



HAL
open science

Polymorphismes du gène de la t-cadhérine (CDH13), récepteur de l'adiponectine, dans les diabètes et leurs complications

Anthony Nicolas

► **To cite this version:**

Anthony Nicolas. Polymorphismes du gène de la t-cadhérine (CDH13), récepteur de l'adiponectine, dans les diabètes et leurs complications. Biologie moléculaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066232 . tel-01589653

HAL Id: tel-01589653

<https://theses.hal.science/tel-01589653v1>

Submitted on 18 Sep 2017

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale 394 : Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Inserm UMRS 1138 / Equipe Roussel - Complications vasculaires du diabète

Polymorphismes du gène de la t-cadhérine (*CDH13*), récepteur de l'adiponectine, dans les diabètes et leurs complications

Par Anthony Nicolas

Thèse de doctorat de Biologie

Dirigée par Frédéric Fumeron

Présentée et soutenue publiquement le 8 septembre 2016

Devant un jury composé de :

Docteur Michèle GUERRE-MILLO

Docteur Aline MEIRHAGHE

Docteur Sophie VISVIKIS-SIEST

Docteur Jean-Philippe BASTARD

Professeur Bruno VERGES

Docteur Frédéric FUMERON

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Je dédie ce travail à mes parents, mes grands-parents et à ma femme Elsa

Remerciements

Je voudrais, tout d'abord, remercier Madame Sophie Visvikis-Siest et Madame Aline Meirhaghe d'avoir accepté de rapporter mon travail. La version finale de ce mémoire a bénéficié de leur lecture très attentive et de leurs remarques précieuses. Je tiens à remercier Madame Michèle Guerre-Millo d'avoir accepté de présider le jury. Je remercie également tous les membres du jury d'avoir accepté d'assister à la présentation de mon travail, particulièrement Monsieur Jean-Philippe Bastard et Monsieur Bruno Vergès.

Je tiens à remercier aussi Ronan Roussel qui m'a accueilli au sein de l'unité de recherche qu'il dirige pour effectuer ce travail.

Je voudrais remercier tout particulièrement Frédéric Fumeron qui m'a fait l'honneur d'accepter de diriger mon travail de recherche tout au long de ces trois années. Il a toujours été disponible, à l'écoute de mes nombreuses questions, et s'est toujours intéressé à l'avancée de mes travaux. Les nombreuses discussions que nous avons eues ainsi que ses conseils sont pour beaucoup dans le résultat final de ce travail. Je le remercie aussi pour le temps passé ensemble et toutes ses qualités humaines. Sa capacité d'analyse et son enthousiasme m'ont montré que le monde de la recherche pouvait être un univers passionnant. Enfin, ses nombreuses relectures et corrections de cette thèse ont été très appréciables. Cette thèse lui doit beaucoup. Pour tout cela merci. Pour sa patience et de m'avoir soutenu dans tous mes projets au cours de ma thèse, et j'en ai fait pas mal.

Je remercie aussi Madame Marianne Abi Fadel, directrice de ma thèse de pharmacie et doyen de la faculté de pharmacie de l'Université Saint-Joseph de Beyrouth pour m'avoir encouragé à continuer dans la voie du doctorat et pour tout son support. Aussi, Madame Jamileh Movassat, directrice du Master NuMéSi à l'université Paris Diderot, pour son soutien et sa bienveillance.

Je remercie aussi tous les seniors de notre équipe Michel Marre, Lise Bankir, François Halenc-Gelas, Gilberto Velho, Nadine Bouby, Kamel Mohammedi, Florence Bordu, Catherine Chollet et Naima Munoz-Bellili qui ont rendu mon expérience de doctorat encore plus riche en commentant mes travaux et en partageant leurs connaissances et expériences, ce qui a aidé à l'aboutissement de ce projet. Je remercie particulièrement Suriya Madani, ancienne doctorante de notre laboratoire, pour son soutien, son suivi et surtout son amitié.

Je voudrais remercier aussi toutes les personnes qui ont accepté de collaborer avec nous et de partager leur expertise, notamment, Soraya Fellahi, Maria Filippova, Muriel Andrieu, Karine Bailly, Jean-Philippe Bastard, Samy Hadjadj et François Guichard.

Je remercie aussi tous les jeunes de notre équipe que j'ai eu la chance de rencontrer et avec qui j'espère garder contact. Merci pour tous ces moments précieux passés ensemble. Merci à mes premiers collègues de bureau à Bichat Amel Lamri et surtout Thiago Patente, qui est aussi un ami, merci beaucoup de m'avoir réservé un fauteuil de bureau exceptionnel qui m'a accompagné le long de ce parcours. Et mes collègues de bureau au centre de recherche des

Remerciements

cordeliers Dorinne Desposito (à suivre...), Louis Potier, Claire Ugazio, Camille Sergeant, Emma Kassassey, c'est grâce à vous que l'ambiance du labo a été excellente et nous avons pu ainsi allier bons moments et séances de travail. Un grand merci aussi à Ray Boustany, Margaux Lafourcade, Ludovic Waekel, Christopher Taveau, Manuel Sanchez, Abdul Moutairou pour la bonne ambiance de travail mais également pour les bons moments passés ensemble. Je n'oublie pas tous les voisins de l'équipe 1, Jonatan, Cristian, Gwennane, Alan, Alessandra, Antoine, Basile, Ernesto, Sebastian, Marise, Soumaya.

Je remercie également tous les copains des Cordeliers, ceux qui ont déjà soutenu et qui sont allés faire des post-docs et rayonner un peu partout dans le monde, et ceux qui sont encore là. Sans eux ce travail aura mieux abouti. Merci pour tous les moments précieux passés ensemble, pour tous les afterworks passés au O'Prince (merci Ronan et Claire d'ailleurs pour toutes les pintes servies), pour toutes les férias, les soirées et festivités. Dorinne, Laurinne, Claire, Laure, Charlotte, Audrey, Emilie, Antoine, Basile, Mathieu, François, Yvan, Riccardo, Guillaume, Thomas, Adrien,

Je voudrais remercier toutes les personnes des différentes activités et formations que j'ai effectué au cours de mon doctorat. Je commence par Dominique Belle de l'ED394, Claire Bordes du DFC, Pascal Ferré, Dominique Laude, Tarik Rerzki et Brigitte Jarrin du CRC. Ensuite, les Jeunes Chercheurs des Cordeliers pour toutes les discussions scientifiques, ou pas, lors des afterworks du jeudi. Tous les membres très nombreux de l'association Doc'Up, association des doctorants de Sorbonne Universités, plus particulièrement, les membres du Bureau 2015 (Charlotte, Clément, François, Romain, Ahmed, Quentin et Guillaume) et les membres des équipes de communication 2015 et 2016 (Marie-Charlotte, Pauline, Sarah, Jean, Olivier, Alexandre, Guillaume). Doc'Up fût une belle expérience d'apprentissage et surtout un premier pas vers la vie associative et professionnelle. Je n'oublie pas l'équipe d'organisation des Journées de l'Ecole Doctorale 2015, mais aussi toute l'équipe BIOTechno, les doctorants rencontrés pendant les Doctoriales 2014, l'école d'été de la League of European Research Universities (LERU) à l'Université d'Oxford et l'école d'été de l'INSEAD en 2015. C'est un énorme plaisir de vous rencontrer et de faire votre connaissance.

Enfin, je tiens à remercier de tout cœur les personnes les plus proches de moi, celles qui sont là depuis très longtemps, c'est la famille. Mon père, Joseph, pour tous les encouragements et le support à tous les niveaux. Ma mère, Gretta, pour son amour inconditionnel et pour être toujours à l'écoute. A mes deux faiblesses, mes sœurs Joyce et Cynthia, je vous dois en quelque sorte ce travail, par votre support et pour avoir essayé d'être le plus souvent à mes côtés, sachez que je vous aime inconditionnellement. A ma deuxième moitié, « ma chère et tendre », à ma femme Elsa, c'est grâce à toi que se termine ce projet en si belle et due forme. Tu étais là pour me soutenir à tout moment, c'est une vraie force de t'avoir à mes côtés, tu remplis ce monde, le mien au moins, d'amour, de bonté et de joie. Et c'est juste royal d'avoir tout ça. Puis, la plus grande famille, mes grands-parents, mon oncle Jean, sa femme Randa et mes cousins Jimmy et Johny, tous mes oncles, tantes, cousins, cousines et amis d'école, de lycée et d'université. J'ai vraiment de la chance d'être si bien entouré.

Je vous remercie tous encore et encore...

Table des matières

Remerciements	1
Table des matières	3
Introduction	5
I. Le Diabète	5
A. Pathogenèse et épidémiologie	5
B. Complications du diabète	6
1. Les macroangiopathies	7
2. Les microangiopathies	8
La rétinopathie.....	9
La neuropathie.....	9
La néphropathie.....	9
C. Facteurs de risque.....	10
II. Adiponectine	13
A. Structure générale.....	13
B. Rôle de l'adiponectine.....	15
C. Récepteurs de l'adiponectine	23
D. Aspects génétiques	24
III. La T-cadhérine	25
A. Organisation et régulation du gène <i>CDH13</i>	27
1. Gène <i>CDH13</i>	27
2. Les éléments régulateurs du promoteur.....	27
B. Structure de la protéine	28
1. La protéine T-cadhérine.....	28
2. Les isoformes de la T-cadhérine et les modifications post-traductionnelles..	29
C. Localisation cellulaire de la T-cadhérine	30
D. La T-cadhérine dans les tissus.....	31
E. Mécanismes de signalisation de la T-cadhérine	34
Buts de l'étude.....	40
Sujets, matériels et méthodes	42
I. Sujets	42
A. La cohorte D.E.S.I.R	42

B. La cohorte DIABHYCAR	43
C. La cohorte SURGENE	45
D. La cohorte GENESIS	46
E. La cohorte GENEDIAB	47
II. Méthodes	52
A. Sélection des polymorphismes	52
B. Génotypage par la méthode KASPAR	53
C. Dosage	56
1. Adiponectine	56
2. T-cadhérine	57
D. Analyses statistiques	59
Présentation des travaux	61
Article 1 : Les polymorphismes du gène de la T-cadhérine (<i>CDH13</i>) sont associés au diabète de type 2 dans la population Française	62
Article 2 : Polymorphismes du gène de la T-cadhérine (<i>CDH13</i>), adiponectinémie et néphropathie dans le diabète de type 1	73
Données complémentaires : Polymorphismes du gène de l'adiponectine (<i>ADIPOQ</i>) et néphropathie dans le diabète de type 1	98
Discussion et perspectives	99
Références	107
Annexes	125
Technique et mise au point du dosage de la T-cadhérine	125
Article : Polymorphismes du gène <i>ABCG8</i> et maladie rénale chez des patients diabétiques de type 2	132
Liste des tableaux	140
Liste des figures	141
Liste des abréviations	142

Introduction

I. Le Diabète

A. Pathogenèse et épidémiologie

Le diabète, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), est une maladie chronique qui apparaît lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou que l'organisme n'utilise pas correctement l'insuline qu'il produit. Cela se traduit par une hyperglycémie, taux élevé de glucose dans le sang [1]. Un sujet est considéré diabétique quand sa glycémie à jeun est supérieure ou égale à 7 mmol/L (1,26 g/L), et supérieure ou égale à 11,1 mmol/L (2 g/L) à n'importe quel moment de la journée.

L'incidence et la prévalence du diabète ne cessent d'augmenter dans le monde. En 2004, on a estimé que la prévalence du diabète dans le monde allait augmenter de 171 millions de diabétiques (2,8%) en 2000 à 366 millions (4,4%) en 2030 [2]. Il semble que l'ampleur de la propagation du diabète est sous-estimée. En 2013, le nombre de diabétiques dans le monde, âgés entre 20 et 79 ans, atteint déjà 382 millions, soit une prévalence de 8,3% (Figure 1). Actuellement la Fédération Internationale du Diabète estime qu'en 2035 le diabète touchera 592 millions de personnes, soit une prévalence qui atteindra 10,1% de la population mondiale [3]. En France, 3,5 millions de personnes seraient traitées pour un diabète, soit 5,3% de la population totale [3].

Il existe deux formes principales de diabète : le diabète de type 1 ou diabète insulino-dépendant et le diabète de type 2 ou diabète non insulino-dépendant.

Le premier est une maladie auto-immune, où l'organisme ne reconnaît plus les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas qui produisent l'insuline, et les détruit. Cette forme du diabète apparaît à un âge précoce, donc chez les enfants, adolescents et jeunes adultes, et représente environ 10% des diabétiques.

Le deuxième apparaît généralement chez les sujets de plus de 40 ans et représente environ 85% des diabétiques. Le diabète de type 2 est multifactoriel, et possède une composante génétique et une composante environnementale. Cette dernière est liée au mode de vie, la nutrition et la classe socio-professionnelle. Ainsi, les personnes sédentaires, avec un excès de poids et/ou à faible revenu, sont plus à risque de développer ce type de diabète de type 2.

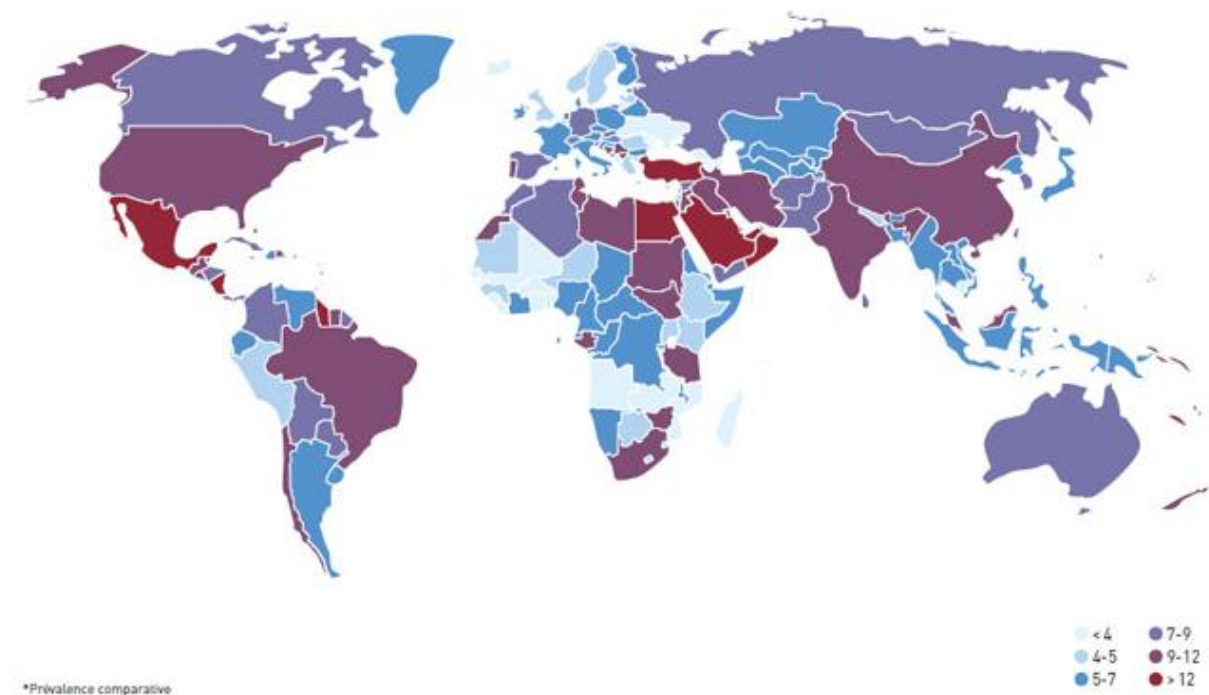


Figure 1. Prévalence* (%) du diabète chez les adultes (20-79 ans) en 2013

Un biomarqueur de surveillance du diabète est l'hémoglobine glyquée A1c (HbA1c). Elle se lie avec le glucose et plus la glycémie est élevée, plus le pourcentage d'HbA1c s'élève. Le résultat de cette mesure donne un aperçu sur la glycémie cumulée durant les deux à trois mois précédents. Un sujet est considéré diabétique quand son taux de HbA1c est supérieur à 6,5%.

Ce biomarqueur est proportionnel au risque de développement de complications du diabète.

B. Complications du diabète

Les complications du diabète s'accompagnent d'une diminution de la qualité de vie du patient et aboutissent souvent à des répercussions fatales. Une régulation de la glycémie, accompagnée d'une amélioration du mode de vie, retardent l'apparition et la progression de ces complications. Les deux types de diabète sont des facteurs de risque importants et indépendants de la maladie coronarienne, de l'accident vasculaire cérébral, et de la maladie artérielle périphérique [4–6]. L'athérosclérose représente pratiquement 80% des causes de décès chez les patients diabétiques [4]. Plus de 75% de toutes les hospitalisations pour complications diabétiques sont attribuables aux maladies cardiovasculaires.

Une exposition prolongée à l'hyperglycémie est un facteur important dans la pathogenèse de l'athérosclérose dans le diabète [7–9]. L'hyperglycémie induit un grand nombre de modifications du tissu vasculaire au niveau cellulaire qui accélèrent le processus potentiellement artérioscléreux. Des études animales et humaines ont élucidé trois mécanismes principaux qui englobent la plupart des altérations pathologiques observées dans la vascularisation diabétique. Tout d'abord, la glycosylation non enzymatique de protéines et de lipides qui peut interférer avec leur fonction normale en perturbant leur conformation moléculaire, modifier l'activité enzymatique, réduire la capacité de dégradation, et interférer avec la reconnaissance de récepteurs ; de ce fait, les protéines glycosylées interagissent avec un récepteur spécifique présent sur toutes les cellules impliquées dans le processus d'athérosclérose, y compris les macrophages dérivés des monocytes, des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses. L'interaction des protéines glycosylées avec leur récepteur conduit à l'induction du stress oxydatif et des réponses pro-inflammatoires. Une altération de l'expression du facteur de croissance conduit enfin à l'activation de la protéine kinase C (PKC). De plus, ces mécanismes peuvent être liés entre eux. Par exemple, le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie favorise à la fois la formation de produits terminaux de glycosylation et l'activation de la PKC [10].

Les complications du diabète sont réparties en deux groupes principaux : les macro- et micro-angiopathies.

1. Les macroangiopathies

Les macroangiopathies sont des maladies liées à une atteinte des grosses artères, causant principalement l'infarctus du myocarde. Le diabète est associé à des dyslipidémies (triglycérides augmentés, HDL-cholestérol diminué, particules LDL petites et denses augmentées) et à l'hypertension artérielle qui vont favoriser aussi la formation des plaques d'athéromes. Le processus athéromateux est initié par une lésion endothéliale, favorisée par l'hypertension artérielle. Celle-ci est suivie par l'adhérence et la migration de monocytes à travers la paroi artérielle lésée. La transformation des monocytes en macrophages puis en cellules spumeuses et les changements accompagnant la matrice environnante et le muscle lisse, conduisent à la formation de la plaque athéromateuse. L'athérosclérose associe l'épaississement de la paroi des grosses artères (aorte abdominale, coronaires, artères cérébrales, artères des membres inférieurs) et leur obstruction par des plaques athéromateuses.

Un certain nombre d'éléments sont susceptibles de favoriser l'apparition ou l'aggravation de l'athérosclérose :

- Habitudes de vie : tabagisme, obésité, stress, sédentarité, contraception orale, alcoolisme ;
- Facteurs génétiques : antécédents familiaux d'accidents cardiovasculaires, sexe masculin, ménopause.

L'infarctus du myocarde se produit lorsque le processus athéromateux empêche l'écoulement sanguin à travers l'artère coronaire [11]. La majorité des cas d'infarctus sont dus à la formation sur la plaque d'un thrombus obstruant. Il y a deux causes majeures de thrombose coronaire : la rupture de la plaque et l'érosion endothéliale. Les ruptures de plaque se produisent préférentiellement lorsque la chape fibreuse est mince et en partie détruite. Au niveau de ces sites, les cellules immunitaires activées sont abondantes. Les macrophages, les lymphocytes T présents au niveau du site de rupture de la plaque produisent plusieurs types de molécules-cytokines inflammatoires, protéases, facteurs de coagulation, radicaux libres et des molécules vasoactives pouvant déstabiliser les lésions. Ils empêchent la formation d'une chape fibreuse stable, attaquent le collagène de la plaque, et initient la formation d'un thrombus. Deux types de protéases ont été impliqués comme des acteurs clés dans l'activation de la plaque : les métalloprotéinases de la matrice (MMPs) et les cystéines protéases. L'activité des MMPs et des cystéines protéases est induite par des cytokines inflammatoires. Le processus inflammatoire dans les artères athérosclérotiques pourrait conduire à des niveaux sanguins augmentés de cytokines inflammatoires et d'autres réactants de phase aiguë. Les niveaux de la protéine C-réactive (CRP) et d'interleukine-6 (IL-6) élevés sont prédictifs de l'infarctus du myocarde [12,13]. Les niveaux d'autres marqueurs inflammatoires sont aussi élevés chez ces patients, incluant le fibrinogène, l'interleukine-7, l'interleukine-8, le ligand CD40 soluble, et la protéine pentraxine apparentée à la CRP [14,15].

2. Les microangiopathies

L'hyperglycémie, la dyslipidémie et l'hypertension qui sont des caractéristiques propres du diabète, sont aussi des acteurs importants de la pathogénèse des complications microvasculaires. Cependant ces complications sont aussi causées par une dysfonction endothéliale qui précède à la fois le développement de plaques dans les artères coronaires et la microangiopathie diabétique [16].

Les microangiopathies sont des maladies liées à l'obstruction de petits vaisseaux de l'organisme. Parmi elles, on distingue les rétinopathies, les neuropathies et les néphropathies.

La rétinopathie

Elle est définie comme un ensemble de troubles non-inflammatoires de la rétine. La rétinopathie est la conséquence d'une hyperglycémie chronique. Chez les sujets diabétiques, cet état se manifeste sous forme de microanévrismes, hémorragies rétiniennes, zones ischémiques, hémorragies vitréennes et peut entraîner la perte de vue. Sa survenue est corrélée à la durée du diabète et au degré d'équilibre glycémique. La rétinopathie menace donc les patients diabétiques après quelques années d'hyperglycémie mal maîtrisée. Le contrôle glycémique prévient ou retarde la rétinopathie : maintenir à long terme un taux correct d'HbA1C (inférieure à 150 % de la normale) met à l'abri des complications microvasculaires dont fait partie la rétinopathie. Dans les pays développés, la rétinopathie diabétique reste la première cause de cécité chez les sujets de 20 à 60 ans. Deux pour cent des diabétiques deviennent aveugles et 10 % deviennent mal voyants. L'hypertension artérielle est un facteur aggravant majeur de la rétinopathie diabétique.

La neuropathie

La neuropathie diabétique est un trouble de la sensibilité épiceritique et profonde, parfois accompagnée de douleurs neuropathiques principalement au niveau des membres inférieurs. Ces troubles de la sensibilité peuvent entraîner un retard de prise en charge de plaies du pied. Le diabétique ne se rendant pas compte qu'il a une blessure, par l'absence de sensibilité douloureuse, la laisse évoluer jusqu'à l'escarre, voire jusqu'à un authentique mal perforant plantaire.

La néphropathie

La néphropathie diabétique se définit comme une glomérulopathie spécifique du diabète, elle expose à deux risques principaux : d'une part l'insuffisance rénale jusqu'au stade ultime terminal nécessitant la dialyse ou la transplantation, d'autre part un pronostic vital beaucoup plus défavorable chez certains diabétiques (décès précoce par coronaropathie surtout) avant même le stade de l'insuffisance rénale terminale.

La néphropathie diabétique, au sens strict du terme, est causée par une élévation de la pression hydrostatique intra-capillaire, provoquée par le diabète mal contrôlé, faisant face aux

résistances glomérulaires constitutives. L'apparition de la néphropathie augmente avec le temps et d'autant plus que le diabète est mal équilibré. Une néphropathie commence par une microalbuminurie, évolue vers une protéinurie franche, puis se termine par une insuffisance rénale. La néphropathie diabétique est l'étiologie la plus fréquente d'insuffisance rénale terminale et sa prévalence ne cesse d'augmenter ces dernières années. Elle représente selon les pays, la cause de l'atteinte rénale de 20 à 45 % des nouveaux patients débutant la dialyse. L'insuffisance rénale à elle seule est responsable de la surmortalité de la population diabétique, les patients sans atteinte rénale ayant une mortalité semblable à celle de la population générale.

La lutte contre ces complications, souvent fatales, se fait par des traitements spécifiques s'ils existent. Un autre moyen de lutter contre les complications du diabète est d'éviter les facteurs de risque.

C. Facteurs de risque

Les facteurs de risque sont des terrains qui favorisent l'apparition et le développement d'une pathologie. Les facteurs de risque du diabète diffèrent selon le type de diabète.

Pour le diabète de type 1, en résumé, ces facteurs se limitent à l'hérédité, où le fait d'avoir un parent atteint augmente le risque de développer ce type de diabète, certaines maladies du foie ainsi que des infections virales.

Le diabète de type 2, dépend aussi de l'héritabilité et d'une multitude d'autres facteurs de nature environnementale. Parmi ces facteurs, certains ne sont pas modifiables comme l'ethnie, l'âge et le sexe, mais d'autres sont modifiables comme le surpoids, le régime alimentaire, l'inactivité physique.

La plupart des facteurs de risque modifiables sont des causes ou des conséquences de l'obésité. À l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. En 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes souffrent de surpoids ($IMC \geq 25$), représentant plus du tiers de la population mondiale ($\approx 39\%$) [17]. Parmi eux, plus de 600 millions seraient obèses ($IMC \geq 30$). Aujourd'hui, la mortalité consécutive au surpoids et à l'obésité est supérieure à celle provoquée par la malnutrition.

La plupart des patients atteints de diabète de type 2 sont obèses, et l'épidémie mondiale d'obésité explique en grande partie l'augmentation spectaculaire de l'incidence et de la

prévalence du diabète de type 2 au cours des dernières années. L'excès de poids est un facteur de risque établi pour le diabète de type 2, mais la plupart des personnes obèses ne développent pas de diabète de type 2. Des études récentes ont identifié des liens entre l'obésité et le diabète de type 2 impliquant la résistance à l'insuline, des cytokines pro-inflammatoires (facteur de nécrose tumorale et l'interleukine-6), le métabolisme des acides gras et les processus cellulaires tels que la dysfonction mitochondriale et le stress du réticulum endoplasmique. Ces interactions sont complexes, avec une importance relative de chacun des facteurs mal définie. Des études génétiques décortiquent aussi les voies physiopathologiques communes à l'obésité et au diabète et identifient à l'échelle nucléotidique des variations constituant des cibles thérapeutiques potentielles et prometteuses.

L'influence de l'obésité sur le risque de diabète de type 2 dépend non seulement du degré d'obésité, mais aussi de l'endroit d'accumulation de la graisse. L'augmentation de la graisse dans la partie supérieure du corps, y compris l'adiposité viscérale, mesurée par une augmentation de la circonférence abdominale ou du rapport taille-hanches, est associée au syndrome métabolique, au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires [18]. Au-delà des différences dans la répartition de la masse grasse, les différents sous-types de tissu adipeux peuvent être fonctionnellement distincts et affecter l'homéostasie du glucose de différentes manières. Les individus adultes ont un nombre limité et variable de cellules de tissu adipeux brun [19], qui jouent un rôle dans la thermogénèse et influence potentiellement la dépense énergétique et l'obésité [20]. De même, le tissu adipeux est constitué de types de cellules hétérogènes. Les cellules immunitaires dans le tissu adipeux contribuent également aux voies métaboliques systémiques.

Sur le plan métabolique, l'obésité est le plus souvent associée à l'insulino-résistance, étape qui précède l'apparition du diabète de type 2. Cette insulino-résistance est liée à l'infiltration des tissus, notamment musculaires, par les lipides en raison d'un flux permanent et accru d'acides gras libres plasmatiques dans ces tissus. Au moins trois mécanismes différents ont été proposés pour lier l'obésité à la résistance à l'insuline et prédisposer au diabète de type 2. Tout d'abord, l'obésité entraîne une production accrue d'adipokines ou de cytokines, comme le facteur de nécrose tumorale- α , la résistine, et le *retinol-binding protein 4*, ainsi que des niveaux réduits d'adiponectine, qui contribuent à la résistance à l'insuline [21]. Des dépôts de graisse ectopique, en particulier dans le foie et peut-être aussi dans le muscle squelettique, entraînent des séquelles dysmétaboliques [22]. Le dysfonctionnement mitochondrial (diminution de masse et/ou de fonction mitochondriales) pourrait être l'un des défauts

importants sous-jacents qui relient l'obésité au diabète, à la fois en réduisant la sensibilité à l'insuline et en compromettant la fonction β -cellulaire [23]. La qualité du dialogue entre le tissu adipeux et le muscle peut donc participer à l'induction ou à la correction du dysfonctionnement mitochondrial et contribuer au déséquilibre métabolique (Figure 2).

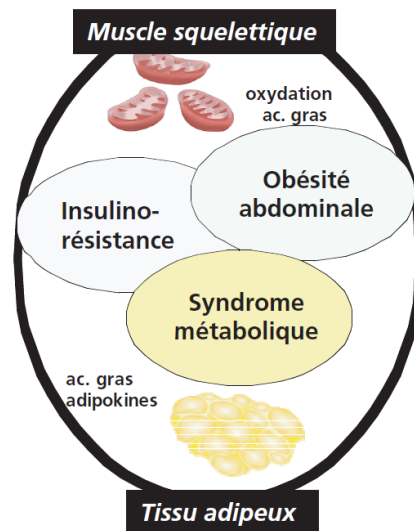


Figure 2. Dialogue adipo-musculaire pour le contrôle du métabolisme des acides gras [24]

Cette figure illustre une certaine communication entre le tissu adipeux et le muscle squelettique.

Le lien entre l'obésité et l'hyperinsulinémie, identifié il y a environ 50 ans [25], reflète la compensation par les cellules β sécrétrices d'insuline à la résistance systémique à l'insuline. Les individus normoglycémiques obèses ont à la fois une augmentation de la masse et de la fonction de cellules β [25–28]. L'intolérance au glucose induite par l'obésité reflète l'incapacité à augmenter un ou plusieurs de ces réponses compensatoires [29]. Les facteurs prédisposant à la décompensation des cellules β pourraient également être principalement génétiques ou épigénétiques. Des études génétiques ont permis d'identifier le rôle de certaines molécules clés dans la biologie des cellules β qui peuvent être importantes à cet égard.

Des études d'association pangénomique (GWAS) et des approches de gènes candidats ont maintenant identifié plus de 80 gènes associés au diabète de type 2 [30–36] et un nombre similaire de gènes, différents pour la plupart, associé à l'obésité [37]. La plupart des gènes du diabète de type 2 semblent être liés à un dysfonctionnement des cellules β , et beaucoup moins sont liés à la résistance à l'insuline indépendamment de l'obésité [38,39]. Il n'est pas surprenant que de nombreux variants du gène de l'obésité soient impliqués dans des voies

affectant l'homéostasie énergétique. Bien que de nombreux gènes associés au diabète et à l'obésité aient été identifiés, ils prédisent seulement 15% du risque de diabète de type 2 et 5% du risque d'obésité [40]. Ce pouvoir prédictif faible peut refléter l'importance des facteurs environnementaux, de variants génétiques rares à effets forts, ou d'interactions gènes-environnement, gène-gène, ou avec l'épigénétique. Ces interactions ne sont pas facilement identifiables par les méthodes de génétique épidémiologique. Des méthodes pour la détection des interactions entre gènes existent, mais la taille de la population nécessaire pour les détecter est encore plus grande que celle requise pour la détection d'effets génétiques simples.

II. Adiponectine

L'adiponectine est une molécule essentielle dans la compréhension des mécanismes régissant les différents acteurs du syndrome métabolique dont l'obésité, l'insulino-résistance, le diabète de type 2 et ses complications. Cette hormone est devenue incontournable pour établir le lien entre ces facteurs.

A. Structure générale

L'adiponectine a été découverte simultanément par quatre groupes de recherche différents, ce qui explique les différents noms qui lui sont attribués : AdipoQ [41], ACRP30 (*Adipocyte Complement-Related protein of 30 kD*) [42], APM1 (*AdiPose Most abundant gene transcript 1*) [43] et GBP28 (*Gelatin-Binding Protein 28*) [44]. L'adiponectine appartient à la famille du complément 1q (C1Q) (figure 3) [45]. Elle forme plusieurs types de multimères circulants comme les trimères (3-plex), ou adiponectine de bas poids moléculaire (LMW), les hexamères (6-plex), ou adiponectine de poids moléculaire moyen (MMW), et aussi des regroupements de ces multimères formant l'adiponectine de haut poids moléculaire (HMW) (12- et 18-plex) [46] (

Figure 3). Les trimères sont formés par l'assemblage de trois monomères au niveau de la partie globulaire. Les isoformes supérieurs sont formés par l'assemblage de plusieurs trimères grâce à des ponts disulfures au niveau de la cystéine 39 dans la partie collagène. La régulation du processus de multimérisation et du rôle biologique des isoformes de l'adiponectine n'est pas tout à fait établie. Cette hormone circule aussi en faible proportion sous forme globulaire (gAdiponectin) obtenu par clivage protéolytique de l'adiponectine [47] (

Figure 4).

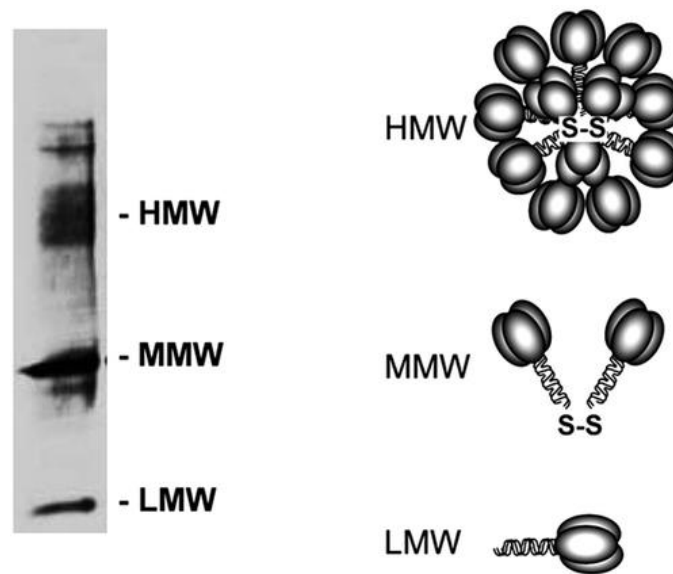


Figure 3 Formation des multimères de l'adiponectine [45]

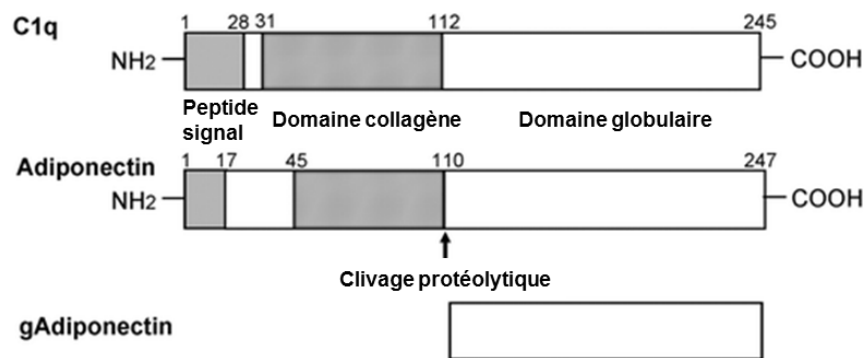


Figure 4. Structure de l'adiponectine [45]

Le gène de l'adiponectine, *ADIPOQ*, est situé sur le chromosome 3q27, il est composé de 3 exons, mesure 15,8 kb de long et code pour une protéine de 244 acides aminés ayant une masse moléculaire de 26 kDa [48]. La région allant de -676 à +41 paraît suffisante pour l'activité transcriptionnelle de base du promoteur. Le gène *ADIPOQ* contient plusieurs sites de liaison à des facteurs de transcription : C/EBP, SREBP, PPAR γ . Ces différents sites de liaison ainsi que les facteurs de transcription correspondants sont représentés dans la Figure 5.

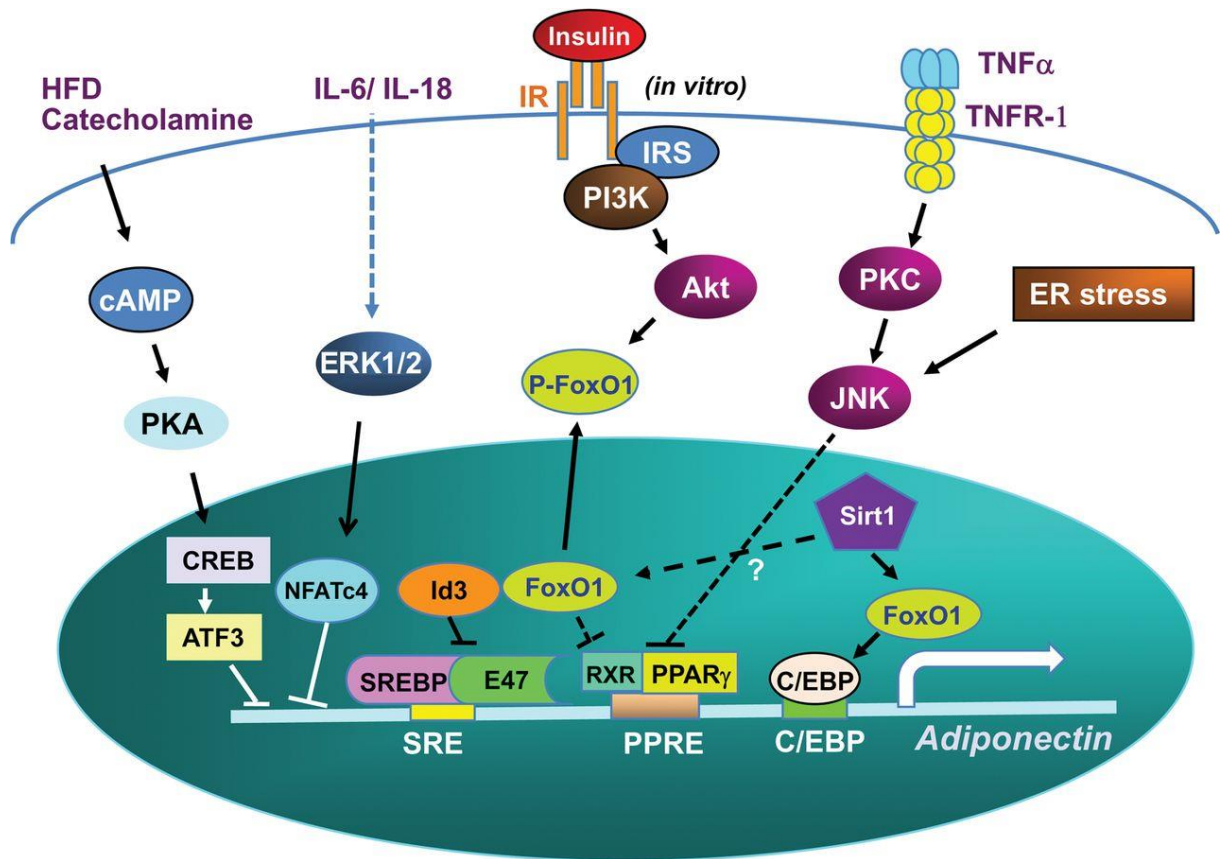


Figure 5. Régulation de la transcription de l'adiponectine par différents signaux d'induction [49].

B. Rôle de l'adiponectine

a. Variations des concentrations d'adiponectine plasmatique

L'adiponectine est abondamment exprimée par le tissu adipeux mais, paradoxalement, les niveaux plasmatiques d'adiponectine sont réduits chez les patients obèses [50], diabétiques de type 2 et les malades coronariens [51–53], trois pathologies étroitement liées à l'insulino-résistance.

Une diminution des concentrations plasmatiques d'adiponectine est associée à une détérioration des différents paramètres du syndrome métabolique [54–56]. Les concentrations d'adiponectine sont négativement corrélées avec les facteurs de risque cardiovasculaires et les marqueurs d'inflammation : pression artérielle, cholestérol total, apolipoprotéines B-100, triglycérides, LDL-cholestérol petites et denses, HbA1c, protéine C réactive, IL-6, PAI-1, tPA, acide urique, fibrinogène, et positivement corrélées au HDL-cholestérol.

Le promoteur du gène de l'adiponectine contient des éléments de réponse pour PPAR γ (PPRE) [49], régulateur clef du métabolisme lipidique et glucidique [57,58] [59]. Ainsi les thiazolidinediones (TZD, ou glitazones), agonistes de PPAR γ , qui améliorent la sensibilité à l'insuline, augmentent l'expression de l'adiponectine. L'expression de l'adiponectine est également sous contrôle des glucocorticoïdes, de la prolactine, de l'hormone de croissance et des catécholamines, via les récepteurs β . Ces hormones ont toutes un impact sur l'insulino-sensibilité.

Plusieurs études indiquent un rôle plus important de l'adiponectine HMW dans la sensibilité à l'insuline [65]. Les niveaux d'adiponectine HMW semblent être régulés négativement par l'insuline. Les TZD augmentent les niveaux circulants de l'adiponectine HMW et le rapport [adiponectine HMW/adiponectine totale]. Ainsi, l'adiponectine HMW, plus que l'adiponectine totale, est corrélée avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline dépendante des TZD [60,61]. Cependant, il existe une très forte corrélation entre l'adiponectine HMW et l'adiponectine totale [62,63]. Ceci suggère que l'adiponectine HMW et l'adiponectine totale pourraient être régulées de manière synchrone. L'adiponectine HMW, comme l'adiponectine totale, est étroitement liée à l'indice de masse corporelle (IMC), aux lipides sanguins, à l'indice HOMA-IR et à la fonction rénale [63].

Le rapport [adiponectine HMW/adiponectine totale] est également plus bas chez les patients ayant une maladie coronarienne que chez les sujets sains [64]. Les hommes diabétiques coronariens ont des concentrations d'adiponectine HMW et un rapport [adiponectine HMW/adiponectine totale] significativement plus bas que celui d'hommes diabétiques non coronariens [63]. Ainsi chez les hommes, l'adiponectine HMW serait plus associée à la maladie coronarienne que l'adiponectine totale et le rapport [adiponectine HMW/adiponectine totale] serait un déterminant indépendant de maladie coronarienne.

Les concentrations d'adiponectine totale sont plus élevées chez les femmes que chez les hommes. La différence dans les concentrations d'adiponectine totale entre les deux sexes pourrait s'expliquer par un effet direct des androgènes sur la synthèse d'adiponectine [58]. La différence entre sexes pour l'adiponectine totale semblerait n'être due qu'à l'adiponectine HMW[57,60], puisque aucune différence n'est décrite, entre sexes, pour les adiponectines LMW et MMW. Des études ont montré que la testostérone réduisait sélectivement l'adiponectine HMW en inhibant sa sécrétion par l'adipocyte, ce qui expliquerait à la fois le dimorphisme sexuel pour les formes oligomériques des complexes, et, le risque plus

important d'insulino-résistance chez les hommes [65,66]. Le dimorphisme sexuel est également retrouvé chez les diabétiques [63].

Alors que des niveaux bas d'adiponectine sont associés au diabète de type 2 et aux maladies cardiovasculaires, l'adiponectine circulante est fortement associée positivement au diabète de type 1. Les facteurs habituels de modification des concentrations d'adiponectine, comme l'insuline plasmatique, l'IMC et le contrôle glycémique, n'influencent pas cette association [67]. Cet effet inverse pourrait être dû à une sensibilité à l'insuline peu affectée et à l'insuline exogène dans le traitement du diabète de type 1. L'effet de l'insuline exogène sur l'adiponectinémie chez les diabétiques de type 1 pourrait être important, compte tenu de doses répétées quotidiennement. En effet, l'administration d'insuline stimule l'expression du gène ADIPOQ dans les adipocytes *in vitro* [68].

Des niveaux élevés d'adiponectine sont aussi observés chez les sujets souffrant de néphropathie diabétique [69–72]: les niveaux d'adiponectine augmentent avec le degré d'atteinte rénale [73,74]. Bien que les niveaux d'adiponectine soient remarquablement élevés chez les patients sous dialyse [75], la corrélation négative entre les niveaux d'adiponectine et l'indice de masse corporelle persiste aussi bien chez les sujets ayant une insuffisance rénale modérée [76], et chez les pré-dialysés que chez les patients dialysés [77,78]. La clairance sérique de l'adiponectine est principalement rénale. Les niveaux de clairance augmentent avec le développement d'une insuffisance rénale chronique et chez ceux subissant une transplantation rénale [78]. L'adiponectine urinaire et l'adiponectinémie sont augmentées chez les patients diabétiques de type 2 ayant une néphropathie à un stade avancé, caractérisée par une macroalbuminurie. Cette observation suggère que la synthèse et la sécrétion de l'adiponectine pourrait en être augmentée en vue de diminuer les dommages microvasculaires chez les diabétiques de type 2 ayant une néphropathie à un stade avancé. L'adiponectinurie est corrélée positivement à l'albuminurie, marqueur de l'atteinte rénale, chez les sujets ayant une macroalbuminurie, alors que cette corrélation n'est pas observée chez les sujets ayant une microalbuminurie.

b. Mécanismes de l'action insulino sensibilisatrice

L'étude des souris transgéniques et invalidées pour le gène de l'adiponectine démontre le rôle fonctionnel de l'adiponectine sur les différents composants du syndrome métabolique,

notamment le diabète de type 2 [70], [71]. Les souris hétérozygotes partiellement déficientes en adiponectine présentent une faible insulino-résistance, alors que les souris homozygotes présentent une insulino-résistance plus importante et une intolérance au glucose [79]. Cette étude apporte la preuve directe que l'adiponectine joue un rôle protecteur, *in vivo*, vis-à-vis de l'insulino-résistance. Chez l'homme ou dans les lignées de cellules humaines, l'adiponectine augmente l'efficacité du signal insulinique, prédit le contenu intra-musculaire et intra-hépatique en triglycérides, diminue la production hépatique de glucose, augmente la capacité d'oxydation des graisses et augmente le captage et l'utilisation du glucose par les graisses [58].

L'adiponectine participe à la réduction des triglycérides tissulaires et à l'induction du signal de l'insuline. Cette action de l'adiponectine résulte de l'activation de PPAR α , un deuxième type de PPARs retrouvé dans le foie, le muscle, le rein et le cœur. Le traitement par l'adiponectine ou sa surexpression montre des niveaux augmentés de l'expression des gènes cibles de PPAR α tels que CD36, acyl-coA oxydase, UCP2 dans le muscle squelettique. Ceci a été observé *in vivo* chez des souris lipoatrophiques KO pour PPAR γ et des souris ob/ob, diabétiques obèses déficientes en leptine [80].

L'activité des ligands endogènes de PPAR α a été mesurée *in vitro* afin de mieux clarifier les mécanismes à la base de l'activation de PPAR α par l'adiponectine [81]. Dans cette étude, le traitement des myocytes avec l'adiponectine pendant 6h augmente significativement l'activité des ligands PPAR α et l'oxydation des acides gras *in vitro*. Le PPAR α augmente également les expressions de la FATP1 (*fatty acid transport protein 1*), de la FAT/CD36 (*fatty acid translocase*), mais également de l'ACS (acyl-CoA synthétase) [82,83] et de la CPT-1 (carnitine palmitoyl acyl transférase-I) [84]. Ces effets entraînent une moindre disponibilité des acides gras (AG) pour la synthèse des triglycérides (TG) et, par conséquent, moins de lipoprotéines riches en triglycérides. Le PPAR α , suite à son activation par l'adiponectine, augmente les expressions des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 de l'adiponectine [85]. L'activité de PPAR α , dans les muscles squelettiques, fait suite à une cascade de phosphorylations impliquant l'*AMP-activated Protein Kinase* (AMPK) [86]. L'AMPK est également une protéine nécessaire aux effets cellulaires et moléculaires de l'adiponectine. Son action est souvent indépendante de PPAR α .

L'AMPK est une enzyme ubiquitaire. Elle existe dans la cellule sous la forme d'un complexe hétérotrimérique avec une sous-unité catalytique (α) et deux sous-unités régulatrices (β , γ).

Plusieurs isoformes ont été identifiées pour chacune des sous-unités ($\alpha 1, \alpha 2, \beta 1, \beta 2, \gamma 1, \gamma 2, \gamma 3$), pouvant conduire à la formation de complexes différents. Les cellules musculaires expriment ainsi des complexes AMPK contenant la sous-unité $\alpha 2$, alors que le foie exprime à la fois les isoformes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ [87].

Le traitement des cellules musculaires avec l'adiponectine pendant une heure stimule l'oxydation des acides gras [88]. Bien que l'actinomycine D supprime l'oxydation des acides gras stimulée par un agoniste de PPAR α , elle n'inhibe pas l'action de l'adiponectine sur cette oxydation. Le traitement par l'adiponectine stimule également l'absorption du glucose par les myocytes. Ainsi, l'adiponectine peut stimuler la bêta-oxydation et l'absorption du glucose par l'intermédiaire de la protéine kinase activée par l'AMP en moins de 6 heures [88]. L'adiponectine globulaire et l'adiponectine entière stimulent la phosphorylation et l'activation de l'AMPK dans les muscles squelettiques, mais seule l'adiponectine entière a cette capacité dans le foie [88]. En parallèle à l'activation de l'AMPK, l'adiponectine stimule la phosphorylation de l'acétyl coenzyme-A carboxylase (ACC), la combustion d'acides gras, l'absorption du glucose et la production du lactate dans les myocytes. Une diminution de l'activité de l'ACC réduit les niveaux intracellulaires de malonyl-CoA et lève l'inhibition de la CPT1, enzyme nécessaire au transport des acides gras dans la mitochondrie, en vue de leur oxydation. Dans le foie, l'adiponectine provoque aussi la réduction des molécules impliquées dans la gluconéogenèse, ce qui montre les effets hypoglycémiantes de l'adiponectine *in vivo*. L'inhibition de l'AMPK inhibe chacun de ces effets, démontrant le fait que la stimulation de l'utilisation du glucose et la combustion des acides gras par l'adiponectine se fait à travers l'activation de l'AMPK. Le groupe de Scherer a aussi montré que dans des souris transgéniques pour l'adiponectine, l'expression réduite des enzymes gluconeogéniques, comme la phosphoenolpyruvate carboxykinase et le glucose-6-phosphatase, était associée à l'élévation de la phosphorylation de l'AMPK dans le foie [89].

La leptine active également l'AMPK dans les muscles squelettiques. L'activation de l'AMPK pourrait être un mécanisme commun par lequel les adipokines comme l'adiponectine et la leptine augmentent la sensibilité à l'insuline [90].

Les différentes formes de l'adiponectine - globulaire, trimérique et à haut poids moléculaire - activent des voies de transduction différentes [91]. Les formes HMW influencent la voie NF-kappa B, alors que la forme trimérique active plutôt la voie AMPK. Pourtant d'autres auteurs évoquent que seule l'adiponectine HMW induit une activation de l'AMPK musculaire [57].

On a parfois émis l'hypothèse que l'adiponectine HMW pourrait représenter un pool de précurseurs qui, après avoir été clivés, donne une forme active, l'adiponectine LMW, responsable des effets sur l'activité de l'AMPK [91]. Cependant, un consensus semble se dégager pour affirmer que l'adiponectine HMW a une activité biologique plus importante que celle de l'adiponectine LMW ou MMW.

L'augmentation du contenu tissulaire en triglycérides interfère avec l'activation de la phosphoinositide-3-kinase (PI3K) par l'insuline, la translocation du transporteur de glucose GLUT-4 et le captage de glucose, le tout menant à l'insulino-résistance [92]. Les effets insulinosensibilisateurs de l'adiponectine résultent, en partie, d'une amélioration de la transduction du signal insulinique *via* une diminution du contenu musculaire et hépatique en triglycérides. L'adiponectine agit en premier lieu sur le muscle squelettique de manière à augmenter l'influx et l'oxydation des acides gras libres, ce qui réduit le contenu musculaire en triglycérides [93]. La baisse des concentrations en triglycérides musculaires et en acides gras libres circulants diminue l'expression de molécules impliquées dans le transport d'acides gras vers le foie. Ceci aboutit ainsi à la diminution des triglycérides hépatiques [93]. En plus de son action sur les niveaux de triglycérides musculaires et hépatiques, l'adiponectine diminue également la néoglucogénèse hépatique [94–97] et augmente le captage et l'utilisation musculaire du glucose [94,98,99]. Ainsi l'adiponectine est-elle une hormone insulinosensibilisatrice dont les effets pléiotropiques aboutissent à diminuer la lipotoxicité, à inhiber la néoglucogénèse hépatique et à favoriser le captage du glucose par les muscles. Les différentes voies de signalisation de l'adiponectine et leur interaction avec le récepteur de l'insuline sont illustrées dans la Figure 6.

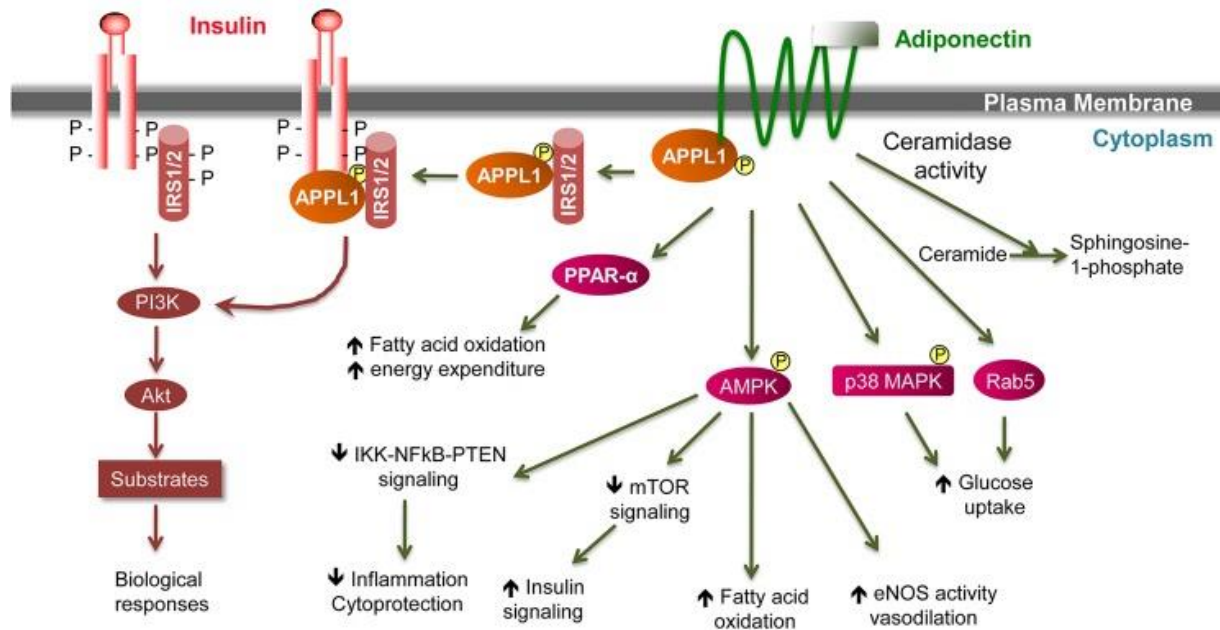


Figure 6. Représentation schématique de la transduction du signal de l'adiponectine impliquant ADIPOR1 et ADIPOR2 et le récepteur de l'insuline [100].

c. Action sur les complications cardiovasculaires

L'adiponectine étant associée à l'insulino-résistance et au diabète de type 2, la question de savoir si cette adipokine pouvait être associée aux maladies cardio-vasculaires, complications du diabète de type 2, a très vite été soulevée. De nombreuses études ont ainsi montré que l'adiponectine avait des propriétés anti-athérogènes [101–103]. Des adiponectinémies basses sont retrouvées chez les patients diabète de type 2 ayant une maladie coronarienne, en comparaison de diabétiques de type 2 contrôlés [51]. Des adiponectinémies basses sont également observées dans les maladies cérébrovasculaires [104], de maladies vasculaires périphériques [52,105,106]. Dans l'étude prospective *Health Professional Follow up Study*, les hommes présents dans les plus hauts quintiles d'adiponectinémie ont un risque significativement plus faible d'infarctus du myocarde [52]. Les facteurs de risque prédictifs de maladies coronariennes comme de longs intervalles QT [107] ou le tabagisme [108] sont associés à une adiponectinémie basse. Les concentrations d'adiponectine et de HDL-cholestérol sont également étroitement corrélées. D'un point de vue moléculaire, des biopsies de graisse épocardique ont révélé que les patients coronariens avaient 40% d'ARNm d'adiponectine en moins que les sujets contrôlés [109].

Outre ces propriétés anti-athérogènes, l'adiponectine présente également des actions anti-hypertrophie myocardique, anti-inflammatoires, anti-apoptotiques et pro-angiogéniques [110–

112]. L'action cardioprotectrice de l'adiponectine est en grande partie due à des effets sur les molécules d'adhésion. L'adiponectine agit par interférence avec la voie de signalisation impliquant NFκB et par inhibition de la production et de la signalisation de TNFα. L'adiponectine, en agissant sur la production de TNFα, réduirait l'expression TNFα dépendante de VCAM-1, d'ICAM-1 et de l'E-sélectine au niveau des cellules endothéliales [53,113,114]. L'E-sélectine, l'ICAM-1 et le VCAM-1 sont des marqueurs des lésions endothéliales ou de leur dysfonctionnement. L'adiponectine réduit aussi la production de TNFα au niveau des cardiomyocytes [111]. Cet effet passerait par la cyclo-oxygénase 2 (COX2).

L'adiponectine agit sur les monocytes/macrophages, les cellules musculaires lisses aortiques et sur l'apoptose des cellules. Au niveau des monocytes/macrophages, il a été montré que sous l'action de l'adiponectine, les monocytes, tout en adhérant aux lésions endothéliales, produisent moins de cytokines inflammatoires, spécialement TNFα [115]. L'adiponectine inhibe l'expression des récepteurs de classe A-1, aboutissant à une décroissance significative du captage des lipoprotéines de faible densité (LDL) par ces cellules et ainsi à la diminution de la formation de cellules spumeuses [116]. La prolifération et la migration des cellules musculaires lisses aortiques, induites par le *Platelet-derived growth factor* (PDGF) sont réduites par l'adiponectine [117]. En effet, l'adiponectine inhibe la liaison du PDGF à son récepteur au niveau de la cellule musculaire lisse aortique et bloque le signal mitogénique induit par le PDGF. L'inhibition de ce signal mitogénique pourrait passer par une réduction de l'activité de la kinase ERK [112]. L'adiponectine favorise la vasodilatation des vaisseaux en stimulant la synthèse du monoxyde d'azote (NO) par l'enzyme Nitric Oxyde Synthase (NOS) endothéliale [118,119], une action améliorant la fonction endothéliale. Elle inhibe l'apoptose des cellules endothéliales dans les grands vaisseaux [64] et des cardiomyocytes [111]. L'activation de l'AMPK serait un des acteurs intervenant dans la suppression de l'apoptose des cellules endothéliales [64]. Bcl2, protéine anti-apoptotique, serait un des autres acteurs [115].

Les propriétés vasculo-protectrices de l'adiponectine pourraient être dues à la forme HMW, qui inhibe l'apoptose de cellules endothéliales en culture [64]. L'adiponectine a été identifiée aussi dans les parois vasculaires lésées de rat, mais pas dans les parois vasculaires intactes. A partir d'études biochimiques *in vitro*, l'adiponectine HMW se lierait spécifiquement au collagène exposé au niveau de l'endothélium lésé de la paroi vasculaire de patients coronariens [63]. Cette liaison résulterait en une diminution de l'adiponectine HMW

circulante. De ce fait, l'adiponectine peut avoir un rôle réparateur à ce niveau, mais aussi, inversement, un rôle dans la formation de la lésion au niveau de l'endothélium.

C. Récepteurs de l'adiponectine

L'adiponectine possède deux récepteurs principaux : AdipoR1, ubiquitaire, mais majoritairement présent au niveau du muscle, et AdipoR2, principalement hépatique. Ces deux récepteurs sont des protéines membranaires de surface avec sept domaines transmembranaires. Leur structure moléculaire est similaire et inversée par rapport aux autres récepteurs couplés aux protéines G, avec un domaine N-terminal interne et un domaine C-terminal externe (Figure 7). Chez l'homme, ils sont exprimés dans le foie, le pancréas, le muscle et le tissu adipeux [120,121]. Dans le muscle, AdipoR1 est un récepteur de haute affinité pour l'adiponectine globulaire et un récepteur de faible affinité pour l'adiponectine monomérique ou multimérique. Dans le foie, AdipoR2 est un récepteur d'affinité moyenne pour les formes globulaire et multimériques. Ces deux récepteurs participent à l'augmentation de l'activité AMPK et PPAR α , l'oxydation des acides gras et la captation du glucose par l'adiponectine [45]. L'expression de ces récepteurs est diminuée chez les sujets obèses [122]. En comparant des souris sauvages (*wild type* : WT) à des souris ob/ob hyperglycémiques et hyperinsulinémiques, l'expression des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 est diminuée significativement dans le muscle et le tissu adipeux de ces dernières [123]. Chez ces souris ob/ob, l'induction de l'activation de l'AMPK par l'adiponectine est aussi réduite, évoquant une résistance à l'adiponectine. Ces souris ne peuvent pas utiliser correctement l'adiponectine. En fait, l'expression réduite des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 jouerait aussi un rôle important dans le développement de l'insulino-résistance, le diabète de type 2, le syndrome métabolique et l'athérosclérose, équivalente à une diminution de la sécrétion et des concentrations circulantes d'adiponectine.

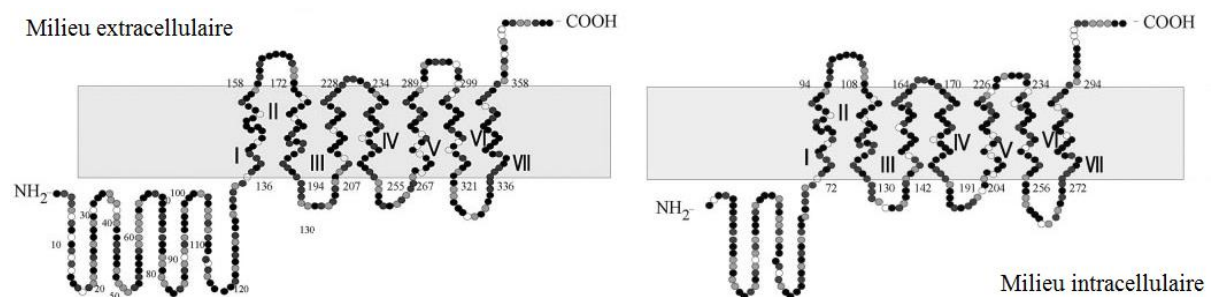


Figure 7. Structure proposée des Récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 de L'adiponectine [121]

L'adiponectine inhibe la formation de plaque d'athérosclérose en inhibant l'expression des récepteurs scavenger SRA1 qui dégradent les lipoprotéines de basse densité (LDL) [124] et en inhibant l'activation de NFκB. Les récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 ne sont pas impliqués dans l'activité de l'adiponectine sur ces voies de signalisation [125].

Un troisième récepteur, isolé par Hug *et al.*, s'exprime fortement au niveau des cellules endothéliales vasculaires et des muscles lisses [126]. Ce dernier pourrait être le récepteur principal de l'adiponectine au niveau vasculaire. La structure de ce récepteur est identique à la T-cadhérine, une cadhérine exceptionnelle, associée à la progression de l'athérosclérose. Le domaine globulaire de l'adiponectine contient un site d'adhésion Ca^{2+} , dépendant de l'Asp 288, qui joue un rôle dans la liaison de la T-cadhérine [127].

D. Aspects génétiques

Selon la base de données HapMap, il existe plus d'une centaine de polymorphismes de substitution d'un seul nucléotide (SNP), au locus *ADIPOQ* formant deux blocs haplotypiques majeurs. Ces deux blocs incluent d'une part la région du promoteur et d'autre part le deuxième intron et le deuxième exon.

Les variants génétiques du gène *ADIPOQ* sont associés aux variations des concentrations d'adiponectine [48,128–131]. Les mécanismes biologiques responsables de ces associations sont mal connus. Certaines associations avec les concentrations d'adiponectine sont observées avec des SNPs localisés dans le promoteur (rs17300539 et rs182052) [132], en relation avec l'activité transcriptionnelle, mais on observe aussi des associations avec des variants situés dans l'autre bloc haplotypique, peut être en relation avec la stabilité de l'ARNm. L'allèle G(45) du rs2241766 est associé à une surexpression en moyenne de l'ARNm du gène de l'adiponectine dans le tissu adipeux [133]. D'autres polymorphismes fonctionnels non étudiés, en déséquilibre de liaison avec les variants connus d'*ADIPOQ*, pourraient expliquer les associations avec les variations de l'adiponectine circulante [48,134].

Les associations des polymorphismes avec les concentrations d'adiponectine varient selon l'origine des populations étudiées. Dans une étude japonaise, les porteurs de l'allèle G(276) du rs1501299 ont des concentrations plus basses d'adiponectine [129], alors que les porteurs italiens de cet allèle ont une adiponectinémie plus élevée [135].

Les variants rs2241766 (45T>G) et rs1501299 (276G>T) et un haplotype défini par ces deux polymorphismes sont associés au diabète de type 2, à l'obésité et à l'insulino-résistance [48]–

[52]. Deux autres SNPs, rs17300539 (-11391G>A) et rs266729 (-11377C>G), sont aussi associés avec le diabète de type 2 et ceci à travers la régulation de l'activité du promoteur [140]. Dans la cohorte Française D.E.S.I.R., les variants G(45) et A(-11391) sont associés à une concentration élevée d'adiponectine et, paradoxalement, à l'incidence de l'hyperglycémie (diabète type 2 ou hyperglycémie à jeûn) [136].

Les études d'épidémiologie génétique effectuées par la méthode de randomisation mendélienne ont montré des résultats contradictoires. Dans l'une, des variants de gènes impliqués dans des variations quantitatives et qualitatives de l'adiponectine influencent le risque de diabète de type 2 et sont associés à la résistance à l'insuline [130]. Dans une autre étude, les variants génétiques du gène de l'adiponectine eux-mêmes n'influencent pas le risque de diabète de type 2, ni celui d'insulino-résistance [141].

Les polymorphismes du gène de l'adiponectine, *ADIPOQ*, ne sont pas les seuls à être associés aux concentrations d'adiponectine. Dans les grandes études pangénomiques, les polymorphismes du gène de la T-cadhérine, *CDH13*, sont parmi ceux le plus constamment et le plus fortement associés à l'adiponectine circulante [130,131,142,143].

III. La T-cadhérine

La T-cadhérine appartient à la famille des cadhérines. Les cadhérines sont des protéines membranaires responsables de l'adhérence cellulaire ; elles assurent ainsi des liaisons intercellulaires au niveau des différents tissus et cela grâce à des liaisons homophiliques Ca^{2+} -dépendantes entre elles. Elles assurent de même un rôle dans la maturation et la signalisation tissulaire. Elles sont classées en cadhérines classiques et non classiques telles que la desmocolline et la desmogléine. Parmi les cadhérines classiques, on cite l'E-cadhérine pour les cellules épithéliales et embryonnaires, la P-cadhérine pour le placenta et les épidermes, la N-cadhérine pour les neurones et les muscles et la VE-cadhérine pour les cellules endothéliales vasculaires. Elles ont en commun leur domaine extracellulaire formé de 5 sous-unités répétitives pouvant lier le calcium et permettre ainsi l'interaction entre les cadhérines et par la suite la liaison cellulaire. De plus, elles sont ancrées dans la membrane par un domaine transmembranaire et possèdent au niveau du cytoplasme un domaine intracellulaire spécifique à chaque type de cadhérine et permettant l'interaction avec différentes protéines ; par exemple, le domaine cytoplasmique de la N-cadhérine peut se lier à la β -caténine, puis à l' α -

caténine, et par la suite au réseau de filaments d'actine, modulant ainsi leurs voies de signalisation [144].

La T-cadhérine constitue une exception. Elle possède un domaine extracellulaire composé de 5 sous-unités comme les cadhérines classiques mais permettant des liaisons homophiliques plus faibles, pouvant être dues au manque de domaine intracellulaire. Cette hypothèse reste à étudier. Les cadhérines classiques se lient entre elles par ces liaisons homophiliques Ca^{2+} -dépendante, afin d'assurer l'adhérence intercellulaire. En fait, la T-cadhérine ne possède pas de domaine cytoplasmique, ni de domaine transmembranaire, et son ancrage à la cellule dépend d'une structure Glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). De ce fait, la T-cadhérine n'intervient pas dans l'adhésion cellulaire mais agit au niveau des voies de signalisation intracellulaires [145] (Figure 8).

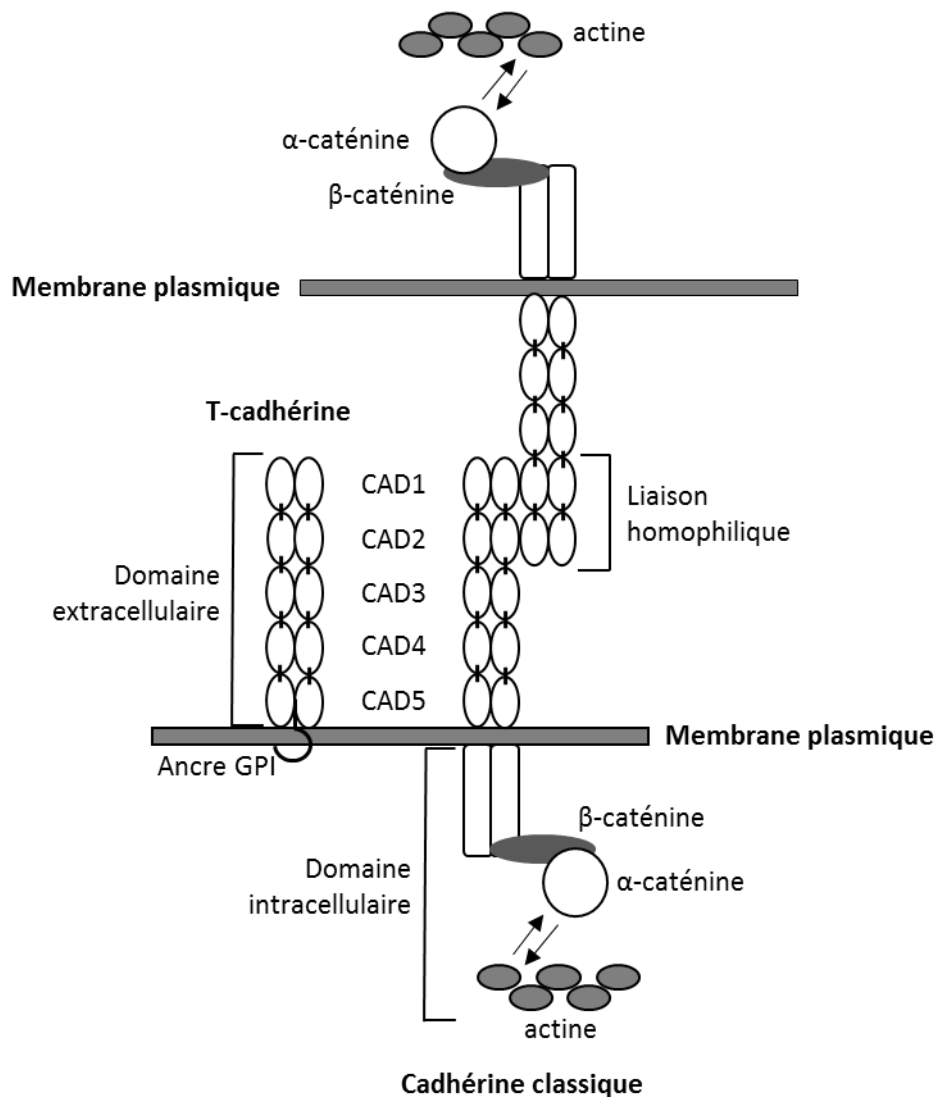


Figure 8. Différences de structure entre les cadhérines classiques et la t-cadherine

A. Organisation et régulation du gène *CDH13*

1. Gène *CDH13*

Le gène de la T-cadhérine (*CDH13*) a été évolutivement conservé et présente une forte homologie avec celui d'autres espèces. La localisation et l'organisation génétique de *CDH13* sont représentées sur la Figure 9. Le gène *CDH13*, chez l'homme, est localisé sur le chromosome 16q24 [146] ainsi que d'autres cadhérines tels que VE-cadhérine, E-cadhérine, P-cadhérine, *CDH8* et *CDH11* [147]. Une telle liaison génétique indique que ces gènes de cadhérines pourraient partager des éléments de régulation. Le gène *CDH13* est constitué de 1 millions de nucléotides environ et contient 14 exons. Son transcrite est traduit en une préprotéine à signal d'ancrage GPI de 713 acides aminés [146,148]. L'organisation du gène de la T-cadhérine ne reflète pas la structure de la protéine qui en résulte ; chaque ectodomaine est codé par deux ou trois exons (Figure 9). Une structure génétique similaire est également observée pour la E-cadhérine et la N-cadherine [149,150], et contraste, par exemple, avec les gènes des protocadhérines où six à sept ectodomains sont codés par un ou deux exons [151]. Le premier et le quatorzième exons du gène *CDH13* sont non traduits. Ce gène possède également un grand intron 2 (173 536 pbs) qui, dans le cas d'autres cadhérines contient des éléments cis régulateurs [149,152].

2. Les éléments régulateurs du promoteur

De même que pour les autres cadhérines, telles que la E-cadhérine, la P-cadhérine et KSP-cadhérine [153–155], le promoteur de *CDH13* ne possède pas de TATA-box. L'extrémité proximale de la région adjacente à 5' contient une CAAT-box à -154 pbs et deux CAAT-box inversées à -179 pbs et -450 pbs, à partir du site de début de la traduction. Un élément GC est situé à -266 pbs. Des études dans divers types cellulaires ont prédit les sites d'initiation de la transcription à -73, -120 et -434 pbs [156,157], ceci pourrait évoquer l'hypothèse de promoteurs alternatifs ou spécifiques au type cellulaire. Certains éléments régulateurs putatifs de contrôle de la transcription de *CDH13* sont représentés dans la Figure 9. Une étude sur les cellules musculaires lisses vasculaires a montré une régulation négative de *CDH13* en réponse à différents facteurs de croissance tels que les facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance épidermique (EGF) ou le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) [158]. Les potentiels sites de liaison pour le récepteur aux œstrogènes, le récepteur des glucocorticoïdes et le récepteur de la progestérone sont probablement situés dans la région 5' du gène *CDH13* et, dans les cellules d'ostéosarcome, divers effets des glucocorticoïdes et des stéroïdes sur la régulation de la T-cadhérine par ont été rapportés

[157]. Un élément de réponse aux androgènes est situé dans le promoteur de *CDH13*, et la suppression de *CDH13* en réponse aux androgènes a été corrélée avec la tumorigenèse de la prostate [159]. À ce jour, une seule étude a démontré une interaction physique directe des éléments régulateurs du promoteur avec un facteur de transcription : dans les cellules cancéreuses de la vésicule biliaire, le régulateur de la transcription, ZEB1, se lie au promoteur de *CDH13* et réprime son activité [160].

Le promoteur de *CDH13* est riche en îlots CpG sujets à la méthylation et donc susceptibles d'entraîner une diminution de l'expression du gène. La régulation négative de *CDH13* se produit à travers au moins trois mécanismes moléculaires: (1) la suppression du locus 16q24, contenant le gène *CDH13* ; (2) la méthylation aberrante du promoteur; (3) la modification des histones.

L'expression de *CDH13* dans les cellules endothéliales est sensible à l'oxydo-réduction. L'induction du gène *CDH13* par le stress oxydatif est inhibée suite au traitement des cellules avec un antioxydant N-acétylcystéine ou avec de l'iodonium diphénylène, un inhibiteur de la NADPH oxydase [161]. Le knock-down de la thioredoxine-1 (Trx-1) médiée par le SiARN inhibe l'élévation de la transcription et des protéines de *CDH13* induite par le stress oxydatif, impliquant ainsi Trx-1 en tant que régulateur important de *CDH13* dans les cellules endothéliales [162].

B. Structure de la protéine

1. La protéine T-cadhérine

L'ADNc de *CDH13* a été initialement cloné à partir d'embryon de cerveau de poulet et appelé T-cadhérine en raison de sa nature tronquée [148]. L'homologue humain de la T-cadhérine de poulet, cadhérine-13 (*CDH13*) a été cloné en premier par Tanihara et al. [163], puis par Lee et al. [146] qui l'a nommé H-cadhérine en raison d'une expression élevée dans le cœur. La séquence d'acides aminés de la T-cadhérine a été bien conservée au cours de l'évolution des vertébrés. La préprotéine de la T-cadhérine se compose de 713 amino acides et comprend un pro-peptide, cinq domaines de cadhérine (domaines EC1-5) et une ancre GPI fixée à l'extrémité carboxyterminale [148].

Le domaine EC1 de la T-cadhérine montre ~38% de similarité de protéine avec celui de la Ecad et ~30% avec celui d'autres cadhérines classiques [148,164].

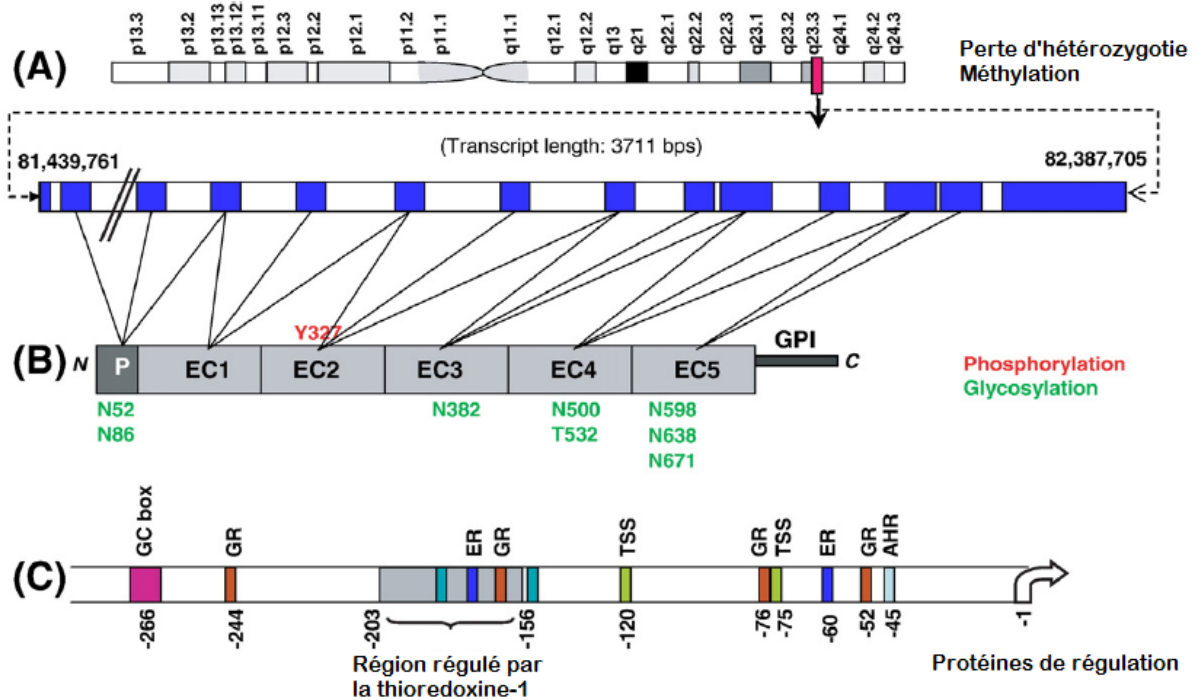


Figure 9. Caractéristiques de structure du gène *CDH13*, de son promoteur et de sa protéine.

(A) Localisation du gène *CDH13* (chromosome 16q24) chez l'homme (carré rouge) et structure du transcrite primaire.

(B) Structure de la protéine : les 5 ectodomains et l'ancrage GPI et les régions de phosphorylation et de N-glycosylation des acides aminés.

(C) La structure du promoteur de *CDH13*

La caractéristique la plus importante qui distingue la T-cadhérine des cadhérines classiques est l'absence de domaines transmembranaires et cytoplasmiques. A la place, la T-cadhérine possède une séquence hydrophobe de 19 acides aminés du côté C-terminal qui sert de signal pour la fixation de l'ancrage GPI [148].

Le domaine EC2 de la T-cadhérine contient un résidu de phosphorylation potentiel, la tyrosine 327, nécessaire à la dégradation de la T-cadhérine par le protéasome. La phosphorylation de la tyrosine pourrait être une étape nécessaire pour l'initiation de l'angiogenèse dans différents tissus [165]. La T-cadhérine est aussi une protéine fortement glycosylée et contient huit sites potentiels de N-glycosylation (deux sur le pro-peptide, un en EC3, deux en EC4 et trois en EC5).

2. Les isoformes de la T-cadhérine et les modifications post-traductionnelles

La taille de la T-cadhérine peut aussi varier. La plupart des études ont détecté plus d'une bande immunoréactive majeure avec les western-blots, avec des tailles comprises entre 45 kDa et 130 kDa. Plusieurs hypothèses sont possibles. Premièrement, certains types de cellules

expriment non seulement la protéine mature de la T-cadhérine sur leur surface, mais aussi un précurseur de la T-cadhérine (propeptide non clivé) [148,158,166]. La fonction du précurseur non clivé n'est pas claire. Pour les cadhérines classiques, le clivage du propeptide est essentiel pour leurs fonctions adhérentes [167]. La conversion du précurseur en protéine mature pourrait être un moyen de régulation de l'activité de la protéine. La présence de bandes variables dans différents tissus suggère l'existence d'isoformes et donc de variants d'épissage. Plusieurs ARNm différents de la T-cadhérine ont été détectés, ce qui pourrait indiquer l'existence d'isoformes et/ou d'épissage alternatif. La seule description détaillée des isoformes protéiques de la T-cadhérine publiée à ce jour est l'étude de Sacristan *et al.* qui a identifié une isoforme de la T-cadhérine, la T-cadhérine 2, dans le cœur, les muscles, le foie, la peau, les somites, et dans le tissu nerveux. Cette isoforme contient une Lysine substituée à la Leucine carboxyterminale et est rallongée par une séquence SerPheProTyrVal [168].

Une autre raison de la variabilité de la taille peut être les modifications post-traductionnelles. La T-cadhérine est fortement glycosylée et, dans de nombreux cas, une glycosylation différentielle de la protéine de la T-cadhérine est responsable de changements du poids moléculaire apparent de la T-cadhérine. Philippova *et al.* observe que le traitement des cellules endothéliales avec la tunicamycine, un inhibiteur de glycosylation, conduit à une diminution concomitante des bandes de 105 et 130 kDa de la T-cadhérine et l'accumulation d'une forme de poids moléculaire de 75 kDa. Cette forme de la T-cadhérine non-glycosylée ne peut pas subir de translocation à la surface cellulaire. La glycosylation pourrait donc jouer un rôle dans le trafic et la régulation de l'expression de la T-cadhérine. Une conséquence de la présence de ces différentes formes de T-cadhérine est que les anticorps commerciaux utilisés dans les différentes études pourraient avoir des spécificités antigéniques différentes et donner ainsi des résultats incohérents.

C. Localisation cellulaire de la T-cadhérine

Contrairement aux autres cadhérines, la T-cadhérine n'est pas localisée au niveau des jonctions adhérentes intercellulaires. Elle se concentre sur les sites de contact intercellulaire dans des agrégats de cellules en suspension plutôt que dans des cultures monocouches, preuve de leur expression élevée pendant les phases de multiplication cellulaire [169].

Au repos, dans les cultures monocouches de différentes cellules (endothéliales, cellules musculaires lisses, lignée de carcinome de la vessie, lignée hépatocellulaire), [170] [171], la T-cadhérine est répartie de manière diffuse sur toute la membrane plasmique avec une

concentration négligeable au niveau des jonctions intercellulaires. Une blessure au niveau de ces monocouches résulte en une redistribution de la T-cadhérine à la surface d'attaque des cellules en migration [170,171], suggérant un rôle dans la régulation du flux migratoire. La présence de l'ancre GPI est responsable de la localisation des protéines dans les radeaux de la membrane plasmique. La T-cadhérine est présente dans les fractions de membrane insolubles, riches en caveoline, des myocytes en culture chez le rat et des cellules endothéliales et musculaires lisses chez l'homme [172,173]. La distribution différentielle de la T-cadhérine dans divers types de cellules pourrait entraîner des effets distincts de la T-cadhérine sur le comportement cellulaire.

D. La T-cadhérine dans les tissus

La T-cadhérine a été découverte au niveau du système nerveux, mais elle est largement distribuée dans l'organisme, avec une expression maximale au niveau du système cardiovasculaire et moindre au niveau des cellules musculaires lisses [148,174].

Système vasculaire

Dans les cellules vasculaires musculaires lisses, deux formes de T-cadhérine, la protéine mature de 105 kDa et son précurseur partiellement transformé de 130 kDa ont été identifiées comme récepteurs membranaires de surface pour lipoprotéines de faible densité (LDL) [158,166,175]. Une analyse immunohistochimique de la distribution de la T-cadhérine dans le tissu vasculaire révèle des niveaux élevés de T-cadhérine dans les cellules endothéliales, les péricytes et les muscles lisses. La T-cadhérine est présente sur les cellules endothéliales dans tous les types de vaisseaux sanguins: artères, veines et capillaires. La coloration de la T-cadhérine dans les cellules musculaires lisses des artères est la plus importante dans la couche subendothéliale de cellules musculaires lisses, puis elle s'affaiblit progressivement vers la couche adventice la plus profonde [174]. Le niveau de T-cadhérine est nettement augmenté dans les lésions artérioscléreuse de l'aorte humaine [174], et lors d'une resténose expérimentale de l'artère carotide chez le rat [176], ce qui suggère une expression associée à un phénotype artérioscléreuse. En culture, l'expression de la T-cadhérine est stimulée dans les cellules vasculaires endothéliales et musculaires lisses apoptotiques et en prolifération [161,177]. Dans les vaisseaux, la T-cadhérine est localisée au niveau de l'intima et de la media ; son expression est augmentée dans la néo-intima suite à une lésion de la carotide chez la souris par un cathéter à ballon [178]. Cette localisation est très similaire à celle de

l'adiponectine qui se lie au collagène exposé suite à une lésion de la paroi du vaisseau et se localise sur le vaisseau lésé.

Les premières expériences de surexpression de la T-cadhérine dans les cultures de cellules musculaires lisses et endothéliales, après une privation de sérum et une inhibition de la réponse au facteur de croissance, suggèrent que la T-cadhérine agirait comme un suppresseur de croissance des cellules vasculaires [158]. Cependant, cette hypothèse a été contredite par des études fonctionnelles ultérieures utilisant des cellules surexprimant ou n'exprimant pas la T-cadhérine. L'utilisation de la protéine de T-cadhérine recombinante ou d'un anticorps agoniste améliore la prolifération, la migration et la survie cellulaires de cellules endothéliales et musculaires lisses, dans des conditions de stress oxydatif [161,177,179]. Dans les cellules endothéliales, des effets pro-migratoires de la T-cadhérine sont accompagnés d'une diminution de l'adhésion de la matrice cellulaire et des changements de la morphologie cellulaire, un réarrangement du cytosquelette d'actine et une redistribution des adhésions focales [179,180].

Ces effets de la T-cadhérine sur le comportement des cellules endothéliales, ainsi que le fait que la T-cadhérine est stimulée dans les cellules endothéliales de néo-vaisseaux des métastases pulmonaires de différentes tumeurs [29] et du carcinome hépatocellulaire [171,181], ont conduit à l'hypothèse d'une implication de la T-cadhérine dans la régulation de l'angiogenèse. En effet, la surexpression de la T-cadhérine favorise l'angiogenèse dans différents modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* [182]. Les propriétés pro-angiogéniques de la T-cadhérine ont été confirmées dans une étude utilisant des souris *knock-out* pour la T-cadhérine (T-cadhérine-KO) [183]. L'implication de la T-cadhérine dans l'angiogenèse tumorale a également été démontrée à l'aide d'une tumeur *in vitro* [184]. Cependant, Tkachuk *et al.* ont rapporté que la T-cadhérine inhibe l'angiogenèse en inhibant la migration des cellules endothéliales [185].

Coeur

La T-cadhérine est exprimée dans les cardiomyocytes [173,186]. La T-cadhérine est abondamment exprimée dans le myocarde et s'associe avec des domaines membranaires riches en cholestérol du sarcolemme cardiaque [173]. On observe une augmentation de la T-cadhérine ainsi que de l'adiponectine à la périphérie de myocytes endommagés chez des patients présentant un infarctus du myocarde et une cardiomyopathie dilatée [187]. Le cœur est le seul organe où la liaison entre l'adiponectine et la T-cadhérine a été étudiée et

confirmée. L'étude d'un modèle d'ischémie/reperfusion du coeur chez des souris KO pour la T-cadhérine montre qu'elle est indispensable à l'effet cardioprotecteur de l'adiponectine [188]. Dans cette étude, une carence en T-cadhérine conduit à une hypertrophie cardiaque exacerbée en cas de surcharge de pression chronique et à des lésions d'ischémie-reperfusion graves et aiguës [188]. La T-cadhérine serait indispensable à l'activation de la voie de signalisation de l'AMPK dépendante de l'adiponectine.

Foie

Dans le tissu hépatique normal, la T-cadhérine n'est pas exprimée sur les hépatocytes [171,181,189]. Cependant, dans des carcinomes hépatocellulaires, une augmentation de l'expression de la T-cadhérine sur les cellules tumorales peut contribuer à des métastases en provoquant la motilité cellulaire. L'administration extracellulaire de T-cadhérine recombinante à des hépatocytes en culture stimule des fonctions hépatocytaires spécifiques telles que la sécrétion d'albumine, la synthèse de l'urée et l'activité du cytochrome P450 1A1 [189]. Le mécanisme d'activation de l'hépatocyte par la T-cadhérine n'est pas clair; les auteurs suggèrent une liaison de la T-cadhérine avec un partenaire encore inconnu à la surface des hépatocytes. Une association entre les niveaux de T-cadhérine et d'adiponectine a été démontrée dans la fibrose du foie [190].

Rein

Au niveau rénal, l'expression de la T-cadhérine a été étudiée par immunohistochimie au cours de la différenciation des glomérules d'un fœtus humain [191]. Elle est impliquée dans la différenciation des podocytes. Au cours du stade précoce de la boucle capillaire, une forte localisation apicale de T-cadhérine est observée sur les cellules épithéliales viscérales de la capsule de Bowman qui commencent à se différencier en podocytes. A un stade plus avancé de la différenciation des néphrons, l'expression de la T-cadhérine survient au cours de la phase terminale de la différenciation des pieds des podocytes. Ces données suggèrent un rôle de la T-cadhérine dans la régulation de la morphogenèse lors de la différenciation des podocytes et la formation du réseau capillaire glomérulaire. Au niveau rénal, l'association entre l'adiponectine et la T-cadhérine pourrait suivre le même processus que celui détaillé plus haut pour le coeur.

Pancréas

La T-cadhérine est impliquée dans la sécrétion de l'insuline [192]. La T-cadhérine est un composant des granules d'insuline des cellules β pancréatiques. La T-cadhérine participe à la deuxième phase de la sécrétion de l'insuline. Au niveau de ces granules d'insuline, l'association entre l'adiponectine et la T-cadhérine n'est pas observée, malgré leur colocalisation au niveau des vaisseaux pancréatiques. Ceci suggère que l'action de la T-cadhérine sur la sécrétion d'insuline est indépendante de l'adiponectine.

E. Mécanismes de signalisation de la T-cadhérine

La T-cadhérine se lie à l'adiponectine, tandis que des protéines transmembranaires encore inconnues, y compris AdipoR1 ou AdipoR2 éventuellement, sont nécessaires pour transmettre le signal de liaison vers les voies de signalisation intracellulaire. Les mécanismes de signalisation activés par la T-cadhérine ne sont pas bien compris. L'absence de domaines transmembranaires et cytoplasmiques implique que le signal induit par la T-cadhérine diffère sensiblement de la signalisation induite par les cadhérines classiques qui dépend de l'interaction physique de leurs parties cytoplasmiques avec les partenaires intercellulaires comme les caténines [147]. Les études des effets de la T-cadhérine sur l'adhésion, la migration, la prolifération et la survie cellulaire, ont identifié plusieurs cibles de signalisation intracellulaire surtout au niveau des cellules endothéliales.

Mécanisme général

Puisque la T-cadhérine manque de domaines transmembranaires et cytoplasmiques qui permettraient une signalisation directe vers l'intérieur de la cellule, il a été proposé l'existence de molécules "adaptatrices" transmembranaires interagissant avec la T-cadhérine à la membrane plasmique. Les protéines liées au GPI, comme la T-cadhérine, sont localisées généralement au niveau du feuillet exoplasmique de la bicouche de la membrane plasmique et résident au sein de microdomaines très dynamiques, riches en stérols et sphingolipides, appelés radeaux lipidiques de la membrane, ou dans les petites invaginations membranaires, les cavéoles, considérées comme un sous-ensemble des radeaux [190]. Les radeaux lipidiques compartimentent les processus cellulaires tels que la transcytose, la potocytose, le captage des toxines, des bactéries et des virus, le transport du cholestérol, l'homéostasie calcique, le tri des protéines et la transduction du signal [191]–[193]. Les radeaux lipidiques contiennent des protéines doublement acylées telles que les tyrosine-kinases et des protéines transmembranaires palmitoylées telles que les récepteurs des facteurs de croissance et les

intégrines. Ces molécules de la membrane des radeaux lipidiques pourraient agir comme des intermédiaires dans la signalisation de la T-cadhérine. Plusieurs protéines susceptibles d'être impliquées dans les voies de signalisation de la T-cadhérine, comme certaines protéines G et certaines kinases, ont été identifiées par des expériences de coprécipitation de lysats cellulaires d'endothélium vasculaire suivi de séquençage des protéines coprécipitées avec la T-cadhérine [112].

Bien que la T-cadhérine permette la liaison de l'adiponectine et l'activation de la voie de signalisation AMPK, il est peu probable qu'elle agisse à la fois comme récepteur et transducteur du signal de liaison aux voies de signalisation intracellulaires. L'ancre GPI de la T-cadhérine exclut les interactions directes avec les adaptateurs de signalisation intracellulaires. La T-cadhérine pourrait s'associer à des protéines transmembranaires qui, à leur tour, s'associeraient à des protéines intracellulaires pour activer les cibles de signalisation de l'adiponectine. Par exemple, la T-cadhérine pourrait activer l'AMPK à travers la voie de l'intégrine. Les niveaux des intégrines sont modulés par la T-cadhérine [180] et l'expression ectopique de la T-cadhérine dans les cellules endothéliales en culture active la voie de signalisation des kinases liées aux intégrines [181]. Par la suite, l'activation des kinases liées aux intégrines est impliquée dans la signalisation AMPK pour protéger le cœur de l'hypertrophie du ventricule gauche [182]. AdipoR1 et AdipoR2 sont d'autres candidats pour s'associer et/ou travailler avec la T-cadhérine puisqu'ils sont activés par l'adiponectine, et agissent en amont de la signalisation AMPK [131].

Signalisation adiponectine-dépendante

Hug *et al.* identifie la T-cadhérine comme le troisième récepteur de l'adiponectine en hexamère et de haut poids moléculaire, mais pas les formes d'adiponectine trimères ou globulaires [126]. De manière générale, la T-cadhérine est indispensable à la séquestration de l'adiponectine et à ses fonctions bénéfiques. Dans des modèles transgéniques de tumeur mammaire, l'inactivation du gène *CDH13* cause une perte de l'association de l'adiponectine au réseau vasculaire de la tumeur et une forte augmentation des taux d'adiponectine sérique [183].

La T-cadhérine exprimée par les cardiomyocytes serait nécessaire pour séquestrer l'adiponectine au niveau cardiaque. La T-cadhérine agit en tant que co-récepteur de l'adiponectine HMW et MMW [188]. De ce fait, la suppression de l'expression de la T-cadhérine chez les souris augmente considérablement les niveaux d'adiponectine dans la

circulation. Le rôle crucial de la T-cadhérine a été souligné par la constatation que des concentrations sériques supraphysiologiques d'adiponectine chez les souris T-cadhérine-KO sont incapables de protéger le cœur. Ces souris hyper-adiponectinémiques ont paradoxalement un phénotype cardiaque similaire à celui de souris adiponectine-KO [188]. Ce phénomène pourrait évoquer la possibilité d'une résistance à l'adiponectine causée par l'absence de la T-cadhérine nécessaire pour la capture tissulaire de l'adiponectine. Cette quantité excessive d'adiponectine ne peut pas activer la signalisation cardiaque de l'AMPK, dépendante de l'adiponectine [179]. Les souris adiponectine-KO sont caractérisées par une faible expression cardiaque de la T-cadhérine. L'administration d'adiponectine recombinante à ces souris abolit le phénotype cardiaque en rétablissant l'expression de la T-cadhérine par les cardiomyocytes à des niveaux physiologiques. Une fois l'association cardiaque rétablie, la signalisation AMPK est réactivée et les lésions cardiaques sont limitées. Le même traitement est inefficace en l'absence de T-cadhérine [179]. Ainsi, la T-cadhérine, exprimée sur la surface des cardiomyocytes, est nécessaire pour la liaison de l'adiponectine et pour permettre ses fonctions cardioprotectrices. Ces résultats suggèrent que le cœur réagit de manière réversible aux niveaux d'adiponectine circulante en régulant les niveaux de T-cadhérine et sont en faveur d'un rôle essentiel de la T-cadhérine dans la localisation cardiaque de l'adiponectine et son activité cardioprotectrice. AdipoR1 et AdipoR2 sont exprimés dans différents organes dont le cœur, et sont donc impliqués dans les fonctions des cardiomyocytes [183], [184]. Contrairement à la T-cadhérine, les niveaux d'expression cardiaque d'AdipoR1 et AdipoR2 sont indépendants des concentrations sériques d'adiponectine et sont identiques chez les souris invalidées pour l'adiponectine et celles invalidées pour la T-cadhérine [179]. L'expression constante d'AdipoR1 et AdipoR2 chez les souris T-cadhérine-KO, combinée à l'absence d'association à l'adiponectine au niveau du cœur, suggère que ces récepteurs sont insuffisants à eux seuls pour permettre la liaison à l'adiponectine et les effets cardioprotecteurs de celle-ci. L'association physique de l'adiponectine avec la T-cadhérine est une condition préalable à l'activité physiologique de l'adiponectine dans le cœur, et suggère qu'une éventuelle fonction des récepteurs AdipoR1/R2 dépend de la liaison de l'adiponectine à la T-cadhérine [179].

Chez des souris invalidées pour AdipoR1 dans le muscle squelettique, l'adiponectine ne parvient pas à réguler le métabolisme musculaire, y compris l'activation de l'AMPK [185]. Comme la T-cadhérine est abondante dans le muscle squelettique et responsable de la liaison

à l'adiponectine, il est concevable qu'une coopération entre T-cadhérine et AdipoR1 permette les fonctions de l'adiponectine dans le muscle squelettique comme dans le muscle cardiaque.

Signalisation vasculaire

Les interactions de la T-cadhérine dans le muscle lisse vasculaire et les cellules endothéliales induisent l'allongement et la polarisation cellulaire, diminuent l'adhérence à la matrice et facilitent la migration cellulaire [177,180]. La surexpression de la T-cadhérine dans les cellules endothéliales a révélé des niveaux plus élevés de phosphorylation de la PI3K dans les voies de survie, et des niveaux inférieurs dans les voies de mort [161]. L'activation de la voie de signalisation PI3K Akt/GSK3 β dépendante de la T-cadhérine protège les cellules endothéliales de l'oxydation et de l'apoptose induite par le stress oxydant. Ces mêmes voies de signalisation sont susceptibles d'être responsables de la croissance des cellules vasculaires dépendante de la T-cadhérine. Dans l'endothélium vasculaire et les cellules musculaires lisses, la T-cadhérine est dynamiquement régulée au cours du cycle cellulaire et son expression active la prolifération [177]. Ainsi, la T-cadhérine pourrait faciliter la progression des troubles vasculaires prolifératifs tels que l'athérosclérose, la resténose et l'angiogenèse tumorale. La contribution de ces voies de signalisation aux effets pro-angiogéniques de la T-cadhérine n'a pas été étudiée en détail. Cependant, *in vivo*, dans un modèle de transfert de gènes dans le muscle squelettique chez la souris, la T-cadhérine favorise la néovascularisation en présence d'un facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) [182]. Ces données suggèrent que la T-cadhérine n'est pas un stimulus angiogénique primaire, mais plutôt un modulateur de l'angiogenèse qui nécessite une déstabilisation initiale du vaisseau par les facteurs de croissance. Une possibilité de communication entre les voies de signalisation de la T-cadhérine et du facteur de croissance des fibroblastes (FGF) [181] suggère une interaction complexe entre plusieurs voies importantes au cours de l'angiogenèse.

Relation avec les LDL

Les lipoprotéines circulant dans le plasma, outre leur rôle dans le transport des lipides, peuvent induire des signaux mitogènes dans de nombreux types cellulaires. La recherche de récepteurs membranaires pouvant servir de médiateur de ces signaux dans les cellules du muscle lisse vasculaire, a permis d'identifier la T-cadhérine comme protéine de liaison des LDL [158,166,175]. La T-cadhérine mature et son précurseur peuvent se lier aux LDL, cette interaction étant dépendante de la présence du fragment GPI dans la molécule de la T-cadhérine [193]. Les interactions T-cadhérine-LDL activent la phospholipase C, l'Erk 1/2

kinase et le NF kappa B dans les cellules endothéliales [194] et favorisent la migration d'une lignée fibroblastique chez la souris [178]. La capacité de la T-cadhérine à lier les lipoprotéines et l'activation consécutive de voies de signalisation dans les cellules vasculaires peuvent jouer un rôle dans la progression de troubles cardiovasculaires tels que l'athérosclérose, caractérisés à la fois par l'hyperlipidémie et une augmentation de l'expression de T-cadhérine [174].

F. Variation génétique de la T-cadhérine, adiponectine circulante et pathologie humaine.

Dans plusieurs études d'association pangénomique (GWAS), les polymorphismes du gène codant pour la T-cadhérine, *CDH13*, sont associés, d'une part, à la variation de la concentration de l'adiponectine [195] et d'autre part, au risque de syndrome métabolique [196] et de maladies cardio-métaboliques [131]. Dans leur association à l'adiponectine circulante, les polymorphismes de *CDH13* sont en première place dans les populations asiatiques et en deuxième place chez les européens, derrière les polymorphismes du gène de l'adiponectine, *ADIPOQ*, lui-même. Dans une étude multi-ethnique, outre leur association avec les concentrations d'adiponectine, les polymorphismes du gène de la T-cadhérine sont associés à l'HbA1c, à la glycémie et l'insulinémie à jeun, et aux scores HOMA-IR et HOMA-B [197]. Dans les populations européennes, l'allèle rare du rs11646213 est associé au développement du syndrome métabolique [198], et à l'hypertension [199]. Dans les populations asiatiques, dans plusieurs études, les polymorphismes du gène *CDH13*, sont associés à la glycémie [143,200], l'insulinémie [200,201], le syndrome métabolique [143,202], le score HOMA-IR [200,201,203], et aussi, aux maladies cardiovasculaires [142], l'infarctus du myocarde [143], au profil lipidique (LDL, HDL et TG) de sujets sains [201,202]. Ces effets sont indépendants de l'effet de l'adiponectinémie sur ces différents phénotypes [200,201]. Paradoxalement, dans une étude, les polymorphismes du gène *CDH13* associés à des concentrations basses d'adiponectine sont aussi associés à une meilleure sensibilité à l'adiponectine [203], ce qui peut s'expliquer par un meilleur captage de celle-ci au niveau cellulaire, entraînant une baisse de la concentration circulante, et une meilleure efficacité.

Les polymorphismes de *CDH13* sont aussi associés à la CRP [202], indice de l'inflammation et à diverses molécules d'adhérence intracellulaire comme les ICAM et la E-sélectine [204],

renforçant l'hypothèse d'un rôle auxiliaire de la T-cadhérine dans la signalisation de l'adiponectine à travers sa liaison à des molécules intracellulaires.

Buts de l'étude

L'adiponectine est une adipocytokine anti-inflammatoire, anti-athérogène et insulino-sensibilisatrice. Ses concentrations plasmatiques sont basses dans le diabète de type 2 et l'obésité, mais élevées dans le diabète de type 1 et la néphropathie diabétique. L'adiponectine circule principalement sous 3 formes. Sa forme HMW est responsable des effets biologiques bénéfiques. L'association des concentrations plasmatiques de l'adiponectine avec le risque de diabète et de ses complications est complexe et pourrait mettre en jeu des récepteurs ou co-récepteurs de l'adiponectine indispensables à son action.

La T-cadhérine est une protéine exprimée principalement dans les systèmes nerveux et cardiovasculaire. Son rôle est mal connu mais elle est impliquée dans le remodelage de la paroi vasculaire et l'angiogénèse. C'est un récepteur pour les formes HMW et MMW de l'adiponectine. De manière répétée, dans les grandes études d'association pangénomique, les polymorphismes du gène codant pour la T-cadhérine, *CDH13*, sont associées aux concentrations d'adiponectine, et parfois au syndrome métabolique et au diabète de type 2. Dans certains modèles, la T-cadhérine est indispensable à l'effet cardioprotecteur de l'adiponectine. Elle est également associée à la différenciation des podocytes et à la sécrétion de l'insuline.

Nous émettons l'hypothèse que des variations dans le gène de la T-cadhérine, associées aux variations de l'adiponectine circulante, seraient impliquées dans l'étiologie du diabète et de ses complications. Le but de notre travail est d'approfondir les relations entre les concentrations d'adiponectine et les variations génétiques du gène *CDH13* modulant ces concentrations, et le risque de diabète et de ses complications.

D'une façon plus spécifique, nous présentons deux études. La première concerne l'association des polymorphismes de *CDH13* à l'adiponectine circulante, au diabète de type 2 et aux phénotypes associés. Les populations étudiées sont une cohorte issue de la population générale Française, D.E.S.I.R., et une cohorte de sujets diabétiques de type 2 DIABHYCAR.

La deuxième étude présente l'association de ces polymorphismes à la néphropathie diabétique dans le diabète de type 1, conjointement à l'adiponectine. Trois cohortes de sujets atteints de diabète de type 1 sont analysées : GENESIS, GENEDIAB, SURGENE.

Dans la suite du manuscrit, nous présenterons d'abord les méthodes. Dans le but de définir si l'effet de l'adiponectine sur la néphropathie dépend des variations de la concentration plasmatique de la T-cadhérine, nous avons mis au point le dosage de la T-cadhérine dans le plasma des sujets atteints, mais les dosages étant en cours, cette mise au point est présentée en annexe. Nous présentons ensuite les différentes études réalisées de manière séparée, puis une discussion générale sur la signification de nos résultats, englobant applications et perspectives de nos travaux.

Sujets, matériels et méthodes

I. Sujets

A. La cohorte D.E.S.I.R

La population D.E.S.I.R (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance) est issue de la population générale Française. Cette étude prospective débutée en 1994, a pour but d'analyser les facteurs favorisant l'apparition du syndrome d'insulino-résistance et des phénotypes associés. Elle regroupe 5212 sujets, âgés de 30 à 64 ans à l'inclusion. Le recrutement s'est fait par sexe et par classe d'âge de 5 ans. Quatre consultations (à l'inclusion puis à 3, 6 et 9 ans) ont permis d'assurer un recueil méthodique des données longitudinales. Tous les sujets ont signé un consentement éclairé. Les caractéristiques de la population D.E.S.I.R. à l'entrée de l'étude sont représentées dans le Tableau 1.

Tableau 1. Caractéristiques de la cohorte D.E.S.I.R. à l'inclusion

N (% d'hommes)	5212 (50%)
Age (ans)	47± 10
IMC (kg/m ²)	24,7±3,8
Tour de taille (cm)	83,4 ± 11,8
Glycémie (mmol/l)	5,36 ± 0,84
HbA1c (%)	5,3 ± 0,5
Insulinémie (pmol/l)	39,8 (27,8-57,3)
Cholestérol total (mmol/l)	5,73±1,02
HDL Cholestérol (mmol/l)	1,62±0,42
LDL Cholestérol (mmol/l)	3,36±1,02
Triglycerides (mmol/l)	0,97 (0,68-1,43)
Pression artérielle diastolique (mm Hg)	80,0±9,7
Pression artérielle systolique (mm Hg)	131,4±15,8

moyenne ± SD ou médiane (interquartile 25%-75%)

Dans la cohorte D.E.S.I.R, la normoglycémie a été définie par une glycémie $<6,1$ mmol/l et le diabète par une glycémie $\geq 7,0$ mmol/l ou un traitement par médicaments antidiabétiques.

B. La cohorte DIABHYCAR

La population DIABHYCAR (DIABetes, Hypertension, microalbuminuria or proteinuria, CARdiovascular events, and Ramipril) est une population de patients diabétiques de type 2, à fort risque cardiovasculaire. Cette étude prospective, randomisée, organisée en double aveugle, avait pour but initial de tester l'effet d'une dose de 1,25 mg/j de Ramipril (inhibiteur de l'enzyme de conversion) sur l'incidence des événements cardiovasculaires et rénaux de 3123 patients diabétiques de type 2, micro-albuminuriques ou protéinuriques (albuminurie ≥ 20 mg/l). Débutée en 1995, elle s'est achevée en mars 2001 et a montré que cette faible dose n'avait pas d'effet protecteur sur les complications cardiovasculaires ou rénales [205]. Le suivi moyen des patients est de 3,9 ans, avec des visites médicales environ tous les six mois. Les patients inclus étaient âgés de 50 ans et plus, sous au moins un antidiabétique oral, avec une créatininémie inférieure ou égale à 150 $\mu\text{mol/L}$ et une albuminurie supérieure ou égale à 20 mg/L. Les patients sous insuline étaient exclus.

Dans cette étude, les différents stades d'albuminurie sont définis :

- Microalbuminurie : $20 \text{ mg/L} \leq \text{albuminurie} < 200 \text{ mg/L}$
- Macroalbuminurie : $200 \text{ mg/L} \leq \text{albuminurie} < 2000 \text{ mg/L}$
- Protéinurie : $\text{albuminurie} \geq 2000 \text{ mg/L}$

Tous les patients ont signé un consentement éclairé. Les caractéristiques biologiques, cliniques et anthropométriques de DIABHYCAR à l'entrée sont données dans le Tableau 2. Les principaux événements vasculaires sont présentés dans le Tableau 3.

L'infarctus du myocarde a été diagnostiqué pour les sujets ayant 2 des 3 caractéristiques suivantes : symptômes typiques et/ou changements à l'électrocardiogramme et/ou enzymes cardiaques élevées. La mort cardiovasculaire au cours de l'étude a été définie comme une mort due à un AVC fatal ou à un infarctus du myocarde fatal ou à une mort subite ou à une insuffisance cardiaque congestive fatale ou à d'autres morts d'origine cardiovasculaire survenues au cours du suivi.

L'événement rénal a été défini comme un doublement de la créatininémie et/ou une insuffisance rénale terminale.

Tableau 2. Caractéristiques de la cohorte DIABHYCAR à l'inclusion

N	3123
Hommes/Femmes	2284/839
Age (ans)	65,6 ± 8,3
IMC (kg/m ²)	29,4 ± 4,6
Glycémie (mmol/L)	9,58 ± 3,07
Cholestérol total (mmol/L)	5,79 ± 1,07
HDL-cholestérol (mmol/L)	1,32 ± 0,36
LDL-cholestérol (mmol/L)	3,53 ± 0,88
Triglycérides (mmol/L)	2,22 ± 1,42
Pression artérielle diastolique (mm Hg)	81,6 ± 8,1
Pression artérielle systolique (mm Hg)	144,3 ± 13,2
HbA1c (%)	7,86 ± 1,76
Statut albuminurique (micro-/macro-/protéinurique)	2390/692/41
Créatininémie (μmol/L)	89,3 ± 20,4
Antécédents d'infarctus du myocarde (%)	5,0

moyenne ± DS pour les variables continues ou en effectif pour les variables discrètes

Tableau 3. Evénements principaux à la fin de l'étude DIABHYCAR

Evénements			
Incidence	Non fatal	Fatal	Total
Accident vasculaire cérébral (AVC)	N = 127	N = 31	N = 158
Infarctus du myocarde (IM)	N = 84	N = 11	N = 95
Insuffisance cardiaque congestive (ICC)	N = 134	N = 2	N = 136
Mort cardiovasculaire			N = 208
Mort toutes causes			N = 456
Doublement de la créatininémie initiale et/ou une insuffisance rénale terminale			N = 77

moynne \pm DS pour les variables continues ou en effectif pour les variables discrètes

C. La cohorte SURGENE

La cohorte SURGENE (*Survival Genetic Nephropathy*) est une étude prospective, monocentrique (Centre hospitalo-universitaire d'Angers) qui a inclus 340 sujets diabétiques de type 1. Les participants ont été sélectionnés sur la base du diagnostic de diabète de type 1 avant l'âge de 40 ans, sans insuffisance rénale terminale et sans autre maladie chronique [206]. Soixante patients avaient une néphropathie diabétique à l'inclusion, soit une prévalence estimée à 17,6 % (10,6 %, 5,3 % et 1,7 % pour la néphropathie diabétique incipiens, établie ou avancée, respectivement). Les caractéristiques cliniques et biologiques des participants en fonction des stades de la néphropathie sont représentées dans le Tableau 4. Les participants avec une néphropathie établie ou avancée, comparés aux sujets sans néphropathie, étaient plus âgés, avaient une durée de diabète plus longue, une pression artérielle plus élevée, une EUA plus importante, une fonction rénale plus altérée et ils prenaient plus souvent un traitement par IEC ou autre antihypertenseur. Par ailleurs, les sujets avec néphropathie incipiens avaient des valeurs intermédiaires de ces paramètres (Tableau 4). La prévalence de la rétinopathie diabétique à l'inclusion était estimée à 38,2% (15,0%, 12,6% et 10,6%, pour la rétinopathie simple, préproliférative et proliférative). La fréquence et la sévérité de la rétinopathie diabétique étaient proportionnelles à la sévérité de la néphropathie (Tableau 4).

La durée moyenne du suivi était 10 ± 3 années (moyenne \pm DS). Les caractéristiques cliniques et biologiques ont été renseignées pour chaque participant en consultation tous les 6 mois pendant les 7 premières années. Un examen ophtalmoscopique du fond d'œil (et une angiographie à la fluorescéine si nécessaire) a été réalisé une fois par an. Des données cliniques, biologiques et ophtalmologiques supplémentaires ont été collectées après une durée moyenne de 10 ans depuis l'inclusion. Parmi les 280 sujets normoalbuminuriques à l'inclusion, 76 patients (27,1%) ont développé un nouveau cas de néphropathie diabétique incipiens (détaillé plus loin) et 98 sujets (28,8%) ont développé un événement rénal (détaillé plus loin) pendant le suivi. Le Tableau 5 montre les caractéristiques des participants à l'inclusion en fonction de l'incidence de la néphropathie incipiens et des événements rénaux au cours du suivi. Les sujets développant une néphropathie incipiens pendant le suivi, comparés aux sujets ayant maintenu une excrétion urinaire d'albumine normale, avaient à l'inclusion une pression artérielle et une EUA plus élevées, et prenaient plus souvent un traitement antihypertenseur. D'autre part, les sujets développant un événement rénal pendant le suivi comparés à ceux maintenant un statut rénal stable, avaient à l'inclusion une durée de diabète plus longue, une HbA1C et une pression artérielle plus élevées, une fonction rénale plus altérée, et prenaient plus souvent un traitement par IEC ou autre traitement antihypertenseur. La rétinopathie diabétique était plus fréquente et plus sévère chez les sujets ayant développé un événement rénal pendant le suivi par rapport à ceux ayant maintenu un statut rénal normal (Tableau 5). A la fin de l'étude, la prévalence de la néphropathie diabétique était estimée à 40,3% (29,4%, 5,0% et 5,9% pour la néphropathie incipiens, établie et avancée, respectivement).

D. La cohorte GENESIS

La cohorte GENESIS (Genesis France-Belgium Study) est une étude familiale, multicentrique (38 centres de diabétologie ou de néphrologie en France et en Belgique), qui a inclus 1195 participants, dont 662 probants diabétiques de type 1, entre novembre 1998 et décembre 2000. Le diabète a été défini par la survenue d'une décompensation diabétique cétosique inaugurale à un âge inférieur à 35 ans et nécessitant un traitement par insuline au plus tard un an après sa découverte. Tous les probants diabétiques avaient une rétinopathie diabétique et 279 sujets (55,7 %) avaient une néphropathie diabétique [207]. Dans le présent travail, nous avons étudié 501 probants diabétiques chez qui des échantillons d'ADN étaient disponibles.

E. La cohorte GENEDIAB

La cohorte GENEDIAB (GENétique de la NEphropathie DIABétique) est une étude transversale, multicentrique, conduite entre mai 1994 et avril 1995, dans 17 centres en France et en Belgique. Dans cette étude, 494 sujets avec un diabète de type 1 ont été inclus sur la base d'un diagnostic de diabète avant l'âge de 35 ans, nécessitant un traitement par insuline dans les douze mois suivant sa découverte. Tous les participants avaient une rétinopathie diabétique proliférative et 310 individus (69,8%) avaient une néphropathie diabétique [208]. Dans le présent travail, nous avons étudié 444 sujets chez qui des échantillons d'ADN étaient disponibles.

Dans le cadre de mon étude, les cohortes GENESIS et GENEDIAB ont été rassemblées afin d'augmenter la puissance statistique. Les caractéristiques des participants des cohortes GENESIS ou GENEDIAB en fonction des stades de néphropathie diabétique sont résumées dans les Tableau 6 et Tableau 7. Dans les deux cohortes, les sujets compliqués de néphropathie établie ou avancée comparés à ceux indemnes de néphropathie avaient une pression artérielle plus élevée, une fonction rénale plus altérée, et prenaient plus souvent un traitement par IEC ou autre antihypertenseur. Dans la cohorte GENESIS, les sujets avec néphropathie avancée avaient une HbA1C plus basse. La fréquence et la sévérité de la rétinopathie diabétique étaient proportionnelles à la sévérité de la néphropathie dans la cohorte GENESIS, mais pas dans la cohorte GENEDIAB, ce qui reflète la différence des critères d'inclusion dans ces 2 cohortes (Tableau 6 et Tableau 7).

Tableau 4. Caractéristiques de la cohorte SURGENE à l'inclusion en fonction des stades de la néphropathie diabétique

	Absence de néphropathie	Néphropathie incipiens	Néphropathie établie	Néphropathie avancée	p
N	280	36	18	6	
Âge (ans)	32 ± 13	36 ± 14	43 ± 14 ^a	49 ± 13 ^a	<0,0001
Sexe : M/F (%)	56 / 44	50 / 50	67 / 33	83 / 17	0,37
Âge au diagnostic du diabète (ans)	19 ± 9	18 ± 10	17 ± 10	23 ± 13	0,71
Durée du diabète (années)	13 ± 11	18 ± 9 ^a	26 ± 9 ^a	27 ± 6 ^a	<0,0001
HbA1C (%)	8,6 ± 1,8	8,8 ± 1,8	8,9 ± 1,7	9,3 ± 1,1	0,52
PAS (mmHg)	123 ± 13	133 ± 15 ^a	156 ± 20 ^{a,b}	153 ± 16 ^{a,b}	<0,0001
PAD (mmHg)	71 ± 9	72 ± 10 ^a	90 ± 11 ^{a,b}	89 ± 6 ^{a,b}	<0,0001
Créatinine plasmatique (µmol/l)	78 ± 15	77 ± 16	105 ± 24 ^{a,b}	206 ± 38 ^{a,b,c}	<0,0001
DFG (ml/min)	99 ± 20	99 ± 31	71 ± 23 ^{a,b}	32 ± 7 ^{a,b,c}	<0,0001
EUA (mg/l)	7 ± 4	67 ± 49 ^a	666 ± 803 ^{a,b}	839 ± 852 ^{a,b}	<0,0001
Traitement par IEC (%)	1	28	72	67	<0,0001
Traitement antihypertenseur (%)	3	36	94	67	<0,0001
Stades de rétinopathie diabétique (%)	69 /16 /10 /5	44 /17 /14 /25	0 /6 /50 /44	0 /0 /33 /67	<0,0001

Résultats exprimés en moyenne ± DS, les analyses statistiques des paramètres quantitatifs ont été réalisées par un test ANOVA. Les paramètres ne suivant pas une distribution normale ont été transformés en log. Le test de Tukey Kramer HSD a été réalisé après l'ANOVA pour déterminer la différence significative ($p < 0,05$) entre les valeurs chez les sujets sans néphropathie (a), avec néphropathie incipiens (b), ou avec néphropathie établie (c). Stades de rétinopathie diabétique : absence, non proliférative, proliférative. PAS : pression artérielle systolique. PAD : pression artérielle diastolique. DFG : débit de filtration glomérulaire. EUA : excrétion urinaire d'albumine. IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion.

Tableau 5. Caractéristiques de la cohorte SURGENE en fonction de l'incidence de la néphropathie diabétique incipiens et des événements rénaux pendant le suivi

	Nouveau cas de néphropathie incipiens			Évènement rénal		
	Non	Oui	p	Non	Oui	p
N	204	76		242	98	
Âge (ans)	32 ± 12	33 ± 14	0,72	33 ± 13	34 ± 13	0,45
Sexe : M/F (%)	54 / 46	62 / 38	0,28	46/54	37/63	0,12
Âge au diagnostic du diabète (ans)	19 ± 9	18 ± 10	0,73	19 ± 10	18 ± 9	0,37
Durée du diabète (années)	13 ± 11	15 ± 10	0,08	14 ± 11	17 ± 11	0,01
HbA1C (%)	8,5 ± 1,8	9,0 ± 1,8	0,02	9,2 ± 2,3	9,8 ± 2,3	0,02
PAS (mmHg)	122 ± 12	127 ± 13	0,006	124 ± 14	133 ± 18	<0,0001
PAD (mmHg)	71 ± 9	72 ± 10	0,006	72 ± 10	75 ± 12	<0,0001
Créatinine plasmatique (µmol/l)	78 ± 15	79 ± 15	0,46	79 ± 20	88 ± 31	0,001
DFG (ml/min)	99 ± 25	98 ± 20	0,91	98 ± 23	91 ± 26	0,009
EUA (mg/l)	6 ± 4	9 ± 5	0,002	38 ± 229	117 ± 345	0,0004
Traitement par IEC (%)	0,5	1,3	0,47	5,8	15,3	0,009
Traitement antihypertenseur (%)	1,0	7,9	0,006	8,3	22,4	0,0008
Stades de rétinopathie diabétique (%)	73/14/8/5	59/20/13/8	0,16	67/14/12/7	48/18/15/19	0,003

Résultats exprimés en moyennes ± DS. Les analyses statistiques des paramètres quantitatifs ont été réalisées par un test ANOVA. Les paramètres ne suivant pas une distribution normale ont été transformés en log. Stades de rétinopathie diabétique : absence, non proliférative, Proliférative. PAS : pression artérielle systolique. PAD : pression artérielle diastolique. DFG : débit de filtration glomérulaire. EUA : excrétion urinaire d'albumine. IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion.

Tableau 6. Caractéristiques de la cohorte GENESIS en fonction des stades de la néphropathie diabétique

	Absence de néphropathie	Néphropathie incipiens	Néphropathie établie	Néphropathie avancée	P
N	222	115	74	90	
Âge (ans)	47 ± 11	44 ± 11 ^a	45 ± 11	46 ± 10	0,04
Sexe : M/F (%)	48 / 52	55 / 45	47 / 53	59 / 41	0,23
Âge au diagnostic du diabète (ans)	17 ± 9	17 ± 8	17 ± 9	16 ± 8	0,78
Durée du diabète (années)	30 ± 9	27 ± 10 ^a	28 ± 9	30 ± 9 ^b	0,0002
HbA1C (%)	8,2 ± 1,3	8,4 ± 1,4	8,5 ± 1,5	7,9 ± 2,1 ^{a,b,c}	0,006
PAS (mmHg)	128 ± 14	129 ± 17	134 ± 18	137 ± 23 ^{a,b}	0,002
PAD (mmHg)	72 ± 8	73 ± 9	75 ± 9	77 ± 12 ^a	0,006
Créatinine plasmatique (µmol/l)	79 ± 17	91 ± 69	124 ± 78 ^{a,b}	262 ± 216 ^{a,b,c}	<0,0001
DFG (ml/min)	89 ± 25	85 ± 24	61 ± 24 ^{a,b}	39 ± 25 ^{a,b,c}	<0,0001
EUA (mg/l)	10 ± 10	59 ± 77 ^a	713 ± 675 ^{a,b}	1789 ± 1769 ^{a,b,c}	<0,0001
Traitement par IEC (%)	26	70	93	64	<0,0001
Traitement antihypertenseur (%)	29	63	87	78	<0,0001
Stades de rétinopathie diabétique (%)	0 / 56 / 15 / 29	0 / 42 / 23 / 35	0 / 23 / 13 / 64	0 / 10 / 13 / 77	< 0,0001

Résultats exprimés en moyenne ± DS. Les analyses statistiques des paramètres quantitatifs ont été réalisées par un test ANOVA. Les paramètres ne suivant pas une distribution normale ont été transformés en log. Le test de Tukey Kramer HSD a été réalisé après l'ANOVA pour déterminer la différence significative ($p < 0,05$) entre les valeurs chez les sujets sans néphropathie (a), avec néphropathie incipiens (b), ou avec néphropathie établie (c). Stades de rétinopathie diabétique : absence, non proliférative, pré-proliférative et proliférative. PAS : pression artérielle systolique. PAD : pression artérielle diastolique. DFG : débit de filtration glomérulaire. EUA : excrétion urinaire d'albumine. IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion.

Tableau 7. Caractéristiques de la cohorte GENEDIAB en fonction des stades de la néphropathie diabétique

	Absence de néphropathie	Néphropathie incipiens	Néphropathie établie	Néphropathie avancée	p
N	134	96	98	116	
Âge (ans)	52 ± 14	49 ± 14	47 ± 13	47 ± 11	0,09
Sexe: M/F (%)	54 / 46	59 / 41	53 / 47	54 / 46	0,71
Âge au diagnostic du diabète (ans)	16 ± 9	17 ± 10	15 ± 8	15 ± 9	0,80
Durée du diabète (années)	36 11	32 ± 10	32 ± 11	32 ± 9	0,06
HbA1C (%)	8,3 ± 1,5	8,6 ± 1,8	8,5 ± 1,7	8,1 ± 1,6	0,17
PAS (mmHg)	132 ± 15	133 ± 18	138 ± 20	143 ± 22 ^{a,b}	0,0001
PAD (mmHg)	75 ± 9	75 ± 11	77 ± 12	80 ± 14 ^{a,b}	0,005
Créatinine plasmatique (µmol/l)	86 ± 18	89 ± 25	121 ± 43 ^{a,b}	275 ± 199 ^{a,b,c}	<0,0001
DFG (ml/min)	81 ± 23	81 ± 24	60 ± 22 ^{a,b}	32 ± 19 ^{a,b,c}	<0,0001
EUA (mg/l)	8 ± 8	46 ± 43 ^a	820 ± 1110 ^{a,b}	1079 ± 1451 ^{a,b}	<0,0001
Traitement par IEC (%)	26	59	71	57	<0,0001
Traitement antihypertenseur (%)	38	69	83	83	<0,0001
Stades de rétinopathie diabétique (%)	0 / 0 / 20 / 80	0 / 0 / 21 / 79	0 / 0 / 22 / 78	0 / 0 / 12 / 88	0,20

Résultats exprimés en moyenne ± DS. Les analyses statistiques des paramètres quantitatifs ont été réalisées par un test ANOVA. Les paramètres ne suivant pas une distribution normale ont été transformés en log. Le test de Tukey Kramer HSD a été réalisé après l'ANOVA pour déterminer la différence significative ($p < 0,05$) entre les valeurs chez les sujets sans néphropathie (a), avec néphropathie incipiens (b), ou avec néphropathie établie (c). Stades de rétinopathie diabétique : absence, non proliférative, pré-proliférative et proliférative. PAS : pression artérielle systolique. PAD : pression artérielle diastolique. DFG : débit de filtration glomérulaire. EUA : excrétion urinaire d'albumine. IEC : inhibiteur de l'enzyme de conversion.

II. Méthodes

A. Sélection des polymorphismes

Le *CDH13*, gène de la T-cadhérine, est constitué de 1,25 Mégabases et contient environ 3700 polymorphismes de type SNP répertoriés dans la base de données dbSNP du NCBI. Il est nécessaire de sélectionner les polymorphismes les plus importants pour notre étude selon plusieurs critères permettant de diminuer le nombre de SNP.

Une sélection des polymorphismes exoniques codants, puis des « tag-SNPs », marqueurs des blocs haplotypiques représentatifs de l'ensemble de la variation génétique (Figure 10) au locus *CDH13*, ramène le nombre de polymorphismes à 770, ce qui est encore bien trop élevé dans une optique de faisabilité par notre laboratoire.

Dans les GWAS, la région du promoteur et du premier intron du gène *CDH13* est la région la plus associée aux variations des concentrations d'adiponectine [131,209,210]. En sélectionnant une partie s'étalant sur 25kb de la région d'intérêt contenant le promoteur et le premier intron, nous aboutissons à 75 SNPs dont 37 à génotyper pour pouvoir couvrir toute cette partie du gène avec un $r^2 \geq 0,8$. Les blocs haplotypiques formés par ces 37 SNPs sont représentés dans la Figure 11.

Afin d'aboutir à un nombre de variants raisonnable à étudier, j'ai cherché les variants cités dans des articles antérieurs pour mieux cibler notre piste de recherche. Au final, j'ai sélectionné 4 SNPs à partir de la littérature, associés aux concentrations d'adiponectine et/ou à des phénotypes métaboliques dans les GWAS. Les caractéristiques de ces polymorphismes sont présentées dans le Tableau 8.

Nom du polymorphisme	Position	Allèles	Fréquence de l'allèle mineur
rs11646213	ch16:82609046	A>T	0,36
rs3865188	ch16:82617112	A>T	0,38
rs12051272	ch16:82629683	G>T	0,01
rs4783244	ch16:82628663	G>T	0,34

Tableau 8. Caractéristiques des polymorphismes du gène *CDH13* sélectionnés.

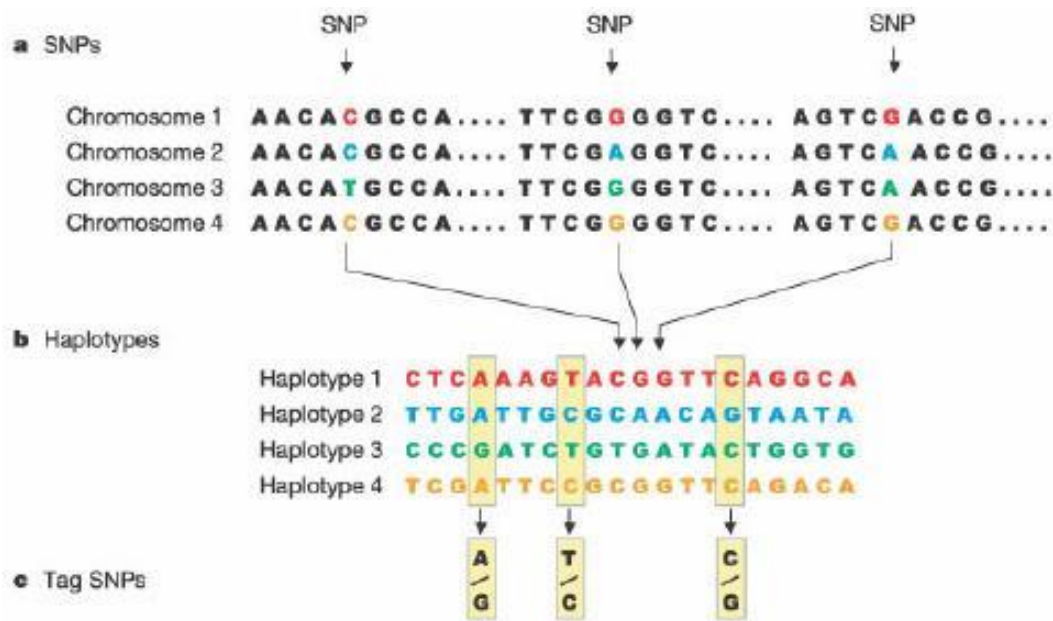


Figure 10. Représentation schématique de la constitution d'haplotypes et de Tag SNP

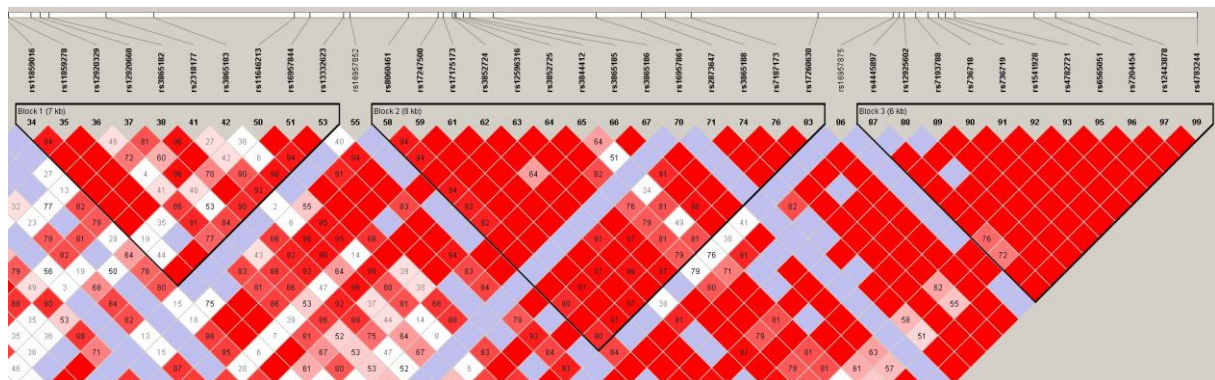


Figure 11. Représentation de blocs haplotypiques pour une séquence de 25Kb du gène CDH13

B. Génotypage par la méthode KASPAR

La méthode KASPAR est proche de la méthode TaqMan. Cette méthode de discrimination allélique repose principalement sur la nécessité d'une complémentarité parfaite entre l'ADN matrice et la région 3' des amorces lors de la réaction de PCR. L'ensemble des étapes est résumé dans la Figure 12.

Trois amorces sont présentes dans le produit réactionnel nommé Master mix de PCR : une amorce anti-sens unique et 2 amorces sens qui diffèrent d'un nucléotide en région 3', celui-ci complémentaire à l'un des deux allèles du SNP d'intérêt. Les deux amorces sens diffèrent

également au niveau de leur région 5', région non complémentaire à l'ADN matrice. Cette extension en 5' est complémentaire à deux autres amorces liées à deux fluorochromes différents. Ces fluorochromes émettent de la fluorescence uniquement lorsqu'ils sont associés à l'ADN en cours d'extension.

La spécificité de la réaction est augmentée en réalisant une «Touchdown» PCR, qui consiste à utiliser une température d'hybridation élevée durant les premiers cycles, température qui sera graduellement abaissée jusqu'à atteindre la température idéale d'hybridation après une dizaine de cycles.

La lecture se fait en point final et à froid. Le type de profil obtenu est similaire à celui observé avec la méthode Taqman (Figure 13).

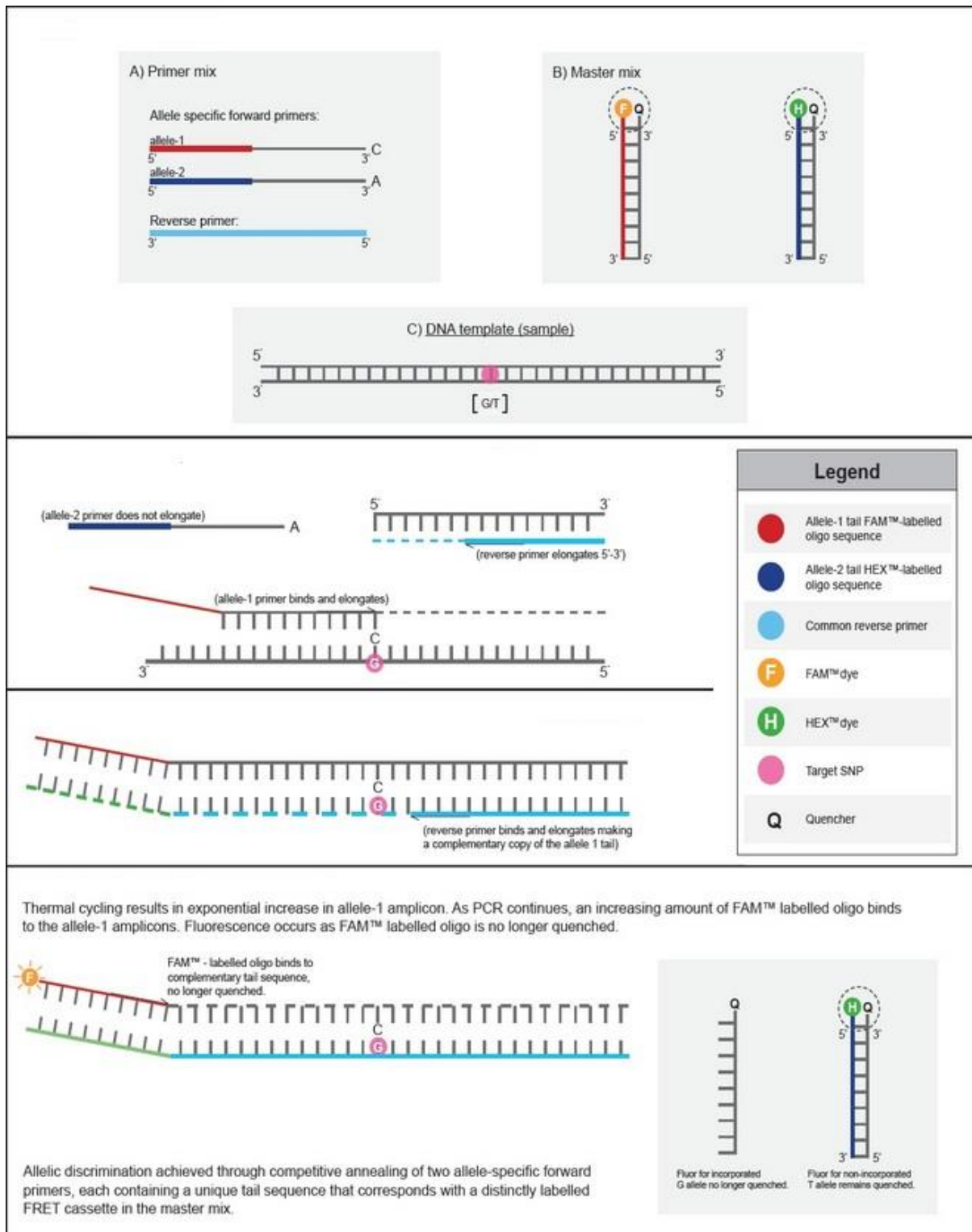


Figure 12. Principe de la technique kasp

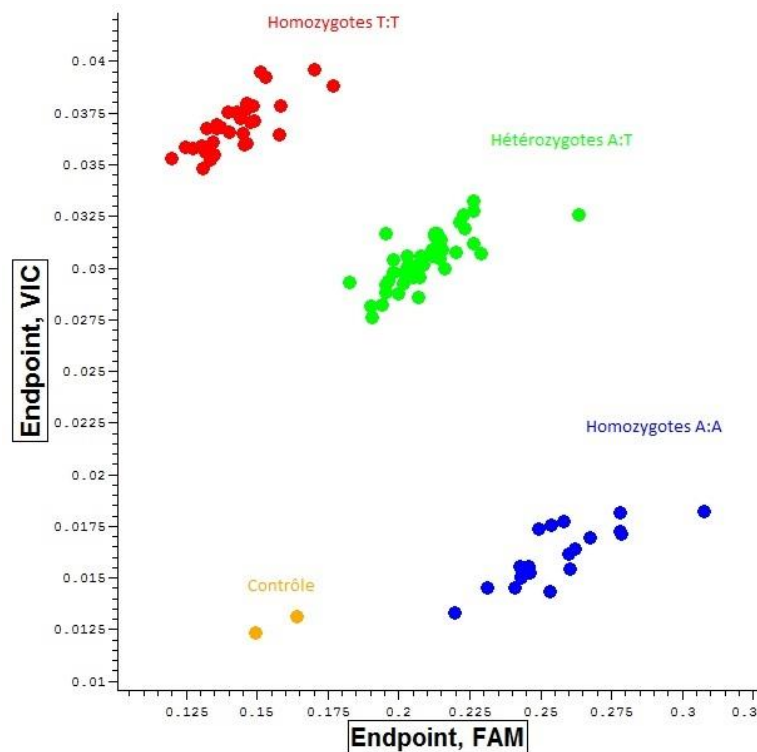


Figure 13. Exemple de profil obtenu pour un génotypage par KASPAR. Génotypage réalisé sur 94 individus de la cohorte DIABHYCAR pour le rs11646213 de CDH13

C. Dosage

1. Adiponectine

L'adiponectine totale a été dosée dans le plasma des sujets des cohortes GENESIS et GENEDIAB (N=1002) par la méthode immuno-enzymatique ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) kit Alpc[®] 47-ADPHUT-E01. Ce dosage est effectué en collaboration avec le Service de Biochimie et Hormonologie de l'hôpital Tenon à Paris.

Le principe du dosage est illustré dans la Figure 14. Ce kit opère sur le principe du Sandwich ELISA qui utilise deux types d'anticorps monoclonaux anti-adiponectine humaine (MoAbs). Tout d'abord, les échantillons sont traités par un tampon acide contenant du sodium-dodécyl-sulfate (SDS) pour convertir les multimères d'adiponectine en une forme dimère. Les 96 puits de la plaque sont recouverts avec de l'anti-adiponectine humaine MoAb. La solution standard et les échantillons pré-traités sont captés par l'anticorps pendant la première incubation. Après cette première incubation suivie par un lavage pour enlever les produits non fixés, le MoAb marqué à la biotine est ajouté. Après la deuxième incubation et les lavages éventuels, la streptavidine marquée à la peroxydase de raifort (HRP) est ajoutée. Après la troisième incubation et les lavages éventuels, la solution substrat est ajoutée. Par la suite, le réactif

« stop » est ajouté. L'intensité de la couleur développée est lue par un lecteur de microplaque. L'absorbance est proportionnelle à la concentration d'adiponectine dans l'échantillon. Dans ce kit, le sérum humain normal pré-traité par le tampon de pré-traitement est utilisé comme calibrateur.

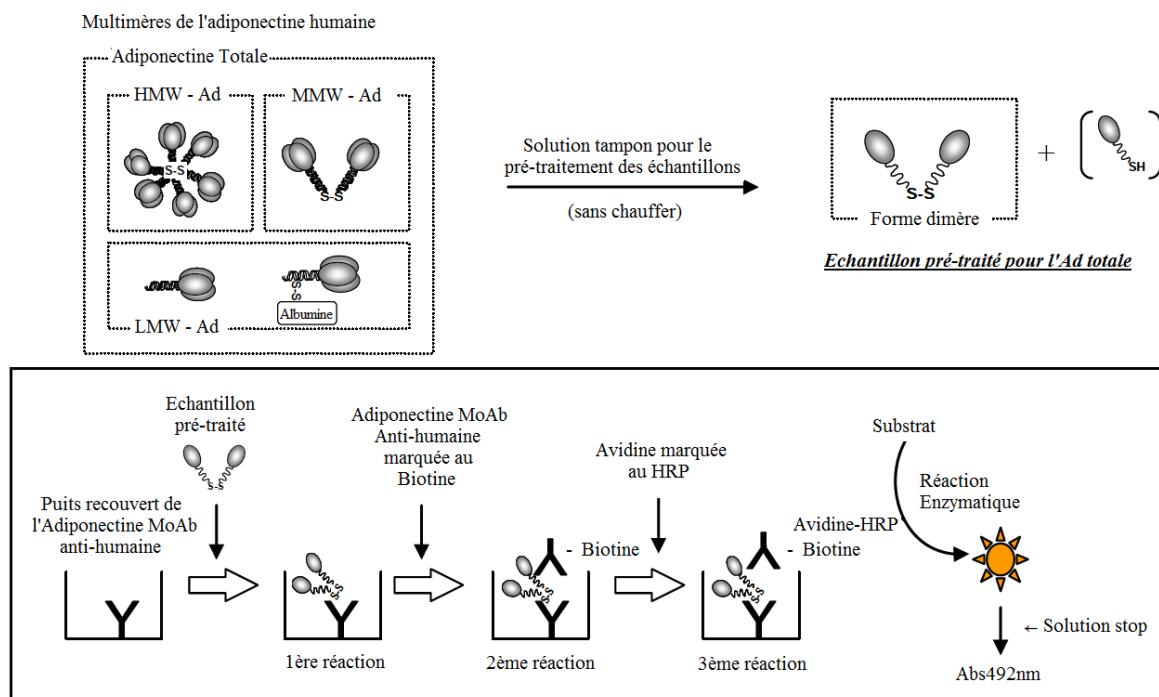


Figure 14. Principe de dosage de l'adiponectine totale humaine selon le kit 47-ADPHUT-E01

2. T-cadhérine

La T-cadhérine, n'étant pas une protéine circulante, nous dosons la portion de T-cadhérine attachée aux produits de dégradation de la membrane. Nous avons choisi d'utiliser une technique ELISA double sandwich sur la plateforme MSD utilisant la technologie d'électrochimiluminescence. Cette technique a été décrite par Philippova *et al.* qui a dosé la T-cadhérine chez des patients atteints de syndrome coronaire aigu. La T-cadhérine a été dosée dans le plasma des patients diabétiques de type 1 des cohortes GENESIS et GENEDIAB (N=1002). Les problèmes de mise au point du dosage détaillés dans l'annexe à la fin de ce manuscrit et maintenant résolus, expliquent que les résultats ne sont pas encore disponibles au moment de la thèse.

On commence par fixer au fond des puits l'anticorps anti-T-cadhérine, dit anticorps de revêtement ou primaire. Puis, on ajoute une solution qui permet de s'assurer que l'anticorps primaire est bien fixé au fond du puit (« blocking solution »). On ajoute par la suite les

échantillons de plasma et la gamme. La T-cadhérine se fixe alors à l'anticorps primaire déjà fixé au fond des puits. Ensuite, on ajoute un anticorps de capture, dit secondaire, marqué par une étiquette Sulfo «tag», permettant une détection du complexe anticorps/antigène/anticorps d'une manière plus spécifique. Enfin, on ajoute le tampon de lecture, qui permettra lors de la lecture de mettre en évidence le complexe coloré entre les anticorps et l'antigène.

La technique de détection est différente de celle utilisée habituellement. On utilise ici, une technique d'électro-chimio-luminescence. Les plaques utilisées possèdent dans le fond des puits des électrodes qui, lors de la lecture, vont être excitées par l'arrivée d'un courant électrique. Ce courant déclenche la réaction enzymatique. Une caméra installée au-dessus de la plaque prend les puits en photo quand la réaction enzymatique est terminée. Les différentes réactions enzymatiques ayant lieu lors de la détection sont présentées dans la Figure 15.

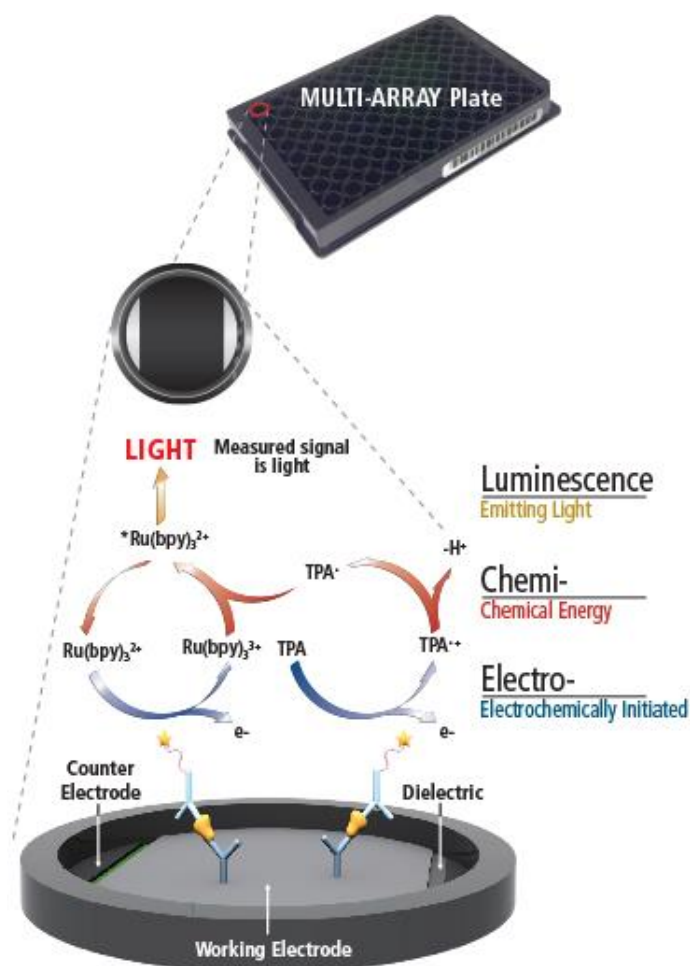


Figure 15. Réactions Redox spécifiques à la technique de détection par électrochimiluminescence de Meso Scale Discovery.

D. Analyses statistiques

La loi de Hardy-Weinberg a été vérifiée par le test du khi-2 à un degré de liberté, en comparant les effectifs génotypiques théoriques par rapport aux effectifs génotypiques observés dans chaque cohorte. Les distributions des fréquences alléliques et génotypiques des différents polymorphismes étaient bien en équilibre de Hardy-Weinberg dans les trois cohortes. Les résultats des variables quantitatives sont exprimés en moyenne \pm déviation standard (DS) et dans certains cas en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (ESM). Les variables ne suivant pas la loi normale et qui étaient rejetées par le test W de Shapiro-Wilk (HbA1C, EUA, concentration de la créatinine, DFG...etc.) ont été transformées en logarithme. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel JMP (SAS Institute Inc., Carey, NC, USA).

La puissance statistique a été estimée à l'aide du programme "Interactive Statistical Calculation"(<http://biostat.hitchcock.org/>) [211].

Les comparaisons des traits phénotypiques catégoriels entre génotypes ont été effectuées par le test de khi-2 ou le test exact de Fisher. Des modèles de régression logistique ont permis de tester l'association des génotypes avec les variables catégorielles à deux classes (maladies). L'analyse de survie par le modèle de Cox a permis de tester l'effet des génotypes sur l'incidence d'un événement durant le suivi dans les cohortes prospectives. Dans ce modèle d'analyse de survie, nous avons pris en compte la durée de suivi depuis l'entrée dans l'étude jusqu'à la survenue de l'événement. Les courbes de Kaplan-Meier ont été utilisées pour visualiser la survie en fonction des génotypes durant le suivi. Les résultats sont exprimés soit par un Odds-Ratio (régression logistique) ou par un Hazards-Ratio (modèle de Cox), par rapport à l'allèle rare ou l'allèle à risque avec leurs intervalles de confiance à 95%. Ces analyses ont été ajustées pour les facteurs confondants nécessaires.

Les comparaisons des traits phénotypiques quantitatifs (pression artérielle systolique, diastolique, EUA, concentration de la créatinine plasmatique, etc...) entre les génotypes ont été effectuées par analyse univariée (ANOVA) ou multivariée (ANCOVA), ajustée pour les différentes covariables. L'analyse de l'évolution d'un paramètre en fonction du génotype au cours du suivi a été réalisée, par ANCOVA à mesures répétées ou par l'utilisation d'un modèle mixte où le génotype peut avoir un effet aléatoire et les covariables, comme le sexe et l'âge, exercent un effet fixe. Le modèle mixte permet d'utiliser tous les individus, même

lorsque des valeurs à certains temps sont manquantes. Cependant, nos résultats ne montrent pas de différences entre ces 2 types d'analyse, et nous avons choisi de présenter l'ANCOVA.

L'étude des effets individuels de polymorphismes sur la susceptibilité à une maladie multifactorielle peut être complétée par l'analyse haplotypique. Celle-ci permet, soit d'évaluer l'effet combiné des variants étudiés sur la susceptibilité de la maladie, soit de tester l'effet d'un variant fonctionnel non génotypé et qui serait en fort déséquilibre de liaison avec une combinaison d'allèles. La définition de la phase haplotypique exacte nécessite le génotypage de plusieurs générations dans les familles et ne peut, de ce fait, aux études consacrées à des maladies à apparition tardive [212]. Ainsi, différentes méthodes basées sur l'inférence statistique ont été développées et permettent d'estimer les phases haplotypiques. Il existe trois principales méthodes : la méthode d'inférence par parcimonie, la méthode de maximum de vraisemblance et la méthode d'inférence des haplotypes utilisant les algorithmes basés sur le calcul probabiliste Bayésien. Nous avons reconstitué les haplotypes par le logiciel THESIAS basé sur la méthode de maximum de vraisemblance [213].

Devant la multitude de tests statistiques effectués, nous avons effectué des corrections du seuil alpha en nous basant sur le nombre effectif de tests indépendants en prenant en considération le niveau de déséquilibre de liaison entre les différents polymorphismes [214,215].

Présentation des travaux

Nous avons mené plusieurs études pour enrichir notre compréhension de la relation entre les polymorphismes du gène de la T-cadhérine, *CDH13*, dans les diabètes et leurs complications. Au début, nous avons sélectionné quatre polymorphismes au niveau du promoteur et du premier intron du gène *CDH13*, en premier lieu pour leur association avec l'adiponectine et/ou les troubles métaboliques dans les données de la littérature. Ces polymorphismes ont été génotypés dans plusieurs cohortes : une cohorte issue de la population générale Française (D.E.S.I.R.), une cohorte de sujets avec un diabète de type 2 (DIABHYCAR), et trois cohortes de patients diabétiques de type 1 (GENESIS, GENEDIAB et SURGENE). Les travaux présentés par la suite, illustrent les associations de deux de ces polymorphismes (rs11646213 et rs3865188). En effet, la fréquence de l'allèle mineur du 3^{ème} polymorphisme choisi rs12051272, est trop faible dans notre population (MAF=0,009) pour permettre une puissance statistique suffisante. Le 4^{ème} polymorphisme rs4783244, en fort déséquilibre de liaison avec le rs3865188, réplique parfaitement les résultats de ce dernier. Je présente, dans un premier temps les résultats en rapport avec la population générale et le développement du diabète de type 2, puis, dans un deuxième temps, les résultats concernant le diabète de type 1 et la néphropathie diabétique.

Article 1 : Les polymorphismes du gène de la T-cadhérine (CDH13) sont associés au diabète de type 2 dans la population Française

L'adiponectine est une adipokine principalement sécrétée par les adipocytes. Les taux plasmatiques d'adiponectine sont associés au diabète de type 2 et à de nombreuses pathologies liées, telle que la stéatose hépatique non-alcoolique (NASH) [136,216–218]. Elle circule dans le sang sous plusieurs formes incluant des trimères caractérisant des oligomères de bas poids moléculaire (LMW), des hexamères de moyen poids moléculaire (MMW), et des multimères (12-18-mères et possiblement plus) de haut poids moléculaire (HMW). Les isomères HMW sont les plus abondants et les propriétés bénéfiques de l'adiponectine leur sont attribuées. L'adiponectine agit par le biais de deux récepteurs principaux Adipo R1 et Adipo R2 et d'un autre récepteur, la T-cadhérine qui lie potentiellement l'adiponectine MMW et HMW [126]. La T-cadhérine, contrairement aux autres cadhérines, n'est pas directement responsable de l'adhérence cellulaire mais participe à la transmission de signaux intracellulaires [219]. Elle est associée à la sécrétion de l'insuline [113]. Il a été montré que la T-cadhérine est essentielle pour le rôle cardio-protecteur de l'adiponectine [188]. Les polymorphismes du gène de la T-cadhérine (*CDH13*) sont associés aux taux circulants d'adiponectine dans les grandes études d'association pangénomique [130,195]. Ces polymorphismes ont été aussi associés aux risques du syndrome métabolique et à la pression artérielle chez des Européens [196,220] et au diabète de type 2 chez des hommes Asiatiques [131]. De plus, une méta-analyse a montré qu'un score génétique incluant le *CDH13*, associé aux taux circulants d'adiponectine, pourrait influencer le risque de diabète de type 2 dans une population multiethnique [130]. De faibles taux d'adiponectine sont associés à un risque élevé d'hyperglycémie et de diabète de type 2 dans la cohorte Française D.E.S.I.R. [221]. L'indice de stéatose hépatique, appelé FLI (*Fatty Liver Index*), est associé à une diminution du risque de l'incidence du diabète de type 2 au cours de 9 ans de suivi [222] dans cette cohorte.

Le but de cette étude est d'évaluer, dans la population de l'étude D.E.S.I.R, les associations des polymorphismes du *CDH13* avec les taux circulants d'adiponectine et le risque du diabète de type 2, ainsi qu'avec les indices métaboliques liés, dont le FLI. Les patients atteints de diabète de type 2 de la cohorte DIABHYCAR ont été également génotypés pour permettre une comparaison cas-témoins avec des effectifs supérieurs.

Résultats-Discussion

Dans une comparaison cas-témoin incluant des sujets non diabétiques de D.E.S.I.R. (n=4316) et des sujets diabétiques de type 2 de D.E.S.I.R. et de DIABHYCAR (n=3292), deux variants de *CDH13* (rs11646213 et rs3865188) sont associés au diabète de type 2. En cohérence avec cette association, les allèles à risque du diabète de type 2 sont aussi associés à des taux élevés d'HbA1c dans D.E.S.I.R.. A notre connaissance, c'est la première étude qui témoigne d'une association entre les variants de *CDH13* et le risque de diabète de type 2 au sein d'une population Européenne Caucasienne. Toutefois, en Suède, le rs11646213 a été associé au syndrome métabolique [196]. De plus, dans des populations est-asiatiques, le rs3865188 a été associé aux paramètres du syndrome métabolique dans le même sens que dans notre étude [131,223,224].

Les variants à risque pour le diabète de type 2 dans notre étude cas-témoins ont été aussi associés à de faibles taux d'adiponectine dans la cohorte D.E.S.I.R.. Ceci concorde avec le rôle sensibilisateur à l'insuline de l'adiponectine [225–227]. Les taux circulants d'adiponectine sont inversement associés à l'incidence du diabète de type 2 [228]. Cependant, certaines données sur le rôle de la T-cadhérine dans l'action de l'adiponectine ne sont pas en accord avec cette explication. Au niveau cardiaque, Denzel *et al.* ont montré que malgré des taux élevés d'adiponectine, les souris T-cadhérine-KO n'étaient pas protégées contre les lésions ischémiques cardiaques. Ce phénomène pourrait évoquer la possibilité d'une résistance à l'adiponectine causée par l'absence de la T-cadhérine nécessaire pour la capture tissulaire de l'adiponectine.

Par analogie, dans notre étude, les allèles du *CDH13* associés à des taux élevés d'adiponectine devraient également être associés à une résistance à l'adiponectine. Puisque nos résultats montrent que ces taux élevés coïncident avec une diminution du risque du diabète de type 2, ceci indique que la résistance à l'adiponectine, induite par la T-cadhérine, n'affecte pas la susceptibilité au diabète de type 2, contrairement à son effet sur les lésions cardiaques induites par une hypertension provoquée. En accord avec la théorie de la résistance à l'adiponectine, Gao *et al.* ont montré que les allèles du *CDH13* associés à des taux élevés d'adiponectine sont aussi associés à un profil métabolique délétère [224]. Ces résultats sont discordants avec nos données. Cette discordance renforce la conclusion d'effets séparés de l'adiponectine circulante et l'adiponectine tissulaire.

Sur le plan moléculaire, Putku *et al.* a noté que la région promotrice de *CDH13* héberge plusieurs loci susceptibles de méthylation (meQTLs) et associés au profil cardiovasculaire

[229]. Les polymorphismes que nous avons étudiés sont localisés dans la région promotrice contenant les meQTLs. Ils sont en déséquilibre de liaison avec quatre SNPs affectant la méthylation. L'association entre les SNPs étudiés et certains traits métaboliques pourrait donc dépendre du degré de méthylation de cette région, variable selon les populations à modes de vies et profils génétiques différents.

Dans la présente étude, les allèles de *CDH13* associés à un risque élevé de diabète de type 2 sont aussi associés à un indice de stéatose hépatique élevé, prédictif du diabète de type 2. Par conséquent, les allèles de *CDH13* pourraient être associés au diabète de type 2 par l'intermédiaire du profil hépatique. En l'absence d'un hépatocarcinome, aucune expression de la T-cadhérine n'a été trouvée au niveau des hépatocytes [230]. L'association avec le diabète de type 2 pourrait donc être secondaire à l'association aux taux plasmatiques d'adiponectine. L'adiponectine est dotée d'une activité antistéatotique et antiapoptique sur les hépatocytes [231]. Les taux d'adiponectine sont associés à la NASH [218,232], et fortement corrélés au FLI dans notre étude. La stéatose hépatique pourrait induire l'insulino-résistance [233]. La T-cadhérine pourrait influencer le diabète de type 2 par l'intermédiaire des taux d'adiponectine et de son effet sur la stéatose hépatique. La relation entre ces mécanismes pourrait être médiée par la voie des céramides. Il a été suggéré que les céramides associés à l'insulino-résistance jouent un rôle majeur dans la progression de la NASH [234]. L'adiponectine empêche l'accumulation des céramides en activant l'activité céramidase des récepteurs AdipoR1/R2 [235]. Cet effet pourrait être central dans la majorité des actions de l'adiponectine [235].

Les variants de *CDH13* sont aussi associés à l'IMC. Dans des populations Est-Asiatiques, une relation similaire a été décrite [209,224]. Dans une méta-analyse récente portant sur des données GWAS [236], un variant de *CDH13* (rs8062451) est associé à l'IMC ($p=7,33 \times 10^{-6}$). Le mécanisme derrière une telle association reste inconnu. Dans notre étude, cette association est en concordance avec la relation inverse entre l'IMC et les taux d'adiponectine. Toutefois, quand on ajuste sur l'IMC, l'association avec l'adiponectine persiste. Les associations avec l'HbA1c et le FLI persistent aussi après ajustement sur l'IMC. Ceci témoigne de l'indépendance, au moins partielle, de ces associations. La T-cadhérine pourrait ainsi exercer des effets pleiotropiques. La T-cadhérine et les taux plasmatiques de l'adiponectine pourraient affecter indépendamment le diabète de type 2.

Cette étude montre plusieurs limites. En raison du faible nombre de dosages d'adiponectine dans la population, nous n'avons pas pu ajuster nos résultats sur les taux plasmatiques

d'adiponectine. Cet ajustement aurait permis une caractérisation du rôle de l'adiponectine dans les associations entre le *CDH13* et les différents phénotypes. La cohorte D.E.S.I.R. manque de puissance statistique pour mettre en évidence une association avec le diabète de type 2 à elle seule, et nous avons dû effectuer une étude cas-témoin en utilisant la population de la cohorte DIABHYCAR. Toutefois, dans D.E.S.I.R., nous avons montré une association entre les polymorphismes du *CDH13* et les seuils d'HbA1c et de FLI prédictifs de l'incidence du diabète de type 2. Ceci est en concordance avec l'étude cas-témoin. Puisque que ces résultats sont décrits pour la première fois, ils doivent être répliqués. En conclusion, deux polymorphismes génétiques de *CDH13* sont associés au diabète de type 2, à un indice de stéatose hépatique (FLI), à l'IMC et à l'adiponectine circulante. De futures études seront nécessaires pour élucider et clarifier les mécanismes de ces associations afin de déterminer si ces résultats indiquent de nouvelles voies dans la physiopathologie du diabète de type 2, et éventuellement de nouvelles cibles thérapeutiques.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com/en

Diabetes
& *Metabolism*

Diabetes & Metabolism xxx (2016) xxx–xxx

Original article

T-cadherin gene variants are associated with type 2 diabetes and the Fatty Liver Index in the French population

A. Nicolas^{a,b,c}, R. Aubert^a, N. Bellili-Muñoz^a, B. Balkau^d, F. Bonnet^{d,e}, J. Tichet^f, G. Velho^a,
M. Marre^{a,g,h}, R. Roussel^{a,b,c,g,h}, F. Fumeron^{a,b,c,h,*}

^a Inserm, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 15, rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France

^b Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France

^c Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France

^d Inserm, Centre for Research in Epidemiology and Population Health (CESP), University Paris-Sud, University Versailles Saint-Quentin, UMR-S 1018, 94800 Villejuif, France

^e Department of Endocrinology and Diabetology, Centre Hospitalier Universitaire de Rennes, University Rennes 1, 35002 Rennes, France

^f IRSA, 37520 La Riche, France

^g Department of Diabetology, Endocrinology and Nutrition, Bichat Hospital, AP-HP, 75018 Paris, France

^h Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France

Received 14 March 2016; received in revised form 26 April 2016; accepted 10 May 2016

Abstract

Aim. – Adiponectin is an adipocyte-secreted protein associated with insulin sensitivity. T-cadherin is a receptor for high and medium molecular weight adiponectin. In GWAS, T-cadherin gene (*CDH13*) polymorphisms are associated with circulating adiponectin levels. This study investigated the associations between genetic variants of *CDH13* and type 2 diabetes (T2D), and its related parameters, in a Caucasian population.

Methods. – Two polymorphisms of *CDH13* (rs11646213 and rs3865188) were genotyped in two French cohorts, a general population from the D.E.S.I.R. study ($n = 5212$) and people with T2D in the DIABHYCAR study ($n = 3123$). Baseline adiponectin levels were measured in D.E.S.I.R. participants who were normoglycaemic at baseline, but hyperglycaemic after 3 years ($n = 230$), and in controls who remained normoglycaemic ($n = 226$) throughout.

Results. – In a cross-sectional analysis, *CDH13* genotype distributions differed between those with and without T2D, with T2D odds ratios (OR) of 1.11 (95% CI: 1.04–1.18; $P = 0.001$) and 0.92 (95% CI: 0.87–0.98; $P = 0.01$) for rs11646213 and rs3865188, respectively. The rs11646213 variant, associated with a higher OR for T2D, was also associated with higher BMI ($P = 0.03$) and HbA_{1c} ($P = 0.006$), and lower plasma adiponectin levels ($P = 0.03$) in the D.E.S.I.R. participants. Conversely, the rs3865188 variant, associated with a lower OR for T2D, was also associated with lower BMI ($P = 0.03$), HbA_{1c} ($P = 0.02$) and Fatty Liver Index (FLI; $P \leq 0.01$), and higher plasma adiponectin levels ($P = 0.002$). Associations with HbA_{1c}, FLI and adiponectin levels persisted after adjusting for BMI.

Conclusion. – *CDH13* polymorphisms are associated with prevalent T2D in this French population study. The association may be mediated through effects on BMI and/or plasma adiponectin.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Adiponectin; Body mass index; Fatty Liver Index; Genetic polymorphisms; T-cadherin; Type 2 diabetes

Abbreviations: BMI, body mass index; CI, confidence interval; FLI, Fatty Liver Index; GGT, gamma-glutamyl transferase; GWAS, genome-wide association study; HMW, high molecular weight; LMW, low molecular weight; MAF, minor allele frequency; MMW, medium molecular weight; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; OR, odds ratio; Tcad, T-cadherin.

* Corresponding author. Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, UMR-S 1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France.
Tel.: +33 1 44 27 81 14.

E-mail address: frederic.fumeron@inserm.fr (F. Fumeron).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.diabet.2016.05.005>

1262-3636/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Adiponectin is an adipokine mainly secreted by adipocytes, and its levels have been associated with type 2 diabetes (T2D) and various related traits, including non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [1–4]. It circulates in the blood in a number of complexes, including trimers described as low molecular weight (LMW) oligomers, as hexamers described as medium molecular weight (MMW) and as high molecular weight (HMW) multimers (12-mer, 18-mer and possibly even larger). The HMW isomer is the most abundant and has been described as responsible for the beneficial effects of adiponectin.

Adiponectin acts through two main receptors — AdipoR1 and AdipoR2 — and an additional receptor, T-cadherin, which binds only to MMW and HMW adiponectin [5]. T-cadherin, unlike other cadherins, is not responsible for cell adhesion, but participates in intracellular signal transmission [6]. It has been demonstrated that T-cadherin is essential for the cardioprotective effect of adiponectin [7] and is associated with insulin secretion [8].

In genome-wide association studies (GWAS), T-cadherin gene (*CDH13*) polymorphisms were associated with circulating adiponectin levels [9,10]. *CDH13* polymorphisms were also associated with the metabolic syndrome and high blood pressure risk in Europeans [11,12], and T2D risk in Asian men [13]. In addition, a meta-analysis showed that a genetic score including *CDH13*, associated with adiponectin levels, might influence the risk of T2D in a multiethnic population [9].

In our previous studies of the Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (D.E.S.I.R.) cohort, low adiponectin levels were found to be associated with a higher risk of hyperglycaemia and T2D, whereas a low Fatty Liver Index (FLI), a surrogate marker of liver steatosis, was associated with a lower risk of T2D incidence at the 9-year follow-up [14]. Thus, the aim of the present study was to test the associations between *CDH13* polymorphisms and adiponectin levels and T2D risk, as well as related metabolic traits, including the FLI, in the French D.E.S.I.R. study population. A case–control comparison was also performed between D.E.S.I.R. participants without T2D and those with T2D from both the D.E.S.I.R. and Type 2 Diabetes, Hypertension, Cardiovascular Events and Ramipril (DIABHYCAR) study cohorts.

2. Material and methods

2.1. Participants

Two populations were recruited: volunteers from the general French population in D.E.S.I.R. and patients with T2D in DIABHYCAR.

The D.E.S.I.R. study was a prospective study that included 2576 men and 2636 women, aged 30–65 years, recruited as volunteers; they were offered periodic health examinations free of charge by the French Social Security System at 10 Health Examination Centres in Western France. All were clinically and biologically evaluated at visits every 3 years, and the final examination was 9 years after inclusion. The study was approved

Table 1

Participants' characteristics on inclusion in the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR studies.

Clinical data	D.E.S.I.R.	DIABHYCAR
<i>n</i> (% men)	5212 (50)	3123 (73)
Age (years)	47 ± 10	65 ± 8
Body mass index (kg/m ²)	24.7 ± 3.8	29.4 ± 4.6
Waist circumference (cm)	83 ± 12	–
Glucose (mmol/L)	5.4 ± 0.8	9.6 ± 3.1
HbA _{1c} (%)	5.3 ± 0.5	7.9 ± 1.8
Insulin (pmol/L)	39.8 (27.8, 57.3)	–
Fatty Liver Index ≥ 70 (%)	11.2	–
Total cholesterol (mmol/L)	5.73 ± 1.02	5.79 ± 1.07
HDL cholesterol (mmol/L)	1.62 ± 0.42	1.32 ± 0.36
LDL cholesterol (mmol/L)	3.36 ± 1.02	3.53 ± 0.88
Triglycerides (mmol/L)	0.97 (0.68, 1.43)	1.83 (1.30, 2.67)
Diastolic blood pressure (mmHg)	80 ± 10	82 ± 8
Systolic blood pressure (mmHg)	131 ± 16	144 ± 13

Data are *n* (percentage), means ± SDs, medians (quartile 1, quartile 3); D.E.S.I.R.: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome; DIABHYCAR: Type 2 Diabetes, Hypertension, Cardiovascular Events and Ramipril; HDL/LDL: high-density/low-density lipoprotein.

by the Ethics Committee of the Kremlin-Bicêtre Hospital, and all participants gave their informed consent. Their clinical and biological measurements have been extensively described elsewhere [15].

The DIABHYCAR was a 6-year clinical trial of men and women with T2D, and included 3137 unrelated French people. The trial tested whether a low dose of ramipril, an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, would reduce cardiovascular and/or renal events. Negative results from this study have been published [16,17]. Participants gave their written informed consent, and study protocols were approved by the Ethics Committee of Angers University Hospital.

Characteristics of the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR cohorts are presented in Table 1.

2.2. Adiponectin assay measurement

In the D.E.S.I.R. cohort, adiponectin levels were measured by radioimmunoassay (RIA) at baseline in 456 people with baseline normoglycaemia [fasting plasma glucose (FPG) < 6.1 mmol/L]; of these, the 226 who remained normoglycaemic throughout the study were matched for gender, age and body mass index (BMI) with the 230 who became hyperglycaemic (FPG ≥ 6.1 mmol/L) at 3 years [1,18].

2.3. Fatty Liver Index

The FLI, a predictor of fatty liver in the general population, is based on an algorithm that includes BMI, triglycerides, gamma-glutamyl transferase (GGT) and waist circumference [19]. In the present study, the FLI was divided into two categories — scores < 70 and ≥ 70 — because an FLI ≥ 70 predicted the onset of T2D in our previous study [14].

Table 2
Association between *CDH13* rs11646213 and rs3865188 variants and metabolic traits in the D.E.S.I.R. cohort.

Polymorphism	n	Body mass index (kg/m ²)		HbA _{1c} (%)	
		T0	T9	T0	T9
<i>rs11646213</i>					
TT	1615	24.6 ± 0.1	25.5 ± 0.12	5.43 ± 0.01	5.58 ± 0.02
TA	2170	24.7 ± 0.08	25.8 ± 0.1	5.47 ± 0.01	5.62 ± 0.01
AA	827	24.9 ± 0.13	26.0 ± 0.16	5.48 ± 0.02	5.64 ± 0.02
<i>P</i> ^a		0.03		0.006/0.02	
<i>rs3865188</i>					
TT	1383	24.8 ± 0.1	25.9 ± 0.12	5.47 ± 0.01	5.62 ± 0.02
TA	2220	24.7 ± 0.08	25.8 ± 0.1	5.47 ± 0.01	5.62 ± 0.01
AA	993	24.5 ± 0.12	25.4 ± 0.15	5.43 ± 0.02	5.58 ± 0.02
<i>P</i> ^a		0.03		0.02/0.09	

Data are means ± SD at inclusion (T0) and at the 9-year follow-up (T9); D.E.S.I.R.: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome.

^a For genotype effect by ANCOVA for repeated measures adjusted for gender, age (*f* and BMI); an additive model was used except for rs3865188 in HbA_{1c} (recessive model analysis); no significant interactions of genotype × time were found.

2.4. Genotyping

Two single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *CDH13* were selected on the basis of previous studies. These SNPs (rs11646213 [A > T] and rs3865188 [A > T]), located in the gene promoter, were associated with plasma adiponectin levels in GWAS [10,20,21].

All polymorphisms in the study population were genotyped using the KASPTM method (LGC, Teddington, Middlesex, UK; www.lgcgenomics.com). The genotyping success rate was 0.97 for both SNPs in D.E.S.I.R. and 0.96 (rs11646213) and 0.97 (rs3865188) in DIABHYCAR.

2.5. Statistical analyses

The associations between genotypes and continuous variables were estimated using analysis of covariance (ANCOVA) for repeated measures, with adjustments for confounding factors (age, gender, BMI). Parameters that were not normally distributed (for example, adiponectin levels) were log-transformed before analysis. Associations between baseline adiponectin levels and continuous variables were assessed by linear regression, after adjusting for confounding variables (gender, age, glycaemic status, BMI). The association between baseline adiponectin levels and the 9-year prevalence of hyperglycaemia was tested by ANCOVA, after adjusting for gender, age and BMI. Associations between polymorphisms and metabolic diseases used logistic regression, adjusted for confounding factors, and were quantified by odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI). Correction for multiple comparisons due to multiple SNP testing took into account the effective number of independent tests (Meff) based on the degree of linkage disequilibrium between SNPs [22]. A value of $P \leq 0.033$ was considered significant. Departure from the Hardy–Weinberg equilibrium was assessed using a χ^2 test. *P*-values were 0.04 and 0.17 (rs11646213), and 0.07 and 0.04 (rs3865188), in the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR cohorts, respectively. The tests for polymorphisms correspond to the best-fitting models of inheritance, according to descriptive

statistics (additive, dominant or recessive). All statistical analyses used SYSTAT 13[®] software for Windows.

In the D.E.S.I.R. study, people born outside of mainland France were excluded from the genetic analyses. For the FLI analyses, only the 3650 people with alcohol consumption levels < 30 g/day (men) and < 20 g/day (women) were included.

3. Results

3.1. D.E.S.I.R. cohort

Baseline adiponectin levels were negatively and significantly associated with BMI ($P = 0.02$) and FLI ($P < 0.0001$); the latter association remained significant after further adjustment for BMI ($P = 0.0006$). There was no association with HbA_{1c} ($P = 0.23$). Plasma adiponectin was also associated with the prevalence of hyperglycaemia at 9 years (ANCOVA adjusted for gender, age and BMI; $P = 0.01$).

The rs11646213 A allele was significantly associated with higher BMI and HbA_{1c} (Table 2) as well as with lower plasma adiponectin levels (Table 3; adjusted for age, gender and BMI

Table 3
Plasma adiponectin levels according to *CDH13* genotypes in a subsample of the D.E.S.I.R. cohort.

Polymorphism	n	Adiponectin (µg/mL)
<i>rs11646213</i>		
TT	160	23.6 (15.2, 35.9)
TA	191	24.0 (14.9, 38.9)
AA	67	21.1 (12.8, 34.8)
<i>P</i> ^a		0.03/0.008
<i>rs3865188</i>		
TT	132	22.2 (13.5, 36.6)
TA	185	23.8 (15.0, 37.7)
AA	99	24.5 (16.3, 37.0)
<i>P</i> ^a		0.002/0.001

Data are medians (quartile 1, quartile 3) at T0 (study baseline); D.E.S.I.R.: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome.

^a For genotype effect (additive model groups) adjusted for age, gender, body mass index and glycaemic status/idem + ADIPOQ polymorphisms.

Table 4
Association of *CDH13* variants rs11646213 and rs3865188 with the Fatty Liver Index (FLI) in the D.E.S.I.R. study cohort.

	<i>n</i>	At baseline, T0			At 9-year follow-up, T9				
		FLI (%)		<i>P</i> ^a	OR (95% CI) ^a	FLI (%)		<i>P</i> ^a	OR (95% CI) ^a
		< 70	≥ 70			< 70	≥ 70		
<i>rs11646213</i>									
TT	1225	35.4	32.2	0.35	1.12 (0.88–1.43)	35.8	29.8	0.05	1.22 (1.00–1.49)
TA	1625	46.6	47.0			46.4	47.9		
AA	635	18.0	20.8			17.8	22.3		
MAF		41.3	44.3			41.0	46.3		
<i>rs3865188</i>									
TT	1074	30.3	37.6	0.010	0.72 (0.57–0.92)	30.3	37.1	0.005	0.75 (0.61–0.92)
TA	1649	47.5	45.9			47.5	48.4		
AA	759	22.2	16.5			22.2	14.5		
MAF		46.0	39.5			46.0	38.7		

Data are percentages unless otherwise specified; MAF: minor allele frequency; D.E.S.I.R.: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome.

^a For the minor allele by logistic regression of the recessive model for rs11646213 (AA vs Tx) and dominant model for rs3865188 (TT vs Ax), adjusted for gender, age, body mass index and alcohol consumption.

when appropriate). In those who at baseline reported no or only light alcohol consumption, the A allele was found to be more frequent at the end of the study in those with FLI scores ≥ 70 (OR: 1.22, 95% CI: 1.00–1.49), although the difference did not reach the statistical threshold of significance ($P=0.05$; Table 4).

The rs3865188 A allele was significantly associated with lower BMI and HbA_{1c} (Table 2), and higher plasma adiponectin levels (Table 3), although the association with HbA_{1c} was no longer significant after adjusting for BMI. The allele was also associated with a lower risk of an FLI ≥ 70 at baseline (OR: 0.72, 95% CI: 0.57–0.92; $P=0.01$) and at the end of the study (OR: 0.75, 95% CI: 0.61–0.92; $P=0.005$; Table 4).

3.2. Association with type 2 diabetes

Both genotypes and allele frequencies were similar between patients with T2D in the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR cohorts. To increase the power of the statistical analysis, a case–control comparison was performed between subjects without T2D in D.E.S.I.R. and patients with T2D in DESIR and DIABHYCAR (Table 5). The results showed that the two polymorphisms were significantly associated with T2D, with a higher risk for the minor allele of rs11646213 (OR: 1.11, 95% CI: 1.04–1.19; $P=0.001$), and a lower risk for the minor allele of rs3865188 (OR: 0.92, 95% CI: 0.87–0.99; $P=0.01$).

4. Discussion

Our main results for the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR cohorts show associations between the two polymorphisms of *CDH13* and T2D, as well as with BMI, FLI and circulating adiponectin levels. The two variants were also associated with the prevalence of T2D in a case–control study of people without T2D from D.E.S.I.R. and patients with T2D from both the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR cohorts. Consistent with this association, the T2D at-risk alleles in D.E.S.I.R. were also associated with higher HbA_{1c} levels. To our knowledge, this is the first report of an association between *CDH13* variants and

the risk of T2D in an European Caucasian population. However, in Sweden, rs11646213 was associated with the metabolic syndrome [11] and, in East Asian populations, rs3865188 was associated with metabolic parameters, in the same directions as in our study [13,23,24]. The mechanisms behind these associations are as yet unclear.

For both polymorphisms, the variants at risk of T2D in our study were also associated with lower adiponectin levels. This is consistent with the insulin-sensitizing role of adiponectin [25–27], and the finding that circulating adiponectin levels are negatively associated with the development of T2D [28]. Nevertheless, the data concerning the role of T-cadherin in adiponectin activity are not consistent with such a straightforward explanation. T-cadherin acts as a co-receptor for HMW and MMW adiponectin [7] and, in the heart, Denzel et al. [7] showed that T-cadherin is essential for adiponectin-mediated activation of the AMP-activated protein kinase signalling pathway. In the same study, plasma adiponectin levels increased in T-cadherin knockout (Tcad-KO) mice. However, despite high circulating adiponectin levels, these animals were not protected against ischaemia–reperfusion cardiac injury. This phenomenon may be interpreted as adiponectin resistance caused by a lack of the T-cadherin necessary for tissue uptake of adiponectin.

Accordingly, in our present study, the *CDH13* alleles associated with high adiponectin levels should also be associated with adiponectin resistance. As our present findings show that higher levels are concomitant with a lower risk of T2D, it indicates that this T-cadherin-induced adiponectin resistance does not affect susceptibility to T2D as it does in stress-induced cardiac injury. In fact, in agreement with the adiponectin resistance hypothesis, Gao et al. [24] found that *CDH13* alleles associated with high circulating adiponectin levels are also linked to a deleterious metabolic profile. These results are discordant with our present data, although the discordance might be explained by the European origin of our present population, as differences in genetic architecture within the *CDH13* locus between Europeans and Asians have been described [29].

Table 5
Genotype and allele frequencies of *CDH13* polymorphisms according to type 2 diabetes status in the DIABHYCAR and D.E.S.I.R. study cohorts.

Polymorphism	Cases (DIABHYCAR + D.E.S.I.R.)	Controls (D.E.S.I.R.)	<i>P</i> ^a	OR (95% CI) ^a
<i>rs11646213</i>				
TT	1055 (32.0)	1521 (35.2)	0.001	1.11 (1.04–1.18)
TA	1581 (48.0)	2026 (46.9)		
AA	656 (19.9)	769 (17.8)		
<i>rs3865188</i>				
TT	1075 (32.2)	1294 (30.1)	0.01	0.92 (0.87–0.98)
TA	1593 (47.8)	2066 (48.0)		
AA	666 (20.0)	941 (21.9)		

Data are *n* (%) unless otherwise specified; D.E.S.I.R.: Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome; DIABHYCAR: Type 2 Diabetes, Hypertension, Cardiovascular Events And Ramipril.

^a For the minor allele by logistic regression (additive models).

Another difference is related to the recruitment procedure. D.E.S.I.R. was a population-based study, whereas the above-mentioned studies included many patients with metabolic diseases where adiponectin resistance may have been present, thereby inhibiting the protective effect of adiponectin. On a molecular basis, Putku et al. [30] stated that the *CDH13* promoter region holds several methylated quantitative trait loci (meQTLs) that they found were associated with cardiovascular traits. The polymorphisms in our present study are localized to the promoter region harbouring those meQTLs and in linkage disequilibrium with four SNPs exhibiting effects on methylation levels. The association of our studied SNPs with certain metabolic traits might therefore depend on promoter methylation status, which varies across populations with different lifestyles and genetic backgrounds. Further studies are needed to determine whether these SNPs are directly functional or whether they are only linked to causal variants that might be meQTLs.

In the present study, one of the *CDH13* alleles associated with a higher relative risk of T2D was also associated with a high FLI, previously found to be predictive of T2D. Therefore, *CDH13* alleles might be associated with T2D through the liver profile. In the absence of hepatocarcinoma, there has been no evidence of T-cadherin expression in hepatocytes [31]. This suggests that the association with T2D may be secondary to the association with plasma adiponectin levels. Adiponectin has antisteatotic and antiapoptotic effects on hepatocytes [32]. Adiponectin levels are associated with NAFLD [3,33] and, in the present study, also with the FLI. It has been proposed that fatty liver may induce insulin resistance [34]. Thus, *CDH13* might influence T2D risk by effects on adiponectin levels and also on fatty liver. Nevertheless, as the effect on the latter most likely depends on the effect on the former, these mechanisms are very likely closely linked. In fact, the connection between these effects may be the ceramide pathway. It has been suggested that ceramides, which are associated with insulin resistance, play a major role in NAFLD progression [35]. Also, as adiponectin diminishes the accumulation of ceramides by activating ceramidase activity in adiponectin receptors (AdipoR1/R2), it has been suggested that the latter effect may be central to most adiponectin actions [36].

The *CDH13* variants were also associated with BMI, and similar results have sometimes been found in East Asian populations [21,24]. In a recent large meta-analysis of GWAS data

on BMI [37], the *CDH13* variant rs8062451 was associated with BMI ($P=7.33 \times 10^{-6}$), although the mechanism of such an association is not known. In our present study, this association was in line with an inverse relationship between BMI and adiponectin levels. Nevertheless, when adjusted for BMI, the association with adiponectin persisted, as did the associations between *CDH13* alleles and HbA_{1c} and FLI, all of which indicate the independence (at least partial) of these associations. T-cadherin might therefore have independent pleiotropic effects. Indeed, T-cadherin and plasma adiponectin levels might independently affect the development of T2D.

Our present study has several limitations. Our genetic analyses could not be adjusted for population stratification. Nevertheless, as only people born in mainland France were analyzed, this should have limited ethnic heterogeneity. Also, due to the low number of adiponectin measures within the population, our results could not be adjusted for plasma adiponectin levels. Such adjustment would have allowed some description of the role of adiponectin in the associations between *CDH13* and certain phenotypes, such as HbA_{1c}. In addition, genetic associations with FLI as a continuous variable could not be determined.

Furthermore, as our results are here described for the first time, these associations need to be replicated. Also, as regards the relationship with T2D, the D.E.S.I.R. study alone lacked statistical power, as it included only 294 people with T2D. However, the present associations found in our cohort of the two *CDH13* polymorphisms with HbA_{1c}, and the FLI threshold predictive of T2D incidence, are consistent with the case–control comparison between the D.E.S.I.R. and DIABHYCAR cohorts.

In conclusion, two common polymorphisms of *CDH13* are associated with T2D, FLI, BMI and circulating adiponectin. Further studies are now needed to clarify the mechanisms behind these associations to determine whether these results indicate new pathways in the pathophysiology of T2D and, thus, some potential new therapeutic targets.

Funding

The D.E.S.I.R. study was supported by INSERM contracts with CNAMTS, Eli Lilly, Novartis Pharma and Sanofi-Aventis; by INSERM (Réseaux en Santé Publique, Interactions entre les déterminants de la santé), Cohortes Santé TGIR, the Association

Diabète Risque Vasculaire, the Fédération française de cardiologie, La Fondation de France, ALFEDIAM, Société francophone du diabète, ONIVINS, Abbott, Ardix Medical, Bayer Diagnostics, Becton Dickinson, Cardionics, Merck Santé, Novo Nordisk, Pierre Fabre, Roche and Topcon.

The analysis and data interpretation were done without the participation of any of these organizations and companies.

Contribution of authors

All authors approved the final version of the manuscript.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgements

The D.E.S.I.R. Study Group: INSERM U1018, B. Balkau, P. Ducimetière, E. Eschwège; INSERM U367, F. Alhenc-Gelas; CHU d'Angers, A. Girault; Bichat Hospital, F. Fumeron, M. Marre, R. Roussel; CHU de Rennes, F. Bonnet; CNRS UMR8090, Lille, S. Cauchi, P. Froguel; Health Examination Centres in Alençon, Angers, Blois, Caen, Chateauroux, Chartres, Cholet, Le Mans, Orléans, Tours; Research Institute of General Practice, J. Cogneau; General practitioners of the region; Interregional Institute for Health, C. Born, E. Caces, M. Cailleau, O. Lantieri, J.G. Moreau, F. Rakotzafy, J. Tichet, S. Vol.

References

[1] Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Péan F, Hadjadj S, et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes* 2004;53:1150–7.

[2] Jaziri R, Aubert R, Roussel R, Emery N, Maimaitiming S, Bellili N, et al. Association of ADIPOQ genetic variants and plasma adiponectin isoforms with the risk of incident renal events in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2231–7, <http://dx.doi.org/10.1093/ndt/gfp771>.

[3] Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2011;60:313–26, <http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2010.09.003>.

[4] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:365–83, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1463-1326.2009.01176.x>.

[5] Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10308–13, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403382101>.

[6] Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Pfaff D, Erne P, Resink TJ. A guide and guard: the many faces of T-cadherin. *Cell Signal* 2009;21:1035–44.

[7] Denzel MS, Scimia M-C, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* 2010;120:4342–52, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI43464>.

[8] Tyrberg B, Miles P, Azizian KT, Denzel MS, Nieves ML, Monosov EZ, et al. T-cadherin (Cdh13) in association with pancreatic β -cell granules

contributes to second phase insulin secretion. *Islets* 2011;3:327–37, <http://dx.doi.org/10.4161/isl.3.6.17705>.

[9] Dastani Z, Hivert M-F, Timpson N, Perry JRB, Yuan X, Scott RA, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet* 2012;8:e1002607, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002607>.

[10] Jee SH, Sull JW, Lee J-E, Shin C, Park J, Kimm H, et al. Adiponectin concentrations: a genome-wide association study. *Am J Hum Genet* 2010;87:545–52, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.09.004>.

[11] Fava C, Danese E, Montagnana M, Sjögren M, Almgren P, Guidi GC, et al. A variant upstream of the CDH13 adiponectin receptor gene and metabolic syndrome in Swedes. *Am J Cardiol* 2011;108:1432–7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjcard.2011.06.068>.

[12] Örg E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet* 2009;18:2288–96, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddp135>.

[13] Chung C-M, Lin T-H, Chen J-W, Leu H-B, Yang H-C, Ho H-Y, et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on CDH13 that predicts cardiometabolic outcomes. *Diabetes* 2011;60:2417–23, <http://dx.doi.org/10.2337/db10-1321>.

[14] Balkau B, Lange C, Vol S, Fumeron F, Bonnet F, Group Study D.E.S.I.R. Nine-year incident diabetes is predicted by fatty liver indices: the French D.E.S.I.R. study. *BMC Gastroenterol* 2010;10:56, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-230X-10-56>.

[15] Fumeron F, Lamri A, Abi Khalil C, Jaziri R, Porchay-Baldérelli I, Lantieri O, et al. Dairy consumption and the incidence of hyperglycemia and the metabolic syndrome: results from a French prospective study. Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome (DESIR). *Diabetes Care* 2011;34:813–7, <http://dx.doi.org/10.2337/dc10-1772>.

[16] Marre M, Lievre M, Chatellier G, Mann JFE, Passa P, Ménard J, et al. Effects of low dose ramipril on cardiovascular and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and raised excretion of urinary albumin: randomised, double blind, placebo controlled trial (the DIABHYCAR study). *BMJ* 2004;328:495, <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.37970.629537.0D>.

[17] Lièvre M, Marre M, Chatellier G, Plouin P, Régliez J, Richardson L, et al. The non-insulin-dependent diabetes, hypertension, microalbuminuria or proteinuria, cardiovascular events, and ramipril (DIABHYCAR) study: design, organization, and patient recruitment. *DIABHYCAR Study Group. Control Clin Trials* 2000;21:383–96.

[18] Bonnet F, Balkau B, Malécot JM, Picard P, Lange C, Fumeron F, et al. Sex hormone-binding globulin predicts the incidence of hyperglycemia in women: interactions with adiponectin levels. *Eur J Endocrinol Eur Fed Endocr Soc* 2009;161:81–5, <http://dx.doi.org/10.1530/EJE-09-0202>.

[19] Bedogni G, Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Passalacqua M, Castiglione A, et al. The Fatty Liver Index: a simple and accurate predictor of hepatic steatosis in the general population. *BMC Gastroenterol* 2006;6:33, <http://dx.doi.org/10.1186/1471-230X-6-33>.

[20] Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, Nakatochi M, Chiu Y-F, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin levels in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. *Hum Mol Genet* 2014;23:1108–19, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt488>.

[21] Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat* 2012;33:402–10, <http://dx.doi.org/10.1002/humu.21652>.

[22] Nyholt DR. A simple correction for multiple testing for single-nucleotide polymorphisms in linkage disequilibrium with each other. *Am J Hum Genet* 2004;74:765–9.

[23] Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, et al. CDH13 polymorphisms are associated with adiponectin levels and metabolic syndrome traits independently of visceral fat mass. *J Atheroscler Thromb* 2015, <http://dx.doi.org/10.5551/jat.31567>.

[24] Gao H, Kim Y-M, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes* 2013;62:4277–83, <http://dx.doi.org/10.2337/db13-0129>.

- [25] Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2013;417:80–4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2012.12.007>.
- [26] Tishinsky JM, Robinson LE, Dyck DJ. Insulin-sensitizing properties of adiponectin. *Biochimie* 2012;94:2131–6, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2012.01.017>.
- [27] Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Horm Athens Greece* 2012;11:8–20.
- [28] Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *Lancet* 2002;360:57–8, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09335-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09335-2).
- [29] Otsuka I, Watanabe Y, Hishimoto A, Boku S, Mouri K, Shirowa K, et al. Association analysis of the Cadherin13 gene with schizophrenia in the Japanese population. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2015;11:1381–93, <http://dx.doi.org/10.2147/NDT.S84736>.
- [30] Putku M, Kals M, Inno R, Kasela S, Org E, Kožich V, et al. CDH13 promoter SNPs with pleiotropic effect on cardiometabolic parameters represent methylation QTLs. *Hum Genet* 2015;134:291–303, <http://dx.doi.org/10.1007/s00439-014-1521-6>.
- [31] Chan DW, Lee JMF, Chan PCY, Ng IOL. Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008;123:1043–52, <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.23634>.
- [32] Jung TW, Lee YJ, Lee MW, Kim SM, Jung TW. Full-length adiponectin protects hepatocytes from palmitate-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase. *FEBS J* 2009;276:2278–84, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06955.x>.
- [33] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* 2015 n.d. doi:10.1016/j.metabol.2015.11.006.
- [34] Grønbaek H, Thomsen KL, Rungby J, Schmitz O, Vilstrup H. Role of nonalcoholic fatty liver disease in the development of insulin resistance and diabetes. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;2:705–11, <http://dx.doi.org/10.1586/17474124.2.5.705>.
- [35] Promrat K, Longato L, Wands JR, de la Monte SM. Weight loss amelioration of non-alcoholic steatohepatitis linked to shifts in hepatic ceramide expression and serum ceramide levels. *Hepatol Res* 2011;41:754–62, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1872-034X.2011.00815.x>.
- [36] Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 2011;17:55–63, <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2277>.
- [37] Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015;518:197–206, <http://dx.doi.org/10.1038/nature14177>.

Article 2 : Polymorphismes du gène de la T-cadhérine (CDH13), adiponectinémie et néphropathie dans le diabète de type 1

La néphropathie diabétique est une complication vasculaire majeure chez les patients diabétiques de type 1 qui peut évoluer en maladie rénale terminale [237]. On estime qu'environ la moitié des patients diabétiques de type 1 développent une néphropathie, ce qui augmente le risque de mortalité [238]. Plusieurs variants génétiques modulent la susceptibilité à la maladie rénale [239,240].

L'adiponectine est une adipokine sécrétée majoritairement par les adipocytes, dotée de propriétés anti-inflammatoires, anti-athérogéniques et insulino-sensibilisatrices. En général, la concentration plasmatique d'adiponectine est élevée chez les patients diabétiques de type 1, [241]. Les taux d'adiponectine plasmatique à l'inclusion sont plus élevés chez des patients diabétiques de type 1 développant une néphropathie dans l'étude prospective SURGENE [69]. Chez des patients diabétiques de type 1 ayant une néphropathie, l'adiponectine a une valeur prédictive sur l'incidence de l'insuffisance rénale terminale.

La T-cadhérine est fortement exprimée au niveau des artères rénales [186]. Elle est de même abondante dans les cellules vasculaires endothéliales endommagées [242]. La T-cadhérine coexiste avec l'adiponectine dans les sites vasculaires lésés [186]. Le voisinage de ces deux molécules au niveau de l'endothélium endommagé pourrait être indispensable à leur action bénéfique. Dans les GWAS, les taux plasmatiques d'adiponectine sont associés, non seulement aux polymorphismes du gène de l'adiponectine (*ADIPOQ*) mais aussi aux polymorphismes du gène de la T-cadhérine (*CDH13*) [131,220]. La T-cadhérine se lie sélectivement à l'adiponectine de haut poids moléculaire (HMW) et de poids moléculaire moyen (MMW), mais son rôle comme récepteur de l'adiponectine est incertain [126,242]. La T-cadhérine pourrait agir comme co-récepteur pour les récepteurs Adipo R1 et/ou Adipo R2, ou pour un autre récepteur encore inconnu [102].

En raison des relations existant entre l'adiponectine et la néphropathie diabétique d'une part, et celles entre la T-cadhérine et l'adiponectine d'autre part, le but de cette étude est d'évaluer la relation entre les polymorphismes de *CDH13* et la néphropathie diabétique chez des patients diabétiques de type 1, en relation avec la concentration d'adiponectine plasmatique.

Nous avons effectué ce travail dans deux cohortes, GENESIS et GENEDIAB, puis cherché à confirmer nos résultats dans une troisième population, SURGENE.

Résultats-Discussion

Dans cette étude, on observe une association entre les taux d'adiponectine et la prévalence de la néphropathie diabétique et l'incidence de l'insuffisance rénale terminale (ESRD) dans GENESIS et GENEDIAB. D'autre part, dans ces mêmes cohortes, il existe des associations entre les polymorphismes de *CDH13* et la prévalence de la néphropathie diabétique établie et/ou avancée, l'incidence de l'ESRD, l'excrétion urinaire d'albumine et la pression artérielle diastolique. Ces associations génétiques ont été validées dans SURGENE, une autre cohorte de patients diabétiques de type 1, où l'on observe une association entre ces polymorphismes et la néphropathie diabétique établie et/ou avancée, mais aussi avec la progression de la néphropathie diabétique au cours du suivi.

Nos résultats concernant les taux d'adiponectine sont en concordance avec plusieurs autres études montrant des taux élevés d'adiponectine dans la néphropathie diabétique. En particulier, les taux élevés d'adiponectine précèdent la néphropathie chez les diabétiques de type 1 dans la cohorte SURGENE [69]. Cependant, le mécanisme de cette relation entre l'adiponectine plasmatique et la néphropathie n'est pas élucidé. L'insuffisance rénale pourrait stimuler la production d'adiponectine pour limiter les lésions endothéliales [243]. Il est aussi possible qu'elle diminue la clairance de l'adiponectine [70], et le rein pourraient développer une résistance secondaire à l'adiponectine [244]. Cependant, le design prospectif de notre étude et certaines études précédentes sont en faveur d'une relation causale, de telle sorte qu'une adiponectine élevée favoriserait la néphropathie. En désaccord avec cette hypothèse, des taux élevés d'adiponectine ont été associés à de faibles taux d'excrétion urinaire d'albumine à un stade précoce de la maladie [245]. Sharma *et al.* montre également que chez des sujets obèses Afro-Américains, non diabétiques et sans maladie rénale, que l'albuminurie est associée négativement à l'adiponectine plasmatique [246]. Cependant, à un stade avancé de la maladie, des taux élevés d'adiponectine plasmatique ont été associés à une néphropathie chronique plus sévère [108] et à un risque augmenté de l'aggravation de la néphropathie [247].

Dans les GWAS, les polymorphismes de *CDH13* ont été associés à des variations de concentrations d'adiponectine [143,248]. Dans notre étude, l'allèle mineur rs3865188, associé à une diminution du risque de néphropathie, est aussi associé à des faibles taux d'adiponectine plasmatique [248]. Après ajustement sur les taux d'adiponectine plasmatique, l'association

entre ce variant de *CDH13* et les symptômes rénaux disparaît. Il est donc tentant d'imaginer que la relation entre les polymorphismes de *CDH13* et la néphropathie diabétique est médiée par les taux plasmatiques de l'adiponectine. Nos résultats sont en faveur d'un rôle délétère de l'adiponectine plasmatique dans la néphropathie diabétique. Précédemment, deux variants d'*ADIPOQ* associés à des taux élevés d'adiponectine étaient aussi associés à un risque de néphropathie accru dans le diabète de type 2 (étude DIABHYCAR). Nous montrons aussi que ces variants d'*ADIPOQ* sont également associés à un risque accru dans le diabète de type 1 (voir *infra*, Données complémentaires).

Cependant, d'après les modèles animaux de cardiopathie, une invalidation du gène *CDH13*, entraînant un déficit en T-cadhérine, est lié à des taux très élevés d'adiponectine plasmatique, par manque de fixation de l'adiponectine au niveau tissulaire [188]. Près de 75% de l'adiponectine totale est liée aux tissus via un mécanisme T-cadhérine dépendant [249]. On pourrait supposer que les allèles de *CDH13*, associés à des faibles taux d'adiponectine, pourraient être aussi associés à une expression augmentée de la T-cadhérine et à une augmentation de la liaison tissulaire d'adiponectine. Une telle relation a déjà été décrite [224]. Dans ce cas, une diminution des taux d'adiponectine pourrait correspondre à une liaison augmentée et aboutir par la suite à un captage tissulaire plus importante de l'adiponectine. Si l'adiponectine avait un rôle délétère sur le rein, le variant de *CDH13* associé à une baisse de l'adiponectine devrait être associé à une augmentation du risque. Nous observons l'inverse. Ceci peut signifier que l'adiponectine peut jouer un rôle délétère sur le rein mais sans passer par la liaison à la T-cadhérine. Une autre possibilité est que la relation du polymorphisme avec l'adiponectine circulante est modifiée par les effets propres du diabète de type 1. En effet, dans notre étude dans la population générale et le diabète de type 2, la relation entre adiponectine et variant de *CDH13* est inversée. De plus, le polymorphisme de *CDH13* rs11646213, associé à la néphropathie, est aussi associé à l'adiponectine dans l'étude précédente, mais pas dans celle-ci.

La T-cadhérine pourrait aussi agir indépendamment de l'adiponectine au niveau rénal. La T-cadhérine joue un rôle fonctionnel dans la différenciation des podocytes et dans la formation du réseau capillaire glomérulaire [191]. Les variations génétiques de *CDH13* pourraient avoir un rôle à ce niveau. A l'inclusion, les variants rs11646213 et rs3865188 sont associés à la prévalence de la néphropathie diabétique et à l'excrétion urinaire de l'albumine. Le génotype associé à une néphropathie plus sévère est de même associé à des taux plus élevés d'excrétion

urinaire d'albumine. Ceci pourrait suggérer un rôle de la T-cadhérine dans la maladie rénale à travers l'albumine.

Les principaux points forts de notre étude sont l'évaluation du phénotype détaillée de la fonction rénale au cours du suivi dans les trois cohortes, le nombre de sujets inclus dans l'étude, ainsi que la validation de nos résultats dans des groupes d'études indépendantes. Les variants étudiés sont dans le promoteur du gène de la T-cadhérine et pourraient être associés à l'expression du gène. Une limite de l'étude est que la T-cadhérine plasmatique n'a pas été mesurée dans ces cohortes [250]. Cette mesure nous permettrait de mieux évaluer la relation entre ces protéines et l'apparition de la néphropathie chez les sujets atteints de diabète de type 1.

En conclusion, les variants génétiques de *CDH13* sont associés à la prévalence et à l'incidence de la néphropathie diabétique chez des sujets diabétiques de type 1, ainsi qu'à la progression vers des stades sévères de la maladie et à l'incidence de l'ESRD. L'association du variant rs3865188 et des phénotypes étudiés aux taux plasmatiques d'adiponectine, suggère que ce dernier pourrait expliquer ces associations comme phénotype intermédiaire. Des études supplémentaires sont nécessaires pour tester si ces associations sont dépendantes des variations des taux d'adiponectine.

T-cadherin gene variants are associated with nephropathy in subjects with type 1 diabetes

A. Nicolas^{1,2}, K. Mohammedi^{1,3}, JP. Bastard⁴, S. Fellahi⁴, N. Bellili-Muñoz¹, R. Roussel^{1,3,5},
S. Hadjadj^{6,7,8}, M. Marre^{1,3,5}, G. Velho¹, F. Fumeron^{1,5}

¹INSERM, Centre de Recherches des Cordeliers, Research Unit 1138, Paris ;

²Univ Pierre et Marie Curie, Sorbonne Universités, Paris, France ;

³Dept. of Diabetology, Endocrinology and Nutrition, APHP - Bichat Hospital, Paris, France ;

⁴Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Biochemistry and Hormonology Department, Tenon Hospital, 75970, Paris, France ;

⁵Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France,

⁶Université de Poitiers, UFR Médecine Pharmacie, CIC1402, Poitiers, France,

⁷Dept. of Diabetology and Endocrinology, Pole DUNE & Centre d'investigation clinique, University Hospital, Poitiers, France, ⁸INSERM, CIC1402, Poitiers, France

Abstract

Objective: High plasma adiponectin levels are associated with diabetic nephropathy (DN). T-cadherin gene (*CDH13*) variants were shown to be associated with adiponectin levels. We investigated associations of allelic variations of *CDH13* with DN in subjects with type 1 diabetes.

Methods: Two polymorphisms of *CDH13* were analysed in 1297 Caucasian subjects with type 1 diabetes from the SURGENE (n=340, 10-year follow-up), GENESIS France-Belgium (n=501, 5-year follow-up for n= 462) and GENEDIAB (n=456, 9-year follow-up for n=283) cohorts. Adiponectin levels were measured in plasma samples from GENESIS and GENEDIAB.

Results: In pooled analysis of GENEDIAB and GENESIS studies, plasma adiponectin levels were associated with the prevalence of established/advanced DN ($p<0.0001$) and the incidence of end-stage renal disease (ESRD) ($p<0.0001$). The minor allele of the variant rs3865188 of *CDH13* was associated with lower plasma adiponectin levels ($p=0.006$). The prevalence of established/advanced DN was associated with rs11646213 (OR 1.47; CI 95% 1.18-1.85; $p=0.0009$), and rs3865188 (OR 0.71, 95% CI 0.57-0.90, $p=0.004$). These polymorphisms were also associated with the incidence of ESRD during follow-up ($0.006<p<0.03$). In the SURGENE study, the incidence of renal events was associated with polymorphisms rs11646213 (HR 1.69, 95% CI 1.01-2.71, $p=0.04$) and rs3865188 (HR 0.74, 95% CI 0.55-0.99, $p=0.04$).

Conclusion: Plasma adiponectin levels are associated with the prevalence of DN and the incidence of ESRD in patients with type 1 diabetes. *CDH13* polymorphisms, associated with plasma adiponectin levels, were also associated with prevalence and incidence of DN, and with incidence of ESRD in patients with type 1 diabetes.

Introduction

Diabetic Nephropathy (DN) is a major vascular complication in type 1 diabetic patients leading to end-stage renal disease (ESRD) [1]. Nowadays, half the patients with type 1 diabetes develop nephropathy, which increases mortality risk [2]. Various genetic factors modulate susceptibility to renal disease [3,4].

Adiponectin is an adipokine mainly secreted by adipocytes, with anti-inflammatory, anti-atherogenic and insulin-sensitizing properties [5]. Nevertheless, its plasma levels are increased in patients with type 1 diabetes [6–8]. Baseline plasma adiponectin was higher in patients with type 1 diabetes who developed nephropathy in the SURGENE prospective study [9]. In patients with type 1 diabetes and DN, adiponectin was predictive of end stage renal disease incidence [10]. However, adiponectin levels may decrease in early stages of nephropathy and increase in more advanced stages [11]. In subjects with type 2 diabetes as well as type 1 diabetes, polymorphisms of the gene coding for adiponectin, *ADIPOQ*, associated with high adiponectin levels, were also associated with an increased risk of nephropathy [12,13].

T-cadherin is a cell adhesion protein anchored to cell membrane with a glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) anchor. It is deprived of its transmembrane segment, but still takes part in cellular signal cascades contributing in cell-cell adhesion, cell polarity and morphogenesis actions [14,15]. T-cadherin is highly expressed in renal arteries [16]. It is expressed abundantly in injured vascular endothelial cells [14]. T-cadherin shares its location with adiponectin at the injured vessel site [17,18]. The coexistence of both molecules at the vascular endothelium is necessary for their action on revascularization [19]. Their colocalization on cardiomyocytes seems also critical for the cardioprotective action of adiponectin [18]. In genome wide association studies (*GWAS*), plasma adiponectin levels are associated not only with *ADIPOQ* polymorphisms, but also with T-cadherin gene (*CDH13*) polymorphisms [20,21]. T-cadherin selectively binds high-molecular-weight (HMW) and medium-molecular-weight (MMW) adiponectin but it remains unclear whether T-cadherin is a receptor for adiponectin [14,17]. T-cadherin might act as a co-receptor for adiponectin receptors Adipo R1 and/or Adipo R2, or a still unknown receptor [18].

Given the relationship between adiponectin and DN on one side and between T-cadherin and adiponectin on another side, the aim of our study was to assess the relation

between *CDH13* polymorphisms and DN in subjects with type 1 diabetes, in relationship with plasma adiponectin concentrations.

Material and Methods

Participants

We studied three cohorts designed to evaluate the genetic components of diabetic nephropathy.

The GENESIS France-Belgium Study and the “Génétique de la Néphropathie Diabétique” (GENEDIAB) study were cross-sectional, multi-centre, binational (Belgium and France) studies. GENESIS was family-based, including 662 probands with type 1 diabetes and presenting with diabetic retinopathy [23]. We studied 501 probands for whom DNA samples were available, including 279 individuals (55.7%) with diagnosis of incipient, established or advanced diabetic nephropathy. GENEDIAB included 456 patients with type 1 diabetes and diagnosis of severe diabetic retinopathy [24]. Incipient, established or advanced diabetic nephropathy was present in 310 individuals (69.8%). In a prospective observational study, a subset of GENEDIAB (n=229) and GENESIS (n=456) participants were followed-up for 9 ± 3 and 6 ± 3 years, respectively. The incidence during follow-up of new cases of ESRD, defined as requirement of renal replacement therapy, was 11.4% for GENEDIAB and 5.5% for GENESIS. All participants from the three cohorts gave written informed consent and study protocols were approved by the ethics committee of the University Hospital of Angers, France.

The “Survival Genetic Nephropathy” (SURGENE) was a prospective study conducted in 340 subjects with type 1 diabetes, recruited consecutively over a 3-year period in the outpatient clinic of the University Hospital of Angers, France [25]. At baseline, 60 individuals (17.6%) had a diagnosis of incipient, established or advanced diabetic nephropathy (see below). Mean duration of follow-up was 10 ± 3 years. New cases of incipient nephropathy (persistent microalbuminuria in consecutive biannual assessments) during follow-up were observed in 76 out of the 280 normoalbuminuric subjects at baseline (27.1%). A renal event, defined as new cases of incipient nephropathy or progression to a more severe stage of nephropathy, was observed in 98 (28.8%) participants during the follow-up. At the end of the study 136 individuals (40%) had diagnosis of incipient, established or advanced diabetic nephropathy.

Diabetic nephropathy and retinopathy stages

Stages of diabetic nephropathy were defined as follows: no nephropathy, defined as urinary albumin excretion (UAE) <30 mg/24 h or <20 µg/min or <20 mg/l and plasma creatinine <150 µmol/l in at least two of three consecutive assessments and in the absence of antihypertensive treatment; incipient nephropathy, defined as persistent microalbuminuria (UAE = 30–300 mg/24 h or 20–200 µg/min or 20–200 mg/l) and plasma creatinine <150 µmol/l in at least two of three consecutive assessments; established nephropathy, defined as past or present macroalbuminuria (UAE>300 mg/24 h or >200 µg/min or >200 mg/l) and plasma creatinine <150 µmol/l; and advanced nephropathy, defined as past or present macroalbuminuria and plasma creatinine >150 µmol/l or renal replacement therapy. Estimation of the glomerular filtration rate (eGFR) was computed with the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) formula [26]. Retinopathy was staged according to Kohner's classification as non-proliferative, pre-proliferative or proliferative retinopathy.

Adiponectin measurements

Total adiponectin was measured in fasting plasma EDTA samples of 928 subjects of GENESIS and GENEDIAB cohorts. Samples were collected at baseline and kept frozen at -80°C. An ELISA kit from Alpco[®], Salem, United States (47-ADPHUT-E01) was used.

Genotyping

Two single nucleotide polymorphisms (SNP) in the promoter region of *CDH13* (chromosome 16q23.3) were selected based on previous studies showing association with adiponectin levels and/or other metabolic traits [20,21,27]. Genotypes were determined by competitive allele-specific PCR genotyping system assays (KASP, LGC Genomics, Hoddesdon, UK). Genotyping success rate was higher than 97%. Genotypes were in Hardy-Weinberg equilibrium (Pearson's chi-squared test with 1 degree of freedom $p>0.05$).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SD except where stated otherwise. For all analyses of quantitative parameters, data were log-transformed when the normality of the distribution was rejected by the Shapiro-Wilk W test. Differences between groups were assessed by Pearson's

chi-squared test, Fisher's exact test, ANOVA and ANCOVA. Associations with DN were assessed by regression models. Cox proportional hazards survival regression analyses were used to examine the effect of explanatory variables on time-related survival rates in prospective analyses. Logistic regression analysis was used for cross-sectional analysis. Hazard ratios (HR) or odds ratios (OR), respectively, with their 95% confidence intervals (CI) were computed in these analyses for the minor alleles. To increase statistical power, GENEDIAB and GENESIS cohorts were pooled for genetic analyses, with appropriate covariate adjustments to take into account cohort differences. In all cohorts, individuals with established or advanced nephropathy were also pooled for genetic analyses. The statistical analyses were adjusted for age, sex, duration of diabetes, BMI and, when applicable, cohort membership. To take into account differences in diabetic retinopathy status in different cohorts resulting from different inclusion criteria, all comparisons of diabetic nephropathy by genotype included adjustment for retinopathy stages. Correction for multiple comparisons due to multiple SNP testing took into account the effective number of independent tests (Meff) based on the degree of linkage disequilibrium between SNPs [0.50]. Therefore a value of $p \leq 0.033$ was considered significant for genotype-related comparisons, unless stated otherwise. The tests concerning polymorphisms correspond to the best fitting models of inheritance according to descriptive statistics (additive, dominant or recessive). The power to detect associations of the SNPs ($MAF \geq 0.30$) with the prevalence of established/advanced nephropathy at baseline and with the incidence of ESRD during follow-up in GENESIS/GENEDIAB pooled analyses, and with the prevalence of established/advanced nephropathy and the incidence of renal events during follow-up in SURGENE was at least equal to 0.99, 0.88, 0.51, and 0.75 respectively, for odds ratio or hazard ratio=1.5 and $\alpha=0.05$. Statistics were performed with the JMP software (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Results

GENESIS and GENEDIAB cohorts: renal status and adiponectin levels

The prevalences of incipient and established or advanced diabetic nephropathy at baseline in GENESIS and GENEDIAB pooled cohorts were 22.3% and 40%, respectively. Characteristics of participants with or without nephropathy were published previously [3].

The cumulative incidence of ESRD during follow-up was 7.4% (N=51) in the pooled cohorts. Clinical characteristics of participants at baseline by ESRD status at follow-up were published previously [4]. Briefly, new cases of ESRD as compared to patients without ESRD were younger, had shorter duration of diabetes, higher levels of HbA1c, blood pressure and UAE, decreased renal function, and were more often taking antihypertensive treatment (Table 1).

At baseline, the median values (interquartile range 0.25-0.75) of plasma adiponectin levels for absent, incipient and established/advanced nephropathy were 7.1 (4.8-10.5) $\mu\text{g/mL}$, 7.5 (5.0-11.0) $\mu\text{g/mL}$ and 11.3 (7.5-16.9) $\mu\text{g/mL}$, respectively. These differences were significant ($p=0.02$ and $p<0.0001$ incipient vs. absent and established/advanced vs. absent, respectively).

Plasma adiponectin levels were associated with the incidence of ESRD ($p<0.0001$). The median values of plasma adiponectin levels for the subjects that did not develop ESRD during follow-up compared to those who developed it were 7.5 (4.9-11.0) $\mu\text{g/mL}$ and 16.2 (10.4-22.9) $\mu\text{g/mL}$, respectively. After adjustment for nephropathy status at baseline, the association remained significant.

GENESIS and GENEDIAB cohorts: association of CDH13 polymorphisms with adiponectin levels and renal traits

The distribution of plasma adiponectin levels by genotype for each polymorphism are illustrated in Table 2. In GENESIS and GENEDIAB pooled cohorts, plasma adiponectin levels were significantly associated with rs3865188, where the holders of the minor allele A had lower plasma adiponectin levels ($p=0.006$). There was no significant association of plasma adiponectin levels with rs11646213.

Genotype frequencies by diabetic nephropathy stages at baseline are shown in Table 3. We observed a positive association of the minor allele A of rs11646213 (OR 1.47, 95% CI 1.18-1.85, $p=0.0009$) and inverse association of the minor allele A of rs3865188 with the prevalence of established/advanced nephropathy at baseline (OR 0.71, 95% CI 0.57-0.90, $p=0.004$). These results are in keeping with genotype-related prevalences of established/advanced nephropathy: 31.9% (TT), 39.1% (TA) and 45% (AA) for rs11646213, and 40.3% (TT), 37.6% (TA) and 28.2% (AA) for rs3865188. Subjects carrying the rs11646213 A allele had also a higher diastolic blood pressure ($p=0.01$) and a higher rate of urinary albumin excretion ($p=0.01$). Those with the genotype AA of rs3865188 had lower levels of UAE ($p=0.04$).

The polymorphisms were associated with ESRD at follow-up (Table 4). The cumulative incidence of ESRD during follow-up by genotype was 7.4% (TT), 5.3% (TA) and 12.8% (AA) for rs11646213. It was 11.5% (TT), 4.6% (TA) and 7.7% (AA) for rs3865188. Cox proportional hazards survival analyses confirmed these associations: HR 1.96, 95% CI 1.06-3.51, $p=0.03$ for the A-allele of rs11646213, HR 0.47, 95% CI 0.27-0.84, $p=0.009$ for the A-allele of rs3865188 (Figure 1).

When adjusted for plasma adiponectin levels, the associations of rs3865188 with the prevalence of established/advanced nephropathy and the incidence of ESRD were no more significant.

SURGENE cohort: association of CDH13 SNPs with renal phenotypes

The cumulative incidence of renal events (new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy) during follow-up was 28.8 % (n=98). Characteristics of participants at baseline by incidence of renal events during follow-up were published previously [3] and are summarized in Table 1. Briefly, individuals who presented a renal event, as compared to those with stable renal status during follow-up, had at baseline a longer duration of diabetes, higher HbA1c, triglycerides and blood pressure levels, decreased renal function, and were more often taking ACE inhibitors and antihypertensive medication. Diabetic retinopathy was more frequent and severe in individuals who presented a renal event.

Genotype frequencies by renal event status during follow-up are shown in Table 5. The incidence of renal events during follow-up by genotype was 30.6% (TT), 27.2% (TA) and 44.4% (AA) for rs11646213 suggesting a positive association of the minor A-allele with renal events. It was 38.5% (TT), 29.4% (TA) and 21.7% (AA) for rs3865188, suggesting an inverse association of the minor A-allele in an additive model. Cox proportional hazards regression analysis confirmed the positive association of A-allele of rs11646213 (HR 1.69, 95% CI 1.01-2.71, $p=0.04$) and the inverse association of the A-allele of rs3865188 (HR 0.74, 95% CI 0.55-0.99, $p=0.04$) with renal events (Figure 2).

Discussion

In the present study, we observed associations of adiponectin levels with the prevalence and the incidence of diabetic nephropathy and ESRD in cohorts of subjects with type 1 diabetes.

We observed associations of *CDH13* polymorphisms with the prevalence of established/advanced DN, the incidence of ESRD, and with urinary excretion of albumin and diastolic blood pressure in GENESIS and GENEDIAB cohorts. These genetic associations were validated in SURGENE, another cohort of subjects with type 1 diabetes, where we observed an association between these polymorphisms and the progression of DN during follow-up.

Our results on adiponectin levels are in agreement with many studies showing higher levels in diabetic nephropathy. In particular, we have previously shown that high adiponectin levels precede nephropathy in type 1 diabetes in the SURGENE cohort [9]. Nevertheless, the mechanism behind the relationship between plasma adiponectin and nephropathy remains unclear. Renal failure *per se* may lead to the stimulation of adiponectin production as a physiological counter-regulatory response to restrict endothelial damage [28]. It may also decrease adiponectin clearance [29], and the kidney may develop secondary resistance to adiponectin [30]. However, the prospective design of the present study, and of some of the previous ones are in favor of a causal relationship. At discrepancy with this hypothesis, higher adiponectin levels were associated with lower urinary albumin excretion rates at an early stage of the disease [31]. Sharma *et al.* have shown in obese Afro-American subjects, without diabetes and kidney disease, that albuminuria had negative correlation with plasma adiponectin [32]. Adiponectin also reduced albuminuria and improved podocyte function by reduction of oxidative stress in a mouse model [32]. On the other hand, at an advanced stage of the disease, higher plasma adiponectin levels were associated with a more severe chronic nephropathy [33] and a higher risk of nephropathy aggravation [12].

In GWAS, *CDH13* polymorphisms alleles have been associated with variations in plasma adiponectin levels [21,34]. As in GWAS, the minor allele of rs3865188, in our study, was also associated with lower plasma adiponectin levels [34]. After adjustment for plasma adiponectin levels, the association of *CDH13* rs3865188 with renal traits was no more significant. Therefore, it is tempting to consider that the relationship between *CDH13* polymorphisms and diabetic nephropathy is mediated by plasma adiponectin levels. Our results are in favour of a deleterious role of plasma adiponectin in diabetic nephropathy. Previously, we had also shown that two *ADIPOQ* variants, associated with high adiponectin levels, were also predictive of the occurrence of DN in type 2 diabetic subjects [12]. The same *ADIPOQ* SNPs have also been associated with nephropathy in subjects with type 1 diabetes [13].

T-cadherin deficient mice have very high plasma adiponectin levels, but develop a cardiomyopathy as a result of lack of binding of adiponectin at the tissue level [18]. It has been shown that T-cadherin was primarily responsible for binding and localizing adiponectin to skeletal muscle tissue, to vascular endothelium and to myocardium [19]. It would appear that about 75% of the organism's total adiponectin is bound to tissue via a T-cadherin dependent mechanism [35]. Therefore, we might suppose that the *CDH13* alleles associated with lower levels of adiponectin might be also associated, whatever the mechanism, with a higher expression of t-cadherin and an increased tissue binding of adiponectin. Such a relationship has already been described [36]. In this case, a decrease in adiponectin levels would correspond to a higher binding and thus a higher adiponectin uptake. If adiponectin had a deleterious effect on kidney, the *CDH13* rs3865188 A allele associated with lower levels in plasma, but putative higher bound adiponectin, should be associated with a higher risk of nephropathy. Since we observed the opposite, this would mean that adiponectin might be deleterious for kidney, but without binding to T-cadherin. Another hypothesis is that the relationship between *CDH13* variants and plasma adiponectin is modified by type 1 diabetes. Actually, in another study on the D.E.S.I.R. cohort from the general population, the rs3865188 A was associated with high plasma levels of adiponectin and the rs11646213 A with low levels [37]. This latter variant is not associated with plasma adiponectin in the present study.

Until causal effects are studied for such associations, we could not rule out the hypothesis that T-cadherin might also act independently from adiponectin in the kidney. T-cadherin has a functional role for the differentiation of podocytes and the formation of the glomerular capillary network [38]. *CDH13* genetic variations might have a role at this level. At baseline, the variants rs11646213 and rs3865188 were associated with the prevalence of DN and also with the urinary albumin excretion. The genotype associated with a more severe nephropathy is also associated with higher levels of urinary albumin excretion. This might suggest a role of T-cadherin on kidney disease through albumin.

The minor allele A of rs11646213 was associated with higher diastolic blood pressure in a pooled GENESIS and GENEDIAB cross-sectional analysis at baseline. The same results were observed in a GWAS conducted in two European populations [20]. T-cadherin regulates vascular wall remodelling and angiogenesis [16]. Renal arteries impairment, leading to microalbuminuria, is a major cause of secondary hypertension, and might be linked to *CDH13* genetic variations.

To our knowledge, this is the first time that T-cadherin gene polymorphisms are studied in subjects with type 1 diabetes at risk of developing renal diseases. The main strengths of our study are the detailed phenotype assessment of renal function during follow-up in the three cohorts, the number of subjects included in the study, as well as the validation of our findings in independent study groups. The variants studied are within the promoter and the first intron of *CDH13*. They might be associated with the gene expression. The plasma levels of adiponectin have been measured, nevertheless, the plasma T-cadherin have not been measured in these cohorts [39]. This measurement would allow us better evaluate the relationship between these proteins and the occurrence of DN in subjects with type 1 diabetes.

In conclusion, genetic variants of *CDH13*, were associated with the prevalence and the incidence of DN in subjects with type 1 diabetes, as well as with the progression to a more severe stage of this pathology and the incidence of ESRD. Future studies are needed to test whether these associations depend on changes in adiponectin levels.

Table 1. Characteristics of participants at baseline by clinical outcomes during follow-up.

	SURGENE cohort: Renal event during follow-up			GENESIS and GENEDIAB cohorts: ESRD during follow-up		
	No	Yes	p	No	Yes	p
N	242	98		634	51	
Age (y)	33 ± 13	35 ± 14	0.24	44 ± 12	39 ± 11	0.002
Sex: Men/Women (%)	46 / 54	36 / 64	0.08	55 / 45	56 / 44	0.89
Age at diabetes onset (y)	19 ± 10	18 ± 9	0.50	16 ± 9	14 ± 9	0.09
Duration of diabetes (y)	14 ± 11	17 ± 11	0.001	28 ± 9	25 ± 10	0.04
HbA _{1c} (%) (mmol/mol)	9.2 ± 2.3 (77 ± 25)	9.7 ± 2.3 (82 ± 26)	0.04	8.5 ± 1.4 (69 ± 16)	9.1 ± 1.9 (77 ± 21)	0.009
Systolic blood pressure (mmHg)	124 ± 14	134 ± 18	<0.0001	132 ± 18	151 ± 19	<0.0001
Diastolic blood pressure (mmHg)	72 ± 10	75 ± 12	0.002	75 ± 10	88 ± 11	<0.0001
Plasma creatinine (µmol/l)	79 ± 20	88 ± 30	0.001	87 ± 37	212 ± 137	<0.0001
eGFR (ml/min/1.73 m ²)	98 ± 23	91 ± 26	0.01	92 ± 44	46 ± 47	<0.0001
Urinary albumin excretion (mg/l)	7 (9)	10 (13)	0.001	15 (85)	1689 (2201)	<0.0001
ACE Inhibitor treatment (%)	6	16	0.002	38	64	0.0003
Antihypertensive treatment (%)	8	26	<0.0001	49	85	<0.0001
Diabetic retinopathy stages (%)	67 / 14 / 12 / 7	45 / 18 / 17 / 20	0.0002	0 / 34 / 18 / 48	0 / 7 / 16 / 77	<0.0001

Results expressed as means ± SD, except UAE expressed as median and interquartile range. Statistics of quantitative parameters are ANOVA performed with log-transformed data, or Wilcoxon test (UAE). HbA_{1c} is expressed in % of total hemoglobin and in mmol/mol (millimoles HbA_{1c} per mole of total hemoglobin). Diabetic retinopathy stages: Absence, Non-Proliferative, Pre-Proliferative, Proliferative. Renal event (SURGENE cohort) defined as a new case of microalbuminuria or the progression to a more severe stage of nephropathy. ESRD (GENESIS and GENEDIAB cohorts) defined as requirement of renal replacement therapy.

Table 2. Plasma Adiponectin Levels at Baseline by Genotype

		Plasma Adiponectin Levels*($\mu\text{g/mL}$)	p [†]
rs11646213	TT	8.4 (5.4-12.5)	0.98
	TA	8.3 (5.3-12.6)	
	AA	8.3 (5.3-11.8)	
rs3865188	TT	8.6 (5.7-12.4)	0.006
	TA	8.2 (5.2-12.8)	
	AA	7.8 (4.9-12.0)	

MAF: minor allele frequency. $p \leq 0.05$ is significant. Test are ANCOVA adjusted for sex, age, duration of diabetes, BMI, retinopathy and cohort membership

* values are median (interquartile range 0.25-0.75)

[†] p-value for recessive model for rs3865188 (AA vs. Tx) and dominant model for rs11646213 and rs3865188 (TT vs. xA)

Table 3. GENESIS-GENEDIAB pooled study: genotype frequencies by prevalence of diabetic nephropathy at baseline

		Absence of nephropathy (n=356)	Incipient nephropathy (n=211)	Established and advanced nephropathy (n=378)	OR [†] (95% C.I.) for incipient nephropathy	p [†]	OR [‡] (95% C.I.) for established and advanced nephropathy	p [‡]
rs1164621 3	TT	0.34	0.38	0.27	1.11 (0.86-1.43)	0.43	1.47 (1.18-1.85)	0.0009
	TA	0.52	0.38	0.50				
	AA	0.14	0.24	0.23				
	MAF	0.40	0.43	0.48				
rs3865188	TT	0.28	0.38	0.37	0.80 (0.63-1.03)	0.08	0.71 (0.57-0.90)	0.004
	TA	0.51	0.40	0.49				
	AA	0.21	0.22	0.14				
	MAF	0.47	0.42	0.39				

MAF: minor allele frequency.

Tests are logistic regression adjusted for sex, age, duration of diabetes, BMI, retinopathy stages and cohort membership.

[†] p-value and odds-ratios for absence of nephropathy versus incipient nephropathy and the minor allele in recessive mode for rs11646213 (AA vs. Tx) and dominant model for rs3865188 (TT vs. xA)

[‡] p-value and odds-ratios for absence of nephropathy versus established or advanced nephropathy and the minor allele in recessive mode for rs11646213 (AA vs. Tx) and dominant model for rs3865188 (TT vs. xA)

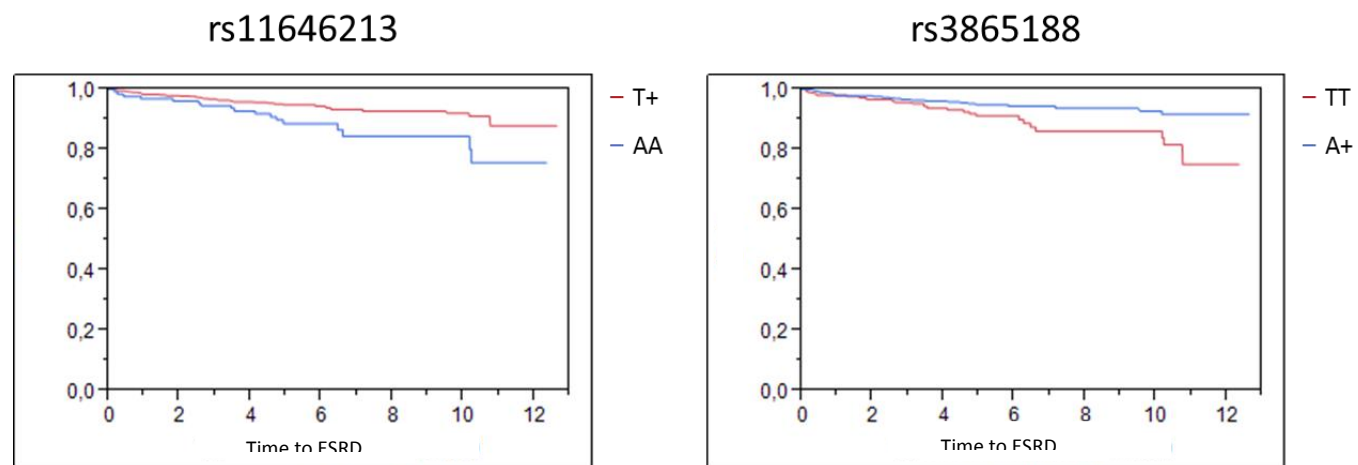
Table 4. GENESIS-GENEDIAB pooled study: genotype frequencies by incidence of End Stage Renal Disease during follow-up

		End Stage Renal Disease			
	Genotype	Yes	No	HR (95% IC)*	p*
rs11646213	N	49	601	1.96 (1.06 – 3.51)	0.03
	TT	0.33	0.33		
	TA	0.33	0.48		
	AA	0.34	0.19		
	MAF	0.51	0.43		
rs3865188	N	49	607	0.47 (0.27 – 0.84)	0.01
	TT	0.51	0.32		
	TA	0.29	0.48		
	AA	0.20	0.20		
	MAF	0.35	0.44		

Cox proportional hazards survival regressive model, adjusted for sex, age, duration of diabetes BMI, retinopathy stages and cohort membership. MAF: minor allele frequency.

*Hazard ratio for the minor allele in a recessive model for rs11646213 and a dominant model for rs3865188

Figure 1. Kaplan-Meier survival (ESRD event-free) curve during follow-up in the GENESIS-GENEDIAB pooled cohorts by CDH13 rs11646213 and rs3865188 genotypes.



Y-axis represents the absence of an incidence of an End Stage Renal Disease.

The cumulative incidence of ESRD during follow-up by genotype was 7.4% (TT), 5.3% (TA) and 12.8% (AA) for rs11646213. It was 11.5% (TT), 4.6% (TA) and 7.7% (AA) for rs3865188

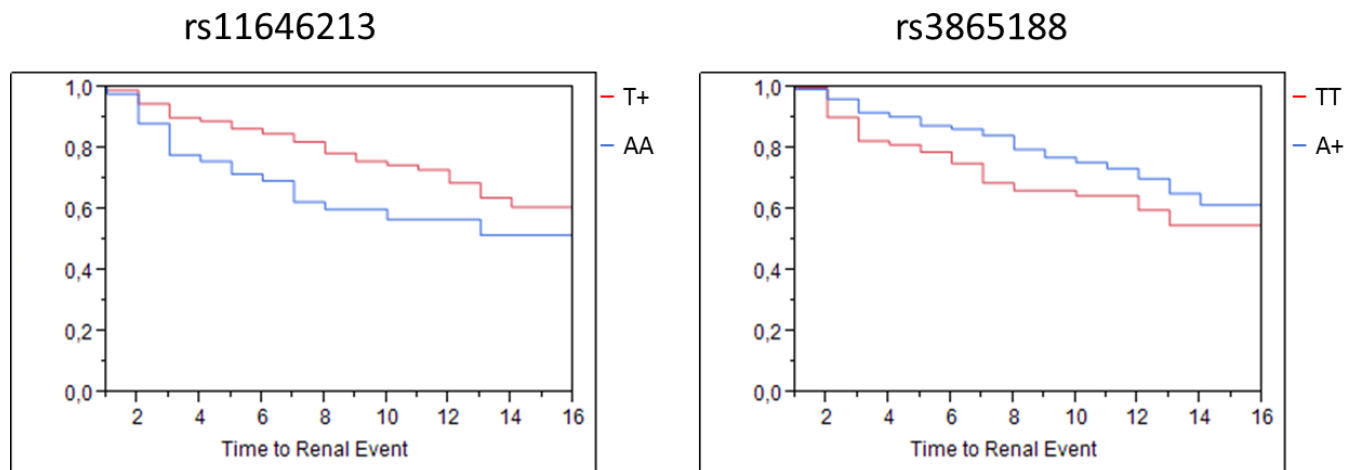
Table 5. SURGENE study: genotype frequencies by incidence of renal events during follow-up

Polymorphism		Renal events at follow-up			
		Yes (n=98)	No (n=242)	HR (95% IC) [*]	p
rs11646213	TT	0.34	0.34	1.69 (1.01-2.71)	0.04
	TA	0.43	0.52		
	AA	0.23	0.14		
	MAF	0.45	0.40		
rs3865188	TT	0.38	0.27	0.74 (0.55-0.99)	0.04
	TA	0.46	0.49		
	AA	0.16	0.24		
	MAF	0.39	0.49		

Cox proportional hazards survival regressive model, adjusted for sex, age, duration of diabetes, BMI and retinopathy stages. MAF: minor allele frequency.

*Hazard ratio for the minor allele in a recessive model for rs11646213 and in an additive model for rs3865188

Figure 2. Kaplan-Meier survival (renal event-free) curve during follow-up in the SURGENE cohort by CDH13 rs11646213 and rs3865188 genotypes.



Y-axis represents the absence of renal events defined as new cases of microalbuminuria or progression to a more severe stage of nephropathy.

References

- [1] Gregg EW, Li Y, Wang J, Burrows NR, Ali MK, Rolka D, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990-2010. *N Engl J Med* 2014;370:1514–23. doi:10.1056/NEJMoa1310799.
- [2] Orchard TJ, Secrest AM, Miller RG, Costacou T. In the absence of renal disease, 20 year mortality risk in type 1 diabetes is comparable to that of the general population: a report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2010;53:2312–9. doi:10.1007/s00125-010-1860-3.
- [3] Mohammadi K, Maimaitiming S, Emery N, Bellili-Muñoz N, Roussel R, Fumeron F, et al. Allelic variations in superoxide dismutase-1 (SOD1) gene are associated with increased risk of diabetic nephropathy in type 1 diabetic subjects. *Mol Genet Metab* 2011;104:654–60. doi:10.1016/j.ymgme.2011.08.033.
- [4] Patente TA, Mohammadi K, Bellili-Muñoz N, Driss F, Sanchez M, Fumeron F, et al. Allelic variations in the CYBA gene of NADPH oxidase and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2015;86:16–24. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.002.
- [5] Stefan N, Stumvoll M. Adiponectin--its role in metabolism and beyond. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme* 2002;34:469–74. doi:10.1055/s-2002-34785.
- [6] Randeve HS, Vatish M, Tan BK, Qureshi Z, Boovalingam P, Lewandowski KC, et al. Raised plasma adiponectin levels in type 1 diabetic pregnancies. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;65:17–21. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02536.x.
- [7] Heilman K, Zilmer M, Zilmer K, Kool P, Tillmann V. Elevated plasma adiponectin and decreased plasma homocysteine and asymmetric dimethylarginine in children with type 1 diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69:85–91. doi:10.1080/00365510802419454.
- [8] Mannucci E, Ognibene A, Cremasco F, Dicembrini I, Bardini G, Brogi M, et al. Plasma adiponectin and hyperglycaemia in diabetic patients. *Clin Chem Lab Med* 2003;41:1131–5. doi:10.1515/CCLM.2003.175.
- [9] Hadjadj S, Aubert R, Fumeron F, Pean F, Tichet J, Roussel R, et al. Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects. *Diabetologia* 2005;48:1088–92. doi:10.1007/s00125-005-1747-x.
- [10] Jorsal A, Tarnow L, Frystyk J, Lajer M, Flyvbjerg A, Parving H-H, et al. Serum adiponectin predicts all-cause mortality and end stage renal disease in patients with type I diabetes and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008;74:649–54. doi:10.1038/ki.2008.201.
- [11] Sweiss N, Sharma K. Adiponectin effects on the kidney. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28:71–9. doi:10.1016/j.beem.2013.08.002.
- [12] Jaziri R, Aubert R, Roussel R, Emery N, Maimaitiming S, Bellili N, et al. Association of ADIPOQ genetic variants and plasma adiponectin isoforms with the risk of incident renal events in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2231–7. doi:10.1093/ndt/gfp771.
- [13] Vionnet N, Tregouët D, Kazeem G, Gut I, Groop P-H, Tarnow L, et al. Analysis of 14 candidate genes for diabetic nephropathy on chromosome 3q in European populations: strongest evidence for association with a variant in the promoter region of the adiponectin gene. *Diabetes* 2006;55:3166–74. doi:10.2337/db06-0271.
- [14] Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y, Furihata M. Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. *Med Mol Morphol* 2007;40:115–20. doi:10.1007/s00795-007-0364-9.
- [15] Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Pfaff D, Erne P, Resink TJ. A guide and guard: the many faces of T-cadherin. *Cell Signal* 2009;21:1035–44.
- [16] Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochem Biokhimiia* 2001;66:1174–86.
- [17] Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10308–13. doi:10.1073/pnas.0403382101.

- [18] Denzel MS, Scimia M-C, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* 2010;120:4342–52. doi:10.1172/JCI43464.
- [19] Parker-Duffen JL, Nakamura K, Silver M, Kikuchi R, Tigges U, Yoshida S, et al. T-cadherin is essential for adiponectin-mediated revascularization. *J Biol Chem* 2013;288:24886–97. doi:10.1074/jbc.M113.454835.
- [20] Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet* 2009;18:2288–96. doi:10.1093/hmg/ddp135.
- [21] Chung C-M, Lin T-H, Chen J-W, Leu H-B, Yang H-C, Ho H-Y, et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on CDH13 that predicts cardiometabolic outcomes. *Diabetes* 2011;60:2417–23. doi:10.2337/db10-1321.
- [22] Parker-Duffen JL, Walsh K. Cardiometabolic effects of adiponectin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28:81–91. doi:10.1016/j.beem.2013.09.001.
- [23] Hadjadj S, Péan F, Gallois Y, Passa P, Aubert R, Weekers L, et al. Different patterns of insulin resistance in relatives of type 1 diabetic patients with retinopathy or nephropathy: the Genesis France-Belgium Study. *Diabetes Care* 2004;27:2661–8.
- [24] Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, et al. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 1997;99:1585–95.
- [25] Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, et al. Prognostic Value of Angiotensin-I Converting Enzyme I/D Polymorphism for Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus: A Prospective Study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:541–9.
- [26] Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med* 1999;130:461–70.
- [27] Fava C, Danese E, Montagnana M, Sjögren M, Almgren P, Guidi GC, et al. A variant upstream of the CDH13 adiponectin receptor gene and metabolic syndrome in Swedes. *Am J Cardiol* 2011;108:1432–7. doi:10.1016/j.amjcard.2011.06.068.
- [28] Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Schram MT, Fuller JH, Stehouwer CDA, EURODIAB Prospective Complications Study Group. Adiponectin is inversely associated with renal function in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:129–35. doi:10.1210/jc.2005-1117.
- [29] Saraheimo M, Forsblom C, Fagerudd J, Teppo A-M, Pettersson-Fernholm K, Frystyk J, et al. Serum adiponectin is increased in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care* 2005;28:1410–4.
- [30] Kollerits B, Fliser D, Heid IM, Ritz E, Kronenberg F, MMKD Study Group. Gender-specific association of adiponectin as a predictor of progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *Kidney Int* 2007;71:1279–86. doi:10.1038/sj.ki.5002191.
- [31] Yano Y, Hoshida S, Ishikawa J, Hashimoto T, Eguchi K, Shimada K, et al. Differential impacts of adiponectin on low-grade albuminuria between obese and nonobese persons without diabetes. *J Clin Hypertens Greenwich Conn* 2007;9:775–82.
- [32] Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1645–56. doi:10.1172/JCI32691.
- [33] Iwashima Y, Horio T, Kumada M, Suzuki Y, Kihara S, Rakugi H, et al. Adiponectin and renal function, and implication as a risk of cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2006;98:1603–8. doi:10.1016/j.amjcard.2006.07.039.
- [34] Jo J, Sull JW, Park EJ, Jee SH. Effects of smoking and obesity on the association between CDH13 (rs3865188) and adiponectin among Korean men: the KARE study. *Obes Silver Spring Md* 2012;20:1683–7. doi:10.1038/oby.2011.128.
- [35] Matsuda K, Fujishima Y, Maeda N, Mori T, Hirata A, Sekimoto R, et al. Positive feedback regulation between adiponectin and T-cadherin impacts adiponectin levels in tissue and plasma of male mice. *Endocrinology* 2015;156:934–46. doi:10.1210/en.2014-1618.

- [36] Gao H, Kim Y-M, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes* 2013;62:4277–83. doi:10.2337/db13-0129.
- [37] Nicolas A, Aubert R, Bellili-Muñoz N, Balkau B, Bonnet F, Tichet J, et al. T-cadherin gene variants are associated with type 2 diabetes and the Fatty Liver Index in the French population. *Diabetes Metab* 2016. doi:10.1016/j.diabet.2016.05.005.
- [38] Arnemann J, Sultani O, Hasgün D, Coerdts W. T-/H-cadherin (CDH13): a new marker for differentiating podocytes. *Virchows Arch Int J Pathol* 2006;448:160–4. doi:10.1007/s00428-005-0055-7.
- [39] Pfaff D, Schoenenberger AW, Dasen B, Erne P, Resink TJ, Philippova M. Plasma T-cadherin negatively associates with coronary lesion severity and acute coronary syndrome. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2014. doi:10.1177/2048872614557229.

Données complémentaires :

Polymorphismes du gène de l'adiponectine (*ADIPOQ*) et néphropathie dans le diabète de type 1

Chez des sujets diabétiques de type 2 ainsi que chez des sujets diabétiques de type 1, les polymorphismes du gène codant pour l'adiponectine, *ADIPOQ*, associés à des taux élevés d'adiponectine, sont aussi associés à un risque augmenté de néphropathie [216,247]. Nous avons étudié l'association des polymorphismes 11391G>A et 45T>G du gène de l'adiponectine, *ADIPOQ*, avec la néphropathie dans une étude prospective chez des sujets diabétiques de type 1 (GENESIS-GENEDIAB) où les concentrations d'adiponectine sont mesurées. Cette étude fait suite à une étude précédente du laboratoire dans une population de sujets porteurs du diabète de type 2, DIABHYCAR [216].

L'allèle rare A du 11391G>A est associé à des concentrations d'adiponectine plus élevées ($p=0,0006$). L'allèle rare G de 45T>G montre une tendance pour une adiponectinémie plus élevée, sans atteindre le seuil de significativité. Les allèles rares de 11391G>A (Odds-Ratio (OR) 1,77 IC95% [1,16-2,73], $p=0,008$) et 45T>G (OR 1,43 [1,09-1,85], $p=0,007$) sont associés à la prévalence de la néphropathie établie et/ou avancée. L'incidence d'un événement rénal, défini par un nouveau cas de néphropathie diabétique ou la progression à un stade plus avancé de la maladie, par génotype, est 24,2% (GG), 31,9% (GA), 0% (AA) pour le 11391G>A et 23,2% (TT), 24,2% (TG), 53,9% (GG) pour le 45T>G. Ceci suggère une association positive de l'allèle rare avec l'incidence d'un événement rénal. Le modèle de Cox ajusté confirme ces associations pour le 11391G>A (HR 1,79 [1,09-2,83], $p=0,02$) et le 45T>G (HR 1,41 [1,06-1,85], $p=0,02$). Le polymorphisme 45T>G est associé à l'incidence de la maladie rénale terminale avec un HR 2,08 [1,33-3,20] ($p=0,001$). Le polymorphisme 11391G>A n'est pas significativement associé à l'incidence de la maladie rénale terminale. Les allèles mineurs sont associés aussi à une excrétion urinaire d'albumine plus élevée pour 1139G>A ($p=0,001$) et 45T>G ($p=0,004$). Après ajustement sur l'adiponectinémie, ces associations disparaissent, suggérant leur dépendance à la concentration d'adiponectine circulante.

Nos résultats montrent que les allèles associés à une adiponectinémie plus élevée sont aussi associés à un stade plus avancé de la néphropathie diabétique dans le diabète de type 1. Ceci est en faveur d'un rôle délétère de l'adiponectine plasmatique vis-à-vis de la néphropathie diabétique. Des associations similaires sont déjà décrites dans le diabète de type 2 [216].

Discussion et perspectives

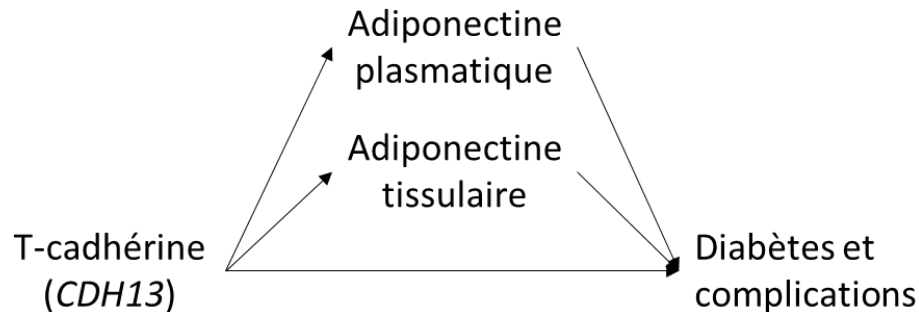
Dans ce travail, nous sommes partis de l'hypothèse que la T-cadhérine, protéine membranaire de liaison ou récepteur à l'adiponectine, modulerait les effets métaboliques de celle-ci. Les polymorphismes du gène de la T-cadhérine, *CDH13*, très associés aux variations des concentrations plasmatiques de l'adiponectine seraient impliqués dans ce processus. De ce fait, notre première hypothèse proposait l'adiponectine circulante comme phénotype intermédiaire entre les variations génétiques étudiées et le phénotype principal, les diabètes et leurs complications, comme représenté dans le schéma.



Dans le diabète type 2, nos travaux montrent des associations de ces polymorphismes avec les différents phénotypes de telle manière que, lorsque l'adiponectine plasmatique est élevée, la prévalence du diabète de type 2, l'IMC et l'indice de stéatose hépatique sont plus bas. Ces résultats vont dans le sens d'un effet protecteur de l'adiponectine plasmatique, mais dans ce genre d'étude, la causalité ne peut être démontrée. Dans notre étude sur la néphropathie dans le diabète de type 1, les résultats du dosage d'adiponectine et des associations avec les polymorphismes vont dans le sens où une adiponectine plasmatique élevée est associée au risque de néphropathie.

La mise en évidence d'une résistance à l'adiponectine provoquée par l'absence de T-cadhérine comme dans les souris T-cadhérine-KO nous pousse à émettre une deuxième hypothèse dans laquelle l'utilisation de l'adiponectine au niveau tissulaire, par l'intermédiaire de la T-cadhérine, serait le facteur causal. Ceci nous amène à une différenciation entre adiponectine plasmatique circulante et adiponectine tissulaire. Par exemple, puisque la T-cadhérine n'est pas exprimée dans le foie, l'effet des polymorphismes de *CDH13* à ce niveau serait dépendant de l'adiponectine circulante. Enfin on ne peut pas exclure l'hypothèse d'un effet indépendant de la T-cadhérine, non expliqué par les variations d'adiponectine circulante ou son utilisation tissulaire. Bien qu'elle soit dépourvue de domaine intracellulaire, la T-cadhérine participe à la signalisation cellulaire par liaison homophile [251]. Des microparticules détachées de la membrane plasmique d'une cellule transportent la T-

cadhérine dans la circulation pour se lier à une T-cadhérine tissulaire par liaison homophile et transmettre l'information biologique d'une cellule à l'autre (homotypique ou hétérotypique) [251]. Notre hypothèse initiale prend plutôt la forme représentée ci-dessous.



Selon ce schéma, trois hypothèses sont proposées pour expliquer les associations phénotypiques des polymorphismes de *CDH13*. Nos études montrent que ces relations pourraient dépendre aussi du phénotype étudié. Les polymorphismes de *CDH13* affecteraient des voies métaboliques différentes selon le tissu et la maladie. Ceci a été montré dans des modèles animaux. Dans l'asthme, par exemple, les souris T-cadhérine-KO ont moins de réactions allergiques, parce que l'adiponectine circulante agit sur des voies de signalisation différentes de celle de la T-cadhérine [252]. Par ailleurs, dans le cœur, la T-cadhérine est indispensable à l'action cardioprotectrice de l'adiponectine tissulaire [188].

Nos résultats sur le diabète de type 2 vont dans le sens d'un rôle bénéfique de l'adiponectine circulante sur la maladie. Cependant, quand l'adiponectine circulante s'élève, l'adiponectine utilisée au niveau tissulaire par l'intermédiaire de la T-cadhérine diminuerait. Cela montre que dans la résistance à l'insuline et le diabète de type 2, l'influence de l'adiponectine circulante est prépondérante, et pas celle utilisée par le tissu au niveau de la T-cadhérine, puisque toute la littérature semble montrer que l'adiponectine plasmatisque protège du diabète de type 2 [228,253]. D'autre part, dans le diabète de type 1, l'adiponectine plasmatisque est corrélée positivement à la néphropathie. De plus, une adiponectinémie élevée précède la survenue de l'événement rénal, ce qui est en faveur d'un rapport de causalité et suggère un effet délétère de l'adiponectine plasmatisque. Une hypothèse alternative serait une résistance à l'adiponectine (moins d'adiponectine captée et utilisée au niveau du tissu). Dans ce cas, l'adiponectine serait aussi bénéfique, et sa rareté au niveau tissulaire aboutirait au développement de la maladie. L'association du variant de *CDH13* avec une adiponectine plasmatisque diminuée et un risque diminué serait un argument en faveur d'un effet bénéfique

de l'adiponectine tissulaire au niveau rénal. Cependant, les variants d'*ADIPOQ*, associés à une élévation d'adiponectine, mais par un effet transcriptionnel, augmentent le risque de néphropathie. Ceci est un argument plutôt en faveur d'un effet délétère de l'adiponectine plasmatique. De plus, comme discuté ci-dessous, la relation des variants de *CDH13* avec l'adiponectine plasmatique pourrait être modifiée par le diabète de type 1. Le sens « vrai » de leur relation avec l'adiponectine du plasma pourrait être une diminution des concentrations plasmatiques dans le cas de l'allèle mineur du rs11646213 et une augmentation pour le rs3865188, comme observé dans la population générale D.E.S.I.R.. Dans ce cas, puisque l'utilisation de l'adiponectine tissulaire varie en sens inverse de l'adiponectine plasmatique, l'utilisation de l'adiponectine au niveau tissulaire par l'intermédiaire de la T-cadhérine serait délétère.

Par ailleurs, nous émettons aussi l'hypothèse d'un effet direct de la T-cadhérine, impliquée dans la phase terminale du développement des podocytes [191], et indépendant de l'adiponectine. Cette hypothèse est renforcée par l'association des variants de *CDH13* avec l'élimination urinaire d'albumine, symptôme rénal étroitement lié à un développement podocytaire déficient. Les effets des polymorphismes de *CDH13* sur les différents phénotypes disparaissent après ajustement sur l'adiponectine circulante. Ceci semble impliquer que les associations observées dépendent de l'adiponectinémie. En fait, la forte association de l'adiponectinémie à ces phénotypes (diabète type 1, néphropathie) pourrait masquer un éventuel effet indépendant de ces variants sur les phénotypes étudiés.

Contradictions

Nos résultats semblent présenter des contradictions. Tout d'abord, l'association d'un polymorphisme de *CDH13* avec l'adiponectine plasmatique est inversée entre, d'une part, les sujets diabétiques de type 1, et, d'autre part, la population générale et les diabétiques de type 2. L'adiponectine circulante est fortement associée positivement au diabète de type 1. Les facteurs habituels de modification des concentrations d'adiponectine, comme l'insuline plasmatique, l'IMC et le contrôle glycémique, n'influencent pas cette association [67]. Cet effet inverse pourrait être dû à l'insuline exogène dans le traitement du diabète de type 1 qui influence la sécrétion de l'adiponectine du tissu adipeux. L'effet de l'insuline exogène sur l'adiponectinémie dans la vie courante chez les diabétiques de type 1 pourrait être important, compte tenu de doses répétées quotidiennement et de leur état métabolique instable. L'augmentation de l'adiponectine plasmatique sous l'effet du diabète de type 1 pourrait

dominer celui des polymorphismes de *CDH13* (comme évoqué plus haut), et expliquer les associations inverses observées entre les deux études.

Une interaction spécifique entre le gène *CDH13* et le diabète de type 1 sur les méthylations de l'ADN pourrait aussi expliquer les différences entre les associations observées dans les différentes cohortes étudiées. Comme nous l'avons déjà évoqué, les polymorphismes étudiés sont en déséquilibre de liaison avec d'autres SNPs affectant la méthylation, un facteur influençant l'expression du gène d'un côté, et la pathogenèse de la maladie d'un autre [254]. La méthylation de l'ADN au niveau du promoteur du gène joue un rôle important dans la régulation de la transcription, souvent d'une manière spécifique au tissu et à la maladie [255]. De telles associations sont décrites pour le promoteur du gène de l'insuline où la méthylation pourrait influencer différemment son rôle dans la physiopathologie du diabète de type 1 et du diabète de type 2 [256]. Ainsi, l'association inverse dans les 2 études entre variant *CDH13* et adiponectine pourrait être due à des différences d'expression de *CDH13* provoquées par des méthylations différentes sous l'effet du diabète de type 1.

Une autre discordance apparente dans nos résultats concerne les associations observées avec la néphropathie diabétique chez les sujets diabétiques de type 1, mais non chez les diabétiques de type 2. Une première explication est le plus grand nombre d'événements dans les cohortes de type 1 que dans la cohorte de diabétiques de type 2, ce qui est en faveur d'une meilleure puissance statistique. Une autre possibilité concerne les caractéristiques des patients. En terme de physiopathologie, les lésions rénales sont identiques entre les diabétiques de type 1 et de type 2. Mais dans nos cohortes, les sujets diabétiques de type 1 sont atteints depuis plus longtemps et de ce fait, sont à un état plus avancé de la maladie. De plus, dans la cohorte DIABHYCAR des patients de type 2, les patients sous insuline étaient exclus, donc les patients les plus gravement atteints.

Perspectives

Dans notre étude d'association génétique par une approche gène-candidat, nous avons sélectionné des polymorphismes localisés dans la région du promoteur du gène de la T-cadhérine, associée aux variations des concentrations de l'adiponectine et aux effets métaboliques. D'autres polymorphismes au niveau d'autres régions du gène *CDH13*, obtenus à partir de données de METABOCHIP dans l'étude D.E.S.I.R. (données laboratoire CNRS-UMR8199, Philippe Froguel, communication personnelle) ne répliquaient pas nos associations et celles publiées, confirmant l'intérêt du promoteur de *CDH13*. De ce fait,

d'autres polymorphismes au niveau du promoteur devraient être étudiés de façon à couvrir toute la variabilité génétique à ce niveau. La région du promoteur de *CDH13* est riche en îlots CpG, cibles de méthylation pouvant moduler l'effet du gène en affectant la transcription, exemple, ce qui met en avant la nécessité d'étudier cet aspect en relation avec les polymorphismes étudiés en particulier, et la région du promoteur en général. L'expression du gène *CDH13* par dosage d'ARNm, en plus du dosage de T-cadhérine (en cours), en fonction des polymorphismes, et en relation avec la concentration d'adiponectine circulante et les phénotypes cliniques serait particulièrement éclairante.

Une autre manière d'explorer les mécanismes responsables de ces associations est de conduire des études expérimentales dans des modèles animaux, murins par exemple. L'étude de l'effet de la T-cadhérine dans le rein chez la souris, dans un modèle d'ischémie-reperfusion rénale en comparant des souris sauvages à des souris où le gène de la T-cadhérine ou celui de l'adiponectine sont invalidés, comme l'étude effectuée par Denzel et al. sur le cœur [188], permettrait d'évaluer une relation de coopération éventuelle entre ces 2 protéines au niveau rénal, et l'effet délétère ou bénéfique de cette relation. Ces résultats sur le rein pourraient être comparés avec les résultats des études sur le cœur afin de confirmer nos hypothèses. Les résultats de ces études *in vivo* pourraient nous orienter vers de nouvelles cibles thérapeutiques.

Concernant les mécanismes en jeu, nous avons évoqué, dans l'article concernant le diabète de type 2 et l'indice de stéatose hépatique, la relation entre l'adiponectine et la voie des céramides. Dans le cadre d'une collaboration internationale, notre laboratoire participe à une étude lipidomique axée sur les céramides dans le développement de l'intolérance au glucose et du diabète de type 2. Ainsi nous pourrions étudier les relations entre *CDH13*, céramides et développement de la NASH et du diabète de type 2 dans la cohorte D.E.S.I.R.

Nous avons montré que les polymorphismes du gène de la T-cadhérine, associés aux variations des concentrations plasmatiques d'adiponectine, sont aussi associés, principalement, au diabète de type 2, à l'IMC et à la néphropathie diabétique. Ces associations ne démontrent pas un lien de causalité. Les études d'observation classique dans la relation entre un facteur de risque et une maladie aboutissent parfois à des résultats contradictoires, comme dans ce travail. Cela est dû à des facteurs de confusion. L'impossibilité de montrer la causalité à partir des résultats d'études d'observation classiques empêche de savoir si un facteur de risque spécifique peut être une cible appropriée pour les traitements futurs. Une solution consiste à effectuer une analyse de randomisation

mendélienne, qui utilise la variation génétique comme un marqueur de substitution pour le facteur de risque [257]. L'établissement d'un modèle fiable et correct de randomisation mendélienne requiert de prendre en compte d'abord la taille de l'échantillon étudié, ce qui explique le fait que la plupart des études de randomisation mendélienne sont des méta-analyses, puis le déséquilibre de liaison entre les variants, la fonction du gène, les problèmes de stratification des populations et les interactions gène-environnement [258]. Le diabète de type 2 est une maladie complexe constituant un fardeau économique et social considérable et nous avons une compréhension relativement limitée de sa pathophysiologie sous-jacente. Des études observationnelles ont mis en évidence un grand nombre de facteurs de risque de diabète de type 2, dont certains sont modifiables grâce à l'intervention comportementale ou pharmacologique. Déterminer lequel de ces facteurs de risque joue un rôle causal dans le développement de cette maladie est un défi. Des études de randomisation mendélienne exploitent les données génétiques dans les études de population pour offrir de nouvelles perspectives en répondant aux questions de causalité liées au diabète de type 2 [259]. La randomisation mendélienne ne peut être utilisée que s'il existe une relation solide entre le variant génétique et le facteur de risque, si le variant génétique n'est pas associé à d'autres facteurs qui confondent la relation entre le facteur de risque et la maladie et si l'effet du variant génétique sur la maladie passe seulement par le facteur de risque, et non par d'autres mécanismes biologiques. Dans l'association avec la néphropathie diabétique, nous n'avons pas pu appliquer la randomisation mendélienne parce que nous ne disposons pas des résultats du dosage de la T-cadhérine, protéine codée par le gène étudié. Nous avons les dosages de l'adiponectine circulante, fortement associée aux polymorphismes étudiés, mais n'est pas directement codée par ce gène, ce qui constitue un handicap pour ce type d'analyse. En fait, l'adiponectine, comme la T-cadhérine, pourrait constituer une cible thérapeutique. Nous pensons que la voie métabolique associant l'adiponectine à la T-cadhérine pourrait être une voie d'intérêt pour de futurs traitements pour le diabète et/ou ses complications.

La relation entre la T-cadhérine et l'adiponectine pourrait être étudiée dans d'autres contextes. Dans une étude récente sur le rôle de l'adiponectine dans la thermogenèse [260], l'exposition chronique au froid conduit à une production élevée d'adiponectine dans les adipocytes du tissu adipeux blanc sous-cutané, qui se lie ensuite aux macrophages M2 dans le stroma vasculaire. L'accumulation des macrophages M2 induite par une exposition chronique au froid, l'activation des cellules beige et le programme thermogénique sont altérés dans le tissu adipeux blanc sous-cutané des souris adiponectine-KO, mais ces déficiences sont annulées par

l'administration d'adiponectine. L'adiponectine est recrutée à la surface cellulaire des macrophages M2 par l'intermédiaire de son partenaire de liaison, la T-cadhérine, et favorise la prolifération cellulaire par l'activation de la voie Akt, conduisant à l'activation des cellules de tissu adipeux brun [260]. Cette découverte présente l'adiponectine comme une protéine clé dans le phénomène de thermogénèse. Le tissu adipeux brun est un dépôt de graisse spécialisé dans la production de chaleur et l'augmentation de la dépense énergétique. L'expansion et/ou l'activation du tissu adipeux brun entraîne une augmentation des dépenses d'énergie et un bilan énergétique négatif et limite le gain de poids chez les souris [261]. Le tissu adipeux brun est aussi capable d'utiliser le glucose sanguin et de lipides et se traduit par une amélioration du métabolisme du glucose et des lipides dans le sang indépendamment de la perte de poids [261]. L'adipocyte beige, qui provient de l'évolution par activation thermogénique du tissu adipeux blanc, est d'origine différente des adipocytes bruns classiques mais les deux partagent une teneur élevée en mitochondries, une expression élevée d'UCP1 et une capacité thermogénique, une fois activé. L'activation du tissu adipeux brun est devenue une cible thérapeutique attrayante pour le traitement de l'obésité et du syndrome métabolique. Les thiazolidinediones, agonistes de PPAR γ , sont utilisés comme sensibilisateurs à l'insuline dans le traitement du diabète de type 2. Les thiazolidinediones augmentent l'adiponectine et ont un rôle dans l'expansion du tissu adipeux brun, mais présentent des effets indésirables cardiovasculaires qui ont abouti à leur interdiction en France. La voie adiponectine-Tcadhérine, activant le tissu adipeux brun, et cardioprotectrice, constituerait un substitut et/ou un complément à ce traitement, pouvant éviter les complications cardiovasculaires.

L'adiponectine est une protéine très attrayante d'un point de vue thérapeutique compte tenu ces effets bénéfiques, particulièrement dans les maladies métaboliques et cardiovasculaires. C'est une protéine insulinosensibilisatrice, anti-athérogène et anti-inflammatoire, exerçant ces effets principalement par les voies AMPK et PPAR. Plusieurs facteurs, dont les coûts de production, se sont opposés à sa production et à son utilisation en clinique. Cependant, AdipoRon, un agoniste des récepteurs AdipoR1 et AdipoR2 de l'adiponectine administré par voie orale, a été récemment utilisé [262]. Dans une étude d'ischémie/reperfusion cardiaque, AdipoRon améliore la fonction cardiaque et diminue l'apoptose des cardiomyocytes en phase post-ischémique [263]. Cet agoniste agit aussi en l'absence d'adiponectine endogène, et témoigne d'un effet, atténué cependant, en l'absence d'AMPK. Cette dernière observation indique que les effets bénéfiques passent aussi par d'autres voies métaboliques que l'AMPK. Cet agoniste court-circuiterait donc le passage par la T-cadhérine montré par Denzel *et al.*

[190]. En effet, chez les souris, la T-cadhérine, agissant comme co-récepteur, est indispensable à l'action cardioprotectrice de l'adiponectine à travers ses récepteurs AdipoR1 et AdipoR2, mais aussi pour l'activation de la voie AMPK [188]. Des études supplémentaires seront nécessaires pour tester si l'induction directe d'AdipoR1 et AdipoR2 ne masquerait pas une partie de l'effet de l'adiponectine médié par la T-cadhérine, et mieux comprendre la place de la voie adiponectine-Tcadhérine dans le traitement de maladies métaboliques et cardiovasculaire. On pourrait imaginer une comparaison avec un agoniste de la T-cadhérine, ou avec une molécule d'adiponectine s'associant sélectivement à la T-cadhérine. La voie T-cadhérine-adiponectine pourrait constituer une nouvelle cible thérapeutique dans le traitement du diabète, mais une évaluation précise des effets bénéfiques et délétères liés à cette voie reste indispensable, puisque nos résultats, comme ceux d'autres études [188,198,199,203,260] montrent que des effets dans les deux directions peuvent être observés.

Aujourd'hui, il existe pour de nombreuses maladies comme le diabète et ses complications, une bibliographie riche, diverse et en expansion continue permettant l'identification de gènes et de localisations chromosomiques d'intérêt. Cette bibliographie inclue des études d'association pangénomique (GWAS), des approches gène-candidat et des recherches sur la pathogenèse de la maladie. Les GWAS permettent aux chercheurs d'avoir un panel large de gènes et de régions génomiques à étudier d'une façon approfondie. Nous nous sommes basés sur des données de GWAS où nous avons sélectionné des variants d'intérêt potentiel au niveau d'un gène cible afin de conduire une étude gène-candidat. Le GWAS est un puissant outil explorant de nouveaux loci impliqués dans des pathologies complexes, mais ne couvre pas, dans le cas de maladies, tous les phénotypes potentiels, toutes les interactions gène-environnement possibles ni tous les modèles génétiques. De ce fait, la réplification de nos résultats dans d'autres populations est essentielle [264]. L'identification des catégories fonctionnelles de gènes candidats dérivant des études GWAS peuvent aboutir à une meilleure compréhension de leurs conséquences fonctionnelles et pourraient être utiles pour l'identification d'autres facteurs de risque génétiques de ces maladies [265]. L'analyse séparée de ces facteurs de risque ou leur intégration dans notre modèle statistique nous amène à mieux comprendre les mécanismes de ces associations et rajoutera une pièce dans le puzzle, qu'est la maladie complexe multifactorielle, dans l'espoir de pouvoir un jour aboutir à une image complète de ces pathologies.

Références

- [1] OMS | Diabète. WHO n.d. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/fr/> (accessed March 1, 2016).
- [2] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global Prevalence of Diabetes Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047–53. doi:10.2337/diacare.27.5.1047.
- [3] Qu'est-ce que le diabète ? Type 2, type 1, définition, symptômes, causes, traitements, complications... Diabète - Assoc Fr Diabét - AFD n.d. <http://www.afd.asso.fr/videoembarquee/qu-est-ce-que-le-diabete-video-d-animation> (accessed March 1, 2016).
- [4] Role of Cardiovascular Risk Factors in Prevention and Treatment of Macrovascular Disease in Diabetes. *Diabetes Care* 1993;16:72–8. doi:10.2337/diacare.16.2.72.
- [5] Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D, Group TMRFITR. Diabetes, Other Risk Factors, and 12-Yr Cardiovascular Mortality for Men Screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434–44. doi:10.2337/diacare.16.2.434.
- [6] Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA, Kelley JL, Cayatte AJ, Rozek MM. Pathogenesis of the Atherosclerotic Lesion: Implications for diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1992;15:1156–67. doi:10.2337/diacare.15.9.1156.
- [7] Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:937–42.
- [8] Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, et al. Diabetes and Cardiovascular Disease A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association. *Circulation* 1999;100:1134–46. doi:10.1161/01.CIR.100.10.1134.
- [9] Control TD, Group CTR. The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977–86. doi:10.1056/NEJM199309303291401.
- [10] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787–90. doi:10.1038/35008121.
- [11] Hansson GK. Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685–95. doi:10.1056/NEJMra043430.
- [12] Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer H-G, Löwel H, Döring A, et al. C-Reactive Protein, a Sensitive Marker of Inflammation, Predicts Future Risk of Coronary Heart Disease in Initially Healthy Middle-Aged Men Results From the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 1999;99:237–42. doi:10.1161/01.CIR.99.2.237.
- [13] Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006;64:355–65. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x.
- [14] Libby P. Atherosclerosis: Disease Biology Affecting the Coronary Vasculature. *Am J Cardiol* 2006;98:S3–9. doi:10.1016/j.amjcard.2006.09.020.

- [15] Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000;148:209–14. doi:10.1016/S0021-9150(99)00463-3.
- [16] Caballero AE, Arora S, Saouaf R, Lim SC, Smakowski P, Park JY, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes* 1999;48:1856–62.
- [17] OMS | Obésité et surpoids. WHO n.d. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/> (accessed March 1, 2016).
- [18] Björntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care* 1991;14:1132–43.
- [19] Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 2009;360:1509–17. doi:10.1056/NEJMoa0810780.
- [20] Frontini A, Cinti S. Distribution and Development of Brown Adipocytes in the Murine and Human Adipose Organ. *Cell Metab* 2010;11:253–6. doi:10.1016/j.cmet.2010.03.004.
- [21] Deng Y, Scherer PE. Adipokines as novel biomarkers and regulators of the metabolic syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 2010;1212:E1–19. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05875.x.
- [22] Larson-Meyer DE, Newcomer BR, Ravussin E, Volaufova J, Bennett B, Chalew S, et al. Intrahepatic and intramyocellular lipids are determinants of insulin resistance in prepubertal children. *Diabetologia* 2010;54:869–75. doi:10.1007/s00125-010-2022-3.
- [23] Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2010;17:446–52. doi:10.1097/MED.0b013e32833c3026.
- [24] Boirie Y. Obésité: physiopathologie et conséquences. *Urgences* 2009, 2009.
- [25] Bagdade JD, Bierman EL, Porte D. The significance of basal insulin levels in the evaluation of the insulin response to glucose in diabetic and nondiabetic subjects. *J Clin Invest* 1967;46:1549–57. doi:10.1172/JCI105646.
- [26] Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. β -Cell Deficit and Increased β -Cell Apoptosis in Humans With Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2003;52:102–10. doi:10.2337/diabetes.52.1.102.
- [27] Klöppel G, Löhner M, Habich K, Oberholzer M, Heitz PU. Islet Pathology and the Pathogenesis of Type 1 and Type 2 Diabetes mellitus Revisited. *Pathol Immunopathol Res* 1985;4:110–25. doi:10.1159/000156969.
- [28] Polonsky KS, Given BD, Hirsch L, Shapiro ET, Tillil H, Beebe C, et al. Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1988;81:435–41.
- [29] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840–6. doi:10.1038/nature05482.
- [30] Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segrè AV, Steinthorsdottir V, et al. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2012;44:981–90. doi:10.1038/ng.2383.
- [31] DIAbetes Genetics Replication And Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium, Asian Genetic Epidemiology Network Type 2 Diabetes (AGEN-T2D) Consortium, South Asian Type 2 Diabetes (SAT2D) Consortium, Mexican American Type 2 Diabetes (MAT2D) Consortium, Type 2 Diabetes Genetic Exploration by Nex-generation sequencing in multi-Ethnic Samples (T2D-GENES) Consortium, Mahajan A, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet* 2014;46:234–44. doi:10.1038/ng.2897.

- [32] Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, et al. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nat Genet* 2010;42:579–89. doi:10.1038/ng.609.
- [33] Kooner JS, Saleheen D, Sim X, Sehmi J, Zhang W, Frossard P, et al. Genome-wide association study in individuals of South Asian ancestry identifies six new type 2 diabetes susceptibility loci. *Nat Genet* 2011;43:984–9. doi:10.1038/ng.921.
- [34] Cho YS, Chen C-H, Hu C, Long J, Ong RTH, Sim X, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies eight new loci for type 2 diabetes in east Asians. *Nat Genet* 2012;44:67–72. doi:10.1038/ng.1019.
- [35] Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Sulem P, Helgason H, Grarup N, Sigurdsson A, et al. Identification of low-frequency and rare sequence variants associated with elevated or reduced risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 2014;46:294–8. doi:10.1038/ng.2882.
- [36] Ma RCW, Hu C, Tam CH, Zhang R, Kwan P, Leung TF, et al. Genome-wide association study in a Chinese population identifies a susceptibility locus for type 2 diabetes at 7q32 near PAX4. *Diabetologia* 2013;56:1291–305. doi:10.1007/s00125-013-2874-4.
- [37] Fumeron F. Genetics of the human obesities. *Obésité* 2013;8:22–33. doi:10.1007/s11690-013-0357-x.
- [38] Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, Lamina C, Steinthorsdottir V, Qi L, et al. Genome-Wide Association Scan Meta-Analysis Identifies Three Loci Influencing Adiposity and Fat Distribution. *PLOS Genet* 2009;5:e1000508. doi:10.1371/journal.pgen.1000508.
- [39] Scherag A, Dina C, Hinney A, Vatin V, Scherag S, Vogel CIG, et al. Two New Loci for Body-Weight Regulation Identified in a Joint Analysis of Genome-Wide Association Studies for Early-Onset Extreme Obesity in French and German Study Groups. *PLOS Genet* 2010;6:e1000916. doi:10.1371/journal.pgen.1000916.
- [40] Bogardus C. Missing Heritability and GWAS Utility. *Obesity* 2009;17:209–10. doi:10.1038/oby.2008.613.
- [41] Hu E, Liang P, Spiegelman BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 1996;271:10697–703.
- [42] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem* 1995;270:26746–9.
- [43] Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K. cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 1996;221:286–9. doi:10.1006/bbrc.1996.0587.
- [44] Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T, Tomita M. Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem (Tokyo)* 1996;120:803–12.
- [45] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and Adiponectin Receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439–51. doi:10.1210/er.2005-0005.
- [46] Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired Multimerization of Human Adiponectin Mutants Associated with Diabetes MOLECULAR STRUCTURE AND MULTIMER FORMATION OF ADIPONECTIN. *J Biol Chem* 2003;278:40352–63. doi:10.1074/jbc.M300365200.
- [47] Fruebis J, Tsao T-S, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MRS, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci* 2001;98:2005–10. doi:10.1073/pnas.98.4.2005.

- [48] Breitfeld J, Stumvoll M, Kovacs P. Genetics of adiponectin. *Biochimie* 2012;94:2157–63. doi:10.1016/j.biochi.2012.03.004.
- [49] Liu M, Liu F. Transcriptional and post-translational regulation of adiponectin. *Biochem J* 2010;425:41–52. doi:10.1042/BJ20091045.
- [50] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;257:79–83.
- [51] Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1595–9.
- [52] Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA* 2004;291:1730–7. doi:10.1001/jama.291.14.1730.
- [53] Mantzoros CS, Li T, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4542–8. doi:10.1210/jc.2005-0372.
- [54] Li S, Shin H, Ding EL, van Dam RM. Adiponectin levels and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2009;302:179–88. doi:10.1001/jama.2009.976.
- [55] Sweiss N, Sharma K. Adiponectin effects on the kidney. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28:71–9. doi:10.1016/j.beem.2013.08.002.
- [56] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2006;6:772–83. doi:10.1038/nri1937.
- [57] Waki H, Yamauchi T, Kamon J, Ito Y, Uchida S, Kita S, et al. Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes. Molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem* 2003;278:40352–63. doi:10.1074/jbc.M300365200.
- [58] Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2006;188:231–44. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.02.010.
- [59] Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, et al. Complex Distribution, Not Absolute Amount of Adiponectin, Correlates with Thiazolidinedione-mediated Improvement in Insulin Sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:12152–62. doi:10.1074/jbc.M311113200.
- [60] Pajvani UB, Hawkins M, Combs TP, Rajala MW, Doebber T, Berger JP, et al. Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:12152–62. doi:10.1074/jbc.M311113200.
- [61] Tonelli J, Li W, Kishore P, Pajvani UB, Kwon E, Weaver C, et al. Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1621–9.
- [62] Halperin F, Beckman JA, Patti ME, Trujillo ME, Garvin M, Creager MA, et al. The role of total and high-molecular-weight complex of adiponectin in vascular function in offspring whose parents both had type 2 diabetes. *Diabetologia* 2005;48:2147–54. doi:10.1007/s00125-005-1901-5.
- [63] Aso Y, Yamamoto R, Wakabayashi S, Uchida T, Takayanagi K, Takebayashi K, et al. Comparison of serum high-molecular weight (HMW) adiponectin with total adiponectin concentrations in type 2 diabetic patients with coronary artery disease

- using a novel enzyme-linked immunosorbent assay to detect HMW adiponectin. *Diabetes* 2006;55:1954–60. doi:10.2337/db05-1525.
- [64] Kobayashi H, Ouchi N, Kihara S, Walsh K, Kumada M, Abe Y, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin. *Circ Res* 2004;94:e27-31. doi:10.1161/01.RES.0000119921.86460.37.
- [65] Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K, Maeda N, Kuriyama H, Nagaretani H, et al. Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 2002;51:2734–41.
- [66] Xu A, Chan KW, Hoo RLC, Wang Y, Tan KCB, Zhang J, et al. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem* 2005;280:18073–80. doi:10.1074/jbc.M414231200.
- [67] Abi Khalil C, Mohammedi K, Aubert R, Abou Jaoude E, Travert F, Hadjadj S, et al. Hyperadiponectinemia is independent of kidney function, diabetes duration, and control in type 1 diabetic patients without microangiopathy. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E485-487. doi:10.1210/jc.2010-1835.
- [68] Blümer RME, van Roomen CP, Meijer AJ, Houben-Weerts JHPM, Sauerwein HP, Dubbelhuis PF. Regulation of adiponectin secretion by insulin and amino acids in 3T3-L1 adipocytes. *Metabolism* 2008;57:1655–62. doi:10.1016/j.metabol.2008.07.020.
- [69] Hadjadj S, Aubert R, Fumeron F, Pean F, Tichet J, Roussel R, et al. Increased plasma adiponectin concentrations are associated with microangiopathy in type 1 diabetic subjects. *Diabetologia* 2005;48:1088–92. doi:10.1007/s00125-005-1747-x.
- [70] Saraheimo M, Forsblom C, Fagerudd J, Teppo A-M, Pettersson-Fernholm K, Frystyk J, et al. Serum adiponectin is increased in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care* 2005;28:1410–4.
- [71] Looker HC, Krakoff J, Funahashi T, Matsuzawa Y, Tanaka S, Nelson RG, et al. Adiponectin concentrations are influenced by renal function and diabetes duration in Pima Indians with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4010–7. doi:10.1210/jc.2003-031916.
- [72] Tentolouris N, Doulgerakis D, Moysakis I, Kyriaki D, Makrilakis K, Kosmadakis G, et al. Plasma adiponectin concentrations in patients with chronic renal failure: relationship with metabolic risk factors and ischemic heart disease. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme* 2004;36:721–7. doi:10.1055/s-2004-826022.
- [73] Becker B, Kronenberg F, Kielstein JT, Haller H, Morath C, Ritz E, et al. Renal insulin resistance syndrome, adiponectin and cardiovascular events in patients with kidney disease: the mild and moderate kidney disease study. *J Am Soc Nephrol JASN* 2005;16:1091–8. doi:10.1681/ASN.2004090742.
- [74] Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Benedetto FA, Cutrupi S, Parlongo S, et al. Adiponectin, metabolic risk factors, and cardiovascular events among patients with end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol JASN* 2002;13:134–41.
- [75] Ignacy W, Chudek J, Adamczak M, Funahashi T, Matsuzawa Y, Kokot F, et al. Reciprocal association of plasma adiponectin and serum C-reactive protein concentration in haemodialysis patients with end-stage kidney disease--a follow-up study. *Nephron Clin Pract* 2005;101:c18-24. doi:10.1159/000085707.
- [76] Guebre-Egziabher F, Bernhard J, Funahashi T, Hadj-Aissa A, Fouque D. Adiponectin in chronic kidney disease is related more to metabolic disturbances than to decline in renal function. *Nephrol Dial Transplant Off Publ Eur Dial Transpl Assoc - Eur Ren Assoc* 2005;20:129–34. doi:10.1093/ndt/gfh568.

- [77] Stenvinkel P, Heimbürger O, Jogestrand T. Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: association with *Chlamydia pneumoniae* seropositivity. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2002;39:274–82. doi:10.1053/ajkd.2002.30546.
- [78] Díez JJ, Iglesias P, Fernández-Reyes MJ, Aguilera A, Bajo MA, Alvarez-Fidalgo P, et al. Serum concentrations of leptin, adiponectin and resistin, and their relationship with cardiovascular disease in patients with end-stage renal disease. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;62:242–9. doi:10.1111/j.1365-2265.2005.02207.x.
- [79] Kadowaki T, Hara K, Yamauchi T, Terauchi Y, Tobe K, Nagai R. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Exp Biol Med Maywood NJ* 2003;228:1111–7.
- [80] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–6. doi:10.1038/90984.
- [81] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Imai Y, Shimozawa N, Hioki K, et al. Globular Adiponectin Protected ob/ob Mice from Diabetes and ApoE-deficient Mice from Atherosclerosis. *J Biol Chem* 2003;278:2461–8. doi:10.1074/jbc.M209033200.
- [82] Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 1998;273:16710–4.
- [83] Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest* 1999;103:1489–98. doi:10.1172/JCI6223.
- [84] Barbier O, Torra IP, Duguay Y, Blanquart C, Fruchart J-C, Glineur C, et al. Pleiotropic actions of peroxisome proliferator-activated receptors in lipid metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:717–26.
- [85] Tsuchida A, Yamauchi T, Takekawa S, Hada Y, Ito Y, Maki T, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha activation increases adiponectin receptors and reduces obesity-related inflammation in adipose tissue: comparison of activation of PPARalpha, PPARgamma, and their combination. *Diabetes* 2005;54:3358–70.
- [86] Yoon MJ, Lee GY, Chung J-J, Ahn YH, Hong SH, Kim JB. Adiponectin increases fatty acid oxidation in skeletal muscle cells by sequential activation of AMP-activated protein kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Diabetes* 2006;55:2562–70. doi:10.2337/db05-1322.
- [87] Woods A, Cheung PC, Smith FC, Davison MD, Scott J, Beri RK, et al. Characterization of AMP-activated protein kinase beta and gamma subunits. Assembly of the heterotrimeric complex in vitro. *J Biol Chem* 1996;271:10282–90.
- [88] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288–95. doi:10.1038/nm788.
- [89] Combs TP, Pajvani UB, Berg AH, Lin Y, Jelicks LA, Laplante M, et al. A transgenic mouse with a deletion in the collagenous domain of adiponectin displays elevated circulating adiponectin and improved insulin sensitivity. *Endocrinology* 2004;145:367–83. doi:10.1210/en.2003-1068.
- [90] Minokoshi Y, Kim Y-B, Peroni OD, Fryer LGD, Müller C, Carling D, et al. Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 2002;415:339–43. doi:10.1038/415339a.
- [91] Tsao T-S, Tomas E, Murrey HE, Hug C, Lee DH, Ruderman NB, et al. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. *Different*

- oligomers activate different signal transduction pathways. *J Biol Chem* 2003;278:50810–7. doi:10.1074/jbc.M309469200.
- [92] Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:171–6. doi:10.1172/JCI10583.
- [93] Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. *Nat Med* 2001;7:941–6. doi:10.1038/90984.
- [94] Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 2002;8:1288–95. doi:10.1038/nm788.
- [95] Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, Ebbets-Reed D, Erickson MR, Yen FT, et al. Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:2005–10. doi:10.1073/pnas.041591798.
- [96] Berg AH, Combs TP, Scherer PE. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2002;13:84–9.
- [97] Daval M, Fougelle F, Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol* 2006;574:55–62. doi:10.1113/jphysiol.2006.111484.
- [98] Salmenniemi U, Zacharova J, Ruotsalainen E, Vauhkonen I, Pihlajamäki J, Kainulainen S, et al. Association of adiponectin level and variants in the adiponectin gene with glucose metabolism, energy expenditure, and cytokines in offspring of type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4216–23. doi:10.1210/jc.2004-2289.
- [99] Fu Y, Luo N, Klein RL, Garvey WT. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J Lipid Res* 2005;46:1369–79. doi:10.1194/jlr.M400373-JLR200.
- [100] Ruan H, Dong LQ. Adiponectin signaling and function in insulin target tissues. *J Mol Cell Biol* 2016;8:101–9. doi:10.1093/jmcb/mjw014.
- [101] Wang ZV, Scherer PE. Adiponectin, the past two decades. *J Mol Cell Biol* 2016. doi:10.1093/jmcb/mjw011.
- [102] Parker-Duffen JL, Walsh K. Cardiometabolic effects of adiponectin. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28:81–91. doi:10.1016/j.beem.2013.09.001.
- [103] Goldstein BJ, Scalia R. Adiponectin: A novel adipokine linking adipocytes and vascular function. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:2563–8. doi:10.1210/jc.2004-0518.
- [104] Chen M-P, Tsai JC-R, Chung F-M, Yang S-S, Hsing L-L, Shin S-J, et al. Hypoadiponectinemia is associated with ischemic cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:821–6. doi:10.1161/01.ATV.0000157784.25920.a7.
- [105] Kawano T, Saito T, Yasu T, Saito T, Nakamura T, Namai K, et al. Close association of hypoadiponectinemia with arteriosclerosis obliterans and ischemic heart disease. *Metabolism* 2005;54:653–6. doi:10.1016/j.metabol.2004.12.009.
- [106] Costacou T, Zgibor JC, Evans RW, Otvos J, Lopes-Virella MF, Tracy RP, et al. The prospective association between adiponectin and coronary artery disease among individuals with type 1 diabetes. The Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2005;48:41–8. doi:10.1007/s00125-004-1597-y.
- [107] Komatsu M, Ohfusa H, Sato Y, Yajima H, Yamauchi K, Aizawa T, et al. Strong inverse correlation between serum adiponectin level and heart rate-corrected QT interval in an apparently healthy population: a suggestion for a direct antiatherogenic effect of adiponectin. *Diabetes Care* 2004;27:1237–8.

- [108] Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, Kida I, Ohishi M, Horio T, et al. Association of hypoadiponectinemia with smoking habit in men. *Hypertension* 2005;45:1094–100. doi:10.1161/01.HYP.0000169444.05588.4c.
- [109] Iacobellis G, Pistilli D, Gucciardo M, Leonetti F, Miraldi F, Brancaccio G, et al. Adiponectin expression in human epicardial adipose tissue in vivo is lower in patients with coronary artery disease. *Cytokine* 2005;29:251–5. doi:10.1016/j.cyto.2004.11.002.
- [110] Shibata R, Ouchi N, Ito M, Kihara S, Shiojima I, Pimentel DR, et al. Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. *Nat Med* 2004;10:1384–9. doi:10.1038/nm1137.
- [111] Shibata R, Sato K, Pimentel DR, Takemura Y, Kihara S, Ohashi K, et al. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 2005;11:1096–103. doi:10.1038/nm1295.
- [112] Shibata R, Ouchi N, Kihara S, Sato K, Funahashi T, Walsh K. Adiponectin stimulates angiogenesis in response to tissue ischemia through stimulation of amp-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2004;279:28670–4. doi:10.1074/jbc.M402558200.
- [113] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 1999;100:2473–6.
- [114] Malyszko J, Malyszko JS, Brzosko S, Wolczynski S, Mysliwiec M. Adiponectin is related to CD146, a novel marker of endothelial cell activation/injury in chronic renal failure and peritoneally dialyzed patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4620–7. doi:10.1210/jc.2004-0387.
- [115] Yokota T, Oritani K, Takahashi I, Ishikawa J, Matsuyama A, Ouchi N, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood* 2000;96:1723–32.
- [116] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Nishida M, Matsuyama A, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 2001;103:1057–63.
- [117] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 2002;105:2893–8.
- [118] Chen H, Montagnani M, Funahashi T, Shimomura I, Quon MJ. Adiponectin stimulates production of nitric oxide in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2003;278:45021–6. doi:10.1074/jbc.M307878200.
- [119] Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, Kasai K. Globular adiponectin upregulates nitric oxide production in vascular endothelial cells. *Diabetologia* 2003;46:1543–9. doi:10.1007/s00125-003-1224-3.
- [120] Wade TE, Mathur A, Lu D, Swartz-Basile DA, Pitt HA, Zyromski NJ. Adiponectin receptor-1 expression is decreased in the pancreas of obese mice. *J Surg Res* 2009;154:78–84. doi:10.1016/j.jss.2008.05.006.
- [121] Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev* 2005;26:439–51. doi:10.1210/er.2005-0005.
- [122] Rasmussen MS, Lihn AS, Pedersen SB, Bruun JM, Rasmussen M, Richelsen B. Adiponectin receptors in human adipose tissue: effects of obesity, weight loss, and fat depots. *Obes Silver Spring Md* 2006;14:28–35. doi:10.1038/oby.2006.5.

- [123] Tsuchida A, Yamauchi T, Ito Y, Hada Y, Maki T, Takekawa S, et al. Insulin/Foxo1 Pathway Regulates Expression Levels of Adiponectin Receptors and Adiponectin Sensitivity. *J Biol Chem* 2004;279:30817–22. doi:10.1074/jbc.M402367200.
- [124] Adipocyte-Derived Plasma Protein Adiponectin Acts as a Platelet-Derived Growth Factor-BB-Binding Protein and Regulates Growth Factor-Induced Common Postreceptor Signal in Vascular Smooth Muscle Cell n.d. <http://circ.ahajournals.org.gate2.inist.fr/content/105/24/2893.long> (accessed March 14, 2016).
- [125] Yamauchi T, Iwabu M, Okada-Iwabu M, Kadowaki T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2014;28:15–23. doi:10.1016/j.beem.2013.09.003.
- [126] Hug C, Wang J, Ahmad NS, Bogan JS, Tsao T-S, Lodish HF. T-cadherin is a receptor for hexameric and high-molecular-weight forms of Acrp30/adiponectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:10308–13. doi:10.1073/pnas.0403382101.
- [127] Schraw T, Wang ZV, Halberg N, Hawkins M, Scherer PE. Plasma Adiponectin Complexes Have Distinct Biochemical Characteristics. *Endocrinology* 2008;149:2270–82. doi:10.1210/en.2007-1561.
- [128] Hivert M-F, Manning AK, McAteer JB, Florez JC, Dupuis J, Fox CS, et al. Common variants in the adiponectin gene (ADIPOQ) associated with plasma adiponectin levels, type 2 diabetes, and diabetes-related quantitative traits: the Framingham Offspring Study. *Diabetes* 2008;57:3353–9. doi:10.2337/db08-0700.
- [129] Hara K, Boutin P, Mori Y, Tobe K, Dina C, Yasuda K, et al. Genetic Variation in the Gene Encoding Adiponectin Is Associated With an Increased Risk of Type 2 Diabetes in the Japanese Population. *Diabetes* 2002;51:536–40. doi:10.2337/diabetes.51.2.536.
- [130] Dastani Z, Hivert M-F, Timpson N, Perry JRB, Yuan X, Scott RA, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet* 2012;8:e1002607. doi:10.1371/journal.pgen.1002607.
- [131] Chung C-M, Lin T-H, Chen J-W, Leu H-B, Yang H-C, Ho H-Y, et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on CDH13 that predicts cardiometabolic outcomes. *Diabetes* 2011;60:2417–23. doi:10.2337/db10-1321.
- [132] Henneman P, Aulchenko YS, Frants RR, Zorkoltseva IV, Zillikens MC, Frolich M, et al. Genetic Architecture of Plasma Adiponectin Overlaps With the Genetics of Metabolic Syndrome-Related Traits. *Diabetes Care* 2010;33:908–13. doi:10.2337/dc09-1385.
- [133] Yang W-S, Tsou P-L, Lee W-J, Tseng D-L, Chen C-L, Peng C-C, et al. Allele-specific differential expression of a common adiponectin gene polymorphism related to obesity. *J Mol Med* 2003;81:428–34. doi:10.1007/s00109-002-0409-4.
- [134] Pollin TI, Tanner K, O'connell JR, Ott SH, Damcott CM, Shuldiner AR, et al. Linkage of plasma adiponectin levels to 3q27 explained by association with variation in the APM1 gene. *Diabetes* 2005;54:268–74.
- [135] Filippi E, Sentinelli F, Trischitta V, Romeo S, Arca M, Leonetti F, et al. Association of the human adiponectin gene and insulin resistance. *Eur J Hum Genet* 2003;12:199–205. doi:10.1038/sj.ejhg.5201120.
- [136] Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Péan F, Hadjadj S, et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes* 2004;53:1150–1157.

- [137] Zacharova J, Chiasson J-L, Laakso M. The Common Polymorphisms (Single Nucleotide Polymorphism [SNP] +45 and SNP +276) of the Adiponectin Gene Predict the Conversion From Impaired Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes The STOP-NIDDM Trial. *Diabetes* 2005;54:893–9. doi:10.2337/diabetes.54.3.893.
- [138] Lee YY, Lee NS, Cho YM, Moon MK, Jung HS, Park YJ, et al. Genetic association study of adiponectin polymorphisms with risk of Type 2 diabetes mellitus in Korean population. *Diabet Med* 2005;22:569–75. doi:10.1111/j.1464-5491.2005.01460.x.
- [139] Vendramini MF, Pereira AC, Ferreira SR, Kasamatsu TS, Moisés RS, Japanese Brazilian Diabetes Study Group. Association of genetic variants in the adiponectin encoding gene (ADIPOQ) with type 2 diabetes in Japanese Brazilians. *J Diabetes Complications* 2010;24:115–20. doi:10.1016/j.jdiacomp.2009.01.007.
- [140] Laumen H, Saningong AD, Heid IM, Hess J, Herder C, Clausnitzer M, et al. Functional Characterization of Promoter Variants of the Adiponectin Gene Complemented by Epidemiological Data. *Diabetes* 2009;58:984–91. doi:10.2337/db07-1646.
- [141] Yaghoobkar H, Lamina C, Scott RA, Dastani Z, Hivert M-F, Warren LL, et al. Mendelian randomization studies do not support a causal role for reduced circulating adiponectin levels in insulin resistance and type 2 diabetes. *Diabetes* 2013;62:3589–98. doi:10.2337/db13-0128.
- [142] Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, Nakatochi M, Chiu Y-F, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin levels in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. *Hum Mol Genet* 2014;23:1108–19. doi:10.1093/hmg/ddt488.
- [143] Chung C-M, Lin T-H, Chen J-W, Leu H-B, Yang H-C, Ho H-Y, et al. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus of adiponectin on CDH13 that predicts cardiometabolic outcomes. *Diabetes* 2011;60:2417–23. doi:10.2337/db10-1321.
- [144] Yap AS, Briehner WM, Gumbiner BM. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997;13:119–46. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.119.
- [145] Philippova MP, Bochkov VN, Stambolsky DV, Tkachuk VA, Resink TJ. T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1998;429:207–10. doi:10.1016/S0014-5793(98)00598-5.
- [146] Lee SW. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer. *Nat Med* 1996;2:776–82. doi:10.1038/nm0796-776.
- [147] Angst BD, Marcozzi C, Magee AI. The cadherin superfamily: diversity in form and function. *J Cell Sci* 2001;114:629–41.
- [148] Ranscht B, Dours-Zimmermann MT. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region. *Neuron* 1991;7:391–402. doi:10.1016/0896-6273(91)90291-7.
- [149] Roy F van, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:3756–88. doi:10.1007/s00018-008-8281-1.
- [150] Harada H, Kimura A, Fukino K, Yasunaga S, Nishi H, Emi M. Genomic structure and eight novel exonic polymorphisms of the human N-cadherin gene. *J Hum Genet* 2002;47:330–2. doi:10.1007/s100380200045.
- [151] Redies C, Vanhalst K, Roy F van. δ -Protocadherins: unique structures and functions. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2005;62:2840–52. doi:10.1007/s00018-005-5320-z.

- [152] Begemann M, Tan SS, Cunningham BA, Edelman GM. Expression of chicken liver cell adhesion molecule fusion genes in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9042–6.
- [153] Ringwald M, Schuh R, Vestweber D, Eistetter H, Lottspeich F, Engel J, et al. The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *EMBO J* 1987;6:3647–53.
- [154] Jarrard DF, Paul R, Bokhoven A van, Nguyen SH, Bova GS, Wheelock MJ, et al. P-Cadherin is a basal cell-specific epithelial marker that is not expressed in prostate cancer. *Clin Cancer Res* 1997;3:2121–8.
- [155] Whyte DA, Li C, Thomson RB, Nix SL, Zanjani R, Karp SL, et al. Ksp-cadherin gene promoter. I. Characterization and renal epithelial cell-specific activity. *Am J Physiol - Ren Physiol* 1999;277:F587–98.
- [156] Bromhead C, Miller JH, McDonald FJ. Regulation of T-cadherin by hormones, glucocorticoid and EGF. *Gene* 2006;374:58–67. doi:10.1016/j.gene.2006.01.013.
- [157] Sato M, Mori Y, Sakurada A, Fujimura S, Horii A. The H-cadherin (CDH13) gene is inactivated in human lung cancer. *Hum Genet* 1998;103:96–101.
- [158] Kuzmenko YS, Stambolsky D, Kern F, Bochkov VN, Tkachuk VA, Resink TJ. Characteristics of Smooth Muscle Cell Lipoprotein Binding Proteins (p105/p130) as T-Cadherin and Regulation by Positive and Negative Growth Regulators. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246:489–94. doi:10.1006/bbrc.1998.8645.
- [159] Wang X-D, Wang B-E, Soriano R, Zha J, Zhang Z, Modrusan Z, et al. Expression profiling of the mouse prostate after castration and hormone replacement: implication of H-cadherin in prostate tumorigenesis. *Differentiation* 2007;75:219–34. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00135.x.
- [160] Adachi Y, Takeuchi T, Nagayama T, Ohtsuki Y, Furihata M. Zeb1-mediated T-cadherin repression increases the invasive potential of gallbladder cancer. *FEBS Lett* 2009;583:430–6. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.042.
- [161] Joshi MB, Philippova M, Ivanov D, Allenspach R, Erne P, Resink TJ. T-cadherin protects endothelial cells from oxidative stress-induced apoptosis. *FASEB J* 2005. doi:10.1096/fj.05-3834fje.
- [162] Joshi MB, Ivanov D, Philippova M, Kyriakakis E, Erne P, Resink TJ. A requirement for thioredoxin in redox-sensitive modulation of T-cadherin expression in endothelial cells. *Biochem J* 2008;416:271–80. doi:10.1042/BJ20080765.
- [163] Tanihara H, Sano K, Heimark RL, St John T, Suzuki S. Cloning of five human cadherins clarifies characteristic features of cadherin extracellular domain and provides further evidence for two structurally different types of cadherin. *Cell Adhes Commun* 1994;2:15–26.
- [164] Dames SA, Bang E, Haüssinger D, Ahrens T, Engel J, Grzesiek S. Insights into the low adhesive capacity of human T-cadherin from the NMR structure of Its N-terminal extracellular domain. *J Biol Chem* 2008;283:23485–95. doi:10.1074/jbc.M708335200.
- [165] Lambeng N, Wallez Y, Rampon C, Cand F, Christé G, Gulino-Debrac D, et al. Vascular Endothelial–Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Angiogenic and Quiescent Adult Tissues. *Circ Res* 2005;96:384–91. doi:10.1161/01.RES.0000156652.99586.9f.
- [166] Stambolsky DV, Kuzmenko YS, Philippova MP, Bochkov VN, Bepalova ZD, Azmuko AA, et al. Identification of 130 kDa cell surface LDL-binding protein from smooth muscle cells as a partially processed T-cadherin precursor. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* 1999;1416:155–60. doi:10.1016/S0005-2736(98)00218-1.
- [167] Ozawa M, Kemler R. Correct proteolytic cleavage is required for the cell adhesive function of uvomorulin. *J Cell Biol* 1990;111:1645–50. doi:10.1083/jcb.111.4.1645.

- [168] Sacristán MP, Vestal DJ, Dours-Zimmermann MT, Ranscht B. T-Cadherin 2: Molecular characterization, function in cell adhesion, and coexpression with T-cadherin and N-cadherin. *J Neurosci Res* 1993;34:664–80. doi:10.1002/jnr.490340610.
- [169] Vestal DJ, Ranscht B. Glycosyl phosphatidylinositol--anchored T-cadherin mediates calcium-dependent, homophilic cell adhesion. *J Cell Biol* 1992;119:451–61. doi:10.1083/jcb.119.2.451.
- [170] Philippova M, Ivanov D, Tkachuk V, Erne P, Resink TJ. Polarisation of T-cadherin to the leading edge of migrating vascular cells in vitro: a function in vascular cell motility? *Histochem Cell Biol* 2003;120:353–60. doi:10.1007/s00418-003-0584-6.
- [171] Riou P, Saffroy R, Chenailler C, Franc B, Gentile C, Rubinstein E, et al. Expression of T-cadherin in tumor cells influences invasive potential of human hepatocellular carcinoma. *FASEB J* 2006;20:2291–301. doi:10.1096/fj.06-6085com.
- [172] Philippova M., Bochkov V., Stambolsky D., Tkachuk V., Resink T. T-cadherin and signal-transducing molecules co-localize in caveolin-rich membrane domains of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1998;429:207–10. doi:10.1016/S0014-5793(98)00598-5.
- [173] Doyle DD, Goings GE, Upshaw-Earley J, Page E, Ranscht B, Palfrey HC. T-cadherin Is a Major Glycophosphoinositol-anchored Protein Associated with Noncaveolar Detergent-insoluble Domains of the Cardiac Sarcolemma. *J Biol Chem* 1998;273:6937–43. doi:10.1074/jbc.273.12.6937.
- [174] Ivanov D, Philippova M, Antropova J, Gubaeva F, Iljinskaya O, Tararak E, et al. Expression of cell adhesion molecule T-cadherin in the human vasculature. *Histochem Cell Biol* 2001;115:231–42.
- [175] Tkachuk VA, Bochkov VN, Philippova MP, Stambolsky DV, Kuzmenko ES, Sidorova MV, et al. Identification of an atypical lipoprotein-binding protein from human aortic smooth muscle as T-cadherin. *FEBS Lett* 1998;421:208–12. doi:10.1016/S0014-5793(97)01562-7.
- [176] Kudrjashova E, Bashtrikov P, Bochkov V, Parfyonova Y, Tkachuk V, Antropova J, et al. Expression of adhesion molecule T-cadherin is increased during neointima formation in experimental restenosis. *Histochem Cell Biol* 2002;118:281–90. doi:10.1007/s00418-002-0463-6.
- [177] Ivanov D, Philippova M, Allenspach R, Erne P, Resink T. T-cadherin upregulation correlates with cell-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells. *Cardiovasc Res* 2004;64:132–43. doi:10.1016/j.cardiores.2004.06.010.
- [178] Rubina K, Talovskaya E, Cherenkov V, Ivanov D, Stambolsky D, Storozhevych T, et al. LDL induces intracellular signalling and cell migration via atypical LDL-binding protein T-cadherin. *Mol Cell Biochem* 2005;273:33–41.
- [179] Ivanov D, Philippova M, Tkachuk V, Erne P, Resink T. Cell adhesion molecule T-cadherin regulates vascular cell adhesion, phenotype and motility. *Exp Cell Res* 2004;293:207–18.
- [180] Philippova M, Ivanov D, Allenspach R, Takuwa Y, Erne P, Resink T. RhoA and Rac mediate endothelial cell polarization and detachment induced by T-cadherin. *FASEB J* 2005. doi:10.1096/fj.04-2430fje.
- [181] Adachi Y, Takeuchi T, Sonobe H, Ohtsuki Y. An adiponectin receptor, T-cadherin, was selectively expressed in intratumoral capillary endothelial cells in hepatocellular carcinoma: possible cross talk between T-cadherin and FGF-2 pathways. *Virchows Arch Int J Pathol* 2006;448:311–8. doi:10.1007/s00428-005-0098-9.
- [182] Philippova M, Banfi A, Ivanov D, Gianni-Barrera R, Allenspach R, Erne P, et al. Atypical GPI-anchored T-cadherin stimulates angiogenesis in vitro and in vivo.

- Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006;26:2222–30. doi:10.1161/01.ATV.0000238356.20565.92.
- [183] Hebbard LW, Garlatti M, Young LJT, Cardiff RD, Oshima RG, Ranscht B. T-cadherin supports angiogenesis and adiponectin association with the vasculature in a mouse mammary tumor model. *Cancer Res* 2008;68:1407–16. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2953.
- [184] Ghosh S, Joshi MB, Ivanov D, Feder-Mengus C, Spagnoli GC, Martin I, et al. Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell–tumor cell interactions: A role for T-cadherin in tumor angiogenesis. *FEBS Lett* 2007;581:4523–8. doi:10.1016/j.febslet.2007.08.038.
- [185] Rubina K, Kalinina N, Potekhina A, Efimenko A, Semina E, Poliakov A, et al. T-cadherin suppresses angiogenesis in vivo by inhibiting migration of endothelial cells. *Angiogenesis* 2007;10:183–95. doi:10.1007/s10456-007-9072-2.
- [186] Ivanov DB, Philippova MP, Tkachuk VA. Structure and functions of classical cadherins. *Biochem Biokhimiia* 2001;66:1174–86.
- [187] Takahashi T, Saegusa S, Sumino H, Nakahashi T, Iwai K, Morimoto S, et al. Adiponectin, T-cadherin and tumour necrosis factor- α in damaged cardiomyocytes from autopsy specimens. *J Int Med Res* 2005;33:236–44.
- [188] Denzel MS, Scimia M-C, Zumstein PM, Walsh K, Ruiz-Lozano P, Ranscht B. T-cadherin is critical for adiponectin-mediated cardioprotection in mice. *J Clin Invest* 2010;120:4342–52. doi:10.1172/JCI43464.
- [189] Khetani SR, Chen AA, Ranscht B, Bhatia SN. T-cadherin modulates hepatocyte functions in vitro. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 2008;22:3768–75. doi:10.1096/fj.07-105155.
- [190] Asada K, Yoshiji H, Noguchi R, Ikenaka Y, Kitade M, Kaji K, et al. Crosstalk between high-molecular-weight adiponectin and T-cadherin during liver fibrosis development in rats. *Int J Mol Med* 2007;20:725–9.
- [191] Arneemann J, Sultani O, Hasgün D, Coerdts W. T-/H-cadherin (CDH13): a new marker for differentiating podocytes. *Virchows Arch Int J Pathol* 2006;448:160–4. doi:10.1007/s00428-005-0055-7.
- [192] Tyrberg B, Miles P, Azizian KT, Denzel MS, Nieves ML, Monosov EZ, et al. T-cadherin (Cdh13) in association with pancreatic β -cell granules contributes to second phase insulin secretion. *Islets* 2011;3:327–37. doi:10.4161/isl.3.6.17705.
- [193] Niermann T, Kern F, Erne P, Resink T. The glycosyl phosphatidylinositol anchor of human T-cadherin binds lipoproteins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:1240–7. doi:10.1006/bbrc.2000.3465.
- [194] Kipmen-Korgun D, Osibow K, Zoratti C, Schraml E, Greilberger J, Kostner GM, et al. T-cadherin mediates low-density lipoprotein-initiated cell proliferation via the Ca(2+)-tyrosine kinase-Erk1/2 pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005;45:418–30.
- [195] Jee SH, Sull JW, Lee J-E, Shin C, Park J, Kimm H, et al. Adiponectin Concentrations: A Genome-wide Association Study. *Am J Hum Genet* 2010;87:545–52. doi:10.1016/j.ajhg.2010.09.004.
- [196] Fava C, Danese E, Montagnana M, Sjögren M, Almgren P, Guidi GC, et al. A variant upstream of the CDH13 adiponectin receptor gene and metabolic syndrome in Swedes. *Am J Cardiol* 2011;108:1432–7. doi:10.1016/j.amjcard.2011.06.068.
- [197] Dastani Z, Hivert M-F, Timpson N, Perry JRB, Yuan X, Scott RA, et al. Novel loci for adiponectin levels and their influence on type 2 diabetes and metabolic traits: a multi-ethnic meta-analysis of 45,891 individuals. *PLoS Genet* 2012;8:e1002607. doi:10.1371/journal.pgen.1002607.

- [198] Fava C, Danese E, Montagnana M, Sjögren M, Almgren P, Guidi GC, et al. A variant upstream of the CDH13 adiponectin receptor gene and metabolic syndrome in Swedes. *Am J Cardiol* 2011;108:1432–7. doi:10.1016/j.amjcard.2011.06.068.
- [199] Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet* 2009;18:2288–96. doi:10.1093/hmg/ddp135.
- [200] Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat* 2012;33:402–10. doi:10.1002/humu.21652.
- [201] Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, et al. CDH13 Polymorphisms are Associated with Adiponectin Levels and Metabolic Syndrome Traits Independently of Visceral Fat Mass. *J Atheroscler Thromb* 2016;23:309–19. doi:10.5551/jat.31567.
- [202] Teng M-S, Hsu L-A, Wu S, Sun Y-C, Juan S-H, Ko Y-L. Association of CDH13 genotypes/haplotypes with circulating adiponectin levels, metabolic syndrome, and related metabolic phenotypes: the role of the suppression effect. *PloS One* 2015;10:e0122664. doi:10.1371/journal.pone.0122664.
- [203] Gao H, Kim Y-M, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes* 2013;62:4277–83. doi:10.2337/db13-0129.
- [204] Teng M-S, Wu S, Hsu L-A, Chou H-H, Ko Y-L. Differential Associations between CDH13 Genotypes, Adiponectin Levels, and Circulating Levels of Cellular Adhesive Molecules. *Mediators Inflamm* 2015;2015:635751. doi:10.1155/2015/635751.
- [205] Marre M, Lievre M, Chatellier G, Mann JFE, Passa P, Ménard J, et al. Effects of low dose ramipril on cardiovascular and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and raised excretion of urinary albumin: randomised, double blind, placebo controlled trial (the DIABHYCAR study). *BMJ* 2004;328:495. doi:10.1136/bmj.37970.629537.0D.
- [206] Hadjadj S, Belloum R, Bouhanick B, Gallois Y, Guilloteau G, Chatellier G, et al. Prognostic Value of Angiotensin-I Converting Enzyme I/D Polymorphism for Nephropathy in Type 1 Diabetes Mellitus: A Prospective Study. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:541–9.
- [207] Hadjadj S, Péan F, Gallois Y, Passa P, Aubert R, Weekers L, et al. Different patterns of insulin resistance in relatives of type 1 diabetic patients with retinopathy or nephropathy: the Genesis France-Belgium Study. *Diabetes Care* 2004;27:2661–8.
- [208] Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, et al. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes: Genetique de la Nephropathie Diabetique (GENEDIAB) study group. *J Clin Invest* 1997;99:1585–95.
- [209] Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, et al. CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population. *Hum Mutat* 2012;33:402–10. doi:10.1002/humu.21652.
- [210] Wu Y, Gao H, Li H, Tabara Y, Nakatochi M, Chiu Y-F, et al. A meta-analysis of genome-wide association studies for adiponectin levels in East Asians identifies a novel locus near WDR11-FGFR2. *Hum Mol Genet* 2014;23:1108–19. doi:10.1093/hmg/ddt488.
- [211] Tosteson TD, Buzas JS, Demidenko E, Karagas M. Power and sample size calculations for generalized regression models with covariate measurement error. *Stat Med* 2003;22:1069–82. doi:10.1002/sim.1388.

- [212] Crawford DC, Nickerson DA. Definition and Clinical Importance of Haplotypes. *Annu Rev Med* 2005;56:303–20. doi:10.1146/annurev.med.56.082103.104540.
- [213] Tregouet DA, Garelle V. A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing haplotype effects in association studies. *Bioinforma Oxf Engl* 2007;23:1038–9. doi:10.1093/bioinformatics/btm058.
- [214] Cheverud JM. A simple correction for multiple comparisons in interval mapping genome scans. *Heredity* 2001;87:52–8.
- [215] Nyholt DR. A Simple Correction for Multiple Testing for Single-Nucleotide Polymorphisms in Linkage Disequilibrium with Each Other. *Am J Hum Genet* 2004;74:765–9.
- [216] Jaziri R, Aubert R, Roussel R, Emery N, Maimaitiming S, Bellili N, et al. Association of ADIPOQ genetic variants and plasma adiponectin isoforms with the risk of incident renal events in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2231–7. doi:10.1093/ndt/gfp771.
- [217] Polyzos SA, Toulis KA, Goulis DG, Zavos C, Kountouras J. Serum total adiponectin in nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Metabolism* 2011;60:313–26. doi:10.1016/j.metabol.2010.09.003.
- [218] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab* 2010;12:365–83. doi:10.1111/j.1463-1326.2009.01176.x.
- [219] Philippova M, Joshi MB, Kyriakakis E, Pfaff D, Erne P, Resink TJ. A guide and guard: the many faces of T-cadherin. *Cell Signal* 2009;21:1035–44.
- [220] Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P, Klopp N, et al. Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet* 2009;18:2288–96. doi:10.1093/hmg/ddp135.
- [221] Fumeron F, Aubert R, Siddiq A, Betoulle D, Péan F, Hadjadj S, et al. Adiponectin gene polymorphisms and adiponectin levels are independently associated with the development of hyperglycemia during a 3-year period: the epidemiologic data on the insulin resistance syndrome prospective study. *Diabetes* 2004;53:1150–7.
- [222] Balkau B, Lange C, Vol S, Fumeron F, Bonnet F, Group Study D.E.S.I.R. Nine-year incident diabetes is predicted by fatty liver indices: the French D.E.S.I.R. study. *BMC Gastroenterol* 2010;10:56. doi:10.1186/1471-230X-10-56.
- [223] Kitamoto A, Kitamoto T, Nakamura T, Matsuo T, Nakata Y, Hyogo H, et al. CDH13 Polymorphisms are Associated with Adiponectin Levels and Metabolic Syndrome Traits Independently of Visceral Fat Mass. *J Atheroscler Thromb* 2015. doi:10.5551/jat.31567.
- [224] Gao H, Kim Y-M, Chen P, Igase M, Kawamoto R, Kim MK, et al. Genetic variation in CDH13 is associated with lower plasma adiponectin levels but greater adiponectin sensitivity in East Asian populations. *Diabetes* 2013;62:4277–83. doi:10.2337/db13-0129.
- [225] Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2013;417:80–4. doi:10.1016/j.cca.2012.12.007.
- [226] Tishinsky JM, Robinson LE, Dyck DJ. Insulin-sensitizing properties of adiponectin. *Biochimie* 2012;94:2131–6. doi:10.1016/j.biochi.2012.01.017.
- [227] Shehzad A, Iqbal W, Shehzad O, Lee YS. Adiponectin: regulation of its production and its role in human diseases. *Horm Athens Greece* 2012;11:8–20.

- [228] Lindsay RS, Funahashi T, Hanson RL, Matsuzawa Y, Tanaka S, Tataranni PA, et al. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. *The Lancet* 2002;360:57–8. doi:10.1016/S0140-6736(02)09335-2.
- [229] Putku M, Kals M, Inno R, Kasela S, Org E, Kožich V, et al. CDH13 promoter SNPs with pleiotropic effect on cardiometabolic parameters represent methylation QTLs. *Hum Genet* 2015;134:291–303. doi:10.1007/s00439-014-1521-6.
- [230] Chan DW, Lee JMF, Chan PCY, Ng IOL. Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008;123:1043–52. doi:10.1002/ijc.23634.
- [231] Jung TW, Lee YJ, Lee MW, Kim SM, Jung TW. Full-length adiponectin protects hepatocytes from palmitate-induced apoptosis via inhibition of c-Jun NH2 terminal kinase. *FEBS J* 2009;276:2278–84. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.06955.x.
- [232] Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Adipokines in nonalcoholic fatty liver disease. *Metabolism* n.d. doi:10.1016/j.metabol.2015.11.006.
- [233] Grønbaek H, Thomsen KL, Rungby J, Schmitz O, Vilstrup H. Role of nonalcoholic fatty liver disease in the development of insulin resistance and diabetes. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2008;2:705–11. doi:10.1586/17474124.2.5.705.
- [234] Promrat K, Longato L, Wands JR, de la Monte SM. Weight loss amelioration of non-alcoholic steatohepatitis linked to shifts in hepatic ceramide expression and serum ceramide levels. *Hepatol Res Off J Jpn Soc Hepatol* 2011;41:754–62. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00815.x.
- [235] Holland WL, Miller RA, Wang ZV, Sun K, Barth BM, Bui HH, et al. Receptor-mediated activation of ceramidase activity initiates the pleiotropic actions of adiponectin. *Nat Med* 2011;17:55–63. doi:10.1038/nm.2277.
- [236] Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR, et al. Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015;518:197–206. doi:10.1038/nature14177.
- [237] Gregg EW, Li Y, Wang J, Burrows NR, Ali MK, Rolka D, et al. Changes in diabetes-related complications in the United States, 1990–2010. *N Engl J Med* 2014;370:1514–23. doi:10.1056/NEJMoal310799.
- [238] Orchard TJ, Secrest AM, Miller RG, Costacou T. In the absence of renal disease, 20 year mortality risk in type 1 diabetes is comparable to that of the general population: a report from the Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetologia* 2010;53:2312–9. doi:10.1007/s00125-010-1860-3.
- [239] Patente TA, Mohammedi K, Bellili-Muñoz N, Driss F, Sanchez M, Fumeron F, et al. Allelic variations in the CYBA gene of NADPH oxidase and risk of kidney complications in patients with type 1 diabetes. *Free Radic Biol Med* 2015;86:16–24. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.002.
- [240] Mohammedi K, Bellili-Muñoz N, Driss F, Roussel R, Seta N, Fumeron F, et al. Manganese superoxide dismutase (SOD2) polymorphisms, plasma advanced oxidation protein products (AOPP) concentration and risk of kidney complications in subjects with type 1 diabetes. *PloS One* 2014;9:e96916. doi:10.1371/journal.pone.0096916.
- [241] Jorsal A, Tarnow L, Frystyk J, Lajer M, Flyvbjerg A, Parving H-H, et al. Serum adiponectin predicts all-cause mortality and end stage renal disease in patients with type I diabetes and diabetic nephropathy. *Kidney Int* 2008;74:649–54. doi:10.1038/ki.2008.201.
- [242] Takeuchi T, Adachi Y, Ohtsuki Y, Furihata M. Adiponectin receptors, with special focus on the role of the third receptor, T-cadherin, in vascular disease. *Med Mol Morphol* 2007;40:115–20. doi:10.1007/s00795-007-0364-9.

- [243] Schalkwijk CG, Chaturvedi N, Schram MT, Fuller JH, Stehouwer CDA, EURODIAB Prospective Complications Study Group. Adiponectin is inversely associated with renal function in type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:129–35. doi:10.1210/jc.2005-1117.
- [244] Kollerits B, Fliser D, Heid IM, Ritz E, Kronenberg F, MMKD Study Group. Gender-specific association of adiponectin as a predictor of progression of chronic kidney disease: the Mild to Moderate Kidney Disease Study. *Kidney Int* 2007;71:1279–86. doi:10.1038/sj.ki.5002191.
- [245] Yano Y, Hoshida S, Ishikawa J, Hashimoto T, Eguchi K, Shimada K, et al. Differential impacts of adiponectin on low-grade albuminuria between obese and nonobese persons without diabetes. *J Clin Hypertens Greenwich Conn* 2007;9:775–82.
- [246] Sharma K, Ramachandrarao S, Qiu G, Usui HK, Zhu Y, Dunn SR, et al. Adiponectin regulates albuminuria and podocyte function in mice. *J Clin Invest* 2008;118:1645–56. doi:10.1172/JCI32691.
- [247] Vionnet N, Tregouët D, Kazeem G, Gut I, Groop P-H, Tarnow L, et al. Analysis of 14 candidate genes for diabetic nephropathy on chromosome 3q in European populations: strongest evidence for association with a variant in the promoter region of the adiponectin gene. *Diabetes* 2006;55:3166–74. doi:10.2337/db06-0271.
- [248] Jo J, Sull JW, Park EJ, Jee SH. Effects of smoking and obesity on the association between CDH13 (rs3865188) and adiponectin among Korean men: the KARE study. *Obes Silver Spring Md* 2012;20:1683–7. doi:10.1038/oby.2011.128.
- [249] Matsuda K, Fujishima Y, Maeda N, Mori T, Hirata A, Sekimoto R, et al. Positive feedback regulation between adiponectin and T-cadherin impacts adiponectin levels in tissue and plasma of male mice. *Endocrinology* 2015;156:934–46. doi:10.1210/en.2014-1618.
- [250] Pfaff D, Schoenenberger AW, Dasen B, Erne P, Resink TJ, Philippova M. Plasma T-cadherin negatively associates with coronary lesion severity and acute coronary syndrome. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2015;4:410–8. doi:10.1177/2048872614557229.
- [251] Philippova M, Suter Y, Toggweiler S, Schoenenberger AW, Joshi MB, Kyriakakis E, et al. T-cadherin is present on endothelial microparticles and is elevated in plasma in early atherosclerosis. *Eur Heart J* 2011;32:760–71. doi:10.1093/eurheartj/ehq206.
- [252] Williams AS, Kasahara DI, Verbout NG, Fedulov AV, Zhu M, Si H, et al. Role of the adiponectin binding protein, T-cadherin (Cdh13), in allergic airways responses in mice. *PloS One* 2012;7:e41088. doi:10.1371/journal.pone.0041088.
- [253] Mantzoros CS, Li T, Manson JE, Meigs JB, Hu FB. Circulating adiponectin levels are associated with better glycemic control, more favorable lipid profile, and reduced inflammation in women with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:4542–8. doi:10.1210/jc.2005-0372.
- [254] Sun B, Hu L, Luo Z-Y, Chen X-P, Zhou H-H, Zhang W. DNA methylation perspectives in the pathogenesis of autoimmune diseases. *Clin Immunol* 2016;164:21–7. doi:10.1016/j.clim.2016.01.011.
- [255] Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet* 2006;38:1378–85. doi:10.1038/ng1909.
- [256] Todd JA. Etiology of Type 1 Diabetes. *Immunity* 2010;32:457–67. doi:10.1016/j.immuni.2010.04.001.
- [257] de Haan HG, Siegerink B, van Hylckama Vlieg A. [Mendelian randomisation]. *Ned Tijdschr Geneeskd* 2014;158:A7547.

- [258] Little J, Khoury MJ. Mendelian randomisation: a new spin or real progress? *The Lancet* 2003;362:930–1. doi:10.1016/S0140-6736(03)14396-6.
- [259] Swerdlow DI. Mendelian Randomization and Type 2 Diabetes. *Cardiovasc Drugs Ther* 2016;30:51–7. doi:10.1007/s10557-016-6638-5.
- [260] Hui X, Gu P, Zhang J, Nie T, Pan Y, Wu D, et al. Adiponectin Enhances Cold-Induced Browning of Subcutaneous Adipose Tissue via Promoting M2 Macrophage Proliferation. *Cell Metab* 2015;22:279–90. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.004.
- [261] Poekes L, Lanthier N, Leclercq IA. Brown adipose tissue: a potential target in the fight against obesity and the metabolic syndrome. *Clin Sci Lond Engl 1979* 2015;129:933–49. doi:10.1042/CS20150339.
- [262] Okada-Iwabu M, Yamauchi T, Iwabu M, Honma T, Hamagami K, Matsuda K, et al. A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature* 2013;503:493–9. doi:10.1038/nature12656.
- [263] Zhang Y, Zhao J, Li R, Lau WB, Yuan Y-X, Liang B, et al. AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signalings. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2015;309:E275–82. doi:10.1152/ajpendo.00577.2014.
- [264] Michel S, Liang L, Depner M, Klopp N, Ruether A, Kumar A, et al. Unifying candidate gene and GWAS Approaches in Asthma. *PloS One* 2010;5:e13894. doi:10.1371/journal.pone.0013894.
- [265] Guio-Vega GP, Forero DA. Functional genomics of candidate genes derived from genome-wide association studies for five common neurological diseases. *Int J Neurosci* 2016:1–6. doi:10.3109/00207454.2016.1149172.

Annexes

Technique et mise au point du dosage de la T-cadhérine

Matériel :

PBS Debulco, Plaque « *MSD Multiarray high bind* » 96 puits, Blocker A et 3%, solution de *Cold capture antibody diluted in PBS*, Tween20, eau MQ, R&D T-cadhérine recombinante, MSD Diluent 2 et 3, solution MSD de « *SulfoTag labeled Streptavidin* », échantillons de plasma des patients et de sujets sains.

Méthode :

Manipulation du jour 1 :

- (1) Ajouter 30 μL de « anticorps de revêtement + PBS » ou 30 μL de PBS selon le plan de dépôt (Figure 16).
- (2) Laisser incuber toute la nuit à 4°C sans agitation.

Manipulation du jour 2 :

- (3) Eliminer le liquide contenu dans les plaques
- (4) Laver 3 fois les plaques avec 150 μL d'une solution PBS-Tween20
- (5) Ajouter 150 μL /puits de *blocking solution* agité à 600 *rpm* pendant 2h à température ambiante
- (6) Laver 3 fois les plaques avec 150 μL /puit
- (7) Ajouter 30 μL /puits de recombinant T-cadhérine ainsi que les échantillons (plasmas) ainsi que la gamme dans les puits correspondants puis agiter à 600 *rpm* pendant 1h30
- (8) Laver les plaques 4 fois avec 150 μL /puit de PBS-T
- (9) Ajouter 30 μL /puit d'une solution de *Streptavidine sulfo-TAG* et *biotinylated detection antibody*, puis agité à 600 *rpm* pendant 1h
- (10) Laver 3 fois les plaques avec 150 μL /puit avec du PBS-Tween20
- (11) Ajouter 150 μL /puit de *read buffer*
- (12) Lire les plaques sur le *MSD Sector Imager 2400*

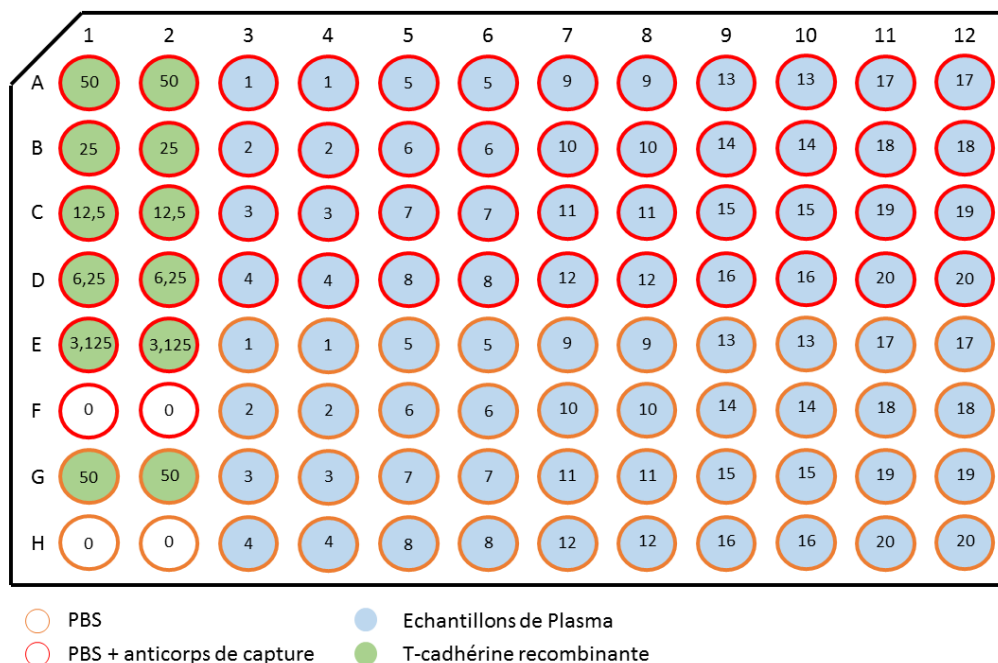


Figure 16. Plan de la plaque de dosage de la T-cadhérine

Résultats :

Les résultats du premier dosage ELISA double sandwich sont représentés dans la Figure 17. Le coefficient de corrélation de la gamme est de 0,998, la linéarité de la gamme est donc validée. Cependant, le point 0 de la gamme indique une concentration à 16,3 ng/ml, ce qui réduit la plage de détection. Les points rouges représentés sur la courbe correspondent aux échantillons des patients et la plupart sont en dehors de la plage de détection. C'est pourquoi, l'équipe a envisagé d'approfondir ce point en effectuant une mise au point de la gamme.

Suite à ces observations, plusieurs hypothèses ont été émises quant au décalage des concentrations observées. La qualité du plasma utilisé pour la gamme est un facteur majeur de variation dans cette expérience. Les facteurs de variation du plasma utilisé pour la gamme par rapport aux échantillons sont d'une part un nombre de décongélations inférieur, et un prélèvement beaucoup plus récent.. Ce plasma est constitué par un *pool* de plusieurs plasmas supposé être exempt de T-cadhérine. Une gamme sans dilution dans le plasma devra être testée.

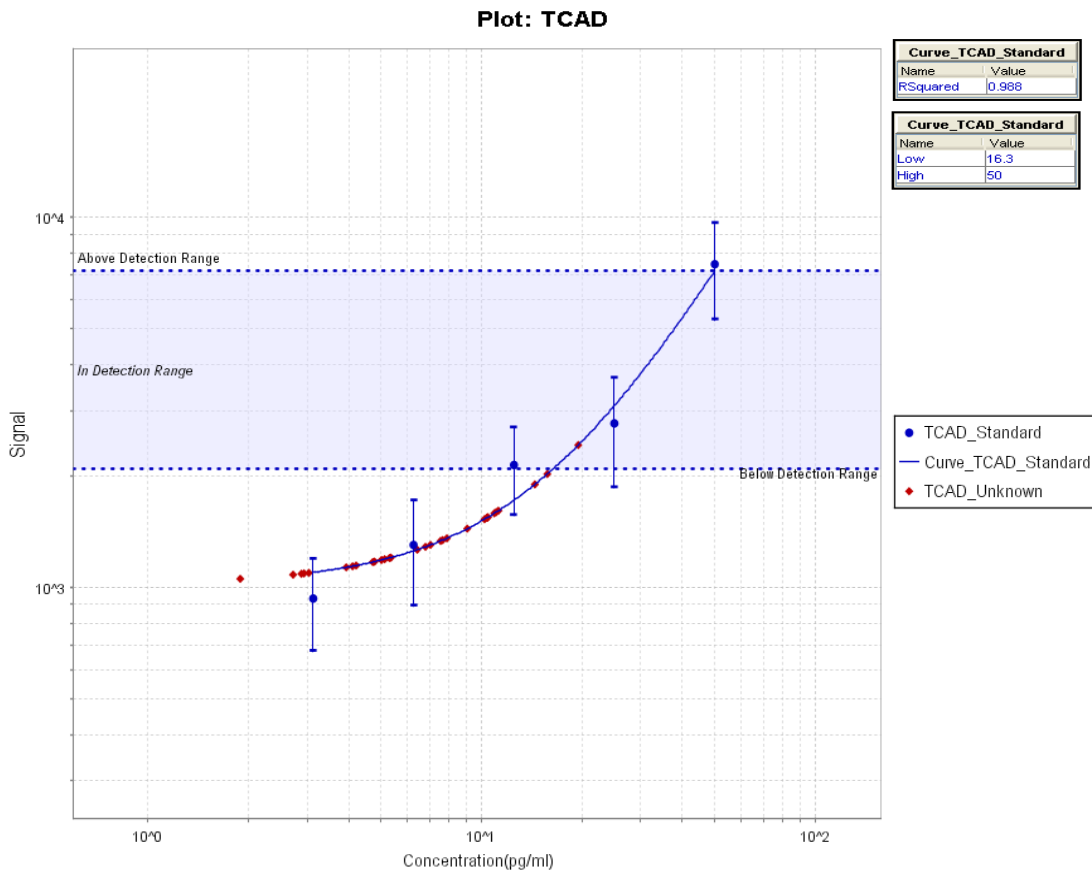


Figure 17. Résultats de la première expérience de dosage de la T-cadhérine

D'autres sources d'erreurs, de nature technique, peuvent être à l'origine de nos observations. Le plasma pouvant ne pas être suffisamment homogénéisé, des agrégats sont observés au fond des puits, posant un problème lors de la détection. De plus, les valeurs de lecture de nos plaques indiquent que les puits des colonnes 6 et 9 montrent un signal significativement inférieur à celui des colonnes voisines, l'efficacité du laveur automatique peut influencer à ce niveau.

Le service technique de l'entreprise MSD nous propose certaines modifications du protocole. La modification de certains temps d'incubation et l'ajustement des concentrations de plusieurs anticorps. L'omission du plasma utilisé pour faire la gamme, dont la concentration en T-cadhérine reste inconnue et pourrait être à la base de l'erreur observée. L'utilisation de plasma dans la gamme sert à reproduire les mêmes conditions de traitement des échantillons.

Une mise au point de la gamme selon ces recommandations est effectuée en collaboration avec la plateforme CYBIO de l'hôpital Cochin. Ces recommandations comprenaient un lavage manuel sans utilisation du laveur automatique, une modification de la concentration de

l'anticorps primaire (1 µg/ml et 5 µg/ml), une dilution de la T-cadhérine recombinante pour les différents points de la gamme avec et sans plasma et deux concentrations différentes du produits de marquage *Streptavidine sulfo-TAG* (0,5 µg/ml et 1 µg/ml). Le schéma de la plaque de mise au point effectuée est représenté dans la Figure 18.

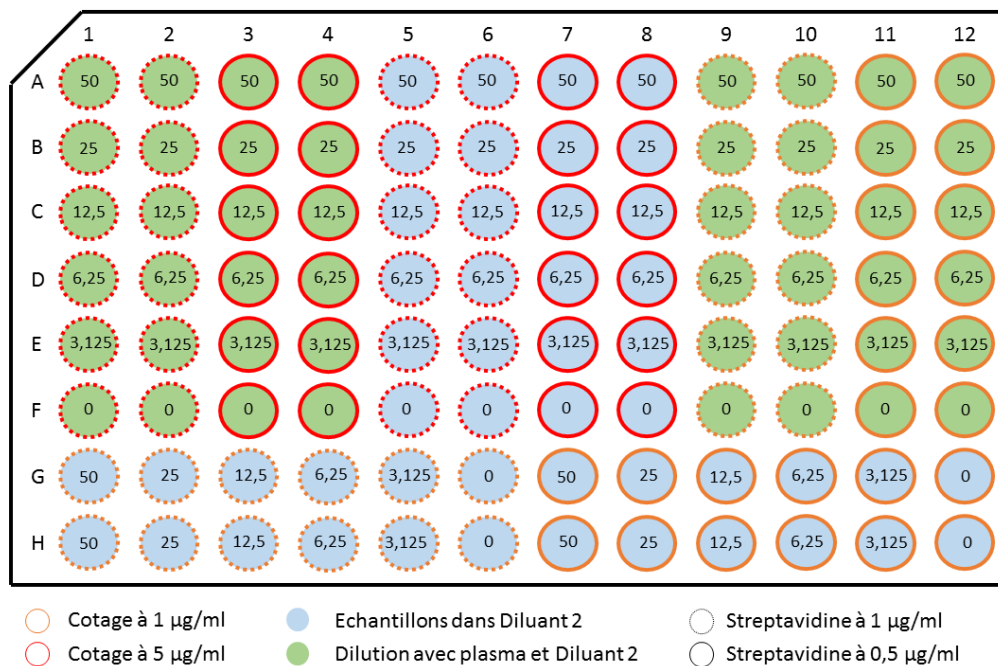


Figure 18. Plan de la plaque de dernière mise au point

Résumé du protocole de la mise au point:

- (1) Revêtement du fond des puits
 - a. 30µL par puit d'anticorps de revêtement dilué en PBS (1µg/mL et 5µg/mL)
 - b. Incubation d'une nuit
- (2) Bloquage
 - a. Laver 2 fois avec 150µL de solution lavage (Tween 20 dans PBS à 0,05%)
 - b. 150µL par puit de solution de bloquage (Blocker A dans PBS à 5%)
 - c. Agitation 1h à température ambiante
- (3) Ajout de la T-cadhérine recombinante
 - a. Laver 2 fois avec 150µL de solution lavage (Tween 20 dans PBS à 0,05%)
 - b. 30µL par puit de la gamme avec des dilutions selon le schéma ci-dessus, préparée dans Diluant 2 ou dans plasma poolé et Diluant 2

- c. Agitation 1h30 à température ambiante
- (4) Ajout anticorps de détection
 - a. Laver 2 fois avec 150 μ L de solution lavage (Tween 20 dans PBS à 0,05%)
 - b. 25 μ L par puit de l'anticorps de détection dans du Diluant 3 à 1 μ g/mL
 - c. Agitation 1h30 à température ambiante
 - (5) Ajout streptavidine SulfoTag
 - a. Laver 2 fois avec 150 μ L de solution lavage (Tween 20 dans PBS à 0,05%)
 - b. 25 μ L par puit de *Streptavidine SulfoTag* dans du Diluant 3 à 1 μ g/mL ou 0,5 μ g/mL
 - c. Agitation 45 minutes à température ambiante
 - (6) Lecture
 - a. Laver 2 fois avec 150 μ L de solution lavage (Tween 20 dans PBS à 0,05%)
 - b. 150 μ L par puit de tampon de lecture dilué à moitié dans du H₂O avec la technique de pipetage inverse.

Les résultats de cette dernière mise au point sont illustrés dans les Figure 19Figure 20. Le revêtement des plaques à la concentration de 1 μ g/ml n'est pas suffisant pour la fixation de l'antigène puisque les courbes ont une allure plutôt horizontale (Figure 19) (pas d'augmentation du signal lumineux émis en fonction de l'augmentation de la concentration de la gamme dans les puits). Avec un revêtement à 5 μ g/ml (Figure 20), la concentration de *Streptavidine SulfoTag* à 0,5 μ g/ml est suffisante par rapport au nombre d'antigène fixé, en particulier dans le cas où les dilutions de la gamme ont été faite avec du *Diluent 2* seule, où il y a superposition presque parfaite des deux courbes représentant ces cas.

Le plasma poolé de sujets sains utilisé n'est pas exempt de la protéine testée, puisque les courbes des gammes effectuées dans du plasma sont au-dessus des courbes montrant la gamme diluée directement dans la solution de dilution. De plus, les deux courbes représentant les gammes effectuées dans le plasma sont parallèles à celles diluées dans le *Diluent 2*, indiquant que l'utilisation du plasma dans la gamme n'est pas indispensable, même si on dose la T-cadhérine dans des microparticules.

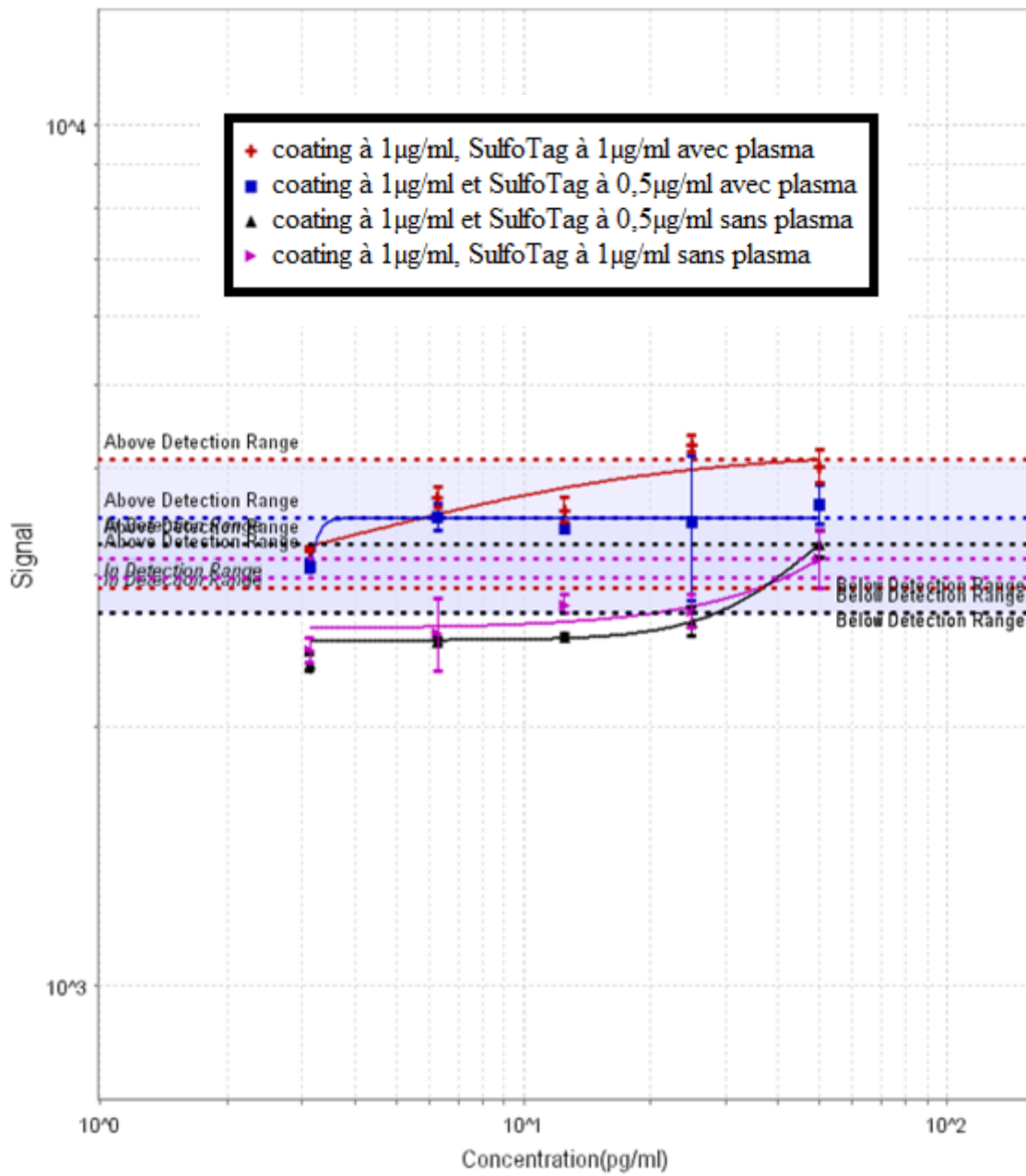


Figure 19. Résultat de la manipulation de mise au point de la gamme de T-cadhérine avec un coating à $1\mu\text{g/ml}$

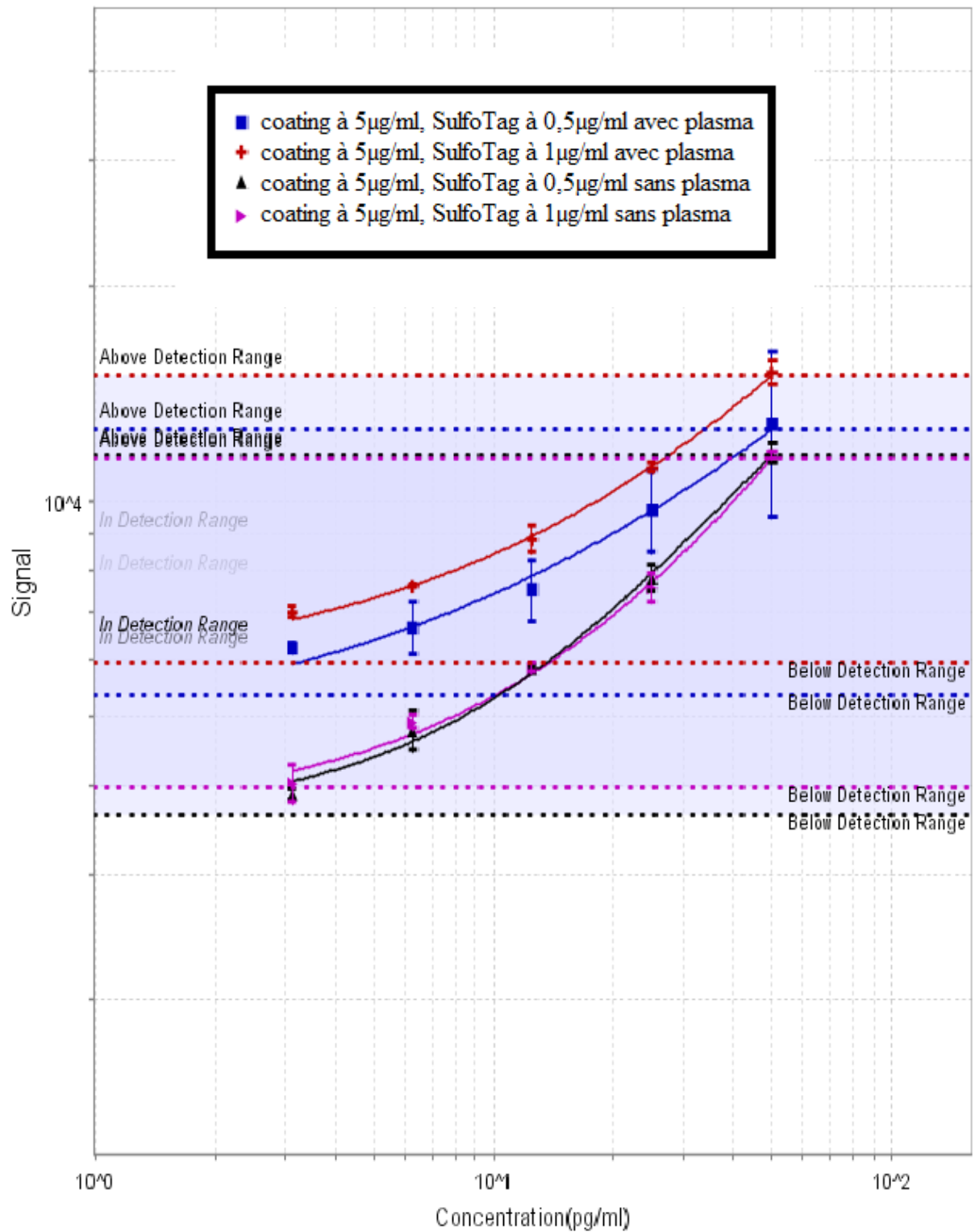


Figure 20. Résultat de la manipulation de mise au point de la gamme de T-cadhérine avec un coating à 5µg/ml

Article : Polymorphismes du gène *ABCG8* et maladie rénale chez des patients diabétiques de type 2

Available online at www.sciencedirect.com

Metabolism

www.metabolismjournal.com

ABCG8 polymorphisms and renal disease in type 2 diabetic patients



Anthony Nicolas^{a,b,1}, Sehrish Fatima^{a,1}, Amel Lamri^{a,c}, Naima Bellili-Muñoz^a, Jean-Michel Halimi^d, Pierre-Jean Saulnier^{e,f,g}, Samy Hadjadj^{e,f,g}, Gilberto Velho^a, Michel Marre^{a,c,h}, Ronan Roussel^{a,c,h}, Frédéric Fumeron^{a,c,*}

^a INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Research Unit 1138, Paris, France

^b Univ Pierre et Marie Curie, Paris, France

^c Univ Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

^d University Hospital of Tours, Diabetology and Nephrology Department, Tours, France

^e Université de Poitiers, UFR Médecine Pharmacie, CIC1402, Poitiers, France

^f CHU de Poitiers, Service Endocrinologie, Diabétologie, Pole DUNE & Centre d'investigation Clinique, Poitiers, France

^g INSERM, CIC1402, Poitiers, France

^h Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Bichat Hospital, Department of Diabetology, Endocrinology and Nutrition, Paris, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2014

Accepted 9 March 2015

Keywords:

Diabetic nephropathy
End-stage renal disease
Genetic polymorphisms
ABCG8 transporter
Association study

ABSTRACT

Background and aim. Sterols, bile acids and their receptors have been involved in diabetic nephropathy. The ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5 and ABCG8) play an important role in intestinal sterol absorption and bile acid secretion. The aim of our study was to assess the associations between two ABCG8 coding polymorphisms, T400K and D19H, and the incidence of renal events in type 2 diabetic subjects.

Methods. Participants were the 3137 French type 2 diabetic subjects with micro- or macro-albuminuria from the genetic substudy of the DIABHYCAR trial. The mean duration of follow-up was 4 years. Renal events were defined as a doubling of serum creatinine concentration or end-stage renal disease at follow-up. We then used a second population (DIAB2NEPHROGENE) of 2140 type 2 diabetic patients for the purpose of validation.

Results. In DIABHYCAR, the 400K allele was significantly associated with a higher risk of incident renal events in a multiple adjusted model (HR: 1.75 [95% CI 1.20–2.56], $P = 0.003$). This association was still significant after further adjustments for baseline values of estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion. In the validation population, the 400K allele was associated with the prevalence of end-stage renal disease (OR = 2.01 [95% CI 1.15–3.54], $P = 0.015$). No significant association was found between the D19H polymorphism and the risk of diabetic nephropathy.

Conclusions. A polymorphism of the sterol transporter ABCG8 has been associated with the prevalence of end-stage renal disease and with the incidence of new renal events in type 2 diabetic patients.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: ABCG, ATP-binding-cassette, subfamily G; LXR, liver X receptor; FXR, farnesoid X receptor; MAF, minor allele frequency; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; UAE, urinary albumin excretion; CRP, C-reactive protein.

* Corresponding author at: INSERM, Centre de Recherche des Cordeliers, Research Unit 1138, 15 rue de l'Ecole de Médecine, Paris 75006, France. Tel. +33 1 44 27 81 14; fax: +33 1 44 27 64 21.

E-mail address: frederic.fumeron@inserm.fr (F. Fumeron).

¹ These authors contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2015.03.005>

0026-0495/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The pathogenesis of diabetic nephropathy is complex and involves many pathways leading to kidney damage, including abnormalities in lipid metabolism [1,2]. Low cholesterol efflux and cholesterol accumulation in the kidney have been shown in different models of diabetic nephropathy [3–6]. Experimental evidence suggests that sterols, bile acids and their receptors may play a role in the pathophysiology of diabetic nephropathy [7,8]. Patients with end-stage renal disease have high cholesterol absorption [9–11].

ATP-binding-cassette (ABC) transporters, particularly heterodimers formed by ABCG5 and ABCG8, play a major role in intestinal sterol absorption and bile acid secretion [12–14]. ABCG5 and ABCG8 promote the efflux of cholesterol and plant sterols from the liver into the biliary tract and from the intestinal wall into the intestinal lumen. They are the main actors in the elimination of plant sterols. Mutations in genes coding for these transporters cause sitosterolemia, a rare autosomal recessive disorder characterized by high levels of circulating phytosterol [15–17]. Frequent polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes have been associated with the absorption of sterols, cholesterol synthesis, circulating lipid levels and with a variety of clinical phenotypes, such as biliary and cardiovascular diseases [18–26]. In particular, the variants of ABCG8 D19H (rs11887534, G>C, exon 1) and ABCG8 T400K (rs4148217, C>A, exon 8) have been the most frequently reported to be associated with phenotypic variability. They have been strongly associated with lower absorption of sterols including cholesterol, higher cholesterol synthesis (higher levels of sterol precursors) [19–22], and a higher risk of gallstone disease [23,24].

In the present investigation, we assessed associations of D19H and T400K variants in the coding region of ABCG8 with the incidence of severe kidney outcomes in the prospective DIABHYCAR cohort of French type 2 diabetic patients [27–30]. Validation was performed in an independent population of type 2 diabetic patients, the DIAB2NEPHROGENE study [28].

2. Methods

2.1. Primary cohort

The methodology and the results of the DIABHYCAR trial have been reported elsewhere [27–30]. Participant characteristics were: a diagnosis of type 2 diabetes, treatment with oral antidiabetic drugs (insulin excluded), high urinary albumin levels (76% micro-, 24% macro-albuminuric patients), age ≥ 50 years and serum creatinine concentrations ≤ 150 $\mu\text{mol/l}$ (1.7 mg/dl). The trial was a four-year, double-blind, parallel study. This trial showed no effect of low dose ramipril on the incidence of renal events [27]. The French Caucasian participants (3137 of the 4912 subjects) gave written informed consent for enrollment in the genetic sub-study. The study protocol was approved by the Angers University Hospital Ethics Committee. Renal events were defined as a doubling of serum creatinine concentration or end-stage renal disease (defined as requirement for dialysis or kidney transplant).

An independent event committee blind to treatment group and genotyping data was responsible for adjudication concerning all the recorded events.

2.2. Validation population

DIAB2NEPHROGENE is a French multi-center case-control study designed to assess the genetic determinants of diabetic nephropathy in type 2 diabetes. This study, used for validation, has been previously described [28]. The population comprised 2140 unrelated Caucasian patients. End-stage renal disease was defined as requirement for dialysis or kidney transplant. The design of this study was approved by the Poitiers University Hospital Ethics Committee. All participants in the study gave their written informed consent.

2.3. Polymorphism determination

Polymorphisms T400K (rs4148217, C>A, exon 8) and D19H (rs11887534, G>C, exon 1) were genotyped using the Kaspar method (LGC Genomics, Hoddesdon, UK). The genotyping success rate was $\geq 98\%$. Genotyping was repeated in 5% of participants with 100% concordance. The genotypes for the ABCG8 polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium in both populations.

2.4. Statistics

The associations between clinical status (incident renal event or end-stage renal disease) and continuous variables at baseline were tested by Student's t-test. A χ^2 test was used for categorical variables. Variables with a skewed distribution (serum creatinine concentrations, eGFR, urinary albumin excretion, serum triglyceride concentrations, CRP) were log-transformed before analysis. A χ^2 test was used to determine whether genotype distributions were in Hardy–Weinberg equilibrium. The relationship between ABCG8 polymorphisms and renal disease was first assessed by χ^2 tests. We assessed the effects of polymorphisms on the incidence of renal events (in the prospective study DIABHYCAR), by carrying out survival analyses, using Cox proportional hazard ratio models to adjust for covariates. In the case-control study DIAB2NEPHROGENE, the associations were assessed by logistic regression analyses. Hazard ratios (HR) or odds ratios (OR), respectively, with their 95% confidence intervals (CI) were computed in these analyses for the minor allele in an additive model unless otherwise stated. A competing-risks regression analysis was also performed to address the issue of survival bias. All calculations were performed with SYSTAT 13 for Windows (Systat Software, San Jose, CA), except the competing risk analysis (Stata Software, StataCorp LP, College Station, TX).

3. Results

3.1. Primary cohort

In DIABHYCAR, 75 renal events (66 doublings of serum creatinine concentration and 9 cases of end-stage renal failure) occurred in genotyped patients during the study. The characteristics of participants at baseline according to the incidence of renal events during

follow-up are shown in Table 1. The genotypes were not significantly associated with any of the baseline characteristics of the patients, except a trend for an association between T400K and eGFR, the K allele being associated with a lower rate (eGFR in ml/mn/1.73 m²: 81.7 (65.4–102.5), 81.1 (63.8–101.5) and 77.8 (63.6–96.7) for the TT, TK and KK genotypes, respectively, P = 0.08). The 400K allele was significantly associated with a higher risk of a renal event (Table 2) (incidence per 100 patient-years: 0.33, 0.51 and 0.95 for the TT, TK and KK genotypes, respectively). This effect remained significant after multiple adjustment (for sex, age, BMI, TG, total and HDL cholesterol, CRP, HbA1c, glycemia, diabetes duration, and prior myocardial infarction, P = 0.003), but to a lesser extent (P = 0.03) after further adjustment for the baseline values of renal function parameters, albuminuria and eGFR. The competing risk with cardiovascular mortality or total mortality did not change the association result (data not shown). No significant association was found between the D19H polymorphism and the incidence of renal events (Table 2).

3.2. Validation population

In order to validate our findings, we tested the ABCG8 T400K polymorphism in the DIAB2NEPHROGENE population. The characteristics of participants according to the presence of end-stage renal disease are shown in Table 3. The 400K allele was associated with a higher prevalence of end-stage renal disease (Table 4).

4. Discussion

Our results in the DIABHYCAR cohort of patients with type 2 diabetes and micro- or macroalbuminuria show that the 400K

allele of the ABCG8 gene is associated with a higher risk of renal events during a 4-year follow-up period. In another population of type 2 diabetic patients, DIAB2NEPHROGENE, we have found that the same allele was associated with a higher prevalence of end-stage renal disease. To our knowledge, this locus has not been identified in other genetic studies of diabetic nephropathy.

ABCG8 plays a major role in cholesterol metabolism and cellular cholesterol efflux. Abnormalities in lipid metabolism in the diabetic kidney contribute to diabetic nephropathy, in particular cholesterol accumulation and ABCA1 downregulation [3,4]. A series of experiments recently showed that impaired reverse cholesterol transport is a characteristic of clinical and experimental diabetic kidney disease and negatively influences podocyte function [5]. Induction of cholesterol efflux with cyclodextrin prevented podocyte injury observed in vitro after exposure to patient sera [5]. ABCG8 expression in podocytes has not been described; nevertheless, ABCG5 and ABCG8 mRNA were slightly expressed in remnant kidneys of 5/6 nephrectomized rats [31]. The latter experiment induced enhanced hepatic expression of ABCG5/G8 transporters, which indicates a close relationship between kidney function and expression of these transporters. This association might explain the increased incidence of gallstones observed in patients with chronic kidney disease. In this regard, it might be observed that the 400K variant has been associated with a higher risk of gallstone disease [24].

One of the possible links of ABCG5/G8 with diabetic nephropathy may be the association of their activity with lipid levels. In ABCG5/G8 deficient mice, an impairment in triglyceride metabolism has been shown [32]. The 400K allele has been associated with an increased ABCG8 activity and has

Table 1 – Baseline characteristics of the genotyped French participants in the DIABHYCAR genetic substudy, as a function of the incidence of renal events.

Characteristic	All (n = 3096)	Incident renal event		P ^a
		With (n = 75)	Without (n = 3021)	
Women (%)	26.9	24.0	27.0	0.56
Age (years)	65.6 ± 8.3	67.1 ± 7.5	65.6 ± 8.3	0.14
BMI (kg/m ²)	29.4 ± 4.6	28.6 ± 5.3	29.4 ± 4.6	0.12
Current smoking (%)	14.4	20.0	14.3	0.16
Prior myocardial infarction (%)	5.4	12.0	5.3	0.01
Diabetes duration (years)	10.5 ± 7.7	12.7 ± 8.6	10.4 ± 7.7	0.01
HbA1c (%)	7.87 ± 1.77	8.44 ± 2.15	7.85 ± 1.75	0.004
Total cholesterol (mmol/l)	5.79 ± 1.07	5.91 ± 1.15	5.79 ± 1.07	0.33
LDL-C (mmol/l)	3.53 ± 0.88	3.49 ± 1.06	3.53 ± 0.88	0.77
HDL-C (mmol/l)	1.32 ± 0.36	1.21 ± 0.35	1.32 ± 0.35	0.008
Triglyceride (mmol/l) ^b	1.83 (1.31–2.67)	2.56 (1.67–3.28)	1.81 (1.30–2.64)	<0.001
SBP (mm Hg)	144.3 ± 13.2	146.5 ± 11.8	144.2 ± 13.2	0.13
DBP (mm Hg)	81.6 ± 8.1	82.5 ± 7.5	81.6 ± 8.1	0.34
UAE (mg/l) ^b	75.5 (40.0–183.3)	512.0 (128.4–1122.8)	74.0 (39.5–173.6)	<0.001
Serum creatinine (μmol/l) ^b	88.4 (75.1–100.8)	97.2 (87.0–115.6)	88.4 (75.1–99.9)	<0.001
eGFR (ml/mn/1.73 m ²) ^b	81.3 (64.6–101.9)	67.3 (53.0–86.0)	81.7 (65.3–102.5)	<0.001
CRP (mg/l) ^b	3.10 (1.50–6.80)	4.00 (2.10–8.90)	3.10 (1.50–6.80)	0.006

Data are means ± SD, %, or medians (interquartile range). SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; UAE: urinary albumin excretion; CRP, C-reactive protein.

^a P values for the differences in each characteristic between the groups with and without renal events. P values were obtained using two-tailed t-tests or χ² tests, as appropriate.

^b Skewed data were log-transformed before analysis.

Table 2 – ABCG8 polymorphism genotype frequencies according to incident renal events in DIABHYCAR.

Polymorphism	Renal event			Statistics	
	Without, n (%)	With, n (%)	Incidence, %	P χ^2 unadjusted	Hazard ratio (95% CI) Model 1 Model 2 ^a
T400K (C>A)					
TT	1948 (64.9)	39 (52.0)	2.0	2 df: 0.018 Additive: 0.007 Dominant (CA + AA vs CC): 0.022	1.75 (1.20–2.56), P = 0.003 1.52 (1.05–2.21), P = 0.03
TK	953 (31.8)	30 (40.0)	3.1		
KK	100 (3.3)	6 (8.0)	5.7		
MAF	0.192	0.280			
D19H (G>C)					
DD	2,615 (87.2)	69 (93.2)	2.6	2 df: 0.29 Additive: 0.13 Dominant (GC + CC vs GG): 0.14	0.53 (0.21–1.31), P = 0.16 0.53 (0.21–1.33), P = 0.18
DH	372 (12.4)	5 (6.8)	1.3		
HH	11 (0.4)	0 (0)	0.0		
MAF	0.066	0.034			

MAF: minor allele frequency.

^a Cox regression analysis for the additive model, model 1: adjustment for sex, age, BMI, TG, total and HDL cholesterol, CRP, HbA1c, glycemia, diabetes duration, and prior myocardial infarction; model 2: idem + eGFR, UAE, SBP, DBP at baseline.

also been shown to lower triglycerides and increase VLDL to LDL-ApoB conversion in overweight men [33]. Nevertheless, we did not find any association with lipid levels in our study.

Another hypothesis is an interaction with Liver X Receptor (LXR) on kidney function. LXRs α and β are nuclear hormone receptors that are widely expressed in the kidney. LXRs promote cholesterol efflux from cells and regulate transcription of a number of genes involved in cholesterol homeostasis including the transporters ABCA1, ABCG1, ABCG5/G8, as well as apolipoprotein E and SREBP1c [34,35]. Conversely, plasma plant sterols, which are modulated by ABCG/G8, activate LXRs [36]. It has recently been shown that LXRs were necessary to preserve glomerular integrity in both normoglycemic and diabetic mice [8]. The 400K allele is associated with lower plasma plant sterol levels

[19,21]. This could lead to a lower activation of LXRs, therefore increasing the risk of glomerular dysfunction. Unfortunately, we could not measure plasma plant sterols in our study. Another nuclear receptor, the farnesoid X receptor (FXR) has been shown to play a critical role in the development of diabetic nephropathy in streptozotocin treated mice [7]. Since FXR is a bile acid receptor, it might interact with ABCG8 involved in bile acid secretion.

The D19H polymorphism was not significantly associated with renal disease in our study, although its effects on plasma plant sterols and bile acid secretion seem of greater magnitude than those of T400K [22]. There may be a lack of statistical power, but the trends for the two variants seem opposite. Therefore, the 400K variant may be linked to a different modification of the protein function than the 19H variant. In this respect, these polymorphisms

Table 3 – Baseline characteristics of the genotyped French participants in the DIAB2NEPHROGENE study, as a function of the presence of end-stage renal disease^a.

Characteristic	All (n = 2140)	End-stage renal disease		P ^a
		With (n = 53)	Without (n = 2087)	
Women (%)	39.3	47.2	39.1	0.04
Age (years)	65.3 ± 10.0	69.5 ± 7.9	65.2 ± 10.1	0.002
BMI (kg/m ²)	31.2 ± 5.9	28.6 ± 5.1	31.2 ± 5.9	0.002
Current smoking (%)	11.2	5.7	11.4	0.37
Prior myocardial infarction (%)	14.6	22.6	14.4	0.10
Diabetes duration (years)	16.2 ± 9.9	20.1 ± 8.0	16.1 ± 10.0	0.004
HbA1c (%)	7.81 ± 1.55	6.91 ± 1.35	7.83 ± 1.55	<0.001
Total cholesterol (mmol/l)	4.79 ± 1.15	4.69 ± 1.36	4.80 ± 1.15	0.52
SBP (mm Hg)	136.4 ± 19.4	141.8 ± 23.3	136.3 ± 19.3	0.04
DBP (mm Hg)	74.0 ± 11.1	70.3 ± 11.9	74.1 ± 11.1	0.02
UAE (mg/l) ^b	27.0 (8.4–142.5)	415.0 (120.3–768.5)	26.0 (8.0–135.0)	<0.001
eGFR (ml/mn/1.73 m ²) ^b	81.7 (57.6–109.5)	12.3 (9.2–22.0)	83.2 (59.6–110.4)	<0.001

Data are means ± SD, %, or medians (interquartile range). SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; UAE: urinary albumin excretion.

^a P values for the differences in each characteristic between the groups with and without renal events. P values were obtained using two-tailed t-tests or χ^2 tests, as appropriate.

^b Skewed data were log-transformed before analysis.

Table 4 – ABCG8 T400K (C>A) polymorphism genotype frequencies according to end-stage renal disease prevalence in DIAB2NEPHROGENE.

T400K (C>A)	End-stage renal disease		Statistics		
	Without, n (%)	With, n (%)	Prevalence, %	P χ^2 unadjusted	Odds ratio (95% CI) ^a
TT	1366 (65.5)	26 (49.1)	1.9	2 df: 0.028; additive: 0.05 Dominant (CA + AA vs CC): 0.015	Additive model 1 1.54 (0.99–2.38), P = 0.055 Additive model 2 1.63 (1.05–2.54), P = 0.03
TK	627 (30.0)	25 (47.2)	3.8		Dominant model 1 2.01 (1.15–3.54), P = 0.015 Dominant model 2 2.22 (1.25–3.94), P = 0.007
KK	94 (4.5)	2 (3.8)	2.1		
MAF	0.195	0.273			

MAF: minor allele frequency.
^a Logistic regression analysis, model 1: adjusted for sex, age, BMI, total cholesterol, HbA1c, diabetes duration and prior myocardial infarction. Model 2: idem + SBP, DBP.

have been associated with vascular diseases in subjects with familial hypercholesterolemia, but in opposite directions [25].

The key strength of the DIABHYCAR study is its prospective follow-up design, with assessment of the studied events as part of a clinical trial. However, this study is subject to several limitations. The participants in the DIABHYCAR study had type 2 diabetes with albuminuria. Therefore, the findings of this study may not be generally applicable to non-albuminuric diabetic patients or to non-diabetic subjects. Its statistical power for the detection of significant associations with end-stage renal disease was limited by the small number of incident cases. Nevertheless, the association of ABCG8 T400K polymorphism with renal disease was validated in the DIAB2NEPHROGENE population of patients with type 2 diabetes. In DIAB2NEPHROGENE, the duration of diabetes was 16 years on average vs. only 10 years in DIABHYCAR, which may explain how we were able to demonstrate an association with end-stage renal disease. In DIAB2NEPHROGENE, the number of events was lower than in DIABHYCAR, which might explain why the additive model appeared less significant than in DIABHYCAR. Mortality is high in patients with type 2 diabetes and most patients die before they develop end-stage renal disease. In the DIABHYCAR study, all the patients had micro/macrolbuminuria and thus, even higher risk of mortality. In addition, the studied polymorphisms are related to cardiovascular risk. Therefore, the association found with renal events might be due to a survival bias since the cases might include an excess of subjects who did not die of a cardiovascular event [37]. We performed a competing risk analysis yielding negative results, allowing us to reject this survival bias hypothesis.

In conclusion, a polymorphism of the sterol transporter ABCG8 has been associated with the incidence of new renal events and with prevalence of end-stage renal disease in type 2 diabetic patients. This result confirms the importance of sterol transport in kidney function. Further studies are needed to clarify the role of this transporter in renal pathophysiology.

Author contributions

A.N., S.F. and F.F. contributed to the conception and design of the study, researched data (acquisition, analysis, and interpretation)

and wrote the manuscript. A.L., J.-M.H., S.H., P.-J.S., M.M, G.V. and R.R. contributed to the conception and design of the study, and reviewed/edited the manuscript. N.B.-M. researched data (acquisition, analysis, interpretation) and reviewed/edited the manuscript. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding

The present work was supported by grants from “Association Diabète et Risque Vasculaire” (ADRV), and the “Association Robert Debré” (ARD). Serish Fatima was awarded a scholarship for a split PhD from the Higher Education Commission and the French Embassy in Pakistan.

The original DIABHYCAR trial was supported by grants from Sanofi-Aventis (France), the French Ministry of Health (Programme Hospitalier de Recherche Clinique – PHRC – Angers 1996) and the “Association Française des Diabétiques” (AFD; Research Grant 2004). The DIAB2NEPHROGENE study was supported by grants from the Programme Hospitalier de Recherche Clinique (French health ministry) in 2004 and 2008, by The Association Française des Diabétiques (AFD) (Research Grant 2003) and the Groupe pour l’Etude des Maladies Métaboliques et Systémiques (GEMMS – Poitiers). The funding sources had no role in the study design, data collection, data interpretation, or decision to publish this study.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest associated with this manuscript.

Acknowledgments

The authors thank Dr Maria Rudolph, independent consultant, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, for help with preparing the manuscript and reviewing the English.

The DIABHYCAR study group included: principal investigator: Prof. M. Marre (Bichat Hospital, Paris, France); steering committee:

F. Alhenc-Gelas, J.P. Boissel, F. Cambien, S. Etienne, A. Girault-Louvel, P. Gueret, M. Lièvre, J. Mann (Vice-Chairman), M. Marre, J. Ménard, P. Passa (chairman), P.F. Plouin, D. Vasmant, L. Vaur (secretary), G.C. Viberti, and C. Weisselberg; Central Co-ordinating Center: J.P. Boissel and M. Lièvre; Executive Committee: J.P. Boissel, V. Bost, M. Cambien, Y. Gallois, N. Genes, J. Gillet, M. Hervé, M. Lièvre, M. Marre, L. Martin, A. Perret-Hantzperg, P.F. Plouin, and L. Vaur; Biological Committee: F. Alhenc-Gelas (chairman), F. Cambien, A. Girault-Louvel (vice-chairman), M. Lièvre, M. Marre, and J. Ménard; Central End Point Committee: E. Bonnefoy, G. Chatellier (chairman), T. Moreau, and L. Pinède; Independent Data and Safety Committee: E. Eschwege, C.E. Mogensen, N. Victor, and S. Weber.

Participating physicians/centers of the DIAB2NEPHROGENE study are detailed here.

S Hadjadj, R Marechaud, F Torremocha, X Piguel (Diabetology Department, Poitiers – coordinating center), G. Touchard, F. Bridoux (Nephrology Department Poitiers), B. Duly-Bouhanick, G. Guilloteau, G. Subra, F. Tollis (Diabetology and Nephrology Department University Hospital of Angers), E. Archambeaud-Mouvieroux, (Diabetology Department, University Hospital of Limoges), P. Drouin, B. Guerci, L. Kessler (Diabetology and Nephrology Department University Hospital of Nancy), M. Marre, R Roussel, A Ankotche, F. Mignon (Diabetology and Nephrology Department University Hospital of Bichat-Paris), P. Lecomte, H. Nivet, J.M. Halimi (Diabetology and Nephrology Department University Hospital of Tours), G. Charpentier, D Dardari (Diabetology Department Hospital of Gilles de Corbeil), P Gourdy, M Mata (Diabetology Department, Rangueil Hospital, University Hospital of Toulouse), O Dupuis, B Beauduceau (Diabetology Department Bégin Armed Forces Hospital, Saint Mandé), JF. Pouget-Abadie, S. Baron, A. Sechet (Diabetology and Nephrology department Hospital of Niort), A.M. Chameau, J. Yver (Diabetology and Nephrology department Hospital of Angoulême), J.C. Courrèges (Diabetology department Hospital of Narbonne), F. Rachedi (Diabetology Department Hospital of Papeete), C Faure-Gerard, JY Poirier, F Bonnet (Diabetology Department, Southern Hospital, University Hospital of Rennes), MC Huc (Diabetology Department Hospital of Chatellerault).

REFERENCES

- [1] Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, Levi M, Gafter U. Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy. *J Lipid Res* 2014;55:561–72.
- [2] Xu Y, Huang J, Xin W, Chen L, Zhao X, Lv Z, et al. Lipid accumulation is ahead of epithelial-to-mesenchymal transition and therapeutic intervention by acetyl-CoA carboxylase 2 silencing in diabetic nephropathy. *Metabolism* 2014;63:716–26.
- [3] Proctor G, Jiang T, Iwahashi M, Wang Z, Li J, Levi M. Regulation of renal fatty acid and cholesterol metabolism, inflammation, and fibrosis in Akita and OVE26 mice with type 1 diabetes. *Diabetes* 2006;55:2502–9.
- [4] Zhou H, Tan KC, Shiu SW, Wong Y. Cellular cholesterol efflux to serum is impaired in diabetic nephropathy. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24:617–23.
- [5] Merscher-Gomez S, Guzman J, Pedigo CE, Lehto M, Aguillon-Prada R, Mendez A, et al. Cyclodextrin protects podocytes in diabetic kidney disease. *Diabetes* 2013;62:3817–27.
- [6] Mori Y, Hirano T. Ezetimibe alone or in combination with pitavastatin prevents kidney dysfunction in 5/6 nephrectomized rats fed high-cholesterol. *Metabolism* 2012; 61:379–88.
- [7] Wang XX, Jiang T, Shen Y, Caldas Y, Miyazaki-Anzai S, Santamaria H, et al. Diabetic nephropathy is accelerated by farnesoid X receptor deficiency and inhibited by farnesoid X receptor activation in a type 1 diabetes model. *Diabetes* 2010; 59:2916–27.
- [8] Patel M, Wang XX, Magomedova L, John R, Rasheed A, Santamaria H, et al. Liver X receptors preserve renal glomerular integrity under normoglycaemia and in diabetes in mice. *Diabetologia* 2014;57:435–46.
- [9] Fukushima M, Miura S, Mitsutake R, Fukushima T, Fukushima K, Saku K. Cholesterol metabolism in patients with hemodialysis in the presence or absence of coronary artery disease. *Circ J* 2012;76:1980–6.
- [10] Rogacev KS, Pinsdorf T, Weingartner O, Gerhart MK, Welzel E, van Bentum K, et al. Cholesterol synthesis, cholesterol absorption, and mortality in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 2012;7:943–8.
- [11] Silbernagel G, Baumgartner I, Wanner C, Marz W. Toward individualized cholesterol-lowering treatment in end-stage renal disease. *J Ren Nutr* 2014;24:65–71.
- [12] Yu XH, Qian K, Jiang N, Zheng XL, Cayabyab FS, Tang CK. ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2014;428:82–8.
- [13] Lally S, Owens D, Tomkin GH. Genes that affect cholesterol synthesis, cholesterol absorption, and chylomicron assembly: the relationship between the liver and intestine in control and streptozotocin diabetic rats. *Metabolism* 2007;56: 430–8.
- [14] Altemus JB, Patel SB, Sehayek E. Liver-specific induction of Abcg5 and Abcg8 stimulates reverse cholesterol transport in response to ezetimibe treatment. *Metabolism* 2014;63: 1334–41.
- [15] Berge KE, Tian H, Graf GA, Yu L, Grishin NV, Schultz J, et al. Accumulation of dietary cholesterol in sitosterolemia caused by mutations in adjacent ABC transporters. *Science* 2000;290: 1771–5.
- [16] Lee MH, Lu K, Hazard S, Yu H, Shulenin S, Hidaka H, et al. Identification of a gene, ABCG5, important in the regulation of dietary cholesterol absorption. *Nat Genet* 2001;27:79–83.
- [17] Hubacek JA, Berge KE, Cohen JC, Hobbs HH. Mutations in ATP-cassette binding proteins G5 (ABCG5) and G8 (ABCG8) causing sitosterolemia. *Hum Mutat* 2001;18:359–60.
- [18] Miwa K, Inazu A, Kobayashi J, Higashikata T, Nohara A, Kawashiri M, et al. ATP-binding cassette transporter G8 M429V polymorphism as a novel genetic marker of higher cholesterol absorption in hypercholesterolaemic Japanese subjects. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:183–8.
- [19] Berge KE, von Bergmann K, Lutjohann D, Guerra R, Grundy SM, Hobbs HH, et al. Heritability of plasma noncholesterol sterols and relationship to DNA sequence polymorphism in ABCG5 and ABCG8. *J Lipid Res* 2002;43:486–94.
- [20] Gylling H, Hallikainen M, Pihlajamaki J, Agren J, Laakso M, Rajaratnam RA, et al. Polymorphisms in the ABCG5 and ABCG8 genes associate with cholesterol absorption and insulin sensitivity. *J Lipid Res* 2004;45:1660–5.
- [21] Plat J, Bragt MCE, Mensink RP. Common sequence variations in ABCG8 are related to plant sterol metabolism in healthy volunteers. *J Lipid Res* 2005;46:68–75.
- [22] Jakulj L, Vissers MN, Tanck MW, Hutten BA, Stellaard F, Kastelein JJ, et al. ABCG5/G8 polymorphisms and markers of cholesterol metabolism: systematic review and meta-analysis. *J Lipid Res* 2010;51:3016–23.
- [23] Buch S, Schafmayer C, Volzke H, Becker C, Franke A, von Eller-Eberstein H, et al. A genome-wide association scan identifies the hepatic cholesterol transporter ABCG8 as a susceptibility factor for human gallstone disease. *Nat Genet* 2007;39:995–9.

- [24] Jiang ZY, Cai Q, Chen EZ. Association of three common single nucleotide polymorphisms of ATP binding cassette G8 gene with gallstone disease: a meta-analysis. *PLoS One* 2014;9: e87200.
- [25] Koeijvoets KC, van der Net JB, Dallinga-Thie GM, Steyerberg EW, Mensink RP, Kastelein JJ, et al. ABCG8 gene polymorphisms, plasma cholesterol concentrations, and risk of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2009; 204:453–8.
- [26] Teupser D, Baber R, Ceglarek U, Scholz M, Illig T, Gieger C, et al. Genetic regulation of serum phytosterol levels and risk of coronary artery disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2010;3: 331–9.
- [27] Marre M, Lievre M, Chatellier G, Mann JF, Passa P, Menard J, et al. Effects of low dose ramipril on cardiovascular and renal outcomes in patients with type 2 diabetes and raised excretion of urinary albumin: randomised, double blind, placebo controlled trial (the DIABHYCAR study). *BMJ* 2004;328:495.
- [28] Hadjadj S, Fumeron F, Roussel R, Saulnier PJ, Gallois Y, Ankotche A, et al. Prognostic value of the insertion/deletion polymorphism of the ACE gene in type 2 diabetic subjects: results from the Non-insulin-dependent Diabetes, Hypertension, Microalbuminuria or Proteinuria, Cardiovascular Events, and Ramipril (DIABHYCAR), Diabete de type 2, Nephropathie et Genetique (DIAB2NEPHROGENE), and Survie, Diabete de type 2 et Genetique (SURDIAGENE) studies. *Diabetes Care* 2008;31: 1847–52.
- [29] Jaziri R, Aubert R, Roussel R, Emery N, Maimaitiming S, Bellili N, et al. Association of ADIPOQ genetic variants and plasma adiponectin isoforms with the risk of incident renal events in type 2 diabetes. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2231–7.
- [30] Porchay-Balderelli I, Pean F, Emery N, Maimaitiming S, Bellili N, Travert F, et al. Relationships between common polymorphisms of adenosine triphosphate-binding cassette transporter A1 and high-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in a population with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2009; 58:74–9.
- [31] Lu H, Klaassen C. Gender differences in mRNA expression of ATP-binding cassette efflux and bile acid transporters in kidney, liver, and intestine of 5/6 nephrectomized rats. *Drug Metab Dispos* 2008;36:16–23.
- [32] Mendez-Gonzalez J, Julve J, Rotllan N, Llaverias G, Blanco-Vaca F, Escola-Gil JC. ATP-binding cassette G5/G8 deficiency causes hypertriglyceridemia by affecting multiple metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta* 1811;2011:1186–93.
- [33] Chan DC, Watts GF, Barrett PH, Whitfield AJ, van Bockxmeer FM. ATP-binding cassette transporter G8 gene as a determinant of apolipoprotein B-100 kinetics in overweight men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2188–91.
- [34] Calpe-Berdiel L, Escola-Gil JC, Blanco-Vaca F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. *Atherosclerosis* 2009;203:18–31.
- [35] Pawar A, Botolin D, Mangelsdorf DJ, Jump DB. The role of liver X receptor-alpha in the fatty acid regulation of hepatic gene expression. *J Biol Chem* 2003;278:40736–43.
- [36] Plat J, Nichols JA, Mensink RP. Plant sterols and stanols: effects on mixed micellar composition and LXR (target gene) activation. *J Lipid Res* 2005;46:2468–76.
- [37] Noordzij M, Leffondre K, van Stralen KJ, Zoccali C, Dekker FW, Jager KJ. When do we need competing risks methods for survival analysis in nephrology? *Nephrol Dial Transplant* 2013;28:2670–7.

Liste des tableaux

Tableau 1. Caractéristiques de la cohorte D.E.S.I.R. à l'inclusion	42
Tableau 2. Caractéristiques de la cohorte DIABHYCAR à l'inclusion.....	44
Tableau 3. Evenements principaux à la fin de l'étude DIABHYCAR.....	45
Tableau 4. Caractéristiques de la cohorte SURGENE à l'inclusion en fonction des stades de la néphropathie diabétique	48
Tableau 5. Caractéristiques de la cohorte SURGENE en fonction de l'incidence de la néphropathie diabétique incipiens et des événements rénaux pendant le suivi.....	49
Tableau 6. Caractéristiques de la cohorte GENESIS en fonction des stades de la néphropathie diabétique	50
Tableau 7. Caractéristiques de la cohorte GENEDIAB en fonction des stades de la néphropathie diabétique	51
Tableau 8. Caractéristiques des polymorphismes du gène <i>CDH13</i> sélectionnés.....	52

Liste des figures

Figure 1. Prévalence* (%) du diabète chez les adultes (20-79 ans) en 2013	6
Figure 2. Dialogue adipo-musculaire pour le contrôle du métabolisme des acides gras	12
Figure 3 Formation des multimères de l'adiponectine	14
Figure 4. Structure de l'adiponectine	14
Figure 5. Régulation de la transcription de l'adiponectine par différents signaux d'induction.	15
Figure 6. Représentation schématique de la transduction du signal de l'adiponectine impliquant ADIPOR1 et ADIPOR2 et le récepteur de l'insuline.	21
Figure 7. Structure proposée des Récepteurs ADIPOR1 et ADIPOR2 de L'adiponectine.....	23
Figure 8. Différences de structure entre les cadhérines classiques et la t-cadherine	26
Figure 9. Caractéristiques de structure du gène <i>CDH13</i> , de son promoteur et de sa protéine.	29
Figure 10. Représentation schématique de la constitution d'haplotypes et de Tag SNP	53
Figure 11. Représentation de blocs haplotypiques pour une séquence de 25Kb du gène <i>CDH13</i>	53
Figure 12. Principe de la technique Kaspar.....	55
Figure 13. Exemple de profil obtenu pour un génotypage par Kaspar. Génotypage réalisé sur 94 individus de la cohorte DIABHYCAR pour le rs11646213 de <i>CDH13</i>	56
Figure 14. Principe de dosage de l'adiponectine totale humaine.....	57
Figure 15. Réactions Redox spécifiques à la technique de detection par électro-chimio- luminescence de Meso Scale Discovery.	58
Figure 16. Plan de la plaque de dosage de la T-cadhérine	126
Figure 17. Résultats de la première expérience de dosage de la T-cadhérine.....	127
Figure 18. Plan de la plaque de dernière mise au point.....	128
Figure 19. Résultat de la manipulation de mise au point de la gamme de T-cadhérine avec un coating à 1µg/ml.....	130
Figure 20. Résultat de la manipulation de mise au point de la gamme de T-cadhérine avec un coating à 5µg/ml.....	131

Liste des abréviations

ACC	Acétyl-coenzyme A carboxylase
ACS	<i>Acyl-CoA synthetase</i>
ADIPO R1/R2	Récepteurs de l'adiponectine
<i>ADIPOQ</i>	Gène de l'adiponectine
ADNc	ADN complémentaire
AG	Acides gras
AMPK	<i>AMP activated proteine kinase</i>
APM1	<i>Adipose most abundant gene transcript 1</i>
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASP	<i>Acylation stimulating protein</i>
AVC	Accident vasculaire cérébral
Bc12	<i>Apoptosis regulating protein</i>
C1Q	Complément 1q
C/EBP	<i>CCAAT/ enhancer binding protein</i>
Ca	Calcium
<i>CDH13</i>	Gène de la T-cadhérine
COX2	Cyclo-oxygénase 2
CPT1	Carnitine palmitoyl transférase 1
CRP	Protéine C-réactive
DFG	Débit de filtration glomérulaire
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
E-selectine	<i>Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1</i>
EGF	Facteur de croissance épidermique
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Récepteur des œstrogènes
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ESRD	<i>End stage renal disease</i>
EUA	Excretion urinaire d'albumine
FAT/CD36	<i>Fatty acid translocase</i>
FATP1	<i>Fatty acid transport protein 1</i>

FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FLI	<i>Fatty liver index</i>
GBP28	<i>Gelatin-binding protein 28</i>
GLUT4	Transporteur type 4 du glucose
GPI	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
GR	Récepteur des glucocorticoïdes
GWAS	<i>Genome-wide association study</i>
HbA1c	Hémoglobine glyquée A1c
HDL	Lipoprotéines de haute densité
HMW	Haut poids moléculaire
HOMA-B	<i>Beta-cell function index</i>
HOMA-IR	<i>Insulin resistance index</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICC	Insuffisance cardiaque congestive
IEC	Inhibiteur de l'enzyme de conversion
IGF	Facteur de croissance analogue à l'insuline
IL-6	Interleukine-6
IM	Infarctus du myocarde
IMC	Indice de masse corporelle
Kb	Kilobases
KDa	Kilodalton
KO	<i>Knock out</i>
LDL	Lipoprotéines de basse densité
LMW	Bas poids moléculaire
MAF	Fréquence de l'allèle mineur
MMPs	Métalloprotéinases de la matrice
MMW	Poids moléculaire moyen
MoAbs	Anticorps anti-adiponectine humaine
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NASH	<i>Nonalcoholic steatohepatitis</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
NGF	Facteur de croissance nerveuse

Liste des abréviations

NO	Monoxyde d'azote
NOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAI-1	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
Pb	Paires de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	Facteurs de croissance dérivés des plaquettes
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PPAR γ	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PPRE	<i>Peroxisome proliferator response element</i>
SNP	Polymorphisme du à la variation d'un seul nucléotide
SREBP	Protéine de liaison régulatrice des stérols
TG	Triglycérides
TNF α	<i>Tumor necrosis factor α</i>
tPA	<i>Tissue plasminogen activator</i>
Trx-1	Tioredoxine-1
TZD	Thiazolidinediones
UCP2	<i>Uncoupling protein 2</i>
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	<i>Wild type</i>

Résumé

La T-cadhérine est un récepteur de l'adiponectine, protéine impliquée dans la physiopathologie du diabète. Dans les études d'association pangénomiques, les polymorphismes du gène de la T-cadhérine (CDH13) sont associés aux variations de concentrations d'adiponectine. Le but de notre étude est d'approfondir les relations entre les polymorphismes de CDH13, l'adiponectine circulante, et le risque de diabète et de ses complications. Nous avons sélectionné deux polymorphismes du gène CDH13. Les génotypages ont été effectués dans plusieurs cohortes : D.E.S.I.R., issue de la population générale française, DIABHYCAR, cohorte de sujets atteints du diabète de type 2, et trois cohortes de patients diabétiques de type 1, GENESIS, GENEDIAB et SURGENE. Dans la population générale, les polymorphismes de CDH13 sont associés à l'indice de masse corporelle, à l'HbA1c, au Fatty Liver Index, indice de stéatose hépatique, et aux concentrations plasmatiques d'adiponectine. Dans une étude cas-contrôle entre D.E.S.I.R. et DIABHYCAR, les polymorphismes sont associés au risque de diabète de type 2. Ces associations pourraient être dues aux effets bénéfiques de l'adiponectine. Dans les cohortes de sujets diabétiques de type 1, GENESIS et GENEDIAB, nous avons observé des associations entre les polymorphismes de CDH13, la prévalence et l'incidence de la néphropathie. L'analyse dans l'étude prospective SURGENE confirme ces associations. Le sens des relations observées dans cette étude est en faveur d'un rôle délétère de l'adiponectine dans la néphropathie diabétique. En conclusion, les associations observées pourraient s'expliquer par des variations d'adiponectinémie et suggérer un lien de causalité.

Mots-clé : adiponectine, diabète de type 1, diabète de type 2, études d'associations, polymorphismes génétiques, néphropathie, stéatose hépatique non alcoolique, T-cadhérine.

Abstract

T-cadherin is a receptor of adiponectin, a protein involved in the pathophysiology of diabetes. In genome-wide association studies, T-cadherin gene (CDH13) polymorphisms are associated with adiponectin concentrations. The aim of our study was to deepen the relationship between polymorphisms of CDH13, plasma adiponectin, and the risk of diabetes and its complications. We selected two polymorphisms in CDH13. Genotyping was performed in D.E.S.I.R., cohort drawn from the French general population, DIABHYCAR (subjects with type 2 diabetes) and three cohorts of patients with type 1 diabetes, GENESIS, GENEDIAB and SURGENE. In the general population, CDH13 polymorphisms were associated with body mass index, HbA1c, Fatty Liver Index, an index of hepatic steatosis, and plasma adiponectin. In a case-control study between D.E.S.I.R. and DIABHYCAR, polymorphisms were associated with the risk of type 2 diabetes. These associations with clinical phenotypes could be due to the beneficial effects of adiponectin. In subjects with type 1 diabetes from GENESIS and GENEDIAB, we observed associations between polymorphisms of CDH13 and the prevalence and the incidence of kidney disease. The analysis in the SURGENE prospective study confirmed these associations. The direction of the relationships observed in this study is in favor of a deleterious role of adiponectin in diabetic nephropathy. In conclusion, these associations may be explained by variations in adiponectin and suggest a causal relationship.

Keywords: adiponectin, association studies, diabetic nephropathy, genetic polymorphisms, non-alcoholic steatohepatitis, type 1 diabetes, type 2 diabetes, T-cadherin