

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE 2
ÉCOLE DOCTORALE BIOLOGIE - SANTÉ

Année universitaire 2017-2018

Thèse Soutenue en Vue de l'Obtention du Titre de Docteur de l'Université de Lille 2

Discipline : Génétique, génomique, bio-informatique
Spécialité : Biologie cellulaire

**ÉTUDE POST-GWAS DES GÈNES DE SUSCEPTIBILITÉ
AU DIABÈTE DE TYPE 2 : RÔLE PHARE DANS LA
FONCTION DE LA CELLULE β PANCRÉATIQUE**

Par **Fatou kiné NDIAYE**

Sous la direction du **Docteur Amélie BONNEFOND**

Soutenue le 18 décembre 2017 devant le jury composé de :

Jury :

Professeur Sophie LESTAVEL	Examinatrice, Présidente du Jury
Docteur Bertrand BLONDEAU	Rapporteur
Docteur Frédéric FUMERON	Rapporteur
Professeur Pierre FONTAINE	Examineur
Professeur Jean-Pierre RIVELINE	Examineur
Docteur Amélie BONNEFOND	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie grandement le Dr Frédéric FUMERON et le Dr Bertrand BLONDEAU d'avoir accepté de juger ce travail de thèse et d'avoir fait partie de mon comité de suivi de thèse. Merci pour les échanges enrichissants et vos conseils durant ces trois années.

Je remercie le Pr Pierre FONTAINE, le Pr Jean Pierre RIVELINE et le Pr Sophie LESTAVEL d'avoir accepté de me faire l'honneur de faire partie de mon jury de thèse.

J'adresse un très grand merci au Dr Amélie BONNEFOND ma directrice de thèse. Je la remercie de m'avoir encadrée, formée et conseillée durant ces trois années.

Je remercie également le Pr Philippe FROGUEL de m'avoir accueillie dans son unité et de m'avoir permis d'y réaliser ce travail.

Je remercie particulièrement Ana, Clara et Marlène avec qui j'ai travaillé sur ce projet. Mickael, Marie et Cécile pour les analyses bio-statistiques, Manue, Olivier et Iandry pour le RNAseq, Amar et son équipe pour leur participation au projet.

Merci à toute l'équipe de l'UMR 8199 qui m'a aussi formée et aidée tout au long de ces années, je ne peux pas citer tout le monde mais je vous remercie grandement. C'était un plaisir et un honneur de travailler avec vous tous. Merci pour votre participation à ces travaux, votre aide et votre soutien tout au long de ma thèse.

Je remercie mes parents et toute ma famille, sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. Vous nous avez toujours encouragées et soutenues dans nos études, je suis fière de vous. Je vous dédie cette thèse avec toute ma reconnaissance et mon amour.

A Moustapha, avec tout mon amour

RÉSUMÉ

Les études d'association pangénomique (GWAS) ont permis la mise en évidence de nouvelles voies putativement importantes dans la physiopathologie du diabète de type 2, par l'identification de variants génétiques fréquents (SNP) de susceptibilité au diabète de type 2, mais souvent avec peu ou pas d'informations sur le mécanisme sous-jacent expliquant le lien entre ces variants génétiques et le phénotype diabétique. En effet ces SNP sont souvent non codants et ont un effet modeste sur le risque de diabète de type 2, ce qui rend difficile leur étude d'un point de vue fonctionnel. Dès le début des GWAS, il a été suggéré que ces gènes associés au diabète de type 2, étaient des « gènes de la cellule β pancréatique » sans que des études fonctionnelles n'aient été faites de manière systématique. Dans ce contexte, nous avons mené une étude de *fishing* pour déblayer cette quantité importante de données provenant des GWAS et d'identifier des gènes potentiellement importants, pouvant être de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le premier objectif de ma thèse a été l'étude de l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans un panel de tissus humains comprenant des tissus pancréatiques et des tissus sensibles à l'insuline. Pour cela nous avons utilisé une technique de quantification non biaisée de l'expression génique dans le but de montrer si ces gènes associés au diabète de type 2 avaient une expression enrichie (proportion de gènes de susceptibilité au diabète de type 2 surexprimés dans les cellules β *versus* les autres tissus) dans les cellules β pancréatiques. Nous avons ensuite réalisé des études fonctionnelles sur la trentaine de gènes de susceptibilité au diabète de type 2 les plus exprimés dans notre modèle cellulaire par des tests de sécrétion d'insuline, des études de la viabilité cellulaire, du séquençage d'ARN (RNA-seq) et du western blotting dans la lignée de cellules β pancréatiques humaines EndoC- β H1. Les EndoC- β H1 sont des cellules en mesure de sécréter de l'insuline en réponse au glucose et à d'autres sécrétagogues. Nous les avons utilisé afin d'étudier le rôle de ces gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans la fonction de la cellule β pancréatique, en particulier dans la sécrétion insulinaire.

Notre étude d'expression a montré que l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 est enrichie de manière significative dans les cellules β pancréatiques et la lignée EndoC- β H1. Pour cinq gènes du diabète de type 2 (*TBC1D4*, *TCF19*, *KCNK16*, *CDKN2A* et *SLC30A8*) ayant une présence et un effet déjà connus dans la fonction des cellules β , nous avons démontré

une variation significative de la sécrétion d'insuline après extinction génique, en concordance avec la littérature. Par ailleurs, nous avons pu mettre en évidence quatre gènes de susceptibilité au diabète de type 2 (*PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6*) montrant une baisse significative de la sécrétion d'insuline après extinction génique et dont la présence ou la fonction dans la cellule β était pour l'heure inconnue. Les analyses RNA-seq ont montré une association significative de l'extinction de ces gènes avec des réseaux moléculaires liés à la physiopathologie du diabète de type 2 (par exemple : l'apoptose des cellules pancréatiques, l'insulinémie, la glycolyse, le stress du réticulum endoplasmique...). Et l'évaluation de l'expression de nos quatre gènes dans des îlots de souris obèses (*ob/ob*) ou traitées à la streptozotocine a montré une corrélation positive de leur expression avec celle de l'insuline.

Notre étude a démontré que les études fonctionnelles post-GWAS sont importantes et permettent de définir le lien de causalité des gènes de susceptibilité avec la maladie, et ainsi de mener à des progrès sur la compréhension de la physiopathologie de la maladie. Cette étude a permis la mise en évidence de gènes dont la fonction dans la cellule β était inconnue auparavant et qui interviennent dans la fonction de la cellule β pancréatique, et donc pourraient participer de manière importante dans la pathophysiologie du diabète de type 2.

ABSTRACT

Genome-wide association studies (GWAS) have identified a plethora of single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with the risk of type 2 diabetes, but most often with little information about the mechanism underlying the relationship between these genetic variants associated with type 2 diabetes and the diabetic phenotype. Indeed, these SNPs are often noncoding and have a modest effect on the risk of type 2 diabetes, making difficult their functional study. At the beginning of the GWAS era, it has been suggested that susceptibility genes for type 2 diabetes are strongly involved in pancreatic β cell gene function, while no functional studies had been systematically performed. In this context, we conducted a “fishing” study to decipher this large amount of data generated by GWAS and to pinpoint potentially important genes that may be new therapeutic targets.

The first objective of my thesis was to study the expression of type 2 diabetes susceptibility genes in a panel of human tissues comprising pancreatic and insulin-sensitive tissues using an unbiased technique of quantification of genes expression in order to show that these genes associated with type 2 diabetes were enriched in pancreatic β -cells. We then performed functional studies on the thirty mostly expressed genes in our cell model by insulin secretion tests, cell viability test, RNA sequencing (RNA-seq) and Western blotting in the human pancreatic β cell line (EndoC- β H1). These cells are able to secrete insulin in response to glucose and other secretagogues. Our goal was to study the role of these type 2 diabetes susceptibility genes in pancreatic β cell function, particularly in insulin secretion.

Our expression study of type 2 diabetes susceptibility genes showed that their expression is significantly enriched in pancreatic β cells and the EndoC- β H1 cell line. For five genes associated with type 2 diabetes (*TBC1D4*, *TCF19*, *KCNK16*, *CDKN2A* and *SLC30A8*) with an already known presence and function in pancreatic β cell, we showed a significant variation in glucose-stimulated insulin secretion after gene silencing, in agreement with the literature. In addition, we identified four type 2 diabetes associated genes (*PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* and *ZFAND6*), with a significant decrease in insulin secretion after gene silencing without already know function in pancreatic β cell. RNA-seq has shown a significant association between the extinction of these genes and molecular networks related to the pathophysiology of type 2 diabetes (e.g. apoptosis of pancreatic cells, insulinemia, glycolysis, endoplasmic reticulum stress response...). The assessment of the expression of our four genes in the islets of obese

mice (*ob/ob*) or treated with streptozotocin shows a positive correlation between their expression and the expression of insulin.

Our study has shown that post-GWAS functional studies are important and can help to define the causal link between these genes and the disease, and therefore to make progress in the understanding of the pathophysiology of type 2 diabetes. This study allowed us to identify genes whose function in β cell was not anterior known and which are involved in pancreatic β cell function and the pathophysiology of type 2 diabetes.

Tableau des matières

REMERCIEMENTS	2
RÉSUMÉ.....	3
ABSTRACT	5
LISTE DES TABLEAUX.....	9
LISTE DES FIGURES.....	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	13
Introduction	15
I. Etat de l’art sur le diabète.....	15
1. Épidémiologie du diabète	16
II. Les différents types de diabète	21
1. Méthodologie génétique	23
2. Les diabètes monogéniques	25
3. Le diabète de type 2 commun.....	32
Mon travail de Thèse.....	46
Physiologie du pancréas et physiopathologie du diabète de type 2	48
1. La sécrétion d’insuline	49
1.1. Sécrétion d’insuline stimulée par le glucose.....	49
1.2. La machinerie de sécrétion	52
1.3. Relation entre le diabète et la sécrétion d’insuline	53
2. La résistance à l’insuline	57
1.1. Mécanismes moléculaires de la réponse à l’insuline	59
1.2. La résistance à l’insuline au niveau foie	61
1.3. La résistance à l’insuline au niveau du muscle	62
1.4. La résistance à l’insuline au niveau du tissu adipeux	65
Matériels et Méthodes	66
1. Echantillons du panel de tissus humains	66
2. Design et sélection des sondes du panel de gènes sélectionnés pour l’étude d’expression	68
3. Le protocole NanoString	74
4. Le modèle cellulaire utilisé.....	74
5. La culture des EndoC-βH1	76
6. Principe des siRNA et leur transfection dans les EndoC-βH1	76
7. Test de sécrétion d’insuline dans les EndoC-βH1	78

8. Mesure de la viabilité cellulaire.....	79
9. Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative.....	79
10. Isolement et Traitement des îlots pancréatiques de souris.....	81
11. RNA-seq.....	83
12. Marquage par immunofluorescence.....	84
13. Extraction protéique et Western Blot.....	85
14. Calculs statistiques.....	86
Résultats et Discussion de l'étude.....	89
1. Expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans un large panel d'organes, de tissus et de cellules humaines.....	89
2. Effets de l'extinction des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans la lignée humaine EndoC-βH1.....	93
3. Confirmation de l'expression de <i>PRC1</i> , <i>SRR</i> , <i>ZFAND6</i> et <i>ZFAND3</i> dans les cellules β pancréatiques humaines.....	110
4. Déchiffrage des pathways et des networks biologiques affectés par la baisse d'expression de <i>PRC1</i> , <i>SRR</i> , <i>ZFAND6</i> et <i>ZFAND3</i> dans les EndoC-βH1.....	113
5. Evaluation de <i>PRC1</i> , <i>SRR</i> , <i>Zfand3</i> et <i>Zfand6</i> dans les îlots de souris avec une fonction β pancréatique altérée.....	121
6. Confirmation de la baisse d'expression de <i>PRC1</i> , <i>SRR</i> , <i>ZFAND3</i> et <i>ZFAND6</i> au niveau protéique.....	122
Conclusion et Discussion générale.....	126
Perspectives.....	129
But de notre étude.....	130
Bibliographie.....	132
Annexe 1. Article.....	159
Annexe 2. Design et sélection des sondes du panel de gènes sélectionnés pour l'étude d'expression.....	217
Annexe 3. Heatmaps représentant l'expression des gènes de susceptibilité au diabète dans notre panel d'étude.....	237

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Critères de l'ADA pour le diagnostic du diabète

Tableau 2: Prix Nobel pour des découvertes majeures dans la recherche sur le diabète

Tableau 3: Dépistage et diagnostic du diabète gestationnel

Tableau 4: Augmentation du risque de diabète de type 2 due au mode de vie montrée par les études épidémiologiques

Tableau 5: Vue d'ensemble de la classification et de la fonction physiologique des GLUT

Tableau 6: Voies du métabolisme du glucose altérées lors de la résistance à l'insuline

Tableau 7: Séquences et références des primers humains

Tableau 8: Séquences des primers de souris

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence du diabète dans le monde en 1980 et en 2014 dans la population masculine

Figure 2 : Prévalence du diabète dans le monde en 1980 et en 2014 dans la population féminine

Figure 3 : Evolution de la prévalence du diabète en Chine de 1980 à 2008

Figure 4 : Complications majeures liées au diabète

Figure 5 : Historique de la découverte des gènes du diabète de type 2 monogénique et les méthodes utilisées

Figure 6 : Rôle clé des gènes du diabète monogénique dans la cellule β pancréatique

Figure 7: Illustration du rôle du canal K^+ ATP dépendant dans la sécrétion d'insuline au niveau de la cellule β pancréatique

Figure 8 : Spectre des effets de différents variants dans *KCNJ11* et *ABCC8* sur le risque de diabète. (Florez et al 2014 chapitre 17)

Figure 9 : Augmentation de la prévalence du diabète de type 2 en France selon l'âge et le sexe en 2007

Figure 10 : Prévalence du diabète de type 2 dans trois populations (non-Pimas du Mexique, Indiens Pimas du Mexique, Indiens Pimas des Etats-Unis)

Figure 11 : Prévalence du diabète de type 2 selon l'indice de masse corporelle (IMC) dans la population adulte d'indiens Pimas

Figure 12 : Incidence du diabète par rapport à l'activité physique sur une population de Pima

Figure 13 : Gènes de susceptibilité au diabète de type 2 et leurs effets sur le risque de diabète de type 2

Figure 14 : *Overlaps* entre les loci associés au diabète de type 2 et ceux associés aux traits glycémiques

Figure 15 : Représentation schématique de mon travail de thèse

Figure 16 : Sécrétion d'insuline bi phasique en réponse au glucose

Figure 17 : Machinerie d'exocytose des vésicules de sécrétion

Figure 18 : Changements dans la fonction et la masse de cellules β au cours du diabète de type 2 et les mécanismes causaux proposés

Figure 19 : Réponse à l'insuline après l'administration de 20 mg de glucose à un témoin (A) et à un patient diabétique (B)

Figure 20 : Effets pléiotropes de l'insuline

Figure 21 : Structure et domaines du récepteur de l'insuline

Figure 22 : Voie de signalisation IRS-PI3-kinase (A) et CAP-Cbl (B)

Figure 23 : Mécanisme de la résistance à l'insuline hépatique médiée par le diacylglycérol-PKC ϵ

Figure 24 : La translocation de GLUT4 en réponse à l'insuline dans la lignée d'adipocytes 3T3-L1

Figure 25 : Principe des deux techniques d'isolation des cellules β

Figure 26 : Comparaison de l'expression des marqueurs de l'îlot pancréatique dans les cellules isolées par LCM ou par FACS

Figure 27 : Principe de la technologie nCounter de NanoString

Figure 28 : Expression des gènes de ménage dans notre panel de tissus humains

Figure 29 : Expression des marqueurs tissulaires des îlots pancréatiques (A), tissu adipeux (B), Cerveau (C) dans notre panel de tissus humains

Figure 30 : Les différentes étapes de la production des EndoC β H1

Figure 31 : Quantification dans les EndoC β H1 de l'expression des marqueurs spécifiques de la cellule β et des marqueurs des autres types cellulaires pancréatiques

Figure 32 : Extinction de l'expression génique par siRNA

Figure 33 : Souris ob/ob mutée sur le gène de la Leptine (à droite) et témoin (à gauche)

Figure 34 : Le protocole de RNA-seq

Figure 35 : Schéma de l'analyse statistique pour l'étude de l'expression de nos gènes par NanoString

Figure 36 : Schéma de l'analyse statistique après GSIS

Figure 37 : Enrichissement de l'expression des gènes du diabète monogénique, dans notre panel d'organes, de tissus et de cellules humaines

Figure 38 : Enrichissement de l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2, dans notre panel d'organes, de tissus et de cellules humaines.

Figure 39 : Régulation de l'expression d'*IRX3/IRX5* par des variants *FTO* dans la boucle enhancer *FTO* et promoteur d'*IRX3/IRX5*

Figure 40 : Les gènes de notre étude selon leur niveau d'expression dans les EndoC β H1

Figure 41 : Extinction des gènes ayant atteint au moins 40% d'extinction

Figure 42 : Baisse de la sécrétion de l'insuline dans les EndoC-βH1 après extinction de *HNF4A* (A), *KCNJ11* (B) et *GCK* (C)

Figure 43 : Sécrétion de l'insuline dans les EndoCβH1 après la baisse de l'expression de *MPHOSPH9* (A), *SRR1* (B), *FAF1* (C), *KLHDC5* (D)

Figure 44 : Baisse de la sécrétion de l'insuline dans les EndoCβH1 après extinction de *TCF19* (A), *SLC30A8* (B), *TBC1D4* (C), *CDKN2A* (D), *KCNK16* (E)

Figure 45 : Comparaison GSIS test après extinction ou surexpression de *CDKN2A*

Figure 46 : Baisse de la sécrétion de l'insuline dans les EndoCβH1 après la baisse de l'expression de *PRC1* (A), *SRR* (B), *ZFAND3* (C), *ZFAND6* (D)

Figure 47 : Comparaison GSIS test après extinction de *SRR*

Figure 48 : Expression de *SRR* dans notre panel de tissus humains

Figure 49 : Immunomarquage sur des coupes d'îlots pancréatiques humains

Figure 50 : Immunomarquage sur des coupes de pancréas humains

Figure 51 : Immunomarquage sur des EndoC-βH1

Figure 52 : Réseaux moléculaires affectés par la baisse d'expression de *PRC1* (A, B) et baisse significative de la viabilité cellulaire due à la baisse de l'expression de *PRC1* (C)

Figure 53 : Réseaux moléculaires affectés par la baisse d'expression de *SRR*

Figure 54 : Réseaux moléculaires affectés par la baisse d'expression de *ZFAND3*

Figure 55 : Réseaux moléculaires affectés par la baisse d'expression de *ZFAND6*

Figure 56 : Expression de *Prc1*, *Srr*, *Zfand3* et *Zfand6* dans les îlots de souris

Figure 57 : Quantification du niveau protéique de *PRC1* après extinction génique

Figure 58 : Quantification du niveau protéique de *SRR* après extinction génique

Figure 59 : Quantification du niveau protéique de *ZFAND3* après extinction génique

Figure 60 : Expression de *ZFAND3* par RNAseq sur «*single cell*» dans différents types cellulaires du pancréas

Figure 61 : Enrichissement de l'expression des gènes de l'obésité polygénique et de l'IMC, dans notre panel d'organes, de tissus et de cellules humaines

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc : Acide Désoxyribonucléique complémentaire

ADP: Adénosine diphosphate

AMPc: Adénosine monophosphate cyclique

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATP: Adénosine triphosphate

CI : Interval de Confiance

DAG: Diacylglycérol

FFA: Free Fatty Acid

FTO: Fat mass and obesity

GAD: Acide glutamique decarboxylase

GCK: Glucokinase

GLT: Glucose Loading Test

GLUT: Transporteur de glucose

GSIS: Glucose Stimulated Insulin Secretion

GWAS: Genome Wide Association Study

HbA1c: Hémoglobine glyquée

HGPO: Hyperglycémie Provoquée par voie Orale

HNF: Hepatocyte Nuclear Factor

IA-2: Tyrosine phosphate ICA512

IADPSG: International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups

IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine

IMC : Indice de Masse corporelle

INS: Insuline

IR: Insulin Receptor

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

IRS: Insulin Receptor Substrate

KATP: Canaux potassique sensible à l'ATP

kb: Kilobase

LADA: Latent Autoimmune Diabetes in Adults

MDI: Monogenic Diabetes of Infancy

MET: Metabolic Equivalent
MODY: Maturity-onset diabetes of the young
NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey
NIH: National Institutes of Health
NTP: Non-targeting pool
ob/ob: Obese mouse,
OGTT: Oral Glucose Tolerance Test
pb: Paire de base
PBS: Phosphate Buffered Saline
PRC1: Protein Regulator of Cytokinesis 1
qPCR: quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA-seq: Ribonucleic Acid sequencing
RP: Reserve Pool
RRP: Readily Release Pool
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
SNARE: N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
STZ: Streptozotocine
SRR: Serine Racemase
T2D: Type 2 Diabetes
TNF α : Tumor Necrosis Factor
Tyr: Tyrosine
ZFAND3: Zinc Finger AN1-Type Containing 3
ZFAND6: Zinc Finger AN1-Type Containing 6
ZnT8: Zinc Transporter 8

Introduction

I. Etat de l'art sur le diabète

Le diabète est caractérisé par une concentration élevée de glucose dans le plasma sanguin appelée « hyperglycémie » avec une glycémie à jeun $> 126 \text{ mg/dL}$ [7 mmol/L]), ou par un taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c) $\geq 6,5\%$ ou un taux de glucose plasmatique mesuré 2 heures après une prise orale de 75 g de glucose $\geq 200 \text{ mg/dL}$ ($11,1 \text{ mmol/L}$) (**Tableau 1**), et est précédé d'un état de pré-diabète avec des caractéristiques listées dans le **Tableau 1** (1). Le diabète est considéré comme la maladie pandémique du 21^{ème} siècle, mais cela n'en fait pas pour autant une maladie nouvelle. Elle a été mentionnée dans le papyrus d'Eber en l'an 1500 avant Jésus Christ par les anciens égyptiens comme un état rare dans lequel la personne urinait beaucoup et perdait du poids, ce qui est symptomatique du diabète (2). En Chine et en Inde, il a aussi été trouvé des ouvrages de médecine écrits entre le 2^{ème} et le 6^{ème} siècle où il a été mentionné le terme de « *t'ang-naio-ping* » qui veut dire « maladie du sucre dans les urines » (3,4). Le terme « diabète sucré » a été utilisé pour la première fois par le physicien grec Aristote (81-130) qui a été le premier à souligner le goût doux plutôt sucré de l'urine des personnes atteintes. En 1674, Thomas WILLIS confirme les observations d'Aristote (4). C'est finalement en 1776 que la concentration de glucose dans l'urine (glycosurie) a été mesurée pour la première fois dans les urines de patients par Matthew DOBSON (1735-1784) qui a montré que chez les patients diabétiques, il y avait une augmentation significative de la concentration en glucose dans les urines, de même que dans le sérum sanguin des patients dont il isole un dépôt ayant le goût du sucre (5); ce qui a été confirmé par des expériences en Chimie par Apollinaire BOUCHARDAT (1806-1886) et Eugène MELCHIOR PELIGOT (1811-1890) en 1838 (4). Avant la compréhension des mécanismes responsables de la maladie, au 19^{ème} siècle, l'issue était fatale au bout de quelques jours ou quelques mois après le diagnostic à cause de l'hyperglycémie chronique (6). La recherche sur les causes et les conséquences de la maladie a permis une meilleure compréhension et un meilleur traitement de cette dernière, ce qui a généré une dizaine de prix Nobel au siècle dernier listés dans le **Tableau 2** (6).

	Diabète	Pré-diabète
HbA1C (%)	≥ 6,5	5,7 - 6,4
Glycémie à jeun (mg/dL)	≥ 126	100 - 125
Glycémie mesurée 2h après une HGPO (mg/dL)	≥ 200	140 - 199

Tableau 1 : Critères de l'ADA pour le diagnostic du diabète

(Source: William T. Cefalu. The Journal of Clinical and Applied Research and Education; 2017)

HbA1c, hémoglobine glyquée ; *HGPO*, hyperglycémie provoquée par voie orale

Table 1. Nobel Prizes for Diabetes-Related Research.

Year	Category	Recipient	Contribution
1923	Medicine	F.G. Banting and J.J.R. Macleod	Discovery of insulin
1947	Medicine	C.F. Cori and G.T. Cori	Discovery of the course of the catalytic conversion of glycogen
1947	Medicine	B.A. Houssay	Discovery of the role of hormones released by the anterior pituitary lobe in the metabolism of sugar
1958	Chemistry	F. Sanger	Work on the structure of proteins, especially insulin
1971	Medicine	E.W. Sutherland	Discoveries concerning the mechanisms of action of hormones
1977	Medicine	R. Yalow	Development of radioimmunoassays for peptide hormones
1992	Medicine	E.H. Fischer and E.G. Krebs	Discoveries concerning reversible protein phosphorylation as a biological regulatory mechanism

Tableau 2 : Prix Nobel pour des découvertes majeures dans la recherche sur le diabète

(Source: Polonsky. New England Journal of Medicine; Octobre 2012)

1. Épidémiologie du diabète

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), près de 10% des adultes dans le monde présentent une glycémie supérieure ou égale à 1,26 g/L. La prévalence du diabète a augmenté de 4,3% en 1980 à 9% en 2014 chez les hommes et de 5% à 7,9% chez les femmes, avec un nombre total de sujets diabétiques qui est passé de 108 millions en 1980 à 422 millions en 2014 dans le monde ; ce qui fait en moyenne une augmentation de la prévalence de 4,7 à 8,5% dans la population adulte mondiale, confirmant le caractère pandémique de la maladie (**Figure 1 et 2**) (7).

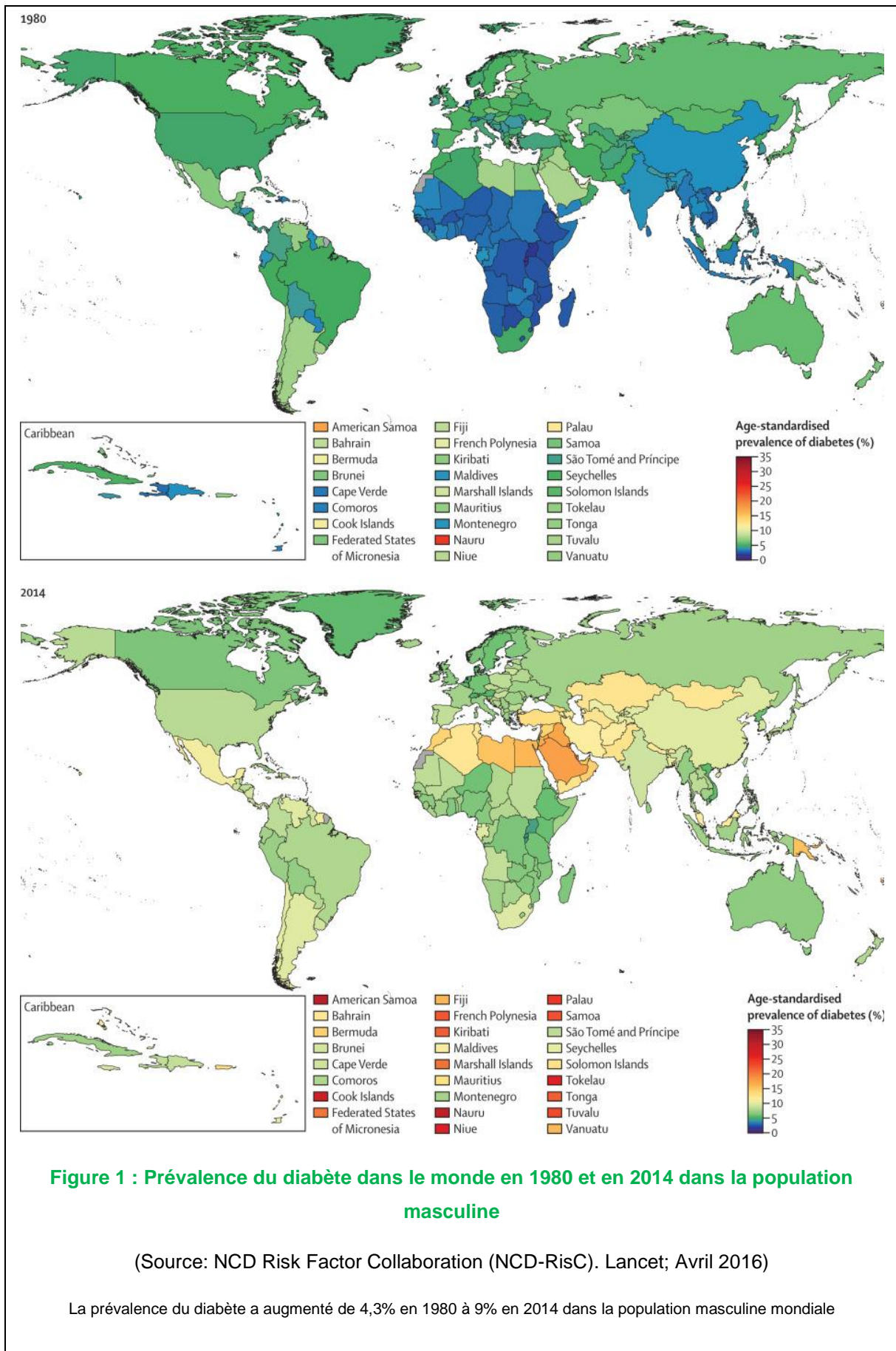
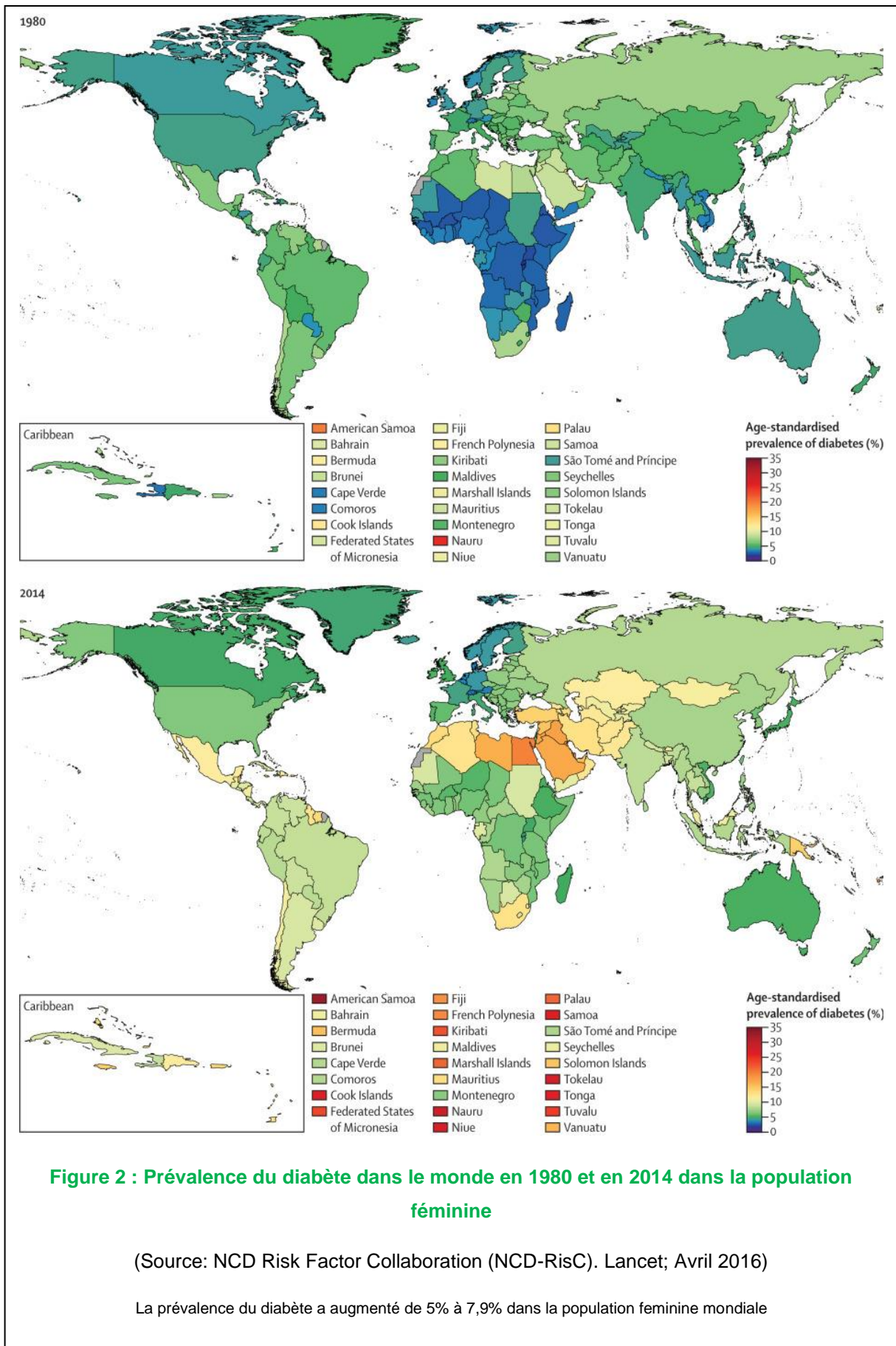


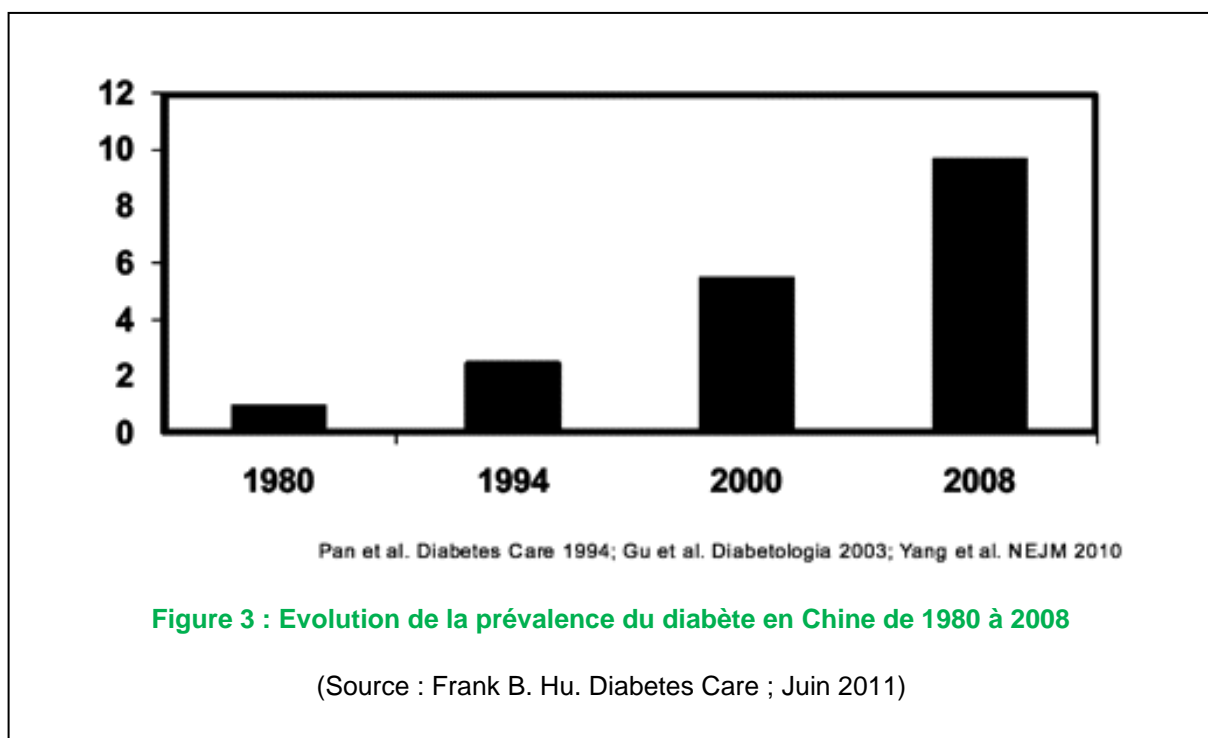
Figure 1 : Prévalence du diabète dans le monde en 1980 et en 2014 dans la population masculine

(Source: NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC). Lancet; Avril 2016)

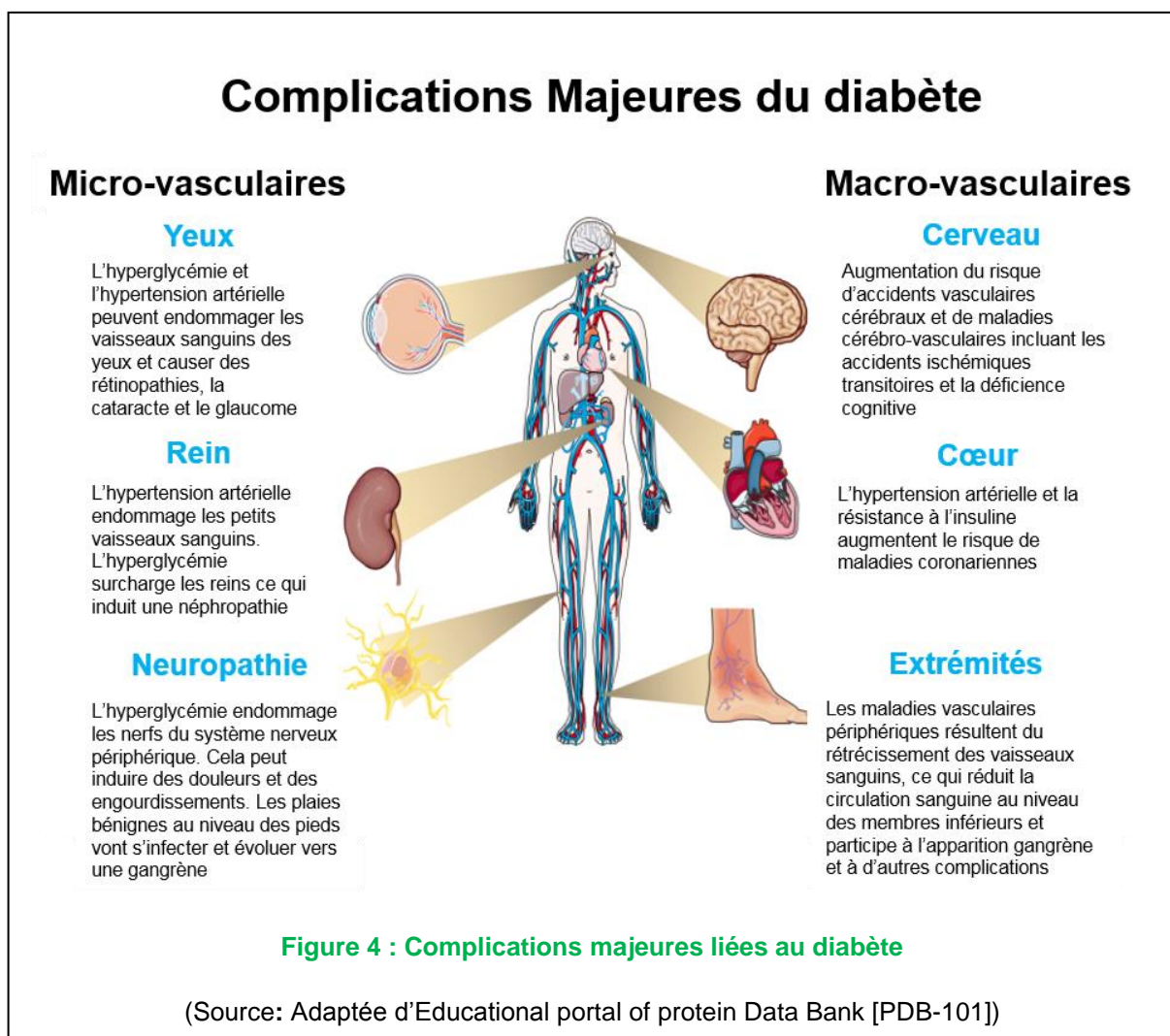
La prévalence du diabète a augmenté de 4,3% en 1980 à 9% en 2014 dans la population masculine mondiale



En 2013, plus de 4,5% des français étaient traités pour un diabète d'après la fédération internationale du diabète. Par ailleurs, toutes les six secondes, une personne meurt des complications du diabète ; ce qui d'ici 2030 selon les estimations de l'OMS fera du diabète la 7^{ème} cause de mortalité dans le monde sachant que le diabète était déjà en 2007 la 4^{ème} cause de mortalité dans les pays développés (8). Considéré auparavant comme une maladie des pays riches, le diabète présente maintenant une augmentation de sa prévalence plus importante dans les pays en voie de développement ou à revenu intermédiaire (9,10), peut-être à cause de l'occidentalisation brutale du mode de vie qui produit plus de facteurs à risque de surpoids et d'obésité. Dans ces pays, la progression économique peut être à l'origine de l'altération du cadre et des conditions de vie car elle entraîne un changement dans le mode de vie incluant régime alimentaire et activité physique sur une ou deux générations, ce qui augmente la susceptibilité de la population au diabète avec un gain de poids moins important comparé à celui des pays développés. L'un des exemples les plus frappants est celui de l'Asie qui a connu une croissance, une urbanisation et un changement rapide des habitudes alimentaires ces dernières décennies. Cela a eu pour conséquence une augmentation importante de la prévalence du diabète qui est passé de 1% en 1980 à 10% en 2008 (**Figure 3**) (11). Avec le phénotype « *metabolically obese* » (c'est-à-dire avec un poids corporel normal mais présentant une augmentation de l'adiposité abdominale) qui est fréquent en Asie, les sujets asiatiques développent un diabète plus précoce comparé aux sujets occidentaux, avec pourtant un degré d'obésité plus faible (12).



Lorsqu'il n'est pas traité ou que le traitement n'est pas adéquat, le diabète peut générer des complications qui peuvent affecter divers organes de l'organisme (incluant le cœur, les vaisseaux sanguins, le cerveau, les yeux, les reins et les nerfs) (**Figure 4**) et augmentent de manière significative le risque de mortalité prématurée. Le risque pour les sujets diabétiques de développer une maladie cardiovasculaire est de deux à quatre fois supérieur à la normale et une grande majorité d'entre eux en meurent (8). La probabilité qu'ils subissent une amputation de membres inférieurs est 10 fois plus élevée comparé aux sujets non diabétiques ; cela est dû à l'altération de la circulation sanguine et à des lésions nerveuses surtout au niveau du pied augmentant le risque d'ulcération et d'infection du pied chez le sujet diabétique. Des lésions des petits vaisseaux sanguins de la rétine dues à l'hyperglycémie à long terme est une cause importante de cécité : 2% des sujets diabétiques depuis une durée d'environ 15 ans deviennent aveugles et 10% développent des anomalies visuelles sévères. A ces conséquences s'ajoute le risque d'accidents cardiaques et d'accidents vasculaires cérébraux.



Toutes ces complications expliquent le fait que les coûts médicaux sont 2 à 5 fois plus élevés chez un sujet diabétique *versus* un sujet non diabétique. Le coût annuel mondial des soins de santé pour les diabétiques (entre 20 et 79 ans) était estimé à 286 milliards en 2007 (8), 376 milliards en 2010 et est estimé à 490 milliards en 2030 (11).

II. Les différents types de diabète

Il existe principalement 3 types de diabète que sont le diabète de type 1, le diabète de type 2 et le diabète gestationnel (13) mais ils ne sont pas les seuls ; il existe aussi le LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), et d'autres formes particulières de diabète dues à des maladies du pancréas exocrine (par exemple la mucoviscidose) ou encore dues à des médicaments (par exemple avec l'utilisation de glucocorticoïdes, dans le traitement de VIH / SIDA, ou après transplantation d'organes) (1).

Le diabète de type 1 est dû à une destruction de la quasi-totalité des cellules β pancréatiques (cellules sécrétrices d'insuline qui est une hormone hypoglycémiante) par une réaction auto-immune (14). Ainsi, les patients ne sont plus capables de produire de l'insuline et doivent être immédiatement traités par insulinothérapie. Les anticorps caractéristiques du diabète de type 1 sont les anticorps anti-GAD (glutamic acid decarboxylase), les anticorps anti-IA-2 (protein tyrosine phosphatase), les anticorps IAA (anticorps anti-Insuline) et les anticorps anti-ZnT8 (zinc transporter) (14–19).

Quant au diabète de type 2, il résulte d'un défaut de la sécrétion d'insuline par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas, dans le contexte d'une mauvaise utilisation du glucose par l'organisme due à un défaut de réponse totale ou partielle des organes cibles à l'insuline (phénomène appelé insulino-résistance ou résistance à l'insuline). Le diabète de type 2 est la forme la plus répandue de diabète (~90-95% des cas de diabète en France).

Parmi les formes de diabète de type 2 (c'est-à-dire le diabète non auto-immun), il existe le diabète de type 2 commun qui est dû à l'interaction de facteurs environnementaux et de facteurs génétiques, et le diabète de type monogénique pour lequel une seule mutation génétique est suffisante pour causer la maladie.

Le LADA est défini comme un diabète non insulino-dépendant avec une présence d'anticorps auto-immuns anti-GAD, anti-IA-2, IAA ou anti-ZnT8 (20). Les critères de diagnostic du LADA proposés par « *Action LADA group* » et « *Immunology of Diabetes Society* » sont les suivants : le patient doit être âgé entre 30 et 70 ans, avec la présence d'au moins un des anticorps auto-immuns dirigés contre les cellules des îlots pancréatiques et présentant un diabète non insulino-dépendant pendant au moins six mois. La présence des anticorps auto-immuns dirigés contre les cellules des îlots pancréatiques permet de distinguer le LADA du diabète de type 2 et la non dépendance à l'insuline lors du diagnostic permet de le différencier du diabète de type 1 (21).

Le diabète gestationnel est caractérisé par une intolérance au glucose qui entraîne une hyperglycémie de sévérité variable selon les cas qui a débuté ou a été diagnostiqué pour la première fois pendant la grossesse (22). Le diabète gestationnel peut avoir des conséquences pour la mère et le nouveau-né, avec un poids de naissance supérieur au 90^e percentile, un accouchement par césarienne, une hypoglycémie néonatale clinique et une hyperinsulinémie fœtale, un accouchement prématuré etc (23). Il a aussi été montré que les enfants dont la mère présentait un diabète gestationnel ont un risque plus élevé de développer une résistance à l'insuline, une adiposité abdominale importante (24), une obésité pendant l'enfance et un risque plus élevé de développer plus tôt des maladies cardiovasculaires (25). Les mères qui ont eu un diabète gestationnel ont quant à elles plus de risque de développer un diabète de type 2 (26,27). Deux méthodes peuvent être utilisées pour le diagnostic du diabète gestationnel : la première ne comporte qu'une étape de diagnostic et utilise les critères recommandés par l'IADPSG (*International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups*) (**Tableau 3A**) (28). La deuxième méthode, couramment utilisée aux Etats-Unis, a été mise en place par le NIH (*National Institutes of Health*) et elle se fait en 2 étapes. Lorsque la concentration en glucose plasmatique est supérieure à 140mg/dL après un premier *glucose load test* (GLT) utilisant 50g de glucose sans être à jeun, un deuxième test de tolérance au glucose est fait avec cette fois-ci 100g de glucose (**Tableau 3B**) (29).

A		Diabète gestationnel
OGTT avec 75g de glucose	Test de l'ADPSG	
	Glycémie à jeun (mg/dL)	≥ 92
	1-h plasma glucose (mg/dL)	≥ 180
	2-h plasma glucose (mg/dL)	≥ 153
B		Diabète gestationnel
Etape 1 : GLT avec 50g de glucose	Test du NIH	
	1-h plasma glucose (mg/dL)	≥ 140
Etape 2 : OGTT avec 100g de glucose	Glycémie à jeun (mg/dL)	95 - 105
	1-h plasma glucose (mg/dL)	180 - 190
	2-h plasma glucose (mg/dL)	155 - 165
	3-h plasma glucose (mg/dL)	140 - 145

Tableau 3 : Dépistage et diagnostic du diabète gestationnel

OGTT, Oral glucose tolerance test; *GLT*, glucose load test

(Source : Adapté d'American Diabetes Association. Diabetes Care ; Janvier 2014)

1. Méthodologie génétique

Différentes techniques telles que l'étude de liaison génétique au sein des familles, l'analyse de gènes candidats, l'analyse de familles consanguines, les études d'association pangénomiques GWAS et plus récemment le séquençage de nouvelle génération (NGS) ont été utilisés dans l'étude de la génétique du diabète de type 2.

L'étude de liaison génétique est basée sur le suivi des haplotypes de marqueurs génétiques associés à une maladie dans des familles. Il est idéal dans ce type d'étude d'avoir des familles comprenant au minimum trois générations pour pouvoir conclure sur l'existence d'une liaison génétique entre les marqueurs génétiques étudiés et la maladie. Les marqueurs microsatellites qui sont très polymorphes (1 à 4 nucléotides souvent des « CA », répétés entre 10 et 40 fois avec un taux d'hétérogénéité de 70%), fréquents (tous les 25 à 100Kb) (30), souvent introniques ou intergéniques, et uniformément distribués dans le génome ont été le plus souvent choisis pour les études de liaison (31). Dans ces études, le taux de recombinaison chromosomique est important car il permet de calculer le score de vraisemblance de liaison exprimé en logarithme

décimale ou *Lodscore* $Z(\Theta)$. Le *Lodscore* se base sur une méthode d'analyse paramétrique qui suppose de définir *a priori* des données relatives à la composante génétique de la maladie dont le gène est à localiser (32). Lorsqu'il est supérieur à 3, le résultat est significatif et il y a liaison entre les marqueurs et la maladie comme dans le cas de maladies monogéniques. Lorsqu'il est entre -2 et 3, le résultat n'est pas significatif et ambiguë ; il faut augmenter le nombre de méioses analysées c'est-à-dire le nombre d'individus dans l'analyse pour définir s'il y a liaison ou non. En deçà de -2, il est conclu qu'il n'y a pas de liaison entre les marqueurs et la maladie (33). Les loci morbides ont été cartographiés en identifiant leur liaison génétique aux polymorphismes. Le principe repose sur la recherche de co-ségrégation ; c'est-à-dire de transmission conjointe d'une génération à l'autre entre la maladie qui est le phénotype étudié, et un allèle particulier ou un assortiment d'allèles au même locus (haplotype) du polymorphisme génétique étudié. Les études génétiques sont faites dans des familles où la maladie s'est manifestée. Les analyses sont ensuite réalisées sur des apparentés (d'une même famille) atteints ou non par la maladie tout en tenant compte de certains paramètres lors du calcul du *Lodscore* comme :

- le mode de transmission (transmission dominante, co dominante ou récessive)
- la pénétrance (pourcentage de sujets porteurs de la mutation et exprimant la maladie)
- la prévalence estimée de la maladie dans la population générale
- l'existence éventuelle de cas sporadique (sujets non porteurs de la mutation et ayant développé la maladie).

Cette approche a été très fructueuse pour l'étude des phénotypes hautement pénétrants (c'est-à-dire que lorsqu'on porte l'allèle, la probabilité d'avoir le phénotype est importante) tels que les diabètes monogéniques.

Pour l'approche gène candidat, les gènes codant des protéines clefs impliquées dans l'homéostasie glucidique (notamment la machinerie de sécrétion d'insuline) ont été des candidats privilégiés pour un éventuel défaut génétique causant un diabète monogénique. Après la sélection d'un gène, ses exons codants sont séquencés pour trouver des mutations potentiellement délétères (non-synonymes, ou qui génèrent des codons stops ou encore qui décalent le cadre ouvert de lecture) ce qui a permis d'identifier des mutations causales de diabètes monogéniques. Dans les années 90 et au début des années 2000, l'approche gène candidat a aussi été utilisée pour mettre en évidence des variants nucléotidiques communs (SNP pour « *single nucleotide polymorphism* »), choisis de manière assez aléatoire, qui étaient plus

présents chez des patients avec un diabète de type 2 *versus* des sujets témoins normoglycémiques pour l'identification de variants de susceptibilité au diabète.

Les études de familles consanguines consistent dans un premier temps à effectuer une analyse d'« *homozygosity mapping* » qui permet l'identification de régions du génome homozygotes chez des individus atteints par puce à ADN, puis d'effectuer dans un deuxième temps le séquençage des gènes candidats dans les loci homozygotes. Dans la plupart des cas, cette stratégie a permis de mettre en exergue des gènes causant un diabète néonatal (34).

Les études d'association pangénomiques (GWAS) basées sur du génotypage à haut débit de centaines de milliers (en 2007) à des millions (aujourd'hui) de SNP tout au long du génome chez un grand nombre d'individus ont été une avancée majeure dans l'étude des variants de susceptibilité au diabète de type 2. Sur le principe, dans un GWAS pour diabète de type 2 on compare la fréquence des variants entre des patients atteints de diabète de type 2 *versus* des sujets témoins normoglycémiques. Lorsqu'un variant est plus fréquent chez les patients en comparaison aux témoins, il devient associé au risque de diabète de type 2. RISCH et MERIKANGAS ont démontré très tôt l'avantage qu'il y avait à utiliser des études GWAS pour l'identification de loci à risque pour des maladies génétiques complexes telles que le diabète de type 2 et la schizophrénie, en montrant la possibilité d'analyser des centaines de milliers de variants chez des milliers de sujets non apparentés (via les puces à ADN), avec une puissance statistique plus élevée que dans une analyse de liaison n'utilisant qu'une centaine de marqueurs chez un nombre restreint d'individus (35). C'est dans ce contexte que REICH et LANDER ont proposé un modèle théorique de génétique des populations, avec une distribution relativement simple des variants de susceptibilité au niveau d'un locus : ils ont reformulé l'hypothèse « *Common Disease/Common Variant* » en proposant que des SNP fréquents, avec une pénétrance faible (c'est-à-dire augmentant faiblement le risque de la maladie), peuvent contribuer de manière significative au risque de la maladie dans une population (36).

Dernièrement, le séquençage de nouvelle génération (NGS) incluant le WES (« *Whole Exome Sequencing* ») pour le séquençage de l'exome entier et le WGS (« *Whole Genome Sequencing* ») pour le séquençage du génome entier ont permis l'identification de mutations du diabète monogénique et l'identification de nouveaux loci associés au risque de diabète de type 2.

2. Les diabètes monogéniques

Le diabète néonatal et le diabète de type « *maturity-onset diabetes of the young* » (MODY) sont les principales formes de diabète monogénique et affectent moins de 5% des sujets atteints de diabète non auto-immun.

Le diabète néonatal est diagnostiqué dans les 6 premiers mois de vie, et touche entre 1/100000 et 1/260000 naissances. Il se caractérise par une hyperglycémie significative avec de faibles taux d'insuline, accompagnée dans certains cas d'une déshydratation, d'une acidocétose sévère pouvant aller jusqu'au coma. Le diabète néonatal peut être permanent (avec un traitement à vie) ou transitoire (dépendant d'une insulinothérapie dans les premiers mois de vie, suivie d'une rémission du diabète) (37). Il est possible qu'un diabète surgisse dans l'enfance après 6 mois, il s'agit alors d'un diabète appelé « *monogenic diabetes of infancy* » (MDI) (37). Les cas de diabète néonatal sont souvent sporadiques avec une mutation *de novo* non portée par les parents, ou avec une mutation non pénétrante chez le parent porteur (37).

Au contraire, le diabète MODY peut affecter toutes les générations d'une famille avec une transmission verticale dominante. Les critères usuels permettant d'identifier un diabète MODY sont les suivants (même si en pratique, ils ne constituent pas des règles absolues) :

- une survenue précoce du diabète (avant 25-30 ans)
- une transmission autosomique dominante verticale du diabète touchant au moins trois générations, avec un phénotype similaire partagé par les diabétiques de la famille
- une absence d'acidocétose lors de la survenue du diabète
- une absence d'anticorps auto-immuns dirigés contre les cellules de l'îlot de Langerhans (cf supra, **II- Les différents types de diabète**)
- une absence d'obésité
- une insulïnémie avec des valeurs normales mais basses par rapport au degré d'hyperglycémie, suggérant un défaut primaire de la fonction de la cellule β pancréatique

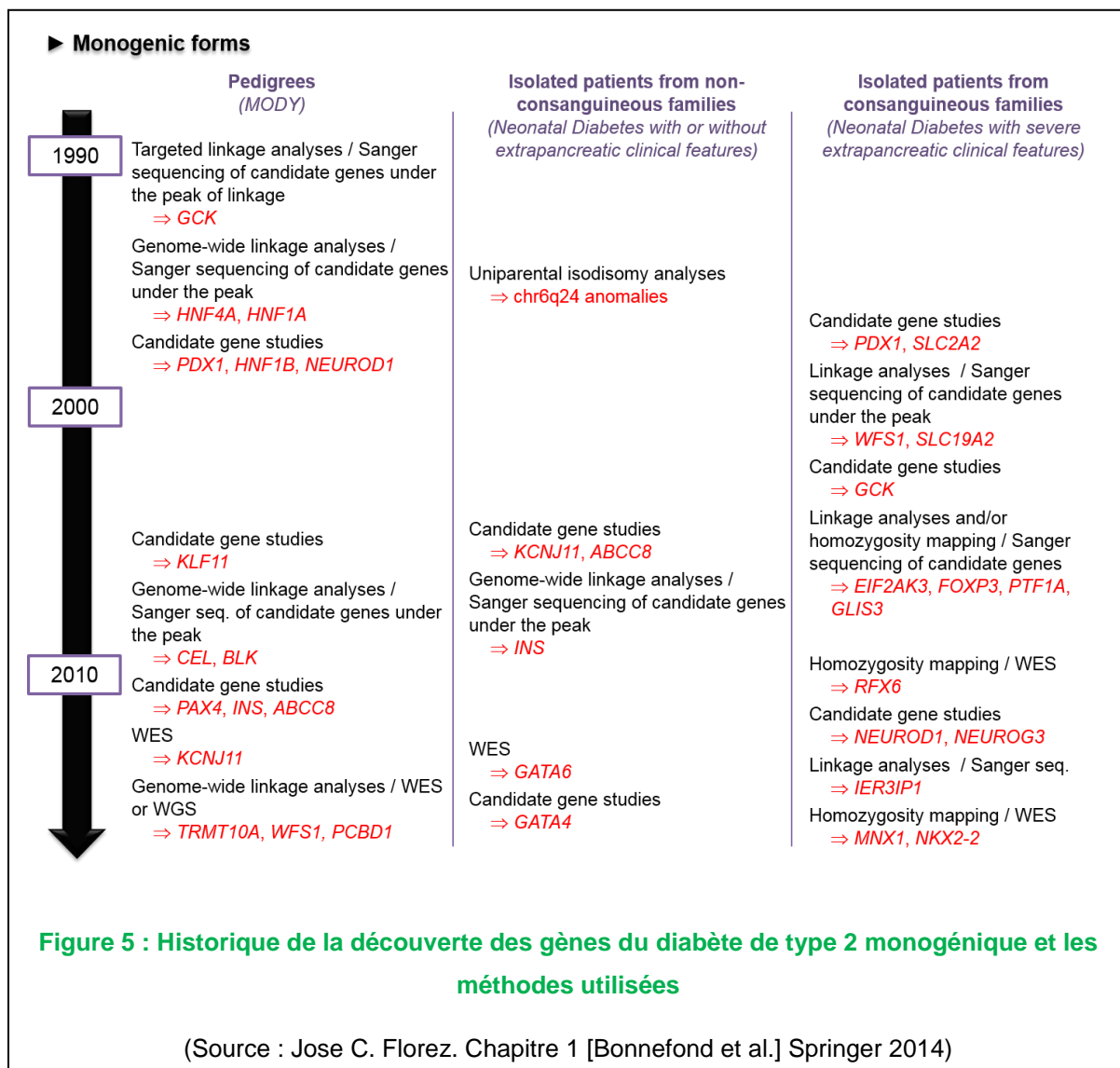
Jusqu'à présent, des mutations dans une trentaine de gènes ont été montrées impliquées dans le diabète monogénique (diabète néonatal et/ou MODY). Ces mutations ont été identifiées via différentes stratégies. Les études de liaison génétique ont permis l'identification de gènes du diabète monogénique tels que la glucokinase *GCK* (33,38) dont les mutations sont responsables du diabète MODY 2, *HNF1A* (39,40) dont les mutations sont responsables du diabète MODY 3, *HNF4A* (41,42) dont les mutations sont responsables du diabète MODY 1 et d'autres gènes (voir la liste complète en **Figure 5**) (34). Le séquençage de gènes candidats dans des familles

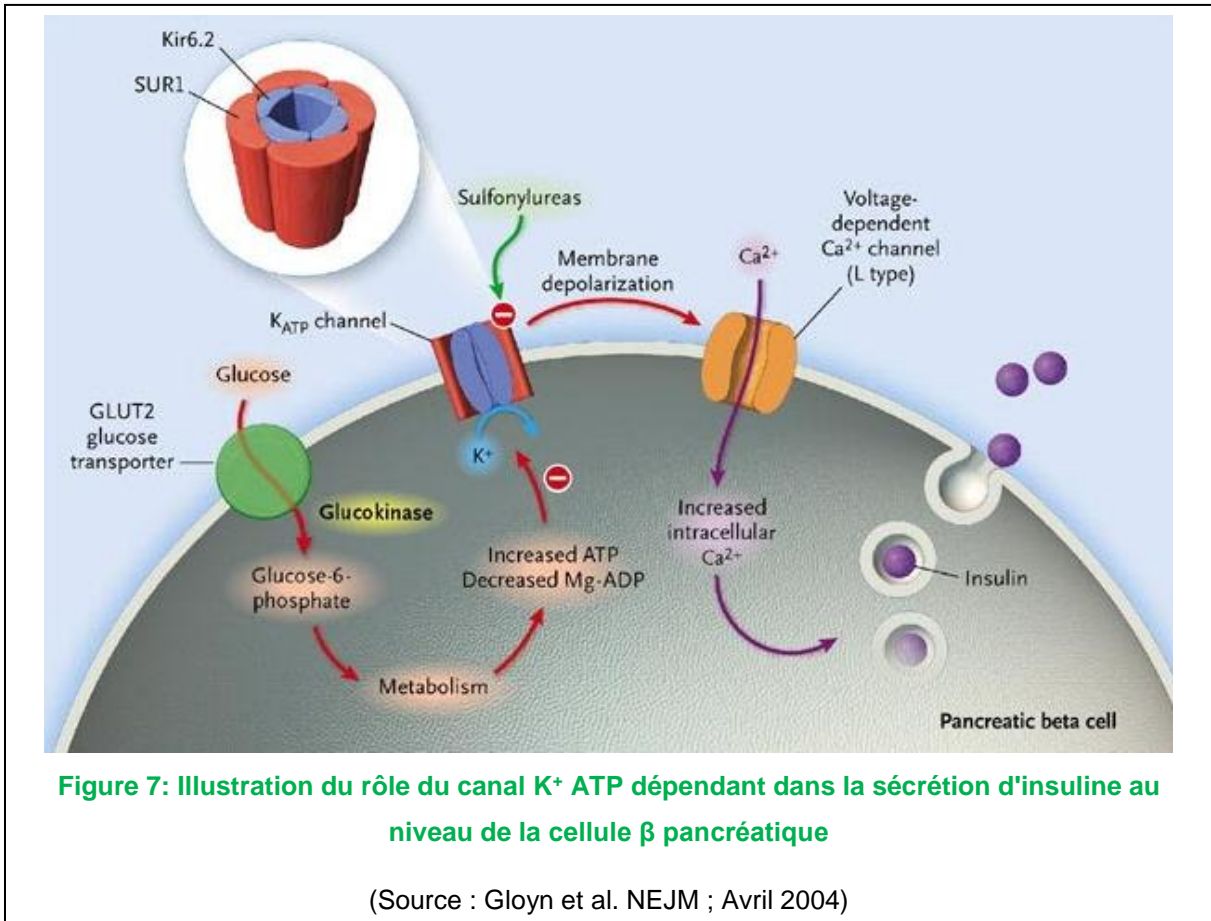
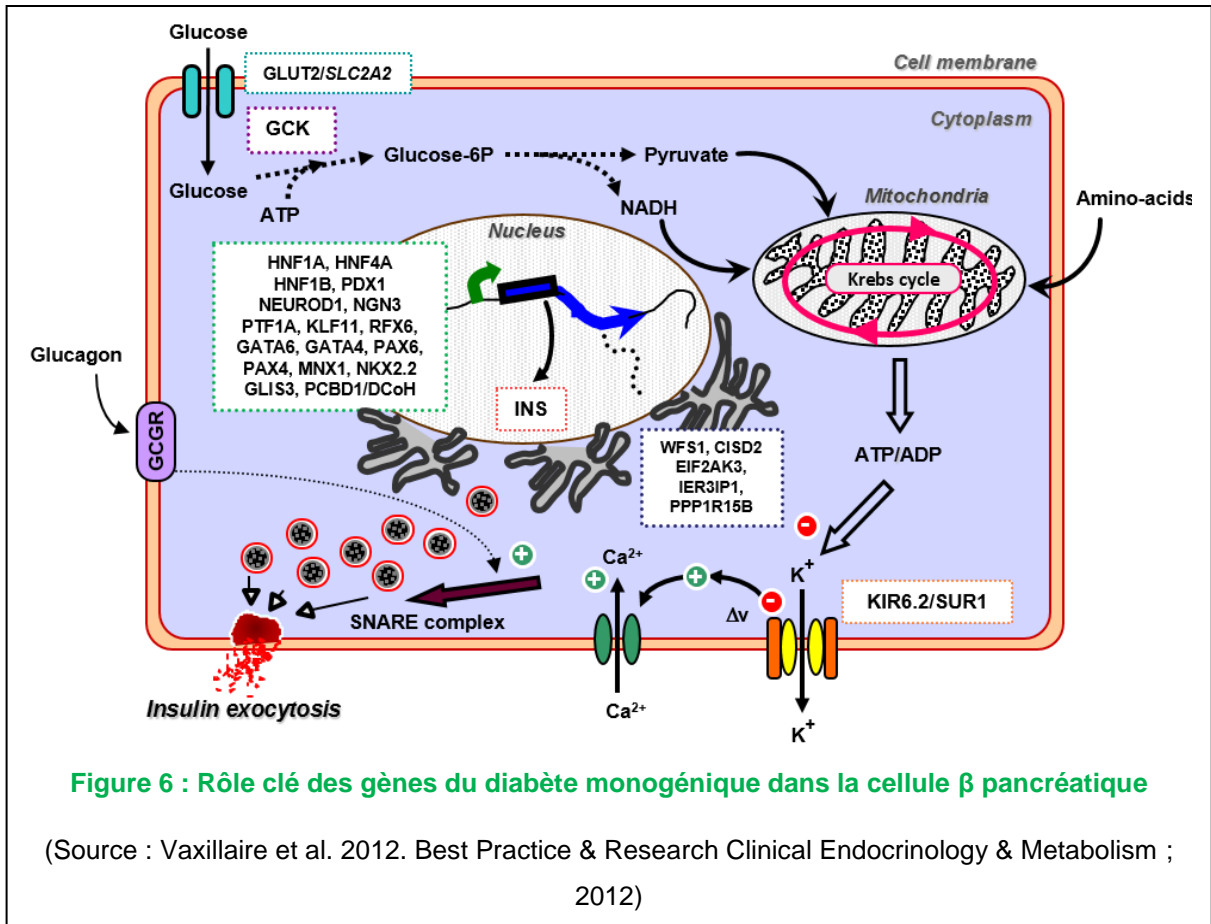
atteintes de diabète MODY ou chez des patients avec un diabète néonatal a permis l'identification de mutations causales du diabète néonatal dans des gènes tels que *KCNJ11*, *ABCC8* et *PDX1* (34, Chapitre 1) (voir la liste complète en **Figure 5**). Les études des familles consanguines ont permis l'identification de mutations sur des gènes comme *RFX6* (43), *MNX1* (44,45), *NKX2-2* (45) causant un diabète néonatal. Une mutation causale du diabète MODY dans *KCNJ11* (46) ou encore des mutations causant un diabète néonatal dans *GATA6* (47) (**Figure 5**) ont été identifiées par NGS.

D'un point de vue global, les gènes du diabète monogénique qui ont été identifiés jusqu'à présent codent des protéines ayant un rôle clef dans le développement et/ou la fonction de la cellule β pancréatique (**Figure 6**) (37).

Les gènes les plus fréquemment mutés dans le diabète néonatal codent les sous-unités SUR1 (*ABCC8*) et Kir6.2 (*KCNJ11*) du canal potassique ATP (adénosine triphosphate) dépendant (K^+ ATP) exprimées à la surface des cellules β pancréatiques, et le précurseur de l'insuline (*INS*) (37). Pour les personnes portant une mutation hétérozygote dans *ABCC8* ou *KCNJ11* du canal potassique ATP-dépendant crucial dans l'exocytose de l'insuline, le canal reste ouvert, ce qui bloque la dépolarisation de la membrane de la cellule β et l'entrée des ions calcium Ca^{2+} dans la cellule permettant l'exocytose des granules d'insuline (48) (**Figure 7**). Les patients diabétiques portant ce type de mutations ont pu passer d'un traitement par injection d'insuline qui est un traitement assez lourd avec des risques d'hypoglycémie à une prise orale de sulphonylurée (permettant la fermeture du canal) moins contraignante et plus simple. Pour la majorité d'entre eux, l'effet métabolique bénéfique des sulphonylurées est maintenu sur plusieurs années après le basculement de l'insuline aux sulphonylurées (49). Cela a été un avancement important dans le traitement du diabète et particulièrement dans la médecine de précision du diabète car l'on peut proposer aux patients un traitement adéquat à leur type de diabète.

Les gènes les plus fréquemment mutés dans le MODY codent la *GCK* et des facteurs de transcription ayant un rôle clef dans le développement et la fonction des cellules β pancréatiques (*HNF1A*, *HNF4A*, *PDX1*, *NEUROD1*...).





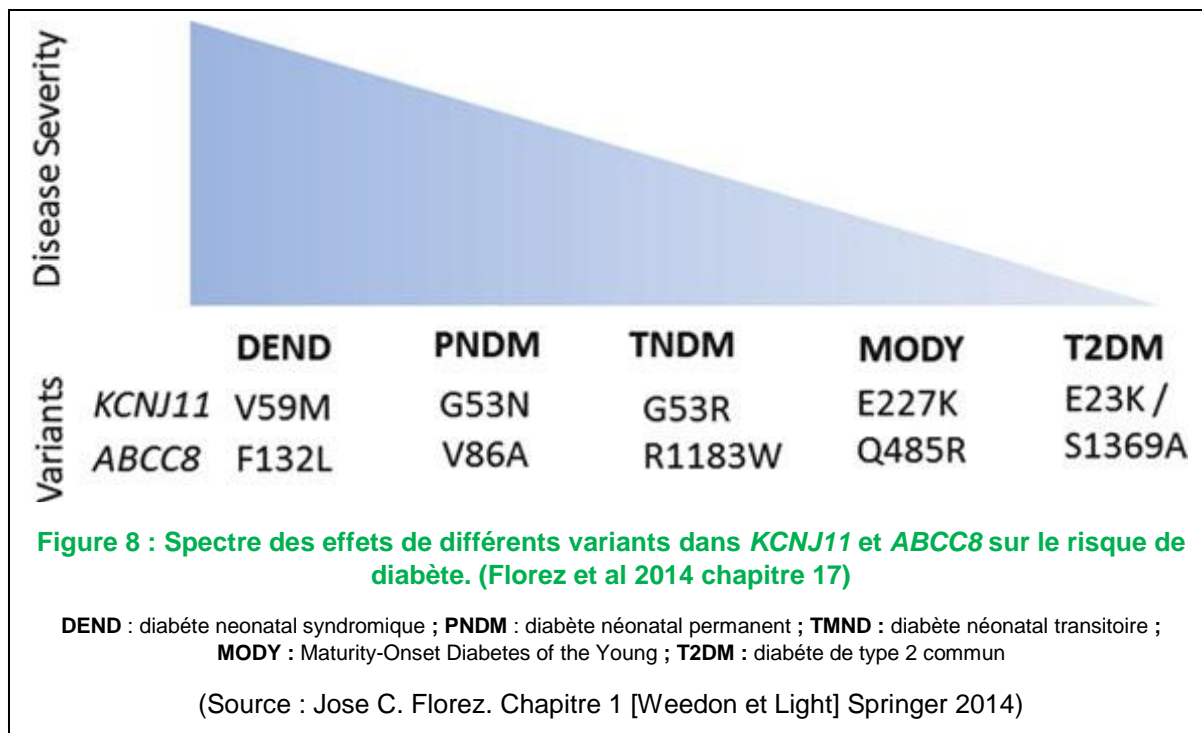
2.1. Trois gènes du diabète monogénique et leur rôle dans la fonction de la cellule β

GCK : La GCK est la première enzyme impliquée dans la glycolyse. *GCK* a été le premier gène du MODY découvert (par le laboratoire en 1992). Cela a permis de montrer qu'un gène impliqué dans le métabolisme du glucose pouvait être impliqué dans la pathophysiologie du diabète de type 2. Les mutations de *GCK* sont causales d'un diabète MODY 2 à l'état hétérozygote (33,38) ou d'un diabète néonatal à l'état homozygote (50). Plus de 600 mutations différentes inactivantes de *GCK* ont été identifiées et plusieurs variants de susceptibilité au diabète de type 2 ont aussi été identifiés au niveau du locus *GCK* (33,50–52). Les patients portant des mutations perte de fonction hétérozygotes de *GCK* sont caractérisés par une hyperglycémie à jeun (5,5-8,0 mmol/l) dès la naissance, mais souvent asymptomatique, jusqu'à ce qu'un test fortuit révèle l'hyperglycémie (53). Une caractéristique importante et spécifique du phénotype MODY 2 est le risque assez faible de développer des complications tardives caractéristiques du diabète, ce qui le différencie des autres formes de diabète MODY (54). Lorsque l'enzyme GCK est défectueuse, la production d'ATP dépendante du glucose est altérée, ce qui peut inhiber la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendant et affecte ainsi la sécrétion d'insuline (55,56) (cf infra, **Physiologie du pancréas et physiopathologie du diabète de type 2/1- La sécrétion d'insuline**). Malgré cela, les mutations de la glucokinase ne semblent affecter que la glycémie à jeun qui augmente ; le métabolisme du glucose semble ne pas être affecté. En effet le dysfonctionnement de GCK se reflète par de petites augmentations des niveaux de glucose plasmatique postprandial avec une réponse à l'insuline non-altérée. Cela expliquerait le faible taux de complications microvasculaires et pourquoi l'HbA1c dépasse rarement 7,5% chez les porteurs de ces mutations (57). Les altérations de l'homéostasie glucidique n'étant pas très grave chez ces patients, un traitement pharmacologique est rarement nécessaire et la majorité des patients peuvent être traités par un régime seul (58). Malgré un faible risque de complications microvasculaires, une mutation *GCK* ne protège pas contre le développement concomitant de diabète de type 2 multifactoriel (37, Chapitre 10).

HNF4A : Les hepatocytes nuclear factors (*HNF*) sont exprimés dans différents organes et tissus, ils sont importants lors du développement du foie et de la fonction hépatique. Des mutations dans certains *HNF* comme *HNF4A* (41,42) et *HNF1A* (39,40) sont causales de diabète MODY 1 et MODY 3 respectivement (cf infra **II/2- Les diabètes monogéniques**). Les mutations sur *HNF4A* causent un dysfonctionnement progressif des cellules β entraînant une hyperglycémie croissante et éventuellement un diabète. Bien qu'il soit exprimé dans plusieurs tissus, c'est

principalement l'activité pancréatique qui est affectée. Il a été montré que le knockout d'*HNF4A* dans la cellule β de modèles animaux induit une altération de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose, mais aussi de l'hyperinsulinisme à la naissance (59,60). De même, des mutations hétérozygotes au niveau du gène *HNF4A* ont été considérées comme une cause d'hyperinsulinisme congénital (59,61). Il existerait donc un « phénotype biphasique » dans un sous-groupe de patients atteints de diabète MODY 1 avec une période d'hypoglycémie hyperinsulinémique très tôt dans la vie et une diminution de la sécrétion d'insuline et un diabète à l'âge adulte (59,62). Chez certains patients cette hyperinsulinémie peut être persistante jusqu'à l'âge de 21 ans en moyenne (63). Cette hyperinsulinémie attribuée au MODY 1 peut être traitée par du diazoxide, avec une baisse de l'hyperinsulinémie d'une durée allant de quelques heures à quelques années (61,64,65).

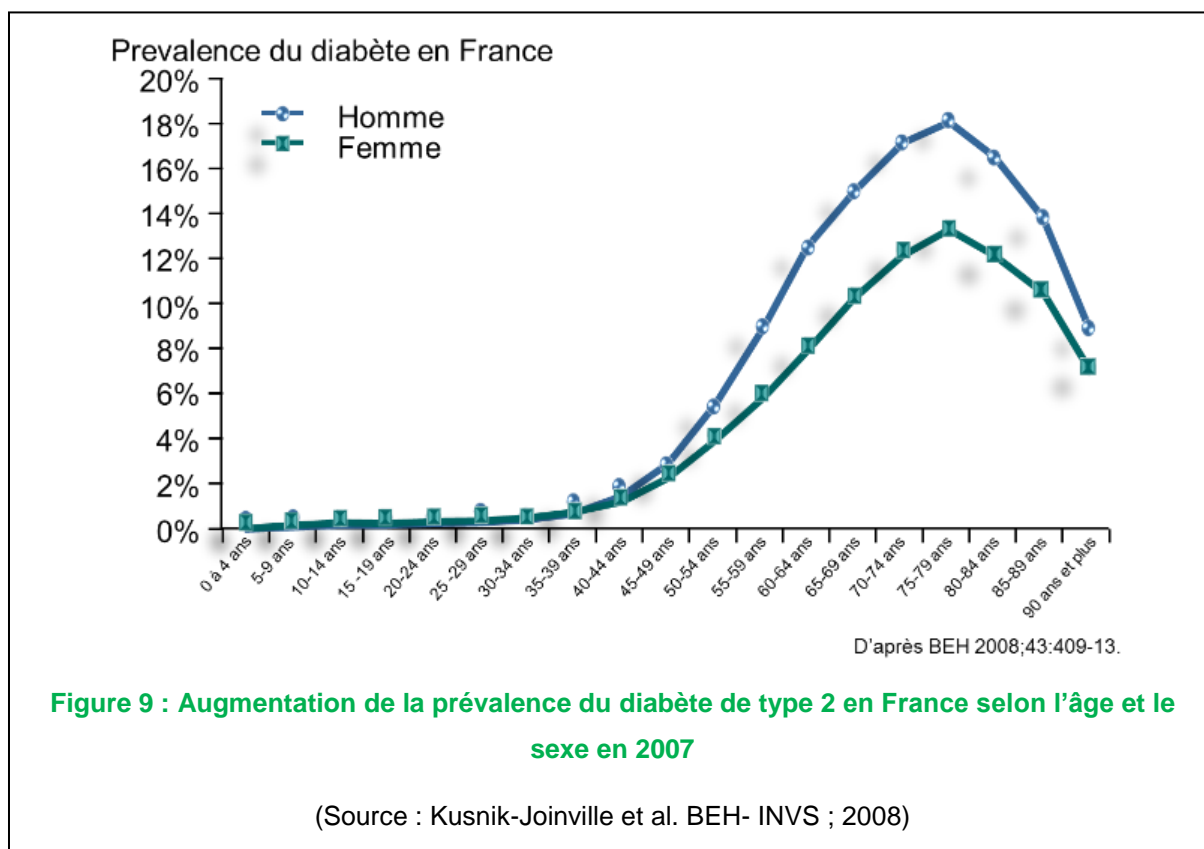
KCNJ11 : Il code la sous-unité Kir6.2 du canal potassique ATP-dépendant dont l'autre sous-unité SUR1 est codée par le gène *ABCC8*. Ce canal hétéro-octamérique joue un rôle crucial dans la sécrétion d'insuline. Il régule notamment la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques en couplant le métabolisme à l'activité électrique membranaire (cf supra **II/2- Les diabètes monogéniques**). Les mutations du canal ATP-dépendant modifient son trafic, son activité intrinsèque et sa capacité à détecter des changements de niveau de l'ATP ou l'ADP, ce qui entraîne une altération de son activité et par conséquent, de la sécrétion d'insuline. Les effets spécifiques de chaque mutation individuelle sur l'activité du canal sont différents et peuvent avoir une sévérité variable (**Figure 8**). Le clonage positionnel et les études gènes candidats ont d'abord démontré que les mutations récessives perte-de-fonction provoquaient une hypoglycémie hyperinsulinémique familiale pendant l'enfance (66,67). Par la suite, les études de gènes candidats ont démontré que les mutations activatrices hétérozygotes de *KCNJ11* et de *ABCC8*, qui aboutissent à l'ouverture constante du canal ATP-dépendant, sont la cause la plus fréquente du diabète néonatal (48). Ces mutations causeraient plus du tiers des cas de diabète néonatal (30,152 Chapitre 28). Plus récemment, des mutations de *KCNJ11* se sont révélées être une cause de diabète MODY (MODY 13) (46,69), ces mutations altèrent radicalement l'activité du canal conduisant à un phénotype de diabète franc (70). Des variants communs ont aussi été identifiés sur ces gènes et leur rôle potentiel dans le développement du diabète de type 2 reste encore à approfondir (cf supra **II/2.2.2- Les variants génétiques associés au diabète de type 2 et leur identification**) (37, Chapitre 17)



3. Le diabète de type 2 commun

a. Rôle des facteurs environnementaux

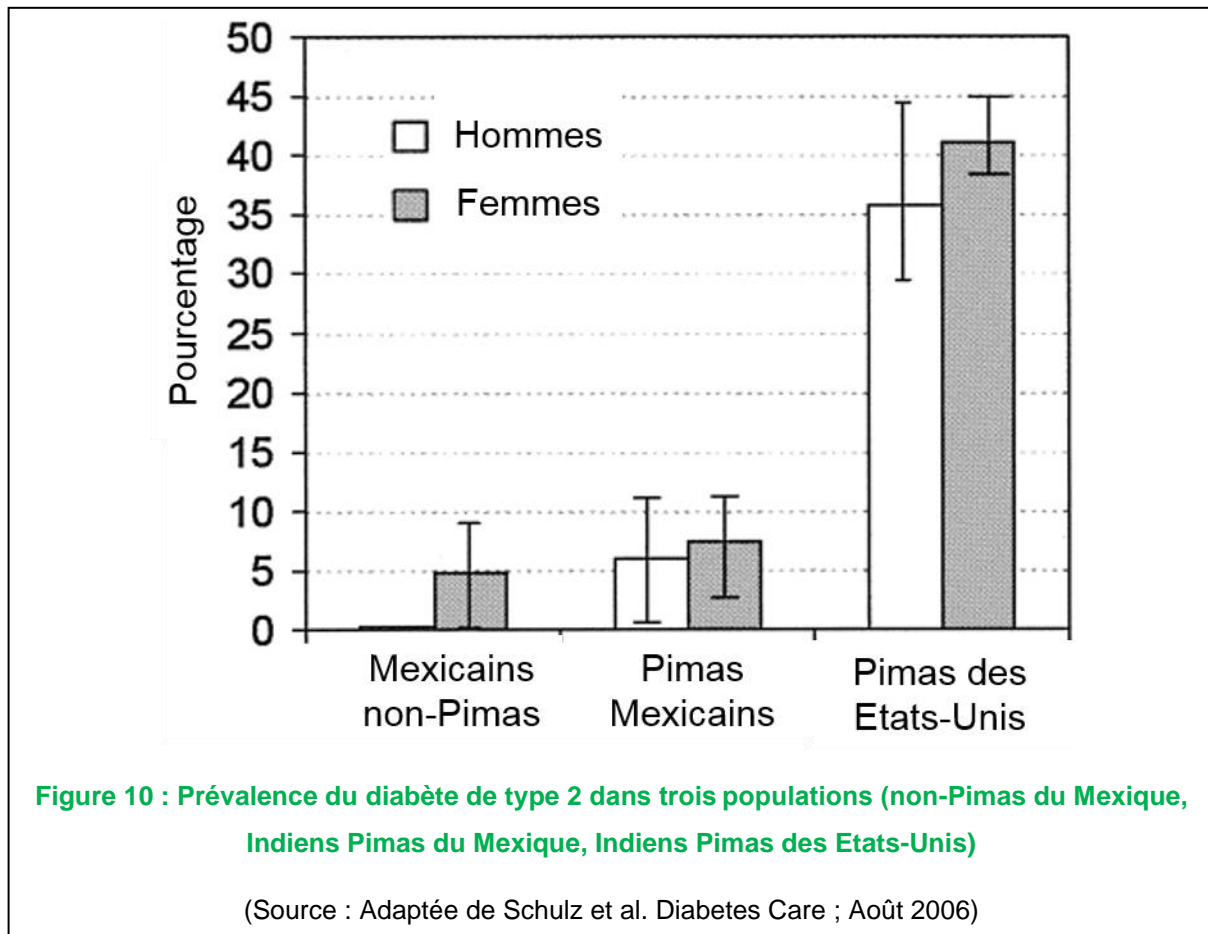
Le diabète de type 2 est une maladie génétique complexe (dite polygénique), dépendant de facteurs environnementaux plus ou moins en interaction avec des facteurs génétiques. Les principaux facteurs environnementaux à risque de diabète de type 2 commun sont l'âge, la sédentarité et la mauvaise alimentation (51,71). Avec l'âge, le vieillissement des cellules surtout des cellules β pancréatiques qui sont des cellules à très faible potentiel de régénération, peut favoriser le diabète de type 2 commun qui est la plupart du temps diagnostiqué vers l'âge de 40 ans, avec une prévalence qui ne cesse d'augmenter à partir de cet âge (**Figure 9**) (72). Comme l'a dit le docteur Francis COLLINS (Directeur du NIH) : « *Genetics loads the gun and environment pulls the trigger* ».



2.1.1 Effet de l'environnement et du style de vie

Une étude réalisée sur 224 indiens Pima du Mexique *versus* 888 indiens Pima des Etats-Unis et 193 mexicains non-Pima a montré que deux populations génétiquement proches peuvent selon l'environnement être plus ou moins susceptibles au diabète de type 2 (**Figure 10**) (73). Dans cette étude, de nombreux paramètres incluant l'obésité, l'activité physique et le régime alimentaire ont été évalués en plus des tests de tolérance au glucose. Pour de nombreux groupes d'amérindiens, la prévalence du diabète de type 2 est assez forte, mais les indiens habitants aux Etats-Unis sont ceux qui présentent la prévalence la plus élevée (74,75). Dans la même idée, une étude parue en 2015 a aussi démontré que les indiens Pima présentent une forte prédisposition génétique pour le diabète de type 2 et qu'avec la transition environnementale d'un style de vie traditionnel à un style de vie modernisé entre 1995 et 2010, la prévalence du diabète a augmenté dans cette population, de même que dans les populations voisines non-Pima mexicains (76). L'exposition à un environnement diabétogène fortement favorisé par l'occidentalisation du mode vie avec une alimentation plus abondante, plus calorique et riche

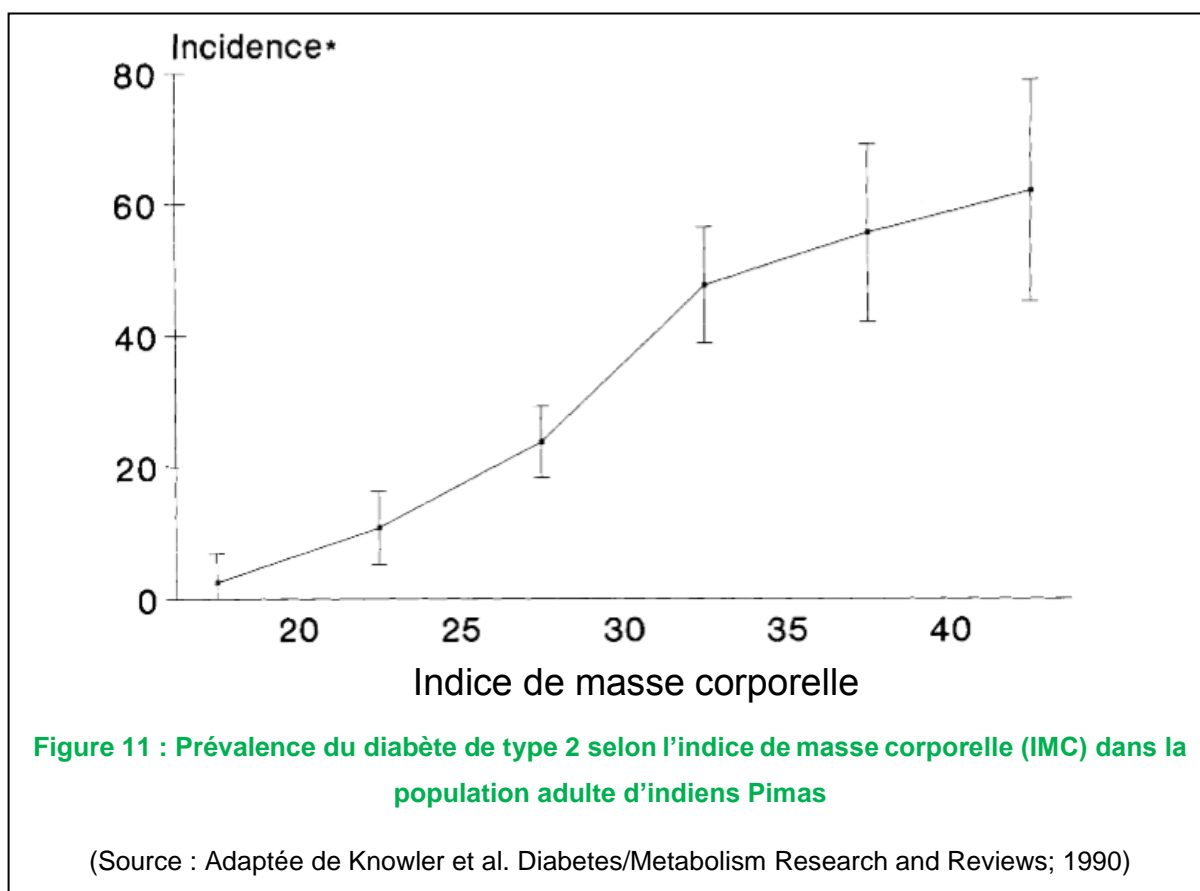
en sucres et lipides, accompagnée d'une baisse de l'activité physique, favorise l'obésité qui est l'un des facteurs à risque majeur du diabète de type 2 (73,77,78).



2.1.2 Rôle de l'obésité

Dans une étude de suivi sur 13 ans aux États-Unis (79), une augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) passant de 22 à 27 kg/m² a entraîné une augmentation d'environ trois fois le risque de diabète. Comme souligné plus haut, l'épidémie mondiale d'obésité est probablement le biais par lequel certains des changements du mode de vie et de l'environnement augmentent le risque de diabète de type 2. En effet avec un risque relatif de survenue du diabète de type 2 chez les personnes atteintes d'obésité (IMC ≥ 30 kg/m²) qui est 10 fois supérieur à celui des personnes avec un poids normal (IMC < 25 kg/m²) (80,81). Dans la population adulte d'indiens Pima des Etats-Unis, la prévalence du diabète de type 2 est corrélée de manière positive avec l'IMC (**Figure 11**) (74). De même, l'excès de graisse viscérale et la résistance à l'insuline, ont

été associés indépendamment avec l'incidence du pré-diabète et du diabète de type 2 chez les adultes obèses dans une étude incluant 732 obèses (65% de femmes ; 71% d'individus de type non caucasiens, $IMC \geq 30$, moyenne d'âge 43 ans) de la cohorte *Dallas Heart Study* (DHS) non atteints de diabète ou de maladies cardiovasculaires au début de l'étude, suivie sur une période de 7 ans (82). Ces résultats sont en accord avec les observations faites chez les personnes obèses métaboliquement saines. En effet, ces individus obèses présentent moins de graisse viscérale (83–85) ou de graisse ectopique (86,87) comparés aux individus qui développent un diabète de type 2 en étant en surpoids ou de poids normale (exemple en Asie) (11). Il est à noter qu'une augmentation des cas de diabète de type 2 au cours des dernières décennies a aussi été observée dans les pays occidentaux qui n'ont pas eu de changement majeur dans la disponibilité des aliments (88). Cependant, au Royaume-Uni, une étude prospective de 1984 à 2007 a révélé que l'IMC ne pouvait expliquer que 26% de l'augmentation de la prévalence du diabète de type 2, suggérant l'intervention d'autres facteurs comme la sédentarité (89) et d'autres facteurs environnementaux supplémentaires contribuant au risque accru de diabète de type 2 (**Tableau 4**) (71).



Lifestyle characteristics conferring risk for type 2 diabetes	Relative risk increase	References
Diets poor in fibre, phytochemicals or plant food in general)	risk increase by 44% to three-fold	(54,55)
Regular consumption of sugar-sweetened beverages	increase by 20 - 30% compared to non-consumption	(56–58)
Little physical activity (leisure time/occupational)	risk approximately 40% higher compared to high total physical activity	(59,60)
Prolonged TV and monitor viewing/sedentary time	risk increased by approximately 3% per hour television watching	(61)
Exposure to road traffic (noise, fine particulate matter)	risk increased by 20–40% for exposure to 10 dB higher noise level or 10 µg/m ³ more of fine dust particles	(62–66)
Smoking	risk increased by approximately 30%/60% for light/heavy smokers	(67)
Short sleep duration and poor quality	risk increased by approximately 9% for every hour of shorter sleep duration	(68)
Low mood/stress/depression	risk increase highly variable, depending on definition of stress and depression	
Low socioeconomic position	relative risk increased by 40–100% when compared to high socioeconomic level	(69–71)
Infection with hepatitis C virus or <i>Chlamydia pneumoniae</i>	no epidemiological data on relative risk increase available	

Tableau 4 : Augmentation du risque de diabète de type 2 due au mode de vie montrée par les études épidémiologiques

(Source : Kolb et al. BMC Medecine; 2017)

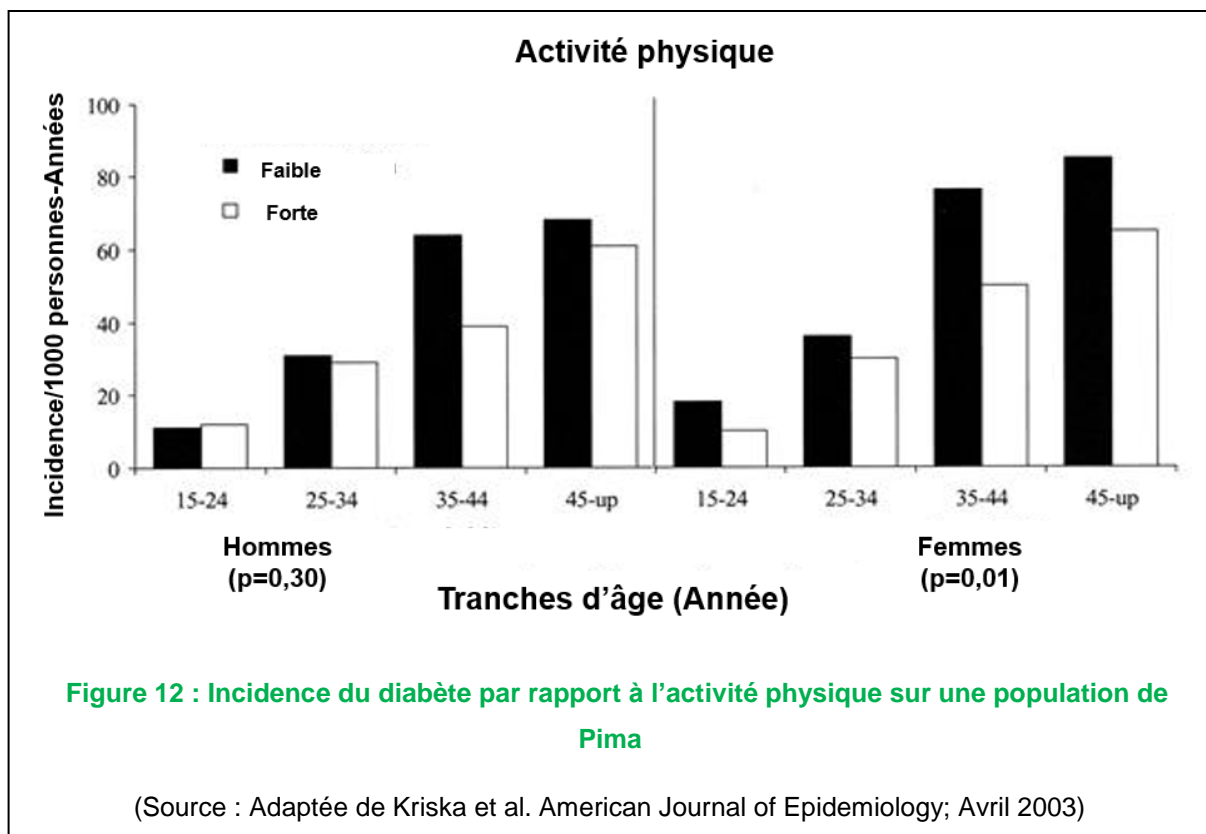
2.1.3 Rôle de l'alimentation

Une méta-analyse de 48 études dans 16 cohortes a montré qu'une alimentation généralement « malsaine » (c'est-à-dire riche en viande rouge ou transformée, grains raffinés, produits laitiers, œufs, produits frits à haute teneur en matières grasses, et boissons sucrées) est associée positivement au risque de diabète contrairement à une alimentation plus « saine » (c'est-à-dire riche en légumes, légumineuses, fruits, volaille et poisson) qui est inversement associée au risque de diabète (90). Une autre méta-analyse dans 13 cohortes a aussi montré qu'une

consommation optimale de produits « sains » tels que ceux cités ci-dessus peut entraîner une réduction de 42% du risque de diabète de type 2, et que la consommation d'aliments « malsains » est associée à une augmentation du risque trois fois plus importante, comparé à leur non-consommation. L'effet de la consommation des légumineuses et des noix sur le risque de diabète de type 2 est considéré comme faible ; l'effet de la consommation des féculents raffinés, des légumes, des fruits, des œufs, des produits laitiers et du poisson est considéré comme modéré ; et l'effet de la consommation de viande transformée, de féculents complets et de boissons sucrées est considéré comme élevé (91).

2.1.4 Effet de la sédentarité

Les études épidémiologiques suggèrent qu'une forte activité physique *versus* une faible activité physique est associée à une baisse du risque relatif du diabète d'environ 30% (71). Les effets bénéfiques de l'activité physique sur la sensibilité à l'insuline et le contrôle glycémique ont été démontrés (92,93). Le suivi de l'incidence du diabète par rapport au niveau d'activité physique montre que l'activité physique totale (incluant le travail, le loisir et le transport) est corrélée à l'incidence du diabète (**Figure 12**) (94).



Par ailleurs, une méta-analyse publiée en 2016 regroupant les données de 28 études prospectives avec des cohortes allant de 916 à 675 496 personnes, une incidence du diabète entre 1,6 et 27,5% et un suivi allant de 3 à 23,1 années, a montré une réduction du risque de diabète de type 2 selon l'activité physique. Parmi ces 28 études, douze ont été menées aux Etats-Unis (95–106), six études ont été menées en Asie (107–112), deux en Australie (113,114), et huit en Europe (115–122). Le risque de diabète de type 2 a été montré abaissé de 26% chez les individus dont l'activité physique atteignait 11,25 MET heures/semaine, ce qui équivaut à 150 minutes d'activité physique modérée par semaine en comparaison avec des individus inactifs (123). Cette baisse du risque atteint 36% lorsque l'activité physique augmente à ~34 MET heures/semaine, et la baisse du risque atteint même 53% pour les individus ayant une activité physique équivalent à 60 MET heures/semaine (123). Une autre méta-analyse publiée elle en 2015 et regroupant les données de 87 publications dans 78 cohortes a aussi montré une association inverse entre l'activité physique et le risque de diabète de type 2, qui peut être partiellement médiée par une adiposité réduite. L'activité physique totale, l'activité physique de loisir (incluant le sport, les exercices physiques, les activités récréatives ou activités hors activité professionnelle) et l'activité physique professionnelle ont été analysées. De même, un changement du niveau d'activité physique (activité forte ≥ 6 MET, une activité modérée entre 3 et 6 MET, une activité faible < 3 MET) et différents types d'activité physique (la marche, les exercices cardio-respiratoires, les exercices de résistance incluant le travail en extérieur, les exercices utilisant des poids libres) ont aussi été analysés dans cette étude. Leurs résultats montrent que tous ces sous-types d'activité physique semblent être bénéfiques et conduisent à une réduction du risque de diabète de type 2 (124). La sédentarité indépendamment de l'activité physique est associée au risque de diabète de type 2 et l'augmentation du temps de sédentarité pourrait doubler le risque de diabète (125). Une étude du « *Diabetes Prevention Program* » totalisant 3 232 participants suivis sur 3 ans montre que les personnes qui restent sédentaires moins longtemps (par exemple qui passent moins de temps assis devant la télévision) ont un risque beaucoup plus faible de développer un diabète de type 2. Chez les individus présentant un risque élevé de développer la maladie, la réduction du temps de sédentarité pourrait réduire ce risque (126).

2.2 Génétique du diabète de type 2 commun

2.2.1 L'héritabilité du diabète de type 2

Le diabète de type 2 a été considéré pendant longtemps comme dû seulement à une mauvaise hygiène de vie du malade et la part de la génétique dans la maladie n'était pas connue (ou n'était pas prise en compte). En France, le diabète de type 2 était appelé « diabète gras » en rapport à une alimentation malsaine et au surpoids que l'on pensait être les seules causes à l'époque (127). C'est dans les années 80 que les scientifiques se sont intéressés à la génétique du diabète de type 2 et aux formes familiales de diabète (128). Ils se sont confrontés à la difficulté de cette recherche et ont surnommé le diabète « *the geneticist's nightmare* » (129). En 1985, un groupe d'étude de l'OMS a suggéré que le diabète de type 2 pourrait être un trouble autosomique dominant impliquant un seul gène dominant et caractérisé par une pénétrance variable en fonction de l'obésité et du vieillissement (130). La contribution de la génétique dans le développement du diabète de type 2 a tout d'abord été démontrée par les études de concordance sur le statut glycémique de jumeaux monozygotes *versus* des jumeaux dizygotes : plus la relation génétique entre deux individus est proche, plus ils sont susceptibles de partager le même statut de tolérance au glucose (131). Par ailleurs, il a été rapporté qu'un enfant avec un parent diabétique avait 40% plus de risque de développer la maladie (132). De même dans une fratrie comportant un sujet atteint de diabète de type 2, le risque de développer le diabète est multiplié par 3 comparé à la population générale (132). L'héritabilité exprime la proportion de la variation totale d'un trait phénotypique attribuable à la variation génétique dans la population et est estimée entre 30 et 70% pour le diabète de type 2. De même, les variables métaboliques telles que la résistance à l'insuline et la sécrétion d'insuline ont une héritabilité non négligeable, entre 26 et 40% pour la résistance à l'insuline et entre 41 et 50% pour la sécrétion d'insuline (133,134). L'héritabilité peut être estimée en comparant la similarité d'un phénotype donné chez des jumeaux monozygotes et des jumeaux dizygotiques, comme dans l'étude danoise incluant 606 paires de jumeaux avec 62 paires dans lesquels un ou deux jumeaux sont diabétiques (133), ou encore dans l'étude anglaise dans laquelle 200 paires de jumeaux ont été étudiées dans lesquelles l'un ou les deux jumeaux sont diabétiques (131). L'héritabilité peut aussi être estimée en analysant la corrélation entre les phénotypes des descendants et les phénotypes parentaux, et la corrélation phénotypique entre frères et sœurs ou demi-frères, comme dans sur la cohorte

finlandaise Botnia dans laquelle 942 familles (5 810 personnes incluant 1 707 individus atteints de diabète de type 2) ont été analysées.

2.2.2 Les variants génétiques associés au diabète de type 2 et leur identification

Si les stratégies d'étude de liaison ont été efficaces dans l'identification de nouveaux gènes impliqués dans le diabète de type MODY (cf supra, **II/1- Le diabète monogénique**), elles n'ont pas eu autant de succès pour identifier des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 commun. En effet, seulement deux signaux reproductibles de liaison au diabète de type 2 ont été identifiés: l'un vers le gène *HNF4A* (135) et l'autre vers le gène *TCF7L2* (136). La principale limite de cette méthode était le manque de puissance pour détecter des variants avec une faible pénétrance qui pourraient avoir un rôle dans la susceptibilité au diabète de type 2 compte tenu de leur haute prévalence dans la population (34, Chapitre 1).

L'approche gène candidat a permis d'identifier un SNP dans le gène *PPARG* qui a été choisi comme gène candidat car le récepteur nucléaire codé par *PPARG* est la cible d'une famille d'antidiabétiques appelés thiazolidinediones (137–139). Les sujets homozygotes porteurs d'une proline au 12^{ème} acide aminé du gène avaient 20% de risque en plus de développer un diabète de type 2, comparés aux sujets portant l'allèle commun (c'est-à-dire une alanine au 12^{ème} acide aminé du gène) (138). Une autre mutation non-synonyme produisant un acide glutamique en position 23 à la place d'une lysine a aussi été montrée associée au risque de diabète de type 2 (avec un odd ratio égal à 1,18) (140). Par ailleurs, des variants du gène *KCNJ11* ont aussi été identifiés : un screening moléculaire sur une cohorte de 79 français de type caucasien atteints de diabète de type 2 a mis en évidence trois mutations causant la modification de trois acides aminés (E23K, L270V et A1337V). Ces trois mutations ont été ensuite génotypées dans une cohorte française (191 diabétiques et 119 témoins) dans une étude d'association qui a montré que pour le variant E23K, les homozygotes pour l'allèle K sont plus fréquents chez les diabétiques comparés aux témoins. La méta-analyse des données sur le variant E23K de cette étude et de trois autres études (141–143) sur des individus de type caucasien a confirmé que l'allèle K est associé de manière significative au diabète de type 2 (144). Cette association de E43K avec le diabète de type 2 a été reconfirmée en 2003 dans une autre méta-analyse plus large incluant 2 486 sujets (140).

C'est l'avènement des études d'association pangénomiques (GWAS pour « *genome-wide association study* ») à partir de 2007 qui a réellement permis d'avancer dans la génétique du diabète de type 2 commun. En effet, jusqu'à aujourd'hui, les GWAS ont permis d'identifier plus d'une centaine de signaux d'association à risque de diabète de type 2.

Le premier GWAS du diabète de type 2 a été publié par le laboratoire en 2007. Dans cette étude 392 935 SNP ont été génotypés chez 1 363 patients avec un diabète de type 2 et témoins. Les résultats ont tout d'abord confirmé l'association du locus *TCF7L2* au risque de diabète de type 2. Par ailleurs, l'étude a identifié 4 nouveaux loci associés au risque de diabète de type 2 : *SLC30A8*, *HHEX*, *LOC387761* et *EXT2*, avec la significativité la plus importante au niveau du gène *SLC30A8* (145). Il s'en est suivi trois autres GWAS avec plus de 300 000 SNP génotypés chez plusieurs milliers d'individus :

- Par le groupe *Diabetes Genetics Initiative* (146)
- Par le consortium *Wellcome Trust Case Control* (147)
- Par le groupe de recherche FUSION (*Finland-United States Investigation of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus Genetics*) (148)

Ces études ont confirmé l'association entre le risque de diabète de type 2 et des loci comme *TCF7L2*, *KCNJ11*, *HHEX*, *PPARG* et *SLC30A8*. Par ailleurs, les auteurs ont identifié de nouvelles associations aux loci *CDKAL1*, *IGF2BP2* et *CDKN2A/B*.

Afin d'augmenter la puissance statistique, une méta-analyse de ces trois études GWAS a ensuite été réalisée avec une réplique incluant environ 50 000 sujets (cas diabétiques ou témoins normoglycémiques) par le consortium DIAGRAM (*DIAbetes Genetics Replication and Meta-analysis*). Elle a permis d'identifier six nouveaux loci associés au diabète de type 2: *JAZF1*, *CDC123-CAMK1D*, *TSPAN8-LGR5*, *THADA*, *ADAMTS9* et *NOTCH2-ADAM30* (149). Depuis ces premiers GWAS, plus d'une centaine de variants associés au diabète de type 2 ont été identifiés dont la majorité est listée dans la **Figure 13**. Ils ont chacun des effets individuels modestes, et n'expliquent ensemble que moins de 15% de l'héritabilité du diabète de type 2 (51,150).

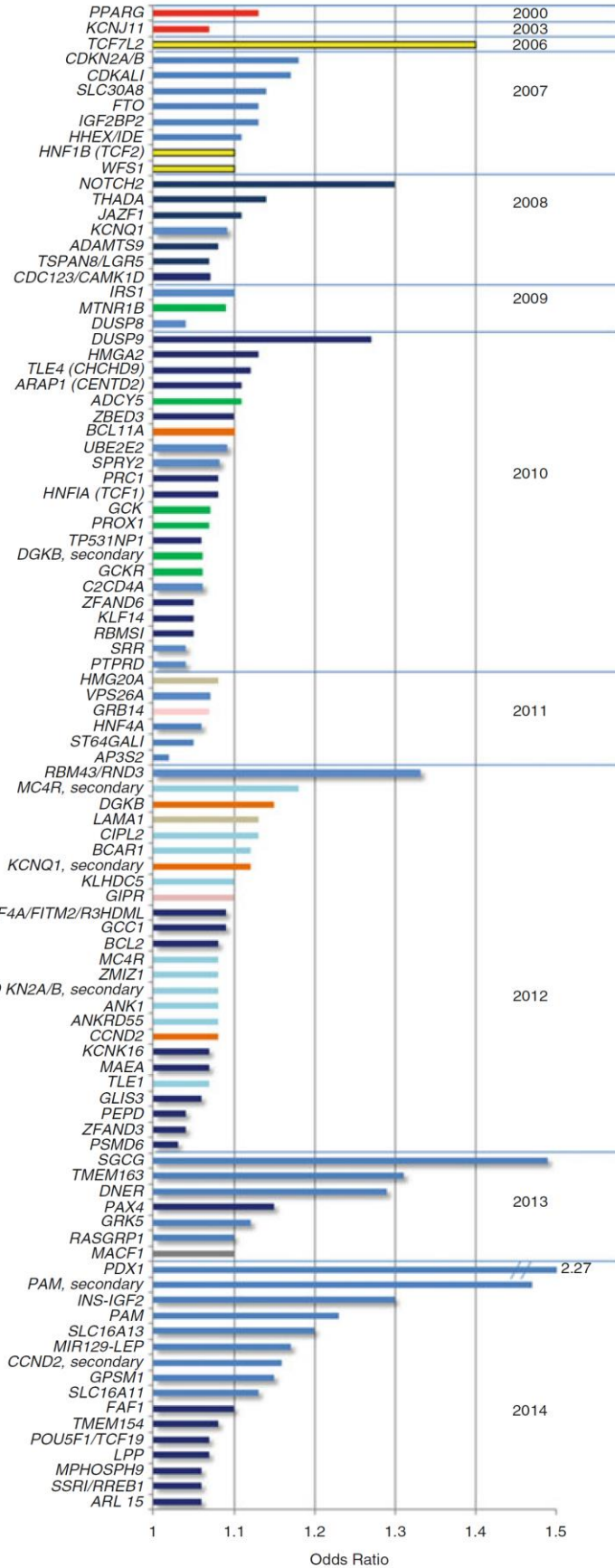


Figure 13 : Gènes de susceptibilité au diabète de type 2 et leurs effets sur le risque de diabète de type 2

(Source : Jose C. Florez. Chapitre 2 [Sladek et al.] Springer 2014)

Par ailleurs, des études GWAS de traits glycémiques associés au diabète de type 2 comme la glycémie à jeun, l'insulinémie à jeun, et le niveau de glucose plasmatique mesurée 2 heures après une hyperglycémie provoquée par voie orale ont permis d'identifier de nouveaux loci associés au risque de diabète de type 2. La méta-analyse du consortium MAGIC (*Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits*) pour comprendre combien les mécanismes responsables de la maintenance de l'homéostasie glucidique normale sont en lien avec ceux impliqués dans le développement du diabète de type 2 a permis une compréhension partielle de l'effet des gènes associés au diabète de type 2. En effet, sur 88 loci associés au risque du diabète de type 2 et 72 loci associés aux traits glycémiques, le consortium MAGIC a montré qu'il n'y avait qu'un *overlap* partiel de seulement 29 loci (**Figure 14**) (151). Pour les loci associés au risque de diabète de type 2 et à la variation de la glycémie à jeun, l'amplitude des effets est faiblement corrélée. Des loci comme *TCF7L2* et *CDKN2A/B* qui ont un effet fort sur le risque du diabète de type 2 (**Figure 13**) ont un effet seulement modeste sur la glycémie à jeun, et des loci avec un effet fort sur la glycémie à jeun comme *G6PC2*, *MADD*, *MTNR1B* et *GCK* ont en fait un effet non détectable ou modeste sur le risque du diabète de type 2 (152,153). Une interprétation de ces résultats serait que les mécanismes responsables de la pathogénicité du diabète de type 2 seraient différents de ceux responsables de l'homéostasie du glucose, et chez les sujets non-diabétiques leur *overlap* ne serait que partiel (150,153,154). Par ailleurs, les GWAS ne testent en fait pas l'effet du variant causal mais ne se focalisent que sur l'association de SNP avec la maladie, et les effets des SNPs pourraient être plus faibles que la réalité (151).

Il est à noter que des loci comme *PPARG*, *GLIS3*, *GCK* et *PDX1* portent des mutations causales de diabète monogénique (150,154) et des SNPs associés aux traits glycémiques (152,153). Par ailleurs, le locus *SLC2A2* (*GLUT2*) impliqué dans le diabète néonatal montre une association avec la glycémie à jeun (152) mais pas avec le diabète de type 2 dans les études de GWAS.

Le séquençage de nouvelle génération a récemment permis l'identification de loci associés au risque de diabète de type 2 comme *COBLL1* et *MACF1* (155), *HNF1A* (156), ou encore *PAM*, *PDX1* et *CCND2* (157).

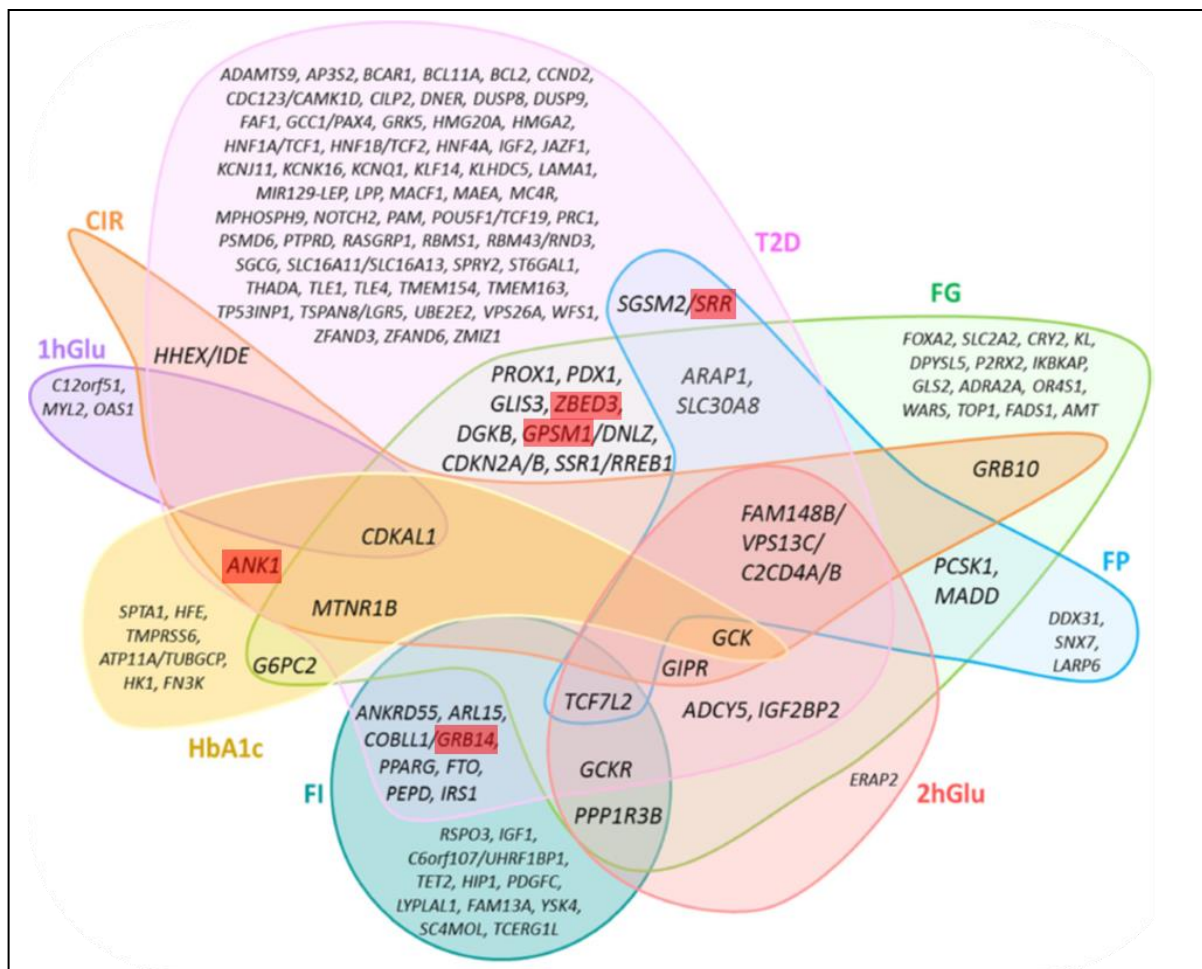


Figure 14 : Overlaps entre les loci associés au diabète de type 2 et ceux associés aux traits glycémiques.

FG, glycémie à jeun ; FI, insulinémie à jeun ; HbA1c, hémoglobine glyquée ; 2hGlu, glycémie à 2h après une OGTT

(Source : Marullo et al. Curr Diab Rep ; 2014)

MEIGS et ses collaborateurs ont étudié la pertinence de l'utilisation des variants de susceptibilité au diabète de type 2 dans la prédiction du diabète de type 2 par des scores de risque génétique (GRS) basés sur le nombre d'allèles à risque portés par participant de la cohorte « *offspring cohort of the Framingham Heart Study* » (158). Dans cette étude, la moyenne des GRS entre patients diabétiques et témoins non diabétiques est à peu près égale ; il n'y a pas de différence significative. Ces résultats peuvent être dus au petit nombre de SNP étudiés à l'époque ou encore aux facteurs environnementaux incluant l'obésité qui ont des effets plus forts. Par ailleurs, LYSENKO et ses collaborateurs ont génotypé 16 SNP dans des populations suédoises et finlandaises dans le but d'évaluer la puissance prédictive des variants génétiques pour le développement du diabète de type 2. Ces résultats n'ont non plus pas montré

de différences significatives entre patients et contrôles (77). Mais la capacité de prédiction du diabète de type 2 par les facteurs de risque génétiques peut être améliorée lorsque le suivi se fait de manière précoce via des études prospectives (159).

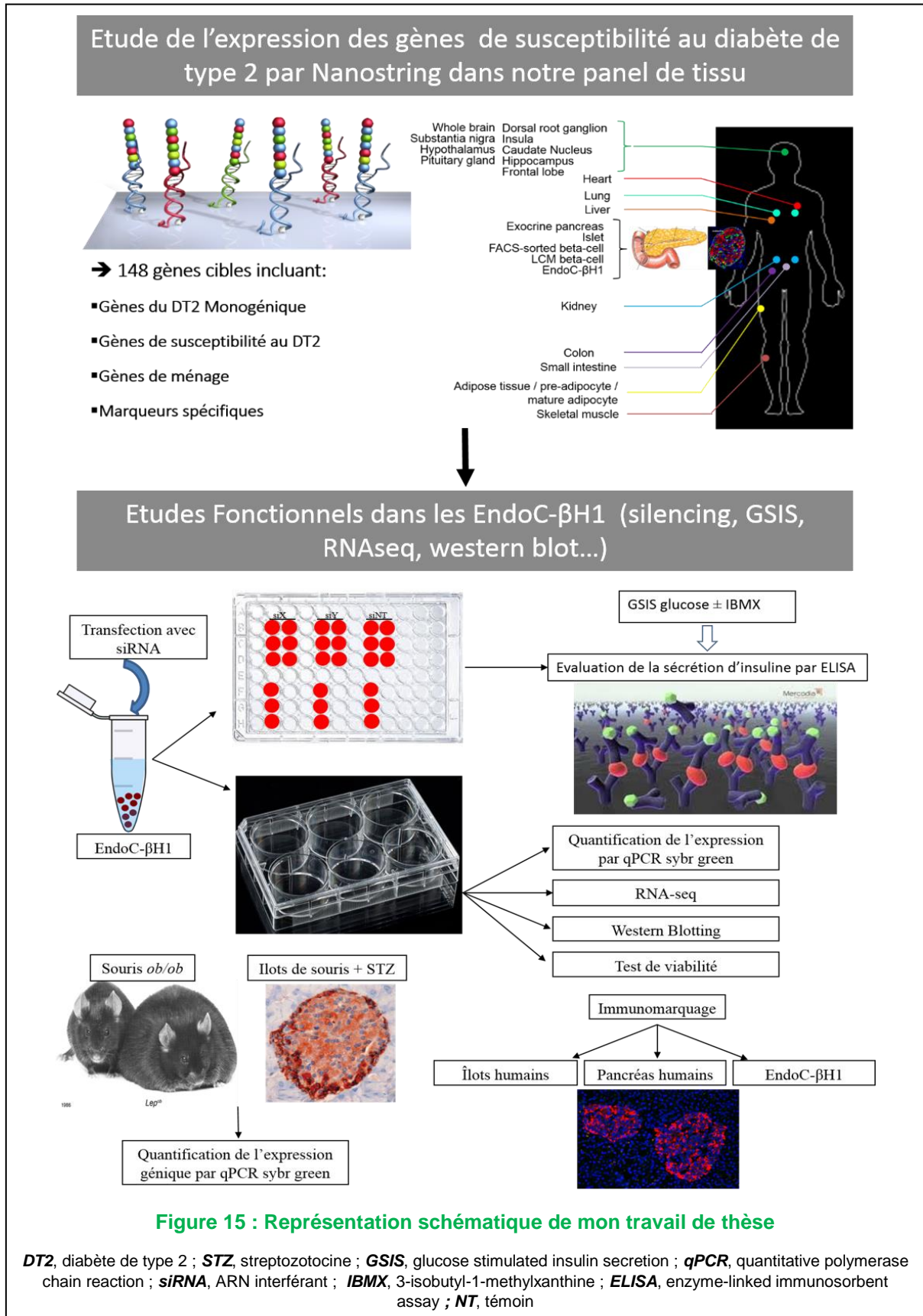
Parmi cette centaine de gènes de susceptibilité, quelques-uns sont des cibles thérapeutiques, mais la majorité de ces gènes n'étaient pas connus comme impliqués dans la physiopathologie du diabète de type 2. Les premières connaissances mécanistiques sur le rôle physiopathologique des loci de susceptibilité au diabète de type 2 ont été connues grâce à l'étude de leur contribution à la variabilité des traits glycémiques chez des individus non diabétiques (151). De même Heidi Rehm du Broad Institute disait que *“There is no true truth for most variants. Most interpretations are expert opinions based on an evaluation of evidence”*. D'où la nécessité des études fonctionnelles pour déterminer l'effet de ces variants dans le diabète de type 2 commun et dans la fonction de la cellule β pancréatique.

Mon travail de Thèse

Les GWAS ont permis la mise en évidence de nouvelles voies putativement importantes dans la physiopathologie du diabète de type 2, par l'identification de SNP de susceptibilité au diabète de type 2, mais souvent avec peu ou pas d'information sur les mécanismes sous-jacents expliquant le lien entre ces variants génétiques et le phénotype diabétique (160). La compréhension du rôle de ces gènes dans la fonction de la cellule β permettrait une meilleure connaissance de la physiopathologie du diabète de type 2, ce qui pourrait ouvrir des perspectives de prévention et/ou de traitement de cette maladie multifactorielle et complexe qu'est le diabète de type 2. En effet ces SNP sont souvent non codants, 90% d'entre eux sont localisés dans des régions non-codantes (161), ce qui rend difficile leur étude d'un point de vue fonctionnel. De plus, ces SNP associés au diabète de type 2 ont un effet faible sur le risque de la maladie ; le cumul de leurs effets n'expliquerait que 15% de l'héritabilité du diabète de type 2 (51,150). L'effet des SNPs non codants a été attribué au gène le plus proche, ce qui en fait un gène de susceptibilité au diabète de type 2. Les généticiens ont, dès le début des GWAS, suggéré que ces gènes associés au diabète de type 2, étaient des « gènes de la cellule β pancréatique » ou des « gènes de la sécrétion d'insuline » (162), alors que des études fonctionnelles n'ont pas été réalisées de manière systématique. Dans ce contexte, nous avons mené une étude de *fishing* pour déblayer cette masse importante de données provenant des GWAS et d'identifier des gènes potentiellement importants, pouvant être de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le premier objectif de ma thèse a été l'étude de l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans un panel de tissus humains comprenant des tissus pancréatiques et des tissus sensibles à l'insuline, par l'utilisation d'une technique de quantification non biaisée de l'expression génique, dans le but de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse émise selon laquelle les gènes de susceptibilité au diabète de type 2 étaient des gènes avec une expression enrichie (proportion de gènes de susceptibilité au diabète de type 2 surexprimés dans les cellules β *versus* les autres tissus) dans la cellule β pancréatique (**Figure 15**). Nous avons ensuite réalisé des études fonctionnelles sur la trentaine de gènes de susceptibilité au diabète de type 2 les plus exprimés dans notre modèle cellulaire (EndoC- β H1) par des tests de sécrétion d'insuline, des études de la viabilité cellulaire, du RNA-sequencing et du western blotting, afin d'étudier le

rôle de ces gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans la fonction de la cellule β pancréatique et plus particulièrement dans la sécrétion insulinique (**Figure 15**).



Physiologie du pancréas et physiopathologie du diabète de type 2

Le pancréas est une glande mixte qui, en moyenne chez l'homme, a un poids de 68 g avec une capacité de sécrétion hormonale directement dans le système sanguin (rôle endocrine) mais aussi de sécrétion d'enzymes dans le tube digestif (rôle exocrine). La fonction endocrine du pancréas est assurée par les îlots de Langerhans qui sont des amas cellulaires vascularisés dispersés un peu partout dans le pancréas, dont ils représentent entre 1 et 2 % du volume. Leur diamètre varie entre 50 et 250 μm (moyenne de 140 μm) avec en moyenne 1 million d'îlots soit entre 500 et 1500 mg chez un humain sain (163).

Ces îlots ont été découverts par l'anatomo-pathologiste et biologiste allemand Paul LANGERHANS (1847-1888) en 1869 dans le laboratoire du pathologiste Rudolf VIRCHOW. Les îlots sont constitués de cellules α qui sécrètent le glucagon, qui est une hormone hyperglycémiant antagoniste de l'insuline, qui est la seule hormone hypoglycémiant de l'organisme et qui est produite par les cellules β , de cellules δ sécrétrices de la somatostatine, de cellules PP sécrétrices du polypeptide pancréatique et de cellules ϵ productrices de la grhélène. Les cellules β pancréatiques sécrètent aussi de l'amyline appelé IAPP (islet amyloid polypeptide) responsable des dépôts amyloïdes dans le pancréas de patients diabétiques (164). Elles sécrètent aussi du GABA (γ -aminobutyric acid) (165) qui régulerait positivement la prolifération des cellules α (166) et celle des cellules β pancréatiques (167). La somatostatine quant à elle est un inhibiteur de la sécrétion de nombreuses autres hormones dont les hormones pancréatiques ; elle exerce un contrôle paracrine sur la production d'insuline et de glucagon avec une forte capacité d'inhibition de la sécrétion d'insuline. Le polypeptide pancréatique aurait quant à lui un rôle dans un mécanisme d'inhibition de la sécrétion pancréatique exocrine, et la grhélène est une hormone digestive antagoniste de la leptine qui stimule l'appétit. La distribution des différents types cellulaires de l'îlot de Langerhans est différente selon les espèces, mais dans tous les cas, les cellules β productrices d'insuline sont les plus abondantes dans l'îlot. Chez l'homme, les cellules β représentent 55% de l'îlot et sont entremêlées avec les autres types cellulaires alors qu'elles représentent 77% de l'îlot et elles ont une position centrale chez la souris (168). La vascularisation des îlots permet de mesurer en continu la glycémie sanguine en fonction de laquelle ils sécréteront plus ou moins d'hormones. Les îlots sont abondamment innervés par le système nerveux sympathique et parasympathique pour assurer une bonne régulation de la sécrétion et de la fonction pancréatique (163).

1. La sécrétion d'insuline

Le lien entre le pancréas et le diabète sucré a été établi expérimentalement lorsque les médecins allemands, Oskar MINKOWSKI (1858-1931) et Josef VON MERING (1849-1908) ont montré que l'ablation du pancréas chez un chien provoquait un diabète sucré fatal. C'est en 1910 qu'Edward Albert SHARPER-SCHAFFER a fait l'hypothèse selon laquelle le diabète serait dû à une déficience en un produit chimique produit par le pancréas qu'il a appelé insuline du latin « *insula* » qui veut dire île, en référence aux îlots de Langerhans (4). En 1921, BANTING et BEST découvrent réellement l'insuline en traitant des chiens diabétiques avec des extraits de pancréas de chiens sains (169). C'est par la suite que James COLLIP et John MACLEOD purifient l'hormone à partir de pancréas de bovins, ce qui a permis les premiers traitements efficaces de patients diabétiques à partir de 1922 (6). Cela a été l'une des avancées majeures dans la recherche pour le traitement du diabète et a permis d'augmenter l'espérance de vie des patients diabétiques. En 1955, l'équipe de Frederik SANGER (1918-2013), en utilisant l'insuline comme modèle pour sa méthode de séquençage des acides aminés protéiques, a décrit la structure chimique de cette dernière (170), ce qui a été la base du clonage du gène et de la production à l'échelle industrielle (171).

1.1. Sécrétion d'insuline stimulée par le glucose

Le transport du glucose du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire est médié par des transporteurs spécifiques, appartenant à la famille des GLUT, qui compte plus d'une dizaine de membres (**Tableau 5**) et qui sont codés par les gènes *SLC2A* (172). Le glucose est ensuite métabolisé générant de l'ATP, qui est le principal moteur de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Le transporteur GLUT2 est le principal transporteur de glucose dans les cellules β pancréatiques chez les rongeurs, mais dans les cellules β humaines le transporteur GLUT1 est principalement exprimé (173). Après l'entrée du glucose dans la cellule β , il est phosphorylé par la GCK qui catalyse la formation de glucose-6-phosphate. Le glucose peut aussi être phosphorylé par les hexokinases, mais la glucokinase est plus abondante et possède une affinité plus faible ($K_m \approx 7,9$ mM) (174). Elle détermine le taux de glycolyse et est considérée comme un « *glucose sensor* » pour la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques (175). L'augmentation de l'ATP intracellulaire produit par la métabolisation du glucose (cycle de

KREBS), augmente de quatre à cinq fois le rapport ATP/ADP ce qui provoque la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants (K^+ ATP) dépolarisant la membrane plasmique, ce qui conduit à l'ouverture des canaux calciques de type L et qui permet l'afflux d'ions calcium (Ca^{2+}) dans la cellule β . L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} induit une exocytose des granules d'insuline (68) comme décrit plus haut (cf supra **II/1-Le diabète monogénique**). Cette augmentation du calcium intracellulaire active différentes kinases telles que la protéine kinase A (PKA) grâce à une production d'AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) dépendante du calcium, la protéine kinase C (PKC), les calcium-calmoduline kinases (CaMK) et les MAP-kinases (Mitogen-Activated Protein kinases), également désignées par ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated protein Kinases 1/2) qui participent aux mécanismes d'exocytose et de recrutement des granules de sécrétion au niveau de la membrane plasmique (174,176). En plus du glucose, d'autres éléments comme les acides gras libres, les acides aminés, les sécrétagogues (les hormones incrélines et leurs analogues, des facteurs de croissance et des neurotransmetteurs) peuvent stimuler la sécrétion d'insuline. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est bi-phasique (**Figure 16**) (68,174,176,177):

- Une première phase transitoire se met en place rapidement, avec une grande amplitude (maximum entre 3 et 5 minutes) et d'une durée globale d'environ 10 minutes. Cette première phase de la sécrétion est stimulée par la forte concentration de calcium cytosolique. Les vésicules déjà « compétentes », c'est-à-dire en première ligne proche de la membrane (*readily release pool [RRP]*), seraient majoritairement exocytées lors de cette première phase.
- Une deuxième phase est ensuite mise en place, d'une amplitude plus faible mais soutenue et graduelle comparé à la première, avec une valeur de sécrétion faible mais supérieure aux valeurs basales. Cette deuxième phase est stimulée par le calcium cytosolique, mais aussi par la production d'ATP et d'AMP cyclique. Cette deuxième phase impliquerait le recrutement de vésicules de sécrétion de réserve moins proches de la membrane (68), qui n'étaient pas matures lors de la première phase. Ces vésicules subissent une série de modifications, dépendantes notamment de l'ATP et du calcium afin de devenir « compétentes » pour la sécrétion (*reserve pool [RP]*).

Une réduction de la taille du RRP et/ou une altération de la signalisation pour l'exocytose de ces vésicules d'insuline peut se développer pendant l'intolérance au glucose et le stade précoce du diabète de type 2. Le RRP est complètement épuisé et le RP est nettement réduit à un stade développé du diabète de type 2. Les mécanismes de signalisation sous-jacents à l'exocytose des

granules d'insuline du RRP et du RP peuvent également être défectueux dans le diabète de type 2 (68).

Table 12.1 The GLUT gene family

Isoform designation*	Class*	HUGO gene nomenclature	Major tissue distribution	Characteristics
GLUT1	I	SLC2A1	Brain microvessels, erythrocytes, placenta, kidney	Ubiquitous, functions as basal transporter, predominates in cultured cell systems
GLUT2	I	SLC2A2	Liver, kidney, β cell, small intestine	High K_m transporter
GLUT3	I	SLC2A3	Brain, placenta, fetal muscle	Low K_m transporter, found in tissues metabolically dependent on glucose
GLUT4	I	SLC2A4	Skeletal muscle, adipocytes, heart	Sequestered intracellularly and translocates to cell surface in response to insulin
GLUT5	II	SLC2A5	Testes, small intestine	High affinity for fructose
GLUT6	III	SLC2A6	Spleen, leukocytes, brain	Transports glucose
GLUT7	II	SLC2A7	Unknown	
GLUT8	III	SLC2A8	Testes, blastocyst, brain	Transports glucose, mediates insulin-stimulated glucose transport in blastocyst
GLUT9	II	SLC2A9	Liver, kidney	
GLUT10	III	SLC2A10	Liver, pancreas	
GLUT11	II	SLC2A11	Heart, muscle	Fructose-inhibitable glucose transport
GLUT12	III	SLC2A12	Heart, prostate	
GLUT13	III	SLC2A13	Brain	Myoinositol transporter, also referred to as HMIT
GLUT 14		SLC2A14	Testes	Alternatively spliced long form and short form which is a duplcon of GLUT3

*Isoform designation and class conforms to nomenclature proposed by Joost HG et al.: *American Journal of Physiology* 2002;282:E974–E976.

Note: Four untranslated pseudogenes have been reported including a pseudogene previously designated as GLUT6.

Tableau 5 : Vue d'ensemble de la classification et de la fonction physiologique des GLUT

(Source : DeFronzo et al. Chapitre 7 [Seino et al.] Springer 2015)

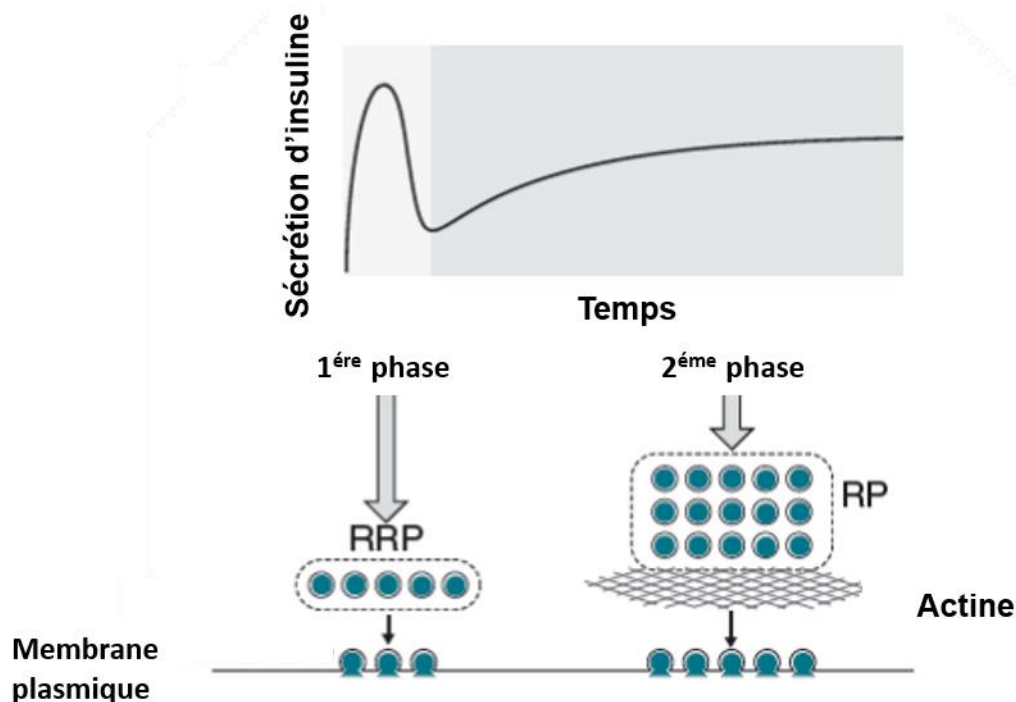
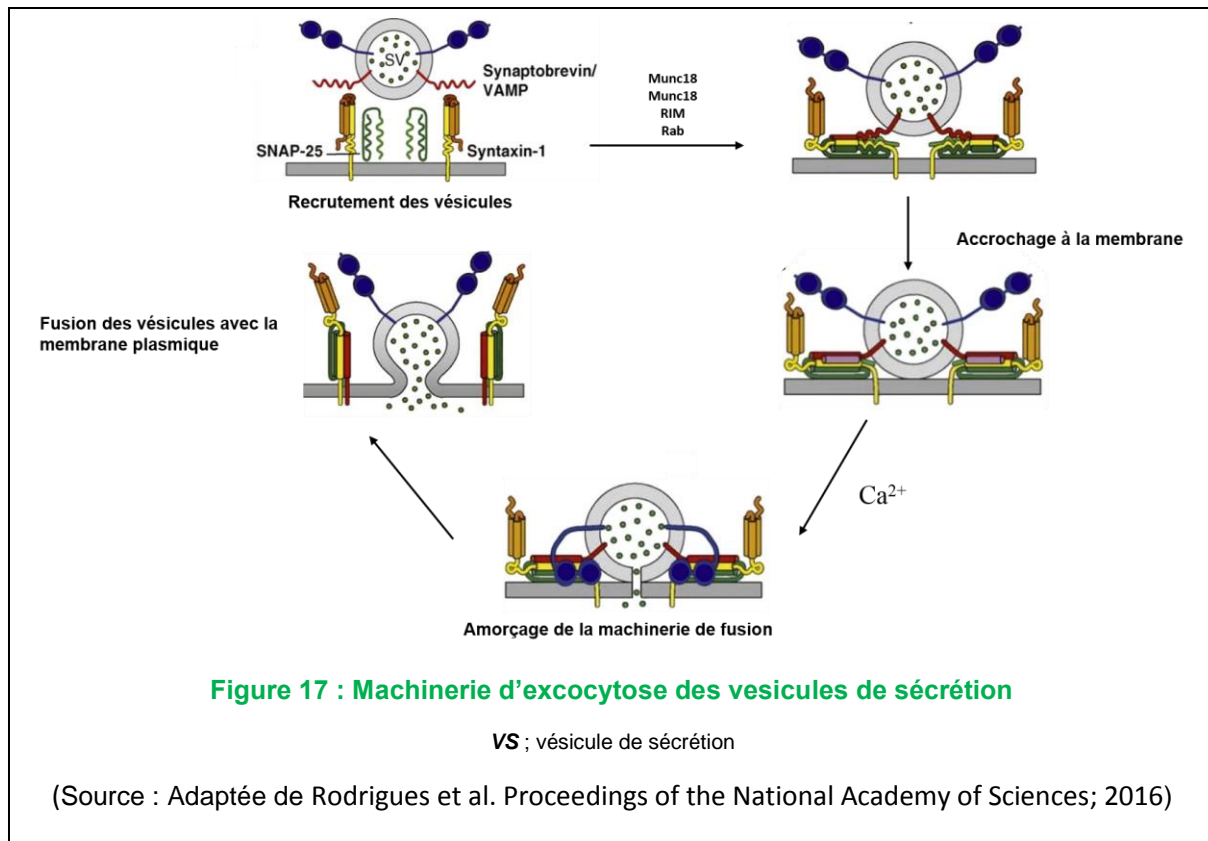


Figure 16 : Sécrétion d'insuline bi phasique en réponse au glucose

(Source : Adaptée de DeFronzo et al. Chapitre 7 [Seino et al.] Springer 2015)

1.2. La machinerie de sécrétion

La machinerie de sécrétion de la cellule β pancréatique ressemble à celle des neurones et implique différentes étapes telles que le recrutement de vésicules à la membrane plasmique, leur accrochage à la membrane plasmique, l'amorçage de la machinerie de fusion et la fusion des vésicules avec la membrane plasmique (**Figure 17**). Les protéines SNARE sont importantes pour l'exocytose des vésicules synaptiques et elles sont aussi exprimées dans les cellules β pancréatiques et les lignées de cellules β (178). Cette machinerie de l'exocytose, y compris syntaxine 1 et SNAP-25 de même que t-SNARE et v-SNARE synaptobrevin / VAMP-2, fonctionnent de manière similaire dans l'exocytose des granules d'insuline (178,179). La hausse de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire déclenche la formation du complexe SNARE à partir de syntaxine 1, SNAP-25 et de VAMP-2, qui favorise la fusion des vésicules à la membrane (178,180). Le complexe SNARE est responsable de l'induction de l'exocytose des granules d'insuline en réponse au glucose. Dans les cellules β pancréatiques, les protéines Munc18-1 et Munc18c sont respectivement impliquées dans la régulation de la première et de la seconde phase de sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et favorisent le rapprochement des granules d'insuline à la membrane plasmique (181). Munc13-1 joue un rôle essentiel dans l'étape d'amorçage lors de l'exocytose des vésicules d'insuline grâce à son interaction avec les effecteurs Rab3 et Rim2 α (182). Elle aurait également un rôle dans la première et la seconde phase de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (183). Les protéines G Rab3 et Rab27a sont aussi associées aux vésicules d'insuline dans les cellules β pancréatiques (184,185) et fonctionnent par interaction avec leurs protéines effectrices, respectivement Rim2 α et granophiline (182,186–188). Rim2 α joue un rôle critique dans les étapes d'accrochage et d'amorçage grâce à son interaction avec Rab3 et Munc13-1 (182). L'interaction de la granophiline avec le complexe Syntaxin1A/Munc18-1 est également importante pour l'attachement des vésicules d'insuline à la membrane plasmique (188) et donc, à l'exocytose de l'insuline dans le milieu extracellulaire.



1.3. Relation entre le diabète et la sécrétion d'insuline

Dans une physiologie normale, le taux de glucose dans le sang augmente après un repas et les cellules β pancréatiques répondent à cela en sécrétant de l'insuline. Cette insuline stimule l'utilisation et/ou le stockage du glucose par des organes périphériques tels que le foie, le tissu adipeux et le muscle. La glycémie qui avait augmenté légèrement, revient à un taux normal, le glucose est stocké sous forme de glycogène dans le foie et le muscle, ou sous forme de lipides dans le tissu adipeux ou utilisé par les organes. Cet équilibre de la balance entre la sécrétion de l'insuline et son action dans les tissus cibles est donc essentiel à l'homéostasie glucidique.

1.3.1. L'altération de la sécrétion d'insuline dans le diabète

Le diabète est considéré comme une anomalie d'assimilation, de stockage et d'utilisation du glucose par l'organisme et/ou de la production de l'insuline, comme rappelé dans l'introduction, dans lequel la machinerie de production d'insuline par la cellule β pancréatique et/ou de stockage du glucose par les organes périphériques est défaillante ou ne fonctionne plus.

Dans le diabète de type 1, plus de 98% des cellules β de l'îlot sont détruites par une réaction auto-immune, ce qui fait que la sécrétion d'insuline est quasiment abolie. La sécrétion résiduelle ne peut pas couvrir les besoins en insuline de l'organisme d'où le nom de diabète insulino-dépendant.

La sécrétion d'insuline altérée a longtemps été reconnue comme une caractéristique clé de la pathogenèse du diabète de type 2. Une perte de la masse de cellules β et un déclin de la fonction de cellule β , sont proposés comme étant les causes de cette altération de la sécrétion d'insuline (**Figure 18**). Chez le diabétique, la première phase de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose administré en intraveineuse est abolie (**Figure 19**) ; cette dernière est importante pour la transition de l'état de jeûne à l'état nourri (189). Elle permet d'arrêter la production de glucose hépatique, la suppression de la lipolyse et la préparation des tissus cibles de l'insuline. C'est l'un des premiers défauts de la cellule β observé chez un sujet diabétique et aussi chez le sujet pré-diabétique intolérant au glucose avec une altération de la glycémie à jeun, ce qui fait qu'il peut être utilisé comme marqueur pour des populations à risque. La seconde phase est aussi réduite mais reste partiellement fonctionnelle. Il arrive qu'elle soit exagérée chez certains patients pour palier à l'hyperglycémie après l'effondrement de la première phase : elle en prend le relais et baisse la production hépatique de glucose mais son efficacité est moindre. Par ailleurs elle augmente le stockage et l'utilisation du glucose par les organes cibles (189).

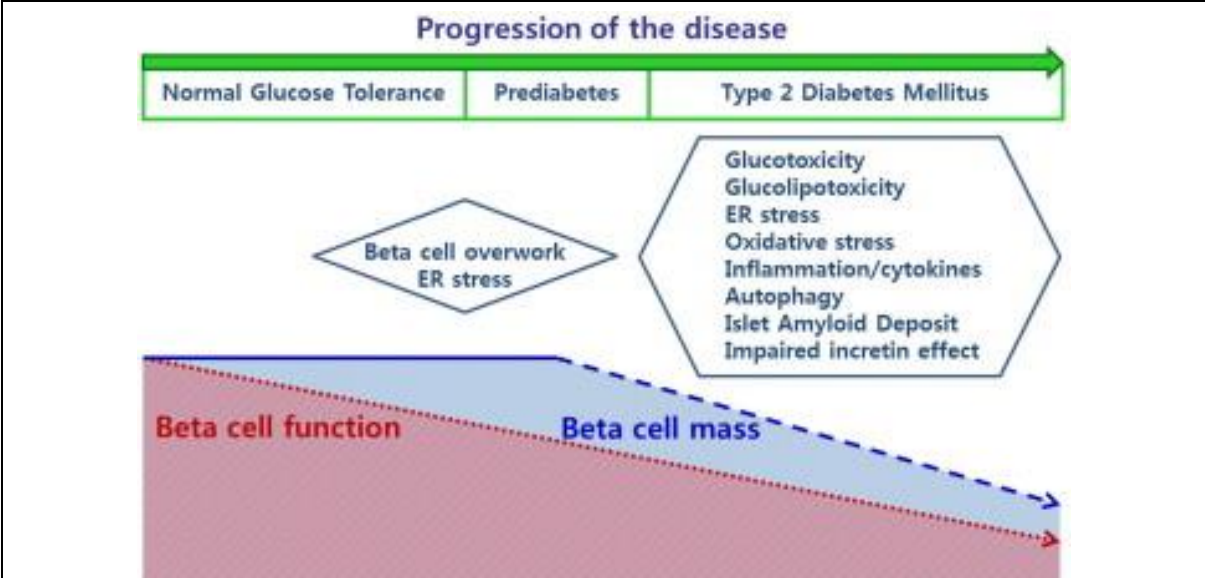


Figure 18 : Changements dans la fonction et la masse de cellules β au cours du diabète de type 2 et les mécanismes causaux proposés

ER, Endoplasmic Reticulum

(Source : Chon et al. Diabetes & Metabolism ; 2014)

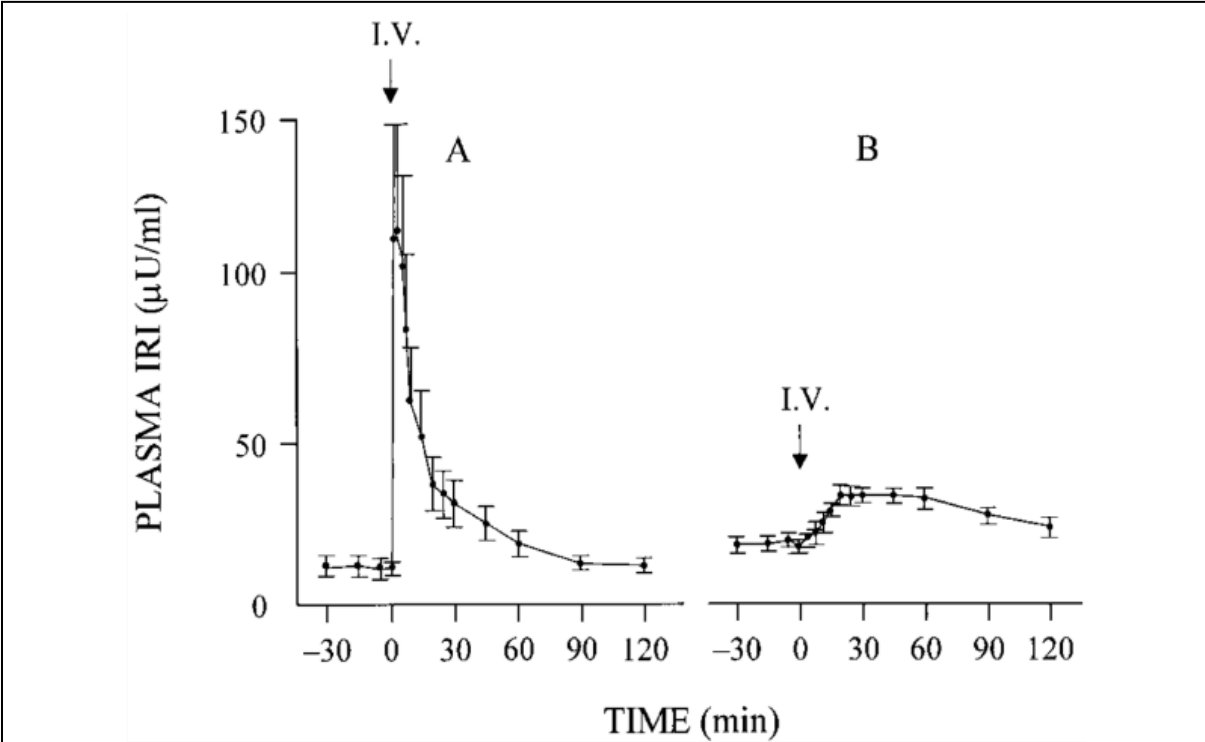


Figure 19 : Réponse à l'insuline après l'administration de 20 mg de glucose à un témoin (A) et à un patient diabétique (B)

I.V., administration du glucose par voie intra veineuse

(Source: Daniel Porte Jr. Diabetes/Metabolism Research and Reviews; Novembre 2000)

1.3.2. Les principales causes de l'altération de la sécrétion d'insuline

1.3.2a. La glucolipotoxicité

Plusieurs facteurs comme la glucotoxicité, la lipotoxicité, l'inflammation, la présence de cytokines, les dépôts amyloïdes dans les îlots, l'altération de la réponse aux incrétines, ou encore la résistance à l'insuline ont été suggérés comme des physiopathologies importantes associées à la défaillance des cellules β dans le diabète de type 2 (176). L'adiposité importante due à une alimentation hypercalorique (trop sucrée, trop grasse), le manque d'activité physique et le vieillissement sont des facteurs aggravant l'inflammation et la glucolipotoxicité. Les cellules β pour palier à l'hyperglycémie causée par l'insulinorésistance augmentent leur sécrétion d'insuline jusqu'à l'épuisement des cellules. Ce phénomène est accentué par ces mêmes facteurs que sont l'inflammation et la glucolipotoxicité, qui réduisent la sécrétion d'insuline, favorisant ainsi le développement du diabète (176). Le mécanisme sous-jacent du concept de lipotoxicité dépend d'un niveau élevé de glucose dans les cellules β . Par conséquent, le terme « glucolipotoxicité » a été proposé pour désigner les effets des lipides sur la fonction de la cellule β (190). La combinaison de niveaux excessifs d'acides gras libres circulants (FFA) (191) et de glucose conduit donc à une diminution de la sécrétion d'insuline, à une diminution de l'expression du gène de l'insuline et à la mort des cellules β par apoptose (191–193). Le stress du réticulum endoplasmique (ER), le stress oxydatif, l'inflammation des îlots (production de cytokines pro-inflammatoires) et le dysfonctionnement mitochondrial, ont été proposés comme des mécanismes intervenant dans le dysfonctionnement des cellules β et dans la mort cellulaire associés à la glucotoxicité, de même que les dépôts amyloïdes, la dégradation de facteurs de survie (comme CREB et IRS), via le système ubiquitine-protéasome et la N-glycosylation (174,176,194). Dans le cadre de la lipotoxicité (ou glucolipotoxicité), plusieurs mécanismes ont été impliqués, comme la formation de céramides, le stress oxydatif, l'inflammation, le stress et l'autophagie (176,193).

1.3.2b. La dédifférenciation des cellules β

De nouvelles études ont montré que les cellules β adultes matures se dédifférencient vers un phénotype moins fonctionnel avec la progression du diabète. Ces résultats concilient potentiellement les points de vue opposés sur la façon dont la sécrétion d'insuline est altérée dans le diabète de type 2 en suggérant que la masse de cellules β fonctionnelles diminue

(176,195). Avec des études par *microarrays* et l'analyse des réseaux de co-expression sur des îlots pancréatiques issus de 123 donneurs humains, dont 41 avaient un diabète de type 2, 168 gènes ont été identifiés comme associés au diabète de type 2 et aux traits métaboliques (incluant l'HbA1c et la sécrétion d'insuline modélisée par l'indice HOMA-B [*Homeostasis model assessment of β -cell function*] ou encore la CIR [*Corrected insulin response to glucose*]). Les auteurs, en comparant les données d'expression, ont trouvé un grand *overlap* entre les signatures géniques du diabète de type 2 dans des îlots de donneurs diabétiques et celles d'îlots humains différenciés artificiellement. Ce set de gènes impliqués est aussi perturbé dans les cellules β immatures (1.3-fold enrichment ; $p < 10^{-6}$) de la même manière que cela a été observé dans les îlots de diabétiques. Ces cellules β immatures expriment *PDX1* mais avec une faible expression du gène de l'insuline ($Pdx1^+/Ins^{Low}$), avec une expression importante des gènes du développement précoce de la cellule β (*MafB*, *Nkx2.2*) et une expression moindre des gènes marqueurs d'un phénotype mature de la cellule β (*MafA*, *Glut2*). Cela peut suggérer que ce groupe de gènes est caractéristique du phénotype de cellules β immatures (196). L'analyse des sites de liaison des facteurs de transcription dans ces 168 gènes a révélé un grand nombre de sites de liaison putatifs de SOX5 qui serait un régulateur important de l'expression de ce groupe de gènes (196).

Des résultats présentés lors du congrès de la Société Francophone du Diabète (SFD) 2017 à Lille par l'équipe du Docteur Raphaël SCHARFMANN (Paris) ont montré que le traitement de la lignée de cellules β pancréatique humaine EndoC- β H1 par le facteur de transcription FGF2 (fibroblast growth factor 2) faisait diminuer leur production d'insuline sans modification significative du nombre de cellules, avec une baisse de l'expression de plusieurs gènes spécifiques de la cellule β mature comme le facteur de transcription de l'insuline *MAFA*, le transporteur de glucose *GLUT2*, le transporteur de zinc *ZnT8* et parallèlement une induction majeure de marqueurs normalement absents d'une cellule β comme la somatostatine et des facteurs de transcription spécifiques aux progéniteurs pancréatiques et aux cellules canalaire (197).

2. La résistance à l'insuline

Harold HIMSWORTH (1905-1993) en 1936 a été le premier à proposer qu'il pourrait exister un type de diabète sucré qui ne serait pas dû à un défaut de sécrétion de l'insuline, mais plutôt

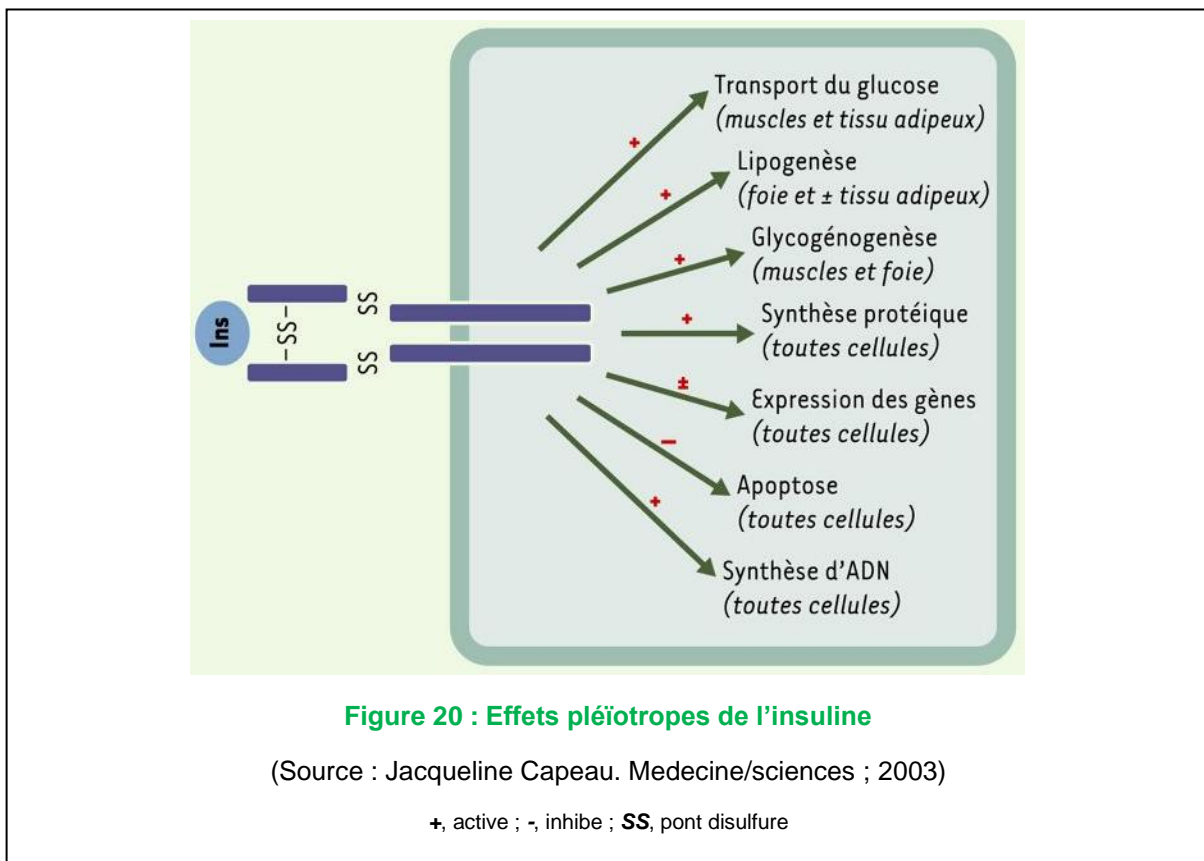
à un manque de ses facteurs sensitifs (198). Au milieu du 19^{ème} siècle, Claude BERNARD a montré que le glucose sanguin ne dépend pas que de l'alimentation mais aussi du foie. Cette production hépatique de glucose se fait soit par la glycogénolyse à partir du glycogène stimulée par le glucagon et l'épinéphrine (secrétée par l'hypophyse antérieure) par activation de la voie protéine kinase /AMPC, soit par néoglucogénèse à partir de substrats carbonés. Cela a suggéré que les tissus périphériques, joueraient un rôle dans le diabète (6). La résistance à l'insuline est définie par une diminution de la capacité de réponse des cellules ou des tissus cibles à l'insuline au niveau physiologique. L'évaluation *in vivo* du métabolisme du glucose en réponse à une hyperinsulinémie montre que chez les patients insulino-résistants, il y a une diminution de la capture du glucose et de son métabolisme dans les tissus périphériques ce qui induit une augmentation de la glycémie. Les études *in vivo* sur des tissus adipeux et musculaires de sujets résistants à l'insuline ont confirmé l'altération de la réponse à l'insuline dans ces tissus (199). La résistance à l'insuline n'est pas présente que dans le diabète de type 2 et l'obésité mais elle est aussi présente dans d'autres maladies telles que le syndrome des ovaires polykystiques ou encore l'hypertension artérielle. Bien que l'insuline ait des effets pléiotropes (cf **Figure 20**), la définition de l'insulino-résistance s'applique habituellement à sa capacité à stimuler la capture du glucose par les tissus périphériques (200,201). La baisse de l'efficacité de l'insuline cause la dérégulation de l'inhibition de la production hépatique du glucose, une baisse de l'inhibition de la lipolyse dans le tissu adipeux ainsi qu'une diminution de la captation de glucose par le muscle squelettique (202).

L'obésité est souvent à la base de la résistance à l'insuline et est aussi l'un des principaux facteurs à risque pour le diabète de type 2 comme montré précédemment (80) (cf supra **II/3.1.2- Rôle de l'obésité**). Des études cliniques ont montré que chez des personnes obèses et qui présentent une altération de la tolérance au glucose, une perte de 5 à 7% de leur poids permettrait de prévenir le diabète (203). En effet, le niveau élevé des FFA (Free Fatty Acid) induit par le stress, la lipodystrophie ou l'excès de matières grasses provenant de l'alimentation conduisent à leur accumulation sous forme de diacylglycérol (DAG) et de triglycérides dans les tissus non-adipeux, tels que le muscle squelettique, le foie, le cœur et les cellules β . Ces intrusions de lipides, en plus d'une alimentation élevée en matière grasse chez des sujets humains et chez des rongeurs, réduisent la prise en charge du glucose sous l'effet de l'insuline (204–206). Cela suggère que les défauts du métabolisme lipidique entraînant une altération de la signalisation de l'insuline semblent être un mécanisme majeur de résistance à l'insuline (207), mais d'autres causes sont possibles. En effet, une diminution du nombre de mitochondries et/ou

une anomalie de leur morphologie, de faibles taux d'enzymes oxydatives mitochondriales et une synthèse plus faible de l'ATP à la fois *in vivo* (208,209) et *in vitro* dans les biopsies musculaires humaines (210) sont aussi associés à la résistance à l'insuline.

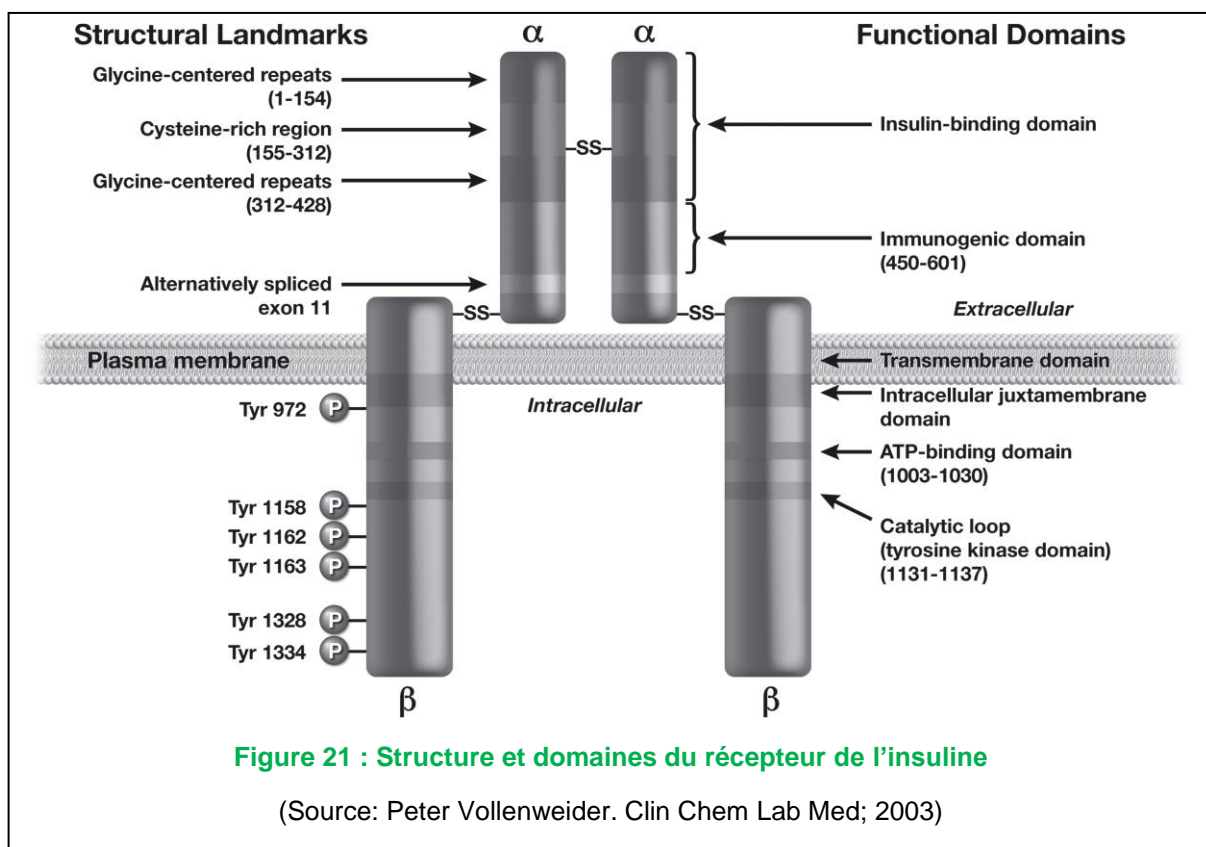
1.1. Mécanismes moléculaires de la réponse à l'insuline

La signalisation de l'insuline lorsqu'elle est altérée affecte non seulement le métabolisme du glucose stimulé par l'insuline dans le foie, le tissu adipeux et le muscle, mais aussi les autres actions de l'insuline dans d'autres tissus, notamment le cœur et le système vasculaire (211–215).



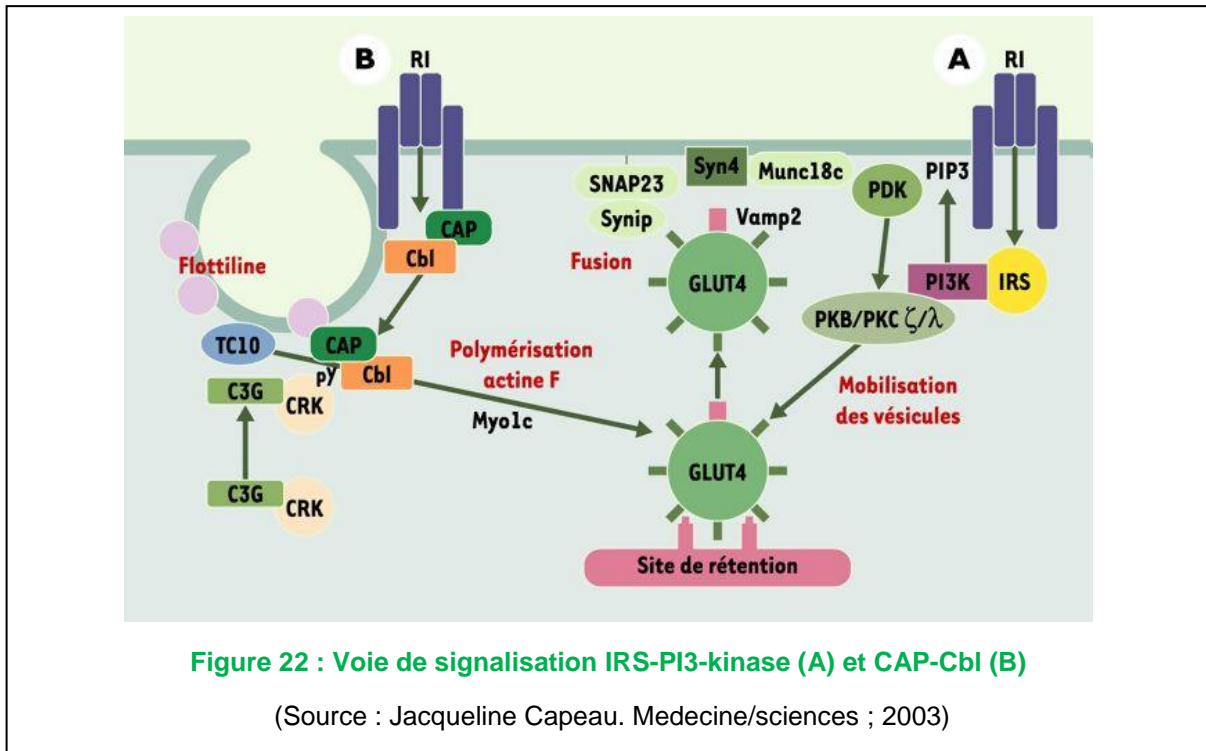
L'insuline agit sur ses tissus cibles via son récepteur (IR), qui est une protéine membranaire hétérotétramérique constituée de deux chaînes α extracellulaires reliées par des ponts disulfures aux deux chaînes β transmembranaires. L'insuline se lie à son récepteur via les sous-unités α et cela conduit à la phosphorylation des résidus tyrosines (Tyr) des sous-unités β par un

mécanisme décrit comme une transphosphorylation ou une autophosphorylation (216). L'autophosphorylation augmente significativement l'activité tyrosine kinase intrinsèque des sous-unités β (217). La stimulation de l'activité des sous-unités β dépendante du ligand est essentielle pour la propagation du signal de l'insuline. Six résidus de tyrosine différents ont été identifiés comme phosphorylés en réponse à l'insuline. La phosphorylation des tyrosines aux positions 1158, 1162 et 1163 de la sous-unité β en particulier est essentielle pour l'augmentation de l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline et constitue le domaine de la régulation kinase. Les mutations de ces résidus Tyr causent une diminution importante des effets de l'insuline en aval. La Tyr 972, qui se trouve dans le domaine juxta-membrane du récepteur IR, est essentielle pour la liaison des protéines substrats du récepteur de l'insuline IRS1 et IRS2. Les résidus de Tyr 1328 et 1334 dans la région carboxy-terminal (COOH) des sous-unités β ont des fonctions moins bien connues (**Figure 21**) (200).



La propagation du signal de l'insuline dans la cellule dépend d'interactions protéine-protéine et de la phosphorylation des médiateurs en aval au niveau de leurs résidus tyrosine. Plusieurs protéines sont phosphorylées en réponse à l'insuline. Elles comprennent des membres de la

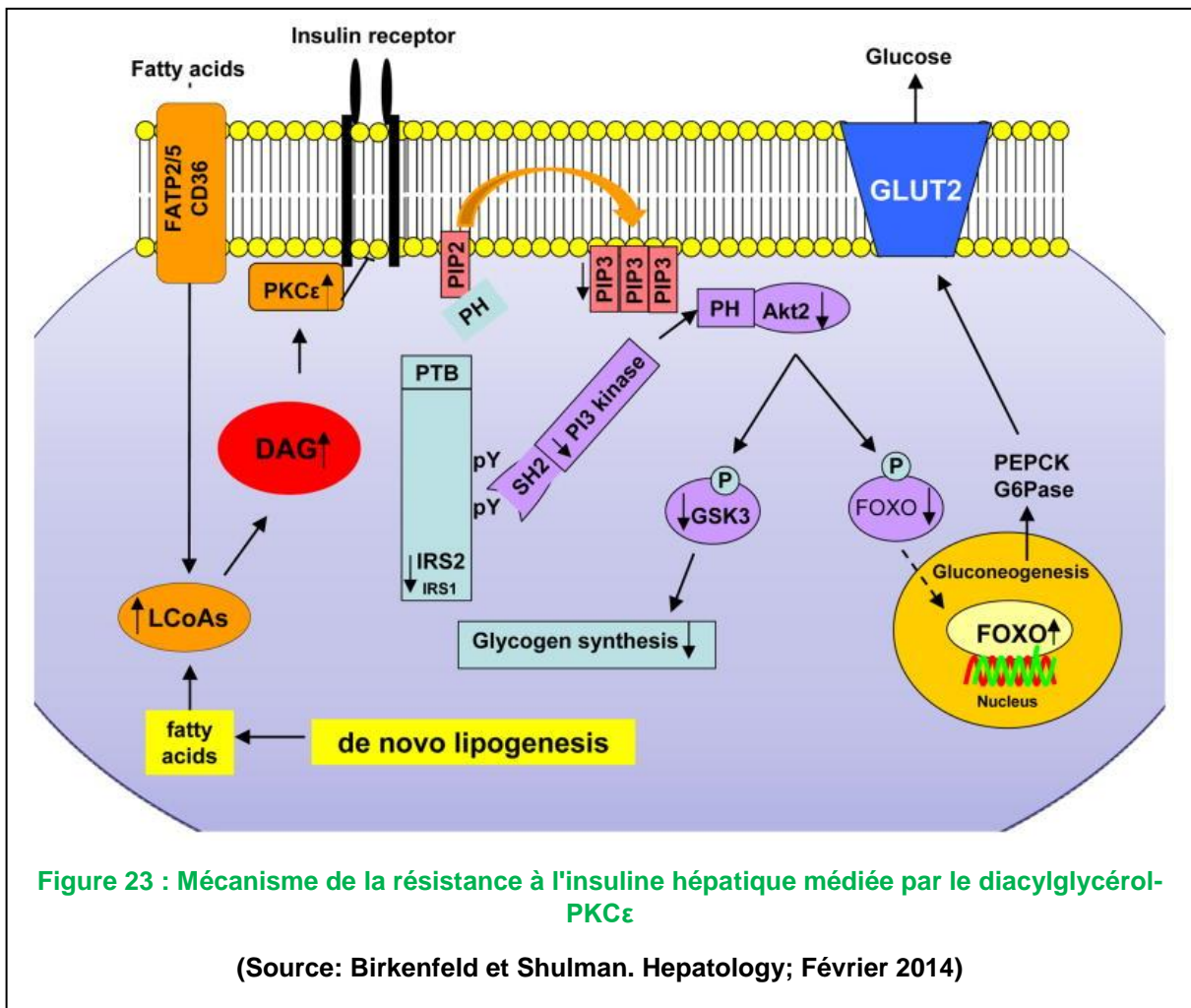
famille IRS, Shc, Gab1, Cbl et p62dok. Les expériences *in vitro* et *in vivo* suggèrent que de nombreuses réponses à l'insuline, en particulier celles associées au métabolisme des glucides, sont largement médiées par les protéines IRS (IRS-PI3-kinase pathway) et le proto oncogène Cbl (The CAP-Cbl pathway) (200) (**Figure 22**).



1.2. La résistance à l'insuline au niveau foie

En condition normale, l'insuline active la fonction tyrosine kinase de son récepteur dans le foie, et s'en suit une cascade d'activation de kinases comme la protéine kinase 1 (PDK1) et le mTORC2, qui aboutit à la phosphorylation d'Akt2 dont l'activation régule le transport du glucose (translocation de GLUT4), la production de glucose hépatique (phosphorylation de FOXO1 [forkhead box protein O] inhibant la néoglucogenèse), la phosphorylation de la GSK3 β et l'augmentation de la synthèse du glycogène (218). Lors de la résistance à l'insuline, l'accumulation de DAG (Diacylglycérol) intracellulaire entraîne une activation de la protéine kinase C ϵ (PKC ϵ) qui va inhiber l'activité kinase du récepteur de l'insuline. Cela conduit alors à une diminution de la phosphorylation des tyrosines des IRS, de l'activation de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K) et de la signalisation de l'insuline en aval. Cela conduit à une diminution de la synthèse hépatique du glycogène, résultant d'une diminution de l'activation de la glycogène synthase et d'une augmentation de la néoglucogenèse hépatique grâce à une

inactivation réduite de la protéine FOXO1, ce qui entraîne une libération de glucose hépatique exagérée via le transporteur GLUT2 (218,219) (**Figure 23**).



1.3. La résistance à l'insuline au niveau du muscle

Chez un individu en bonne santé, 85% du glucose sanguin est absorbé par le muscle (220). Le transporteur de glucose GLUT4 est exprimé dans le tissu adipeux, le muscle squelettique et le muscle cardiaque où il gère la capture du glucose et joue un rôle important dans la résistance à l'insuline (**Tableau 5**) (200,220). En l'absence de stimulation par l'insuline, GLUT4 est séquestré dans des vésicules intracellulaires. Cette rétention l'empêche d'atteindre la surface de la cellule et de permettre la capture du glucose lorsque les taux de glycémie sont faibles. Lorsque la glycémie augmente, l'insuline sécrétée par le pancréas se lie à son récepteur, déclenche une cascade de signalisation intracellulaire, entraînant la translocation de GLUT4

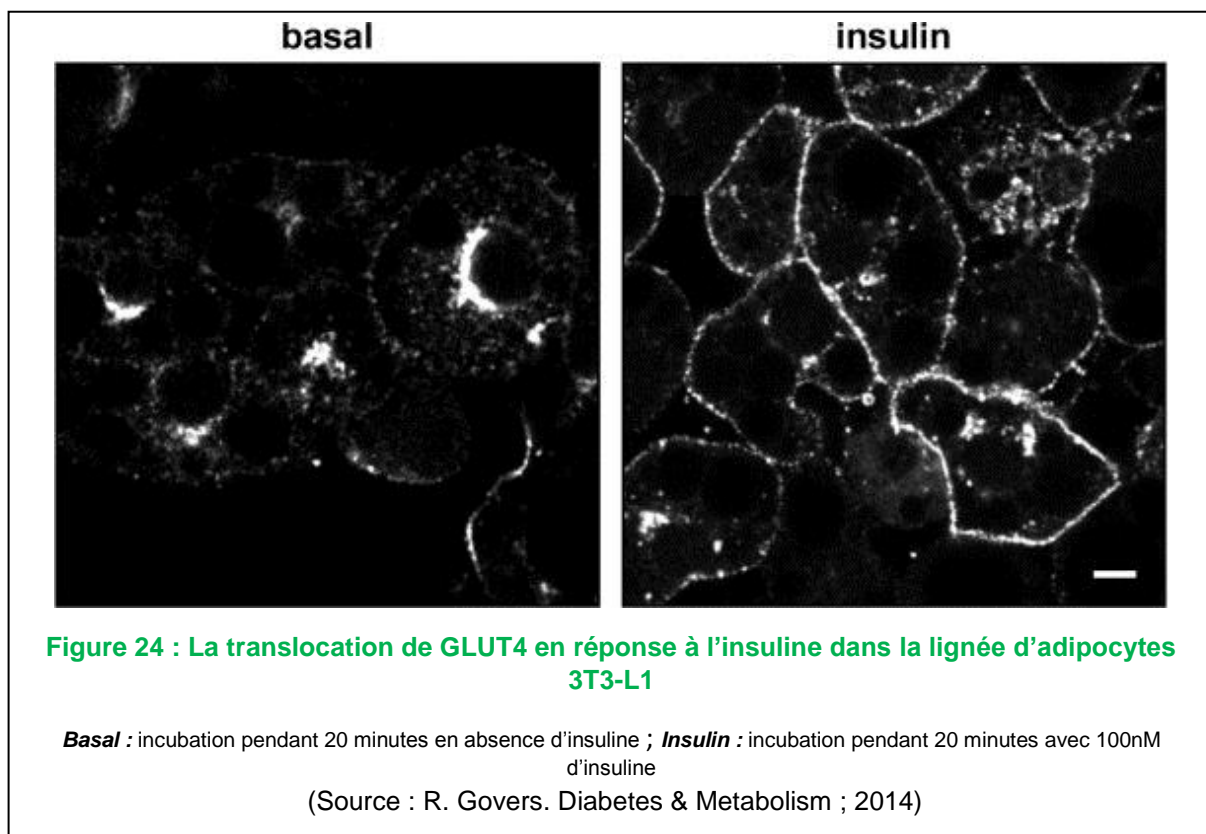
des compartiments intracellulaires à la surface de la cellule, corrélée à une capture du glucose et une normalisation de la glycémie (**Figure 24**) (220). Lorsque le récepteur de l'insuline est activé conduisant à la phosphorylation des IRS, et de la PI3-kinase, cela génère la formation de phosphatidylinositol-3,4,5-P3 (PIP3) qui interagit avec Akt et stimule l'activité de la kinase phosphoinositide-dépendante (PDK1), entraînant une activation accrue d'Akt. La PI3-kinase active également les membres de la famille des protéines kinases C (PKC), en particulier PKC ζ et λ . Grâce à des mécanismes qui sont actuellement inconnus, Akt et PKC ζ / λ induisent la translocation de vésicules contenant GLUT4 du cytoplasme à la membrane plasmique (200).

L'insulinorésistance dans le muscle induit une perte de 55% de la capture du glucose sanguin (189). Les principales voies du métabolisme du glucose altérées lors de l'insulinorésistance au niveau musculaire induisent une baisse de l'activation des voies intracellulaires du signal de l'insuline (**Tableau 6**) (221). La voie IRS-PI3-kinase est particulièrement affectée lors de l'insulinorésistance dans le muscle et le tissu adipeux. L'évaluation de la signalisation en aval de l'IR chez des diabétiques *versus* des témoins a permis d'identifier une réduction de la phosphorylation d'IRS-1 et de l'activation de la PI3-kinase affectant la cascade de signalisation en aval et la prise en charge du glucose chez les sujets diabétiques. Chez des sujets diabétiques et obèses, la capture du glucose est diminuée dans le muscle comparé à des personnes diabétiques minces ou avec un IMC normal (222). Une réduction de la présence du transporteur GLUT4 a été observée au niveau de la membrane plasmique après une incubation avec de l'insuline des biopsies de muscles squelettiques de patients diabétiques par rapport aux témoins. Ce qui montre que l'altération de la translocation de GLUT4 est l'un des mécanismes majeurs de la résistance à l'insuline au niveau du muscle chez les personnes diabétiques (223). L'accumulation de lipides dans les cellules musculaires conduit à une réduction du ratio des activités enzymatiques glycolytiques et oxydatives, qui est négativement corrélée à la sensibilité à l'insuline chez les sujets atteints de diabète de type 2 *versus* les sujets non diabétiques (209,224,225). Ainsi, l'accumulation de lipides dans les cellules musculaires provoquerait une réduction de la capacité oxydative mitochondriale dans le muscle squelettique des sujets atteints diabétiques et des descendants de patients atteints de diabète de type 2.

	<p>Réduction de la phosphorylation en tyrosine du récepteur à l'insuline</p> <p>Diminution de la phosphorylation en tyrosine d'IRS-1</p> <p>Diminution de l'activation de PI3-kinase</p>
Voie de signalisation de l'insuline	
Transport de glucose	<p>Altération de la translocation de GLUT4</p> <p>Altération de la translocation de GLUT1 et 2</p>
Métabolisme du glucose	<p>Diminution de la phosphorylation du glucose</p> <p>Diminution du flux glycolytique et de l'oxydation du glucose</p> <p>Altération de la synthèse de glycogène</p>

Tableau 6 : Voies du métabolisme du glucose altérées lors de la résistance à l'insuline

(Source : Barquissau et Morio. Nutrition clinique et métabolisme ; 2011)



1.4. La résistance à l'insuline au niveau du tissu adipeux

Le tissu adipeux n'absorbe que 5 à 10% du glucose présent dans l'organisme, et les voies de réponse à l'insuline sont similaires à celles du muscle (219). Mais en plus de la capture du glucose, le tissu adipeux produit un grand nombre de facteurs tels que les FFA, $TNF\alpha$, les adipokines comme la leptine, l'adiponectine et la résistine qui modulent l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline dans d'autres tissus. Par conséquent, le tissu adipeux est important dans la pathogenèse de la résistance à l'insuline. Une étude menée sur des patients diabétiques de type 2 montre que leurs adipocytes ont une réponse à l'insuline qui diminue de manière significative (226) et que l'expression de *GLUT4* a baissé de 70 à 80% dans leurs adipocytes alors que cela n'est pas observé dans le muscle squelettique (227). Les adipocytes isolés chez les patients diabétiques présentent une réduction marquée de la phosphorylation d'IRS-1 et de l'activation de la PI3-kinase associée à l'IRS-1 (226). Cependant, cela était principalement associé à une réduction de 70% de l'expression de la protéine IRS-1. L'expression de la protéine IRS-2 et de l'IR restaient stables dans ces adipocytes, et l'activité PI3-kinase en réponse à l'insuline était principalement associée à l'IRS-2 (226). La phosphorylation au niveau d'une serine d'Akt et son activité ont été nettement réduites chez les sujets atteints de diabète de type 2 comparés aux sujets sains (228). En conclusion, les adipocytes de patients diabétiques sont résistants à l'insuline, avec une expression significativement réduite d'importantes molécules de signalisation et une signalisation altérée de la voie IRS-1-PI3-kinase-Akt (229).

Matériels et Méthodes

1. Echantillons du panel de tissus humains

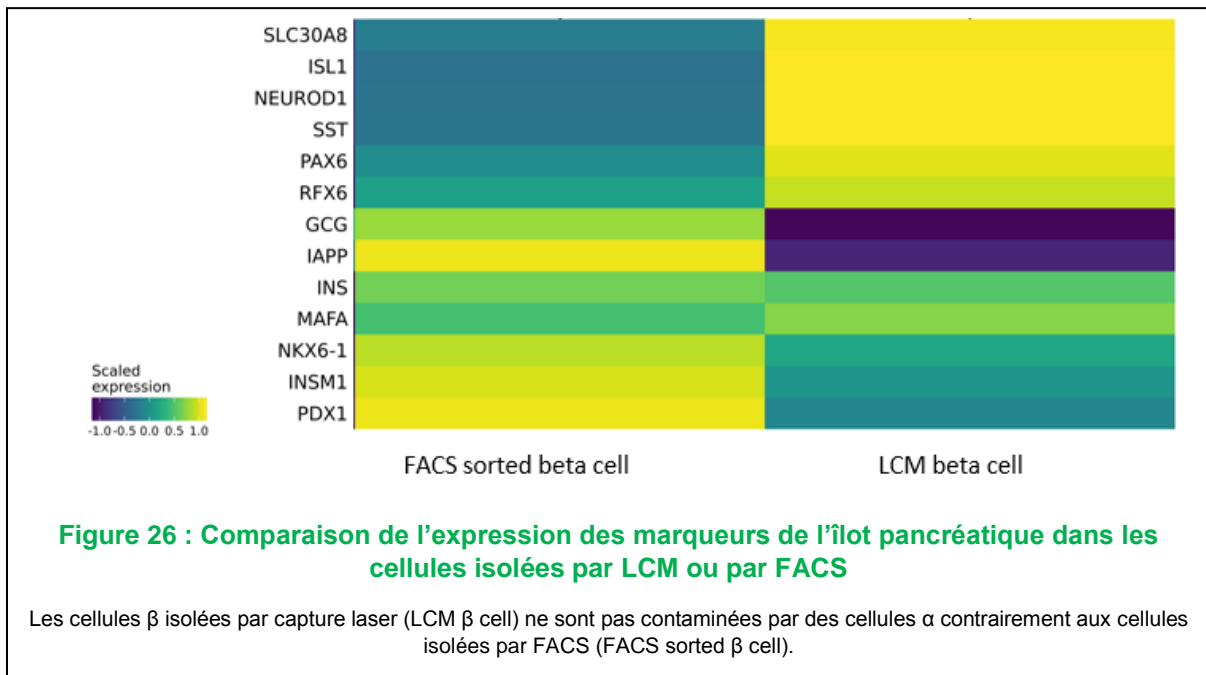
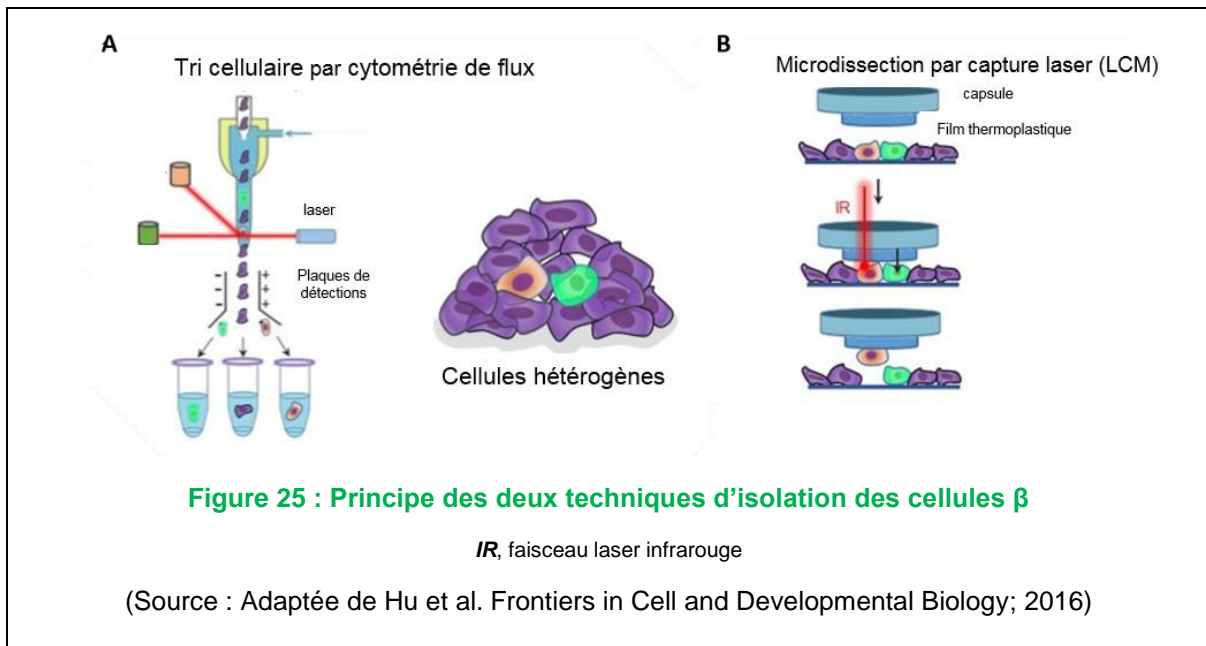
Nous avons obtenu des échantillons d'ARNm totaux de différents tissus humains : colon, foie, rein, tissu adipeux, poumon, muscle squelettique, cœur, cerveau, intestin grêle, substantia nigra, hippocampe, ganglion de la racine dorsale et insula ainsi que de l'ARN Poly A+ d'hypothalamus, glande pituitaire, noyau caudé et de lobe frontal à Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA). Les îlots pancréatiques (n = 8) et le pancréas exocrine (n = 2) ont été prélevés sur des donneurs adultes non-diabétiques en état de mort cérébrale, en accord avec le comité d'approbation éthique franco-italien (230,231). Les pré-adipocytes primaires (Lonza, Basel, Switzerland) proviennent de tissu adipeux sous-cutané issu de patientes non-diabétiques caucasiennes. Ces pré-adipocytes ont été différenciés en adipocytes matures en 10 jours selon le protocole du fournisseur avec le milieu PBM-2 dans lequel sont ajoutés de l'insuline, du dexaméthasone, de l'IBMX et de l'indométacine (tous les composants étant fournis par Lonza). Les échantillons d'ARN d'EndoC- β H1 (n = 3), de pré-adipocytes et d'adipocytes matures ont été extraits comme décrit dans la partie « **Extraction d'ARN, RT-PCR quantitative** ». Les cellules β pancréatiques ont été obtenues par microdissection au laser (LCM β cells) (n = 2) (232), ou par cytométrie de flux (FACS sorted β cells) (n = 5) (233).

Nous avons utilisé des cellules β pancréatiques qui ont été isolées par deux méthodes différentes pour nous affranchir de biais liés à la technique d'isolation. Le FACS est un type de cytométrie de flux spécialisé avec une capacité de tri. Cette technique est la plus sophistiquée et la moins contraignante pour caractériser et définir différents types de cellules dans une population cellulaire hétérogène en fonction de la taille, de la granularité et de la fluorescence. Avant leur séparation, les cellules sont mises en suspension et les cellules cibles sont marquées avec des sondes fluorescentes (*zinc-sensitive fluorescent probe* dans notre cas). À mesure que la suspension cellulaire traverse la cytométrie, chaque cellule est exposée à un laser, ce qui permet aux détecteurs de fluorescence d'identifier les cellules en fonction des caractéristiques sélectionnées. L'instrument applique une charge (positive ou négative) à la gouttelette contenant une cellule d'intérêt et un système de déviation électrostatique facilite la collecte des gouttelettes chargées dans des tubes de collecte appropriés pour une analyse ultérieure (**Figure 25A**) (234). Le principal inconvénient du FACS est la grande quantité de cellules nécessaire au départ (plus

de 10 000 cellules). La rapidité du flux dans le cytomètre peut aussi endommager les cellules. En outre, il est possible qu'il y ait de la fluorescence non-spécifique mais le taux de contamination a été rapporté comme très faible (234).

La LCM est une technologie de pointe pour isoler des populations de cellules pures ou une seule cellule provenant principalement d'échantillons de tissus solides sur une lame de microscope. La LCM commence par une première étape de visualisation des cellules d'intérêt à travers un microscope inversé, puis une impulsion laser sur une courte durée et focalisée est délivrée pour faire fondre le film thermoplastique placé au-dessus des cellules ciblées. Le film fond et fusionne avec les cellules sous-jacentes de choix. Les cellules cibles restent liées au film ce qui permet de les prélever (**Figure 25B**). La LCM est une méthode rapide et fiable pour obtenir des populations pures de cellules, mais des problèmes de contamination des cellules prélevées par des cellules adjacentes peuvent être rencontrés, ce qui baisse la pureté de l'échantillon prélevé. D'autre part, la LCM est une technique "sans contact" qui ne détruit pas les tissus prélevés et adjacents après la microdissection, la morphologie des cellules capturées ainsi que du tissu résiduel est bien conservée et le risque de perte de tissu est réduit (234).

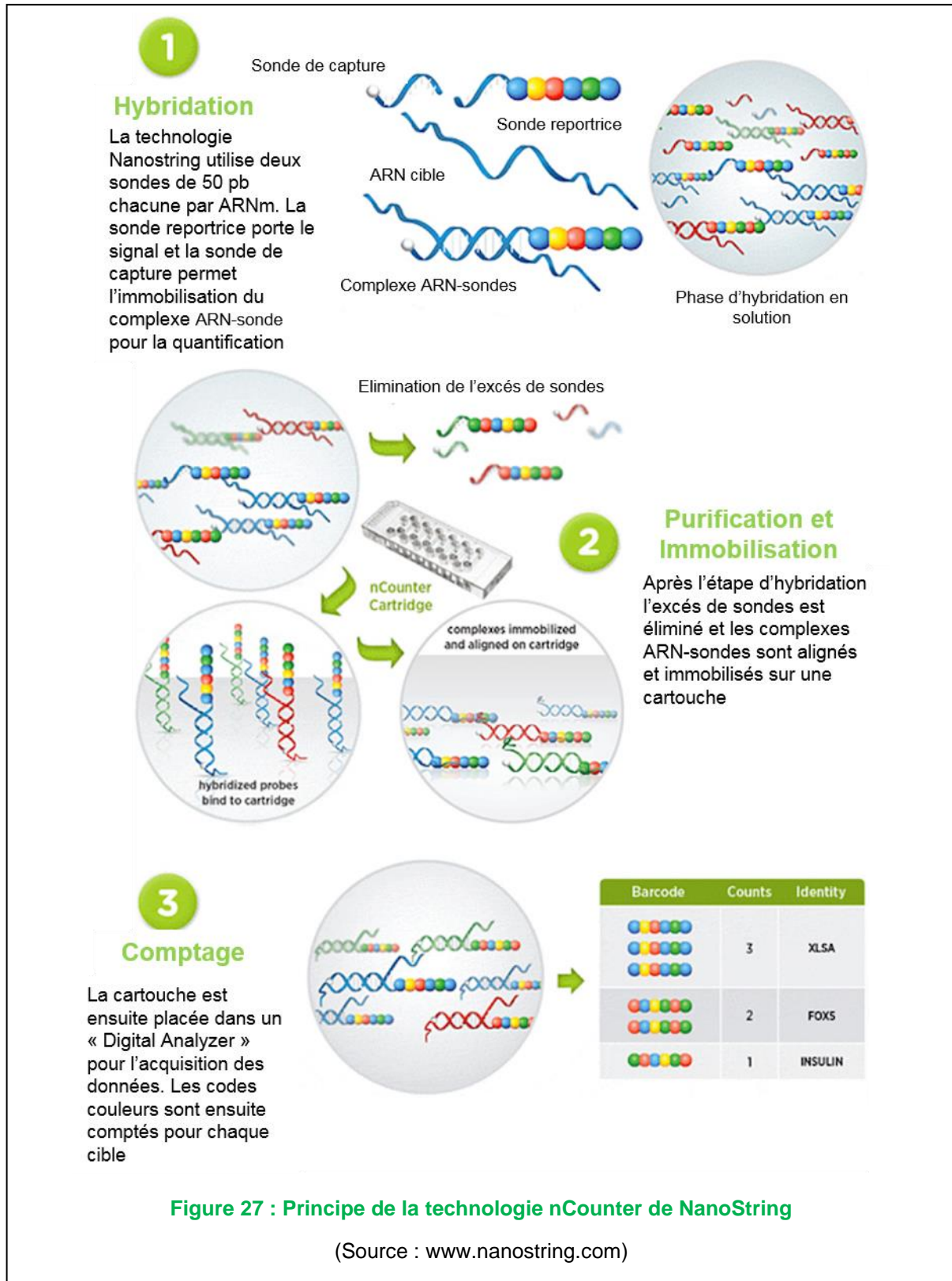
Dans la littérature, les cellules β isolées par LCM sont réputées moins pures, avec un taux de contamination par les cellules adjacentes plus élevé en comparaison avec les cellules isolées par FACS (234). Cependant, dans notre étude, lorsque nous avons comparé l'expression des marqueurs de l'îlot pancréatique dans les deux types d'échantillons, les cellules β isolées par LCM semblaient plus pures que celles isolées par FACS, avec une expression quasi inexistante du glucagon dans celles isolées par LCM en comparaison aux cellules isolées par FACS (**Figure 26**). Cela serait probablement dû à une isolation par LCM des cellules β totalement maîtrisée par l'équipe du professeur Piero Marchetti via laquelle nous avons obtenu ces échantillons.



2. Design et sélection des sondes du panel de gènes sélectionnés pour l'étude d'expression

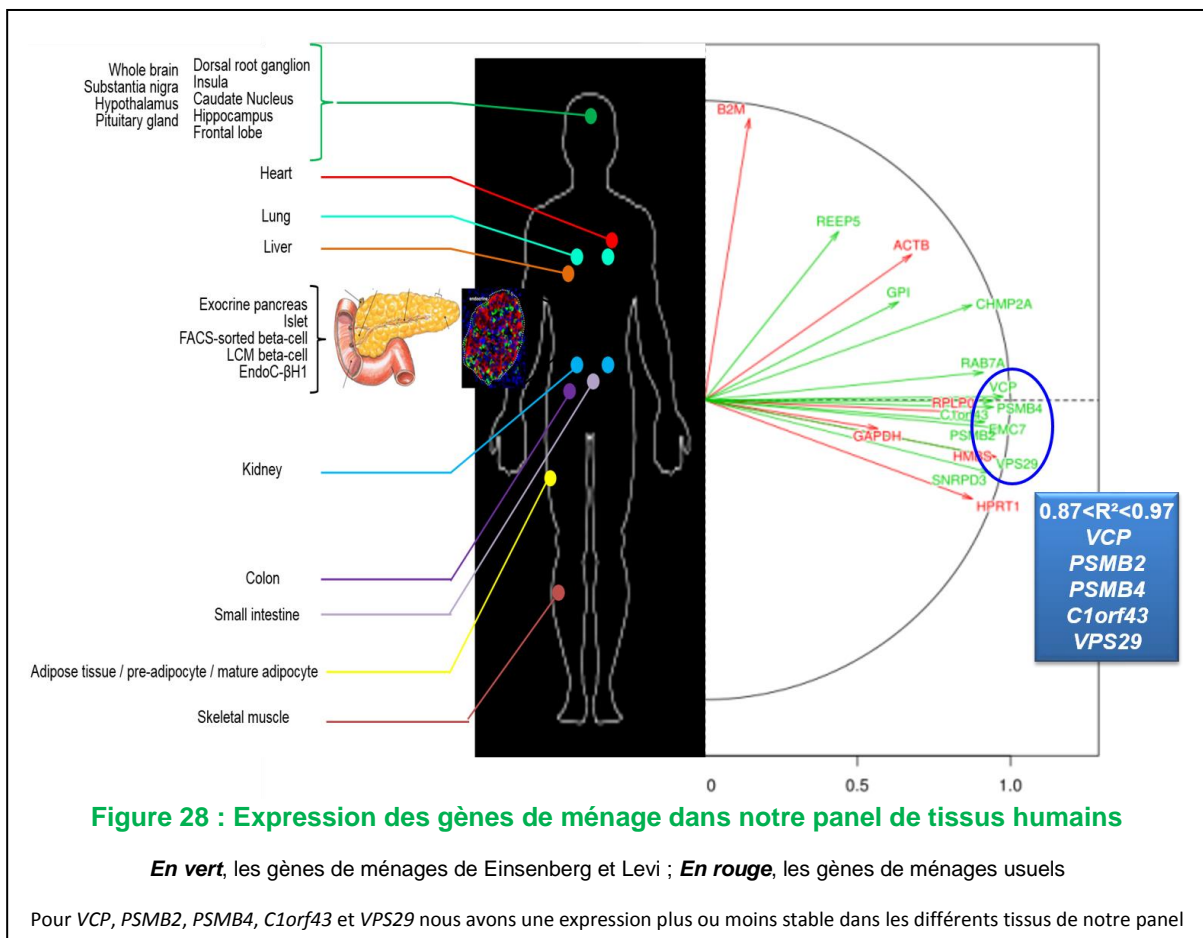
Nous avons utilisé la technologie NanoString (Seattle, WA, USA) pour la quantification des produits de la transcription. Le principe de la technique repose sur l'hybridation de deux sondes, une sonde reportrice et une sonde de capture sur l'ARN messager (ARNm). La sonde reportrice porte un code-barre spécifique pour chaque gène permettant leur reconnaissance. La sonde de

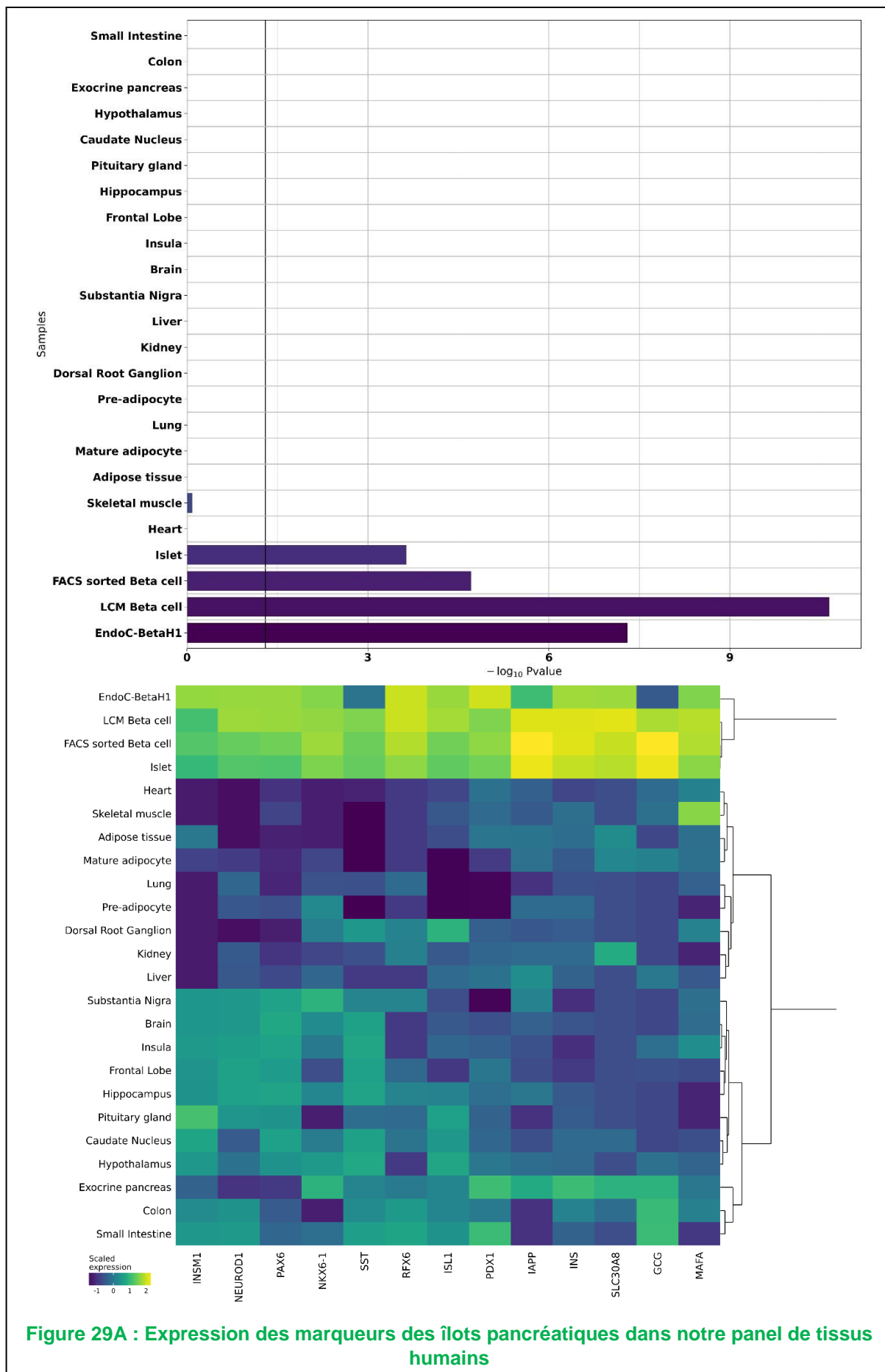
capture est associée à une biotine qui avec la streptavidine fixée sur une cartridge va permettre par une réaction irréversible la fixation des complexes ARNm-sondes pour la quantification de l'expression par comptage des molécules d'ARNm (**Figure 27**).

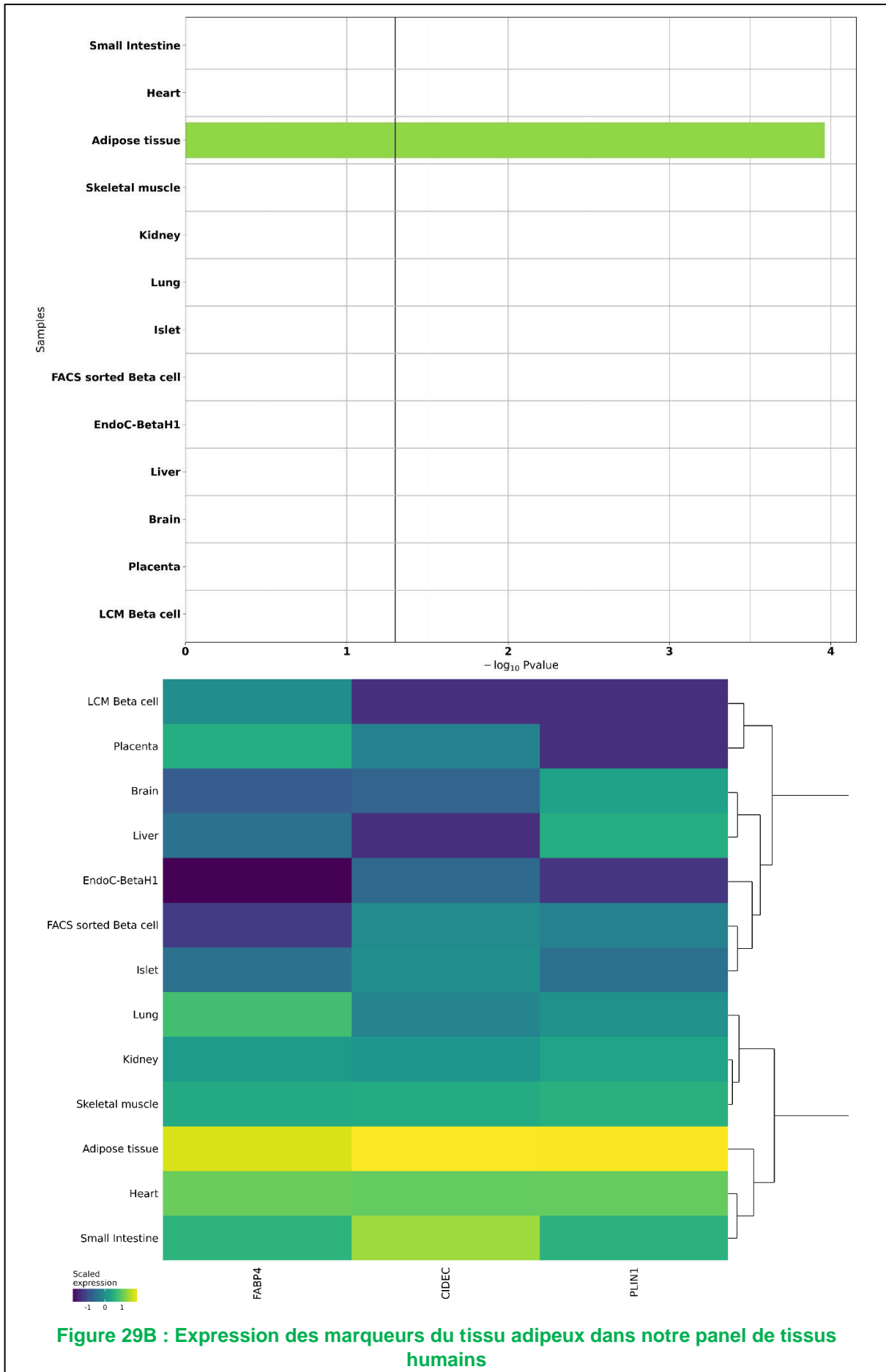


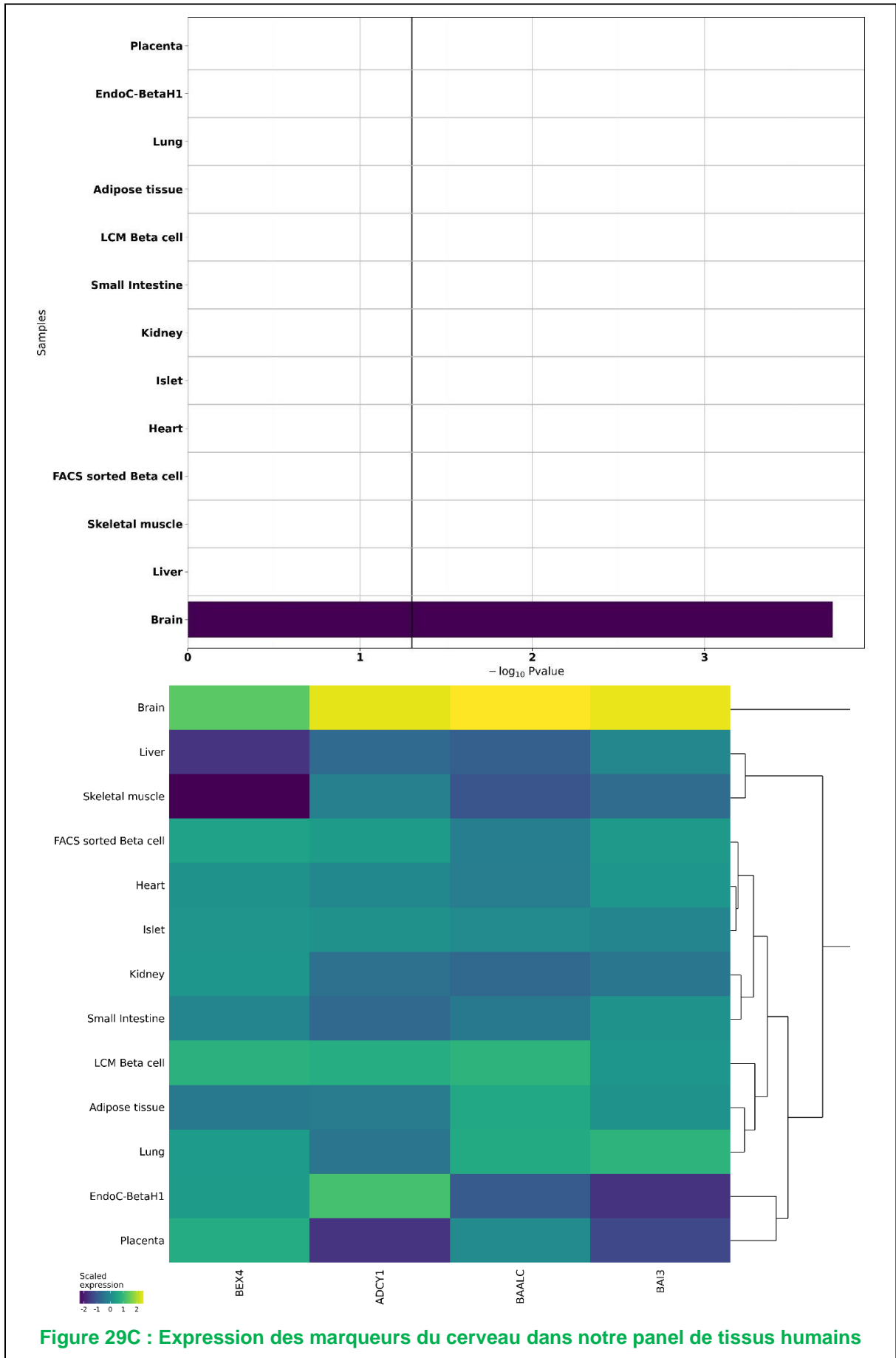
Les sondes de capture et les sondes reportrices ont été conçues pour 148 gènes cibles (**Annexe 2**) comprenant :

- 5 gènes de ménages (*C1orf43*; *PSMB2* ; *PSMB4* ; *VCP*; *VPS29*) dont l'expression a été montrée par RNA-seq comme uniforme dans un panel de tissus humains (235). Nous avons confirmé par NanoString dans notre panel de tissus et de cellules humains la stabilité de ces gènes utilisés pour la normalisation de l'expression de nos gènes d'intérêts (**Figure 28**).
- Des marqueurs dont l'expression est connue pour être élevée et/ou spécifique dans un tissu donné ; par exemple pour les îlots pancréatiques, le tissu adipeux, et le cerveau (**Figure 29 A, B et C**). Pour chaque tissu, nous avons utilisé un certain nombre de marqueurs choisis selon la littérature, les portails GTEx (236) et BioGPS (237), pour les îlots pancréatiques et les cellules β (n = 13), l'intestin (n = 3), le rein (n = 4), le poumon (n = 3), le tissu adipeux (n = 3), le pancréas exocrine (n=4), le foie (n=3), le cerveau (n=3), le cœur (n=7).
- 28 gènes du diabète monogénique (51)
- 104 gènes de susceptibilité au diabète de type 2 (51).









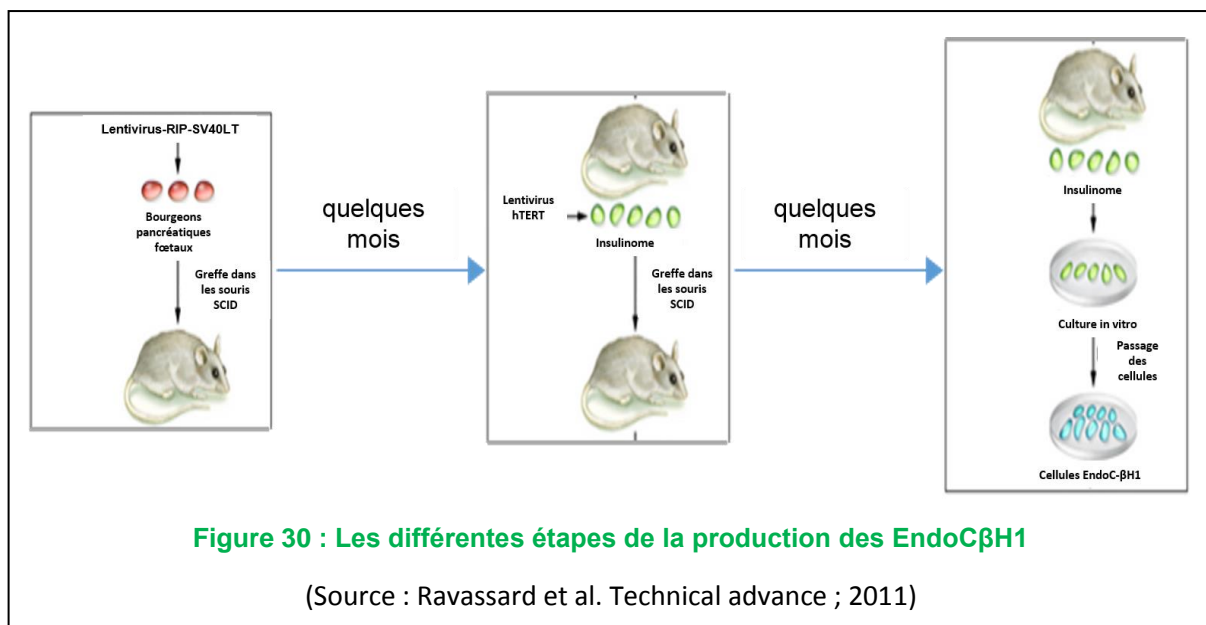
3. Le protocole NanoString

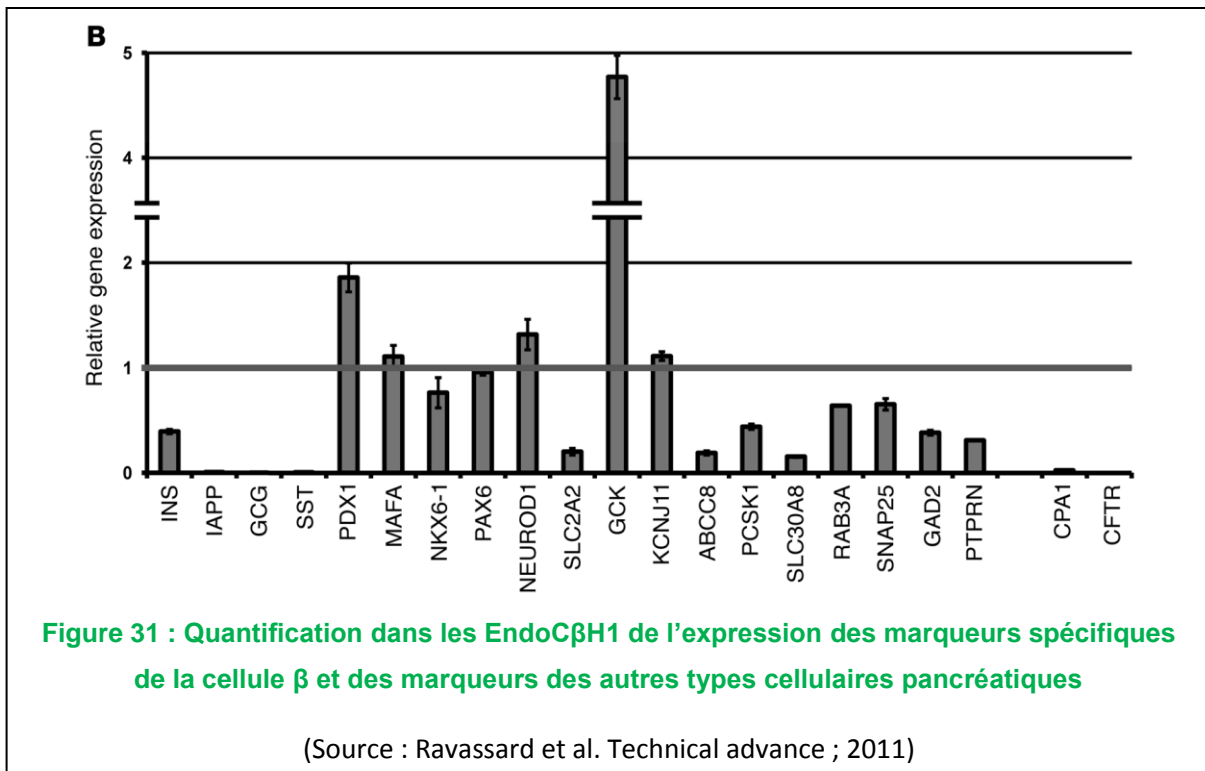
Pour chaque réaction d'hybridation, nous avons utilisé entre 25 et 100 ng d'ARN totaux ou 5 ng d'ARN Poly A+ afin d'atteindre une concentration finale entre 0,8 et 3,3 ng/μl pour les ARN totaux et 0,16 ng/μl pour les ARN Poly A+. Une réaction d'hybridation à 65°C avec un mix de réactifs d'hybridation et des ARN a été incubée pendant 16h sur un bloc de thermocycleur chauffant à couvercle constituant la première étape du protocole. Les étapes suivant l'hybridation ont été robotisées (Prep Station, NanoString Technologies). Les échantillons ont été ensuite répartis dans des chambres microfluidiques (nCounter Cartridge, NanoString Technologies). Des captures d'images ont ensuite été réalisées avec un analyseur numérique (Technologies NanoString). Les codes-barres ont été comptés dans 555 champs de vision pour chaque échantillon. Le contrôle qualité de l'expérience a été réalisé avec le logiciel nSolver (Technologies NanoString) ; ce logiciel permet de repérer et de marquer les échantillons pour lesquels la manipulation n'a pas marché.

4. Le modèle cellulaire utilisé

Les cellules EndoC-βH1 sont une lignée de cellules β pancréatiques humaines, ce qui en fait un modèle cellulaire potentiellement important pour l'étude de la fonction de la cellule β pancréatique compte tenu de la difficulté d'obtention, de manipulation et de maintien en culture des cellules β primaires. Les EndoC-βH1 sont issues de bourgeons pancréatiques fœtaux humains transduits avec un vecteur viral SVLT40 (simian virus 40 large T antigen) sous le contrôle du promoteur de l'insuline. Ces bourgeons transduits ont été greffés sous la capsule surrénale de souris SCID (immuno déficientes) pour leur maturation. Lors de la différenciation, les cellules β qui exprimaient le SVLT40 ont proliféré et formé un insulinoïde. Ces cellules ont ensuite été transduites à nouveau avec le gène de la transcriptase inverse de la télomérase humaine (*hTERT*) puis greffées à nouveau dans d'autres souris SCID. Elles ont ensuite été récupérées etensemencées in vitro pour donner des lignées cellulaires (**Figure 30**) (238,239). Parmi ces lignées, les EndoC-βH1 ont été les seules à exprimer la plupart des marqueurs caractéristiques de la cellule β (**Figure 31**) avec une expression faible des marqueurs spécifiques aux autres types cellulaires pancréatiques (238).

Bien que cette lignée exprime les marqueurs de la cellule β et sécrète de l'insuline en réponse au glucose, elle a quelques points faibles. Les EndoC- β H1 ont un faible taux de sécrétion d'insuline comparées aux modèles de cellule β de rongeur souvent utilisés comme les INS-1 dont le *fold change* entre la condition basale (0,5mM de glucose) et stimulée (20mM de glucose) est de 9,2 alors que pour les EndoC- β H1, il est de 2,4. Mais il faut noter que la sécrétion d'insuline à 16,7mM de glucose des EndoC- β H1 est similaire à celle des îlots pancréatiques humains (*fold change* égale à 2,4) (238). Les EndoC- β H1 sont des cellules très sensibles à tout type de stress, notamment lorsqu'elles sont transfectées avec de la lipofectamine 2000. Lors du *silencing* par siRNA nous avons observé une mortalité cellulaire non négligeable entre le jour zéro de la transfection et 72 heures après (lors du test de sécrétion d'insuline en réponse au glucose). Cette sensibilité des EndoC- β H1 peut induire des variations du métabolisme cellulaire.





5. La culture des EndoC-βH1

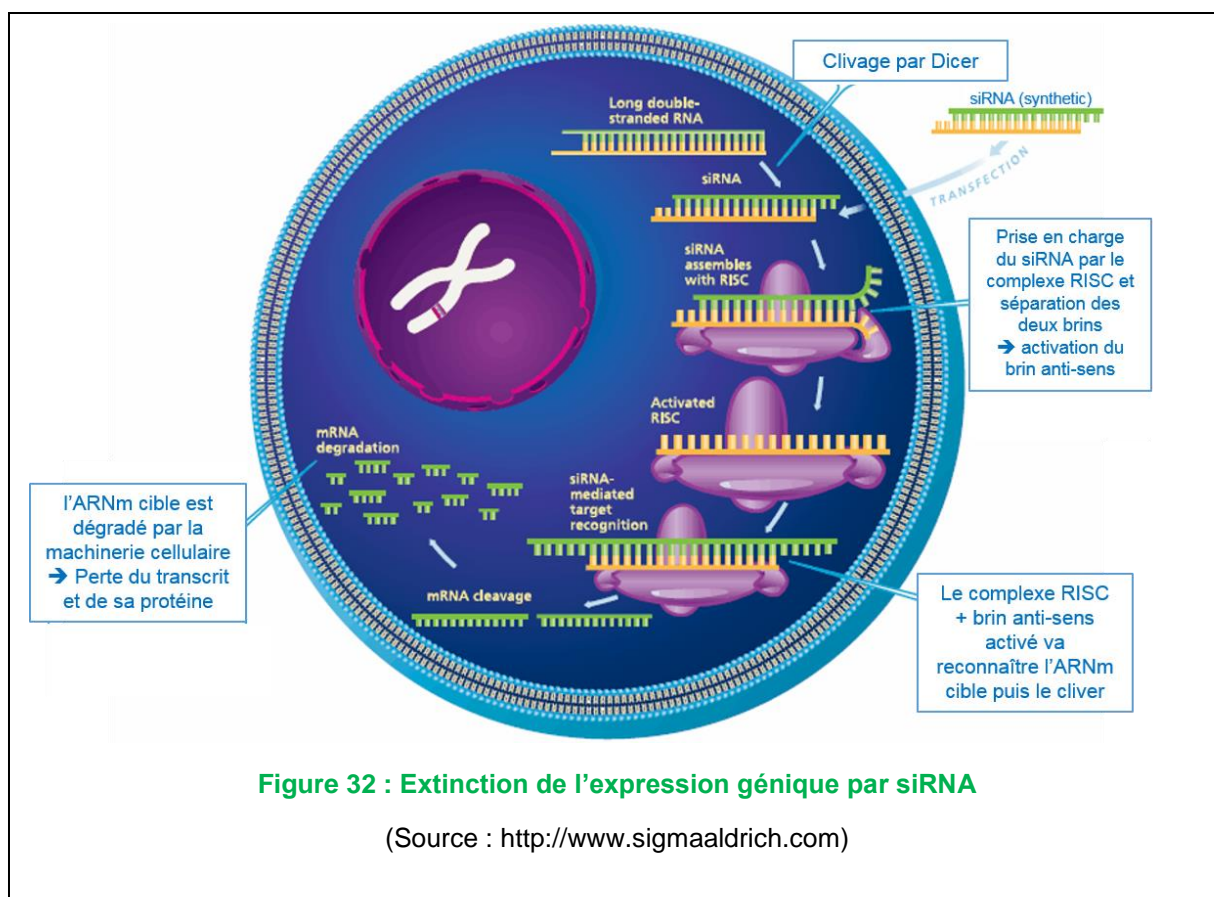
Les EndoC-βH1 (Ravassard et al. 2011) ont été mises en culture dans un milieu « Dulbecco's modified Eagle's medium » (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) à faible concentration de glucose (5.6 mM) auquel ont été ajoutés 2% de BSA fraction V (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 50 μM de 2-mercaptoethanol, 10 mM de nicotinamide (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), 5,5 mg/ml de transferrine humaine (Sigma-Aldrich), 6,7 ng/ml de sélénite de sodium (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Les cellules ont été plâtées à une densité de 2.5×10^6 cellules/cm² dans des T25 recouverts de Matrigel (1%) et de fibronectine (2 mg/ml ; Sigma-Aldrich) et incubées à 37 °C avec 5% de CO₂.

6. Principe des siRNA et leur transfection dans les EndoC-βH1

Le *silencing* est un mécanisme biologique naturel dans lequel un ARN double brin (siRNA) induit une inhibition puissante de l'expression génique par la dégradation de l'ARNm. Ces duplex d'ARN sont produits naturellement chez certains organismes lorsque l'enzyme Dicer

clive un long ARN double brin (ARN_{sd}) en de petits fragments de 21 à 23 nucléotides, appelés siRNA, qui vont être pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) pour être dissocié. L'ARN anti-sens va ainsi être libéré et va s'hybrider avec les séquences d'ARNm complémentaires pour induire leur dégradation, ce qui entraîne une baisse de l'expression des gènes cibles (240) (**Figure 32**). Dans notre étude, des siRNA synthétiques (Dharmacon ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) spécifiques de nos gènes cibles ont été transfectés dans les EndoC-βH1.

Pour la transfection des siRNA dans les EndoC-βH1, nous avons utilisé de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Après avoir trypsiné les EndoC-βH1, 1.5×10^6 cellules ont été incubées en suspension avec un mix Lipofectamine + siRNA dans de l'Opti-MEM (Invitrogen) pendant 10 min avant d'êtreensemencées dans les plaques de culture recouvertes de Matrigel et de fibronectine. Après six heures d'incubation, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture. Nous avons utilisé des siRNA ON-TARGETplus SMARTpool à une concentration entre 20-30 nM pour chaque gène et pour les cellules témoins nous avons utilisé du siRNA ON-TARGETplus nontargeting pool (siNTP) qui est un siRNA contrôle qui n'engendre pas de modifications au niveau des ARN et des protéines dans la cellule. Après 72 heures de transfection, une partie des cellules a été récupérée pour vérifier l'extinction génique et sur l'autre partie des cellules nous avons réalisé les tests de sécrétion d'insuline et les tests de viabilité cellulaire.



7. Test de sécrétion d'insuline dans les EndoC-βH1

Une partie des EndoC-βH1 transfectées a été placée à raison de 5×10^4 cellules/puit dans des plaques de 96 puits recouvertes de Matrigel et de fibronectine. 72 heures après la transfection, les cellules ont été pré-incubées sur la nuit dans du milieu de culture à 2,8 mM glucose, et ensuite dans du tampon de KREBS (HEPES-buffered Krebs-Ringer Buffer contenant 116 mmol/L de NaCl, 5,06 mmol/L de KCl, 1,007 mmol/L de CaCl₂, 1,01 mmol/L de MgCl₂, 23,96 mmol/L de NaHCO₃, 10 mmol/L d'HEPES à pH 7,4 et 0,2% solution de BSA) à 0,5 mM de glucose en présence ou en absence de 0,5 mM d'IBMX (Sigma Aldrich) pendant une heure. Le surnageant a ensuite été collecté (surnageant 1) et remplacé avec une solution KREBS à 16,7 mM de glucose en présence ou en absence de 0,5 mM d'IBMX pendant une heure à 37 °C, puis le surnageant a été collecté à nouveau (surnageant 2). Pour mesurer le contenu en insuline des cellules, les cellules ont été lysées avec du tampon de lyse (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 2 mM EGTA avec des inhibiteurs de protéases Roche). Les lysats et les surnageants ont ensuite été centrifugés pendant 5 minutes à 700 g et les

échantillons ont été gardés à -20°C. La concentration d'insuline secrétée et intracellulaire a été mesurée par test ELISA avec le Kit « Human Insulin » (Merckodia, Uppsala, Sweden) qui ne réagit pas avec la pro-insuline.

L'IBMX (3-Isobutyl-1-méthylxanthine) que nous avons utilisé est un sécrétagogue qui permet de potentialiser l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline en augmentant le taux intracellulaire d'AMPc (Adénosine Monophosphate cyclique). Ce qui induit une phosphorylation de canaux calciques voltage dépendant et permet une meilleure réponse de ces derniers et ainsi, une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et de la sécrétion d'insuline (241,242).

8. Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée avec le Kit « CellTiter-Glo 2.0 Assay » (Promega, Madison, WI, USA) en utilisant le protocole du Kit. La technique consiste à quantifier l'ATP, qui est un indicateur de la présence de cellules métaboliquement actives. La luminescence est ensuite mesurée au jour zéro de la transfection et 72 heures après transfection.

9. Extraction d'ARN et RT-PCR quantitative

Les ARN totaux ont été extraits des EndoC-βH1 72 heures après transfection en utilisant le Kit NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany). Nous avons ensuite mesuré la concentration et la pureté de nos ARN avec le NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher). L'ADN complémentaire (ADNc) a ensuite été synthétisé à partir de 400ng d'ARN totaux avec le Kit « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Pour les PCR quantitatives, nous avons utilisé le Mix « Brilliant III QRT-PCR SYBR Green Low ROX Master Mix » (Agilent, Santa Clara, CA, USA) et elles ont été réalisées avec le « ViiA 7 Real-Time PCR System » (Applied Biosystems). L'efficacité d'extinction des gènes cibles avec les primers ci-dessous a été évaluée par RT-qPCR sur des plaques de 384 puits en faisant des triplicatas techniques.

Nous avons utilisé deux types de primers, des « PrimeTime qPCR Primers » déjà designés (**Tableau 7A**) et des primers designés par nous même (**Tableau 7B**). Nous avons utilisé le gène

PSMB2 comme gène de ménage pour normaliser après RT-qPCR l'expression des gènes par la méthode des $\Delta\Delta C_t$ dans laquelle la quantité d'ARN est exprimée comme suit : $2^{(C_t \text{ target} - C_t \text{ siNTP})}$.

A	
Gène	Référence primer
<i>ZFAND3</i>	Hs.PT.58.1283673
<i>ZFAND6</i>	Hs.PT.58.14433903
<i>PRC1</i>	Hs.PT.58.50434811
<i>SRR</i>	Hs.PT.58.25800883
<i>KCNJ11</i>	Hs.PT.56a.276493-17g
<i>KCNK16</i>	Hs.PT.58.20909681
<i>CDKN2A</i>	Hs.PT.58.40743463g
<i>SLC30A8</i>	Hs.PT.56a.14618432
<i>TBC1D4</i>	Hs.PT.58.45499
<i>TCF19</i>	Hs.PT.58.23138597
<i>MPHOSPH9</i>	Hs.PT.58.3849657
<i>SSR1</i>	Hs.PT.58.2437881
<i>FAF1</i>	Hs.PT.58.39097947
<i>KLHDC5</i>	Hs.PT.58.21065180

B	
Gène	Séquence primer
<i>HNF4A</i>	Forward: 5'-GCC ATC ATC TTC TTT GAC CCA-3'
	Reverse: 5'-GAT GTA GTC CTC CAA GCT CAC-3'
<i>GCK</i>	Forward: 5'-TGA AGG TGG GAG AAG GTG AG-3'
	Reverse: 5'-GAT GCA CTC AGA GAT GTA GTC G-3'
<i>PSMB2</i>	Forward: 5'-TTG TCC AGA TGA AGG ACG ATC A-3'
	Reverse: 5'-AGC CTC TCC AAC ACA CAG GA-3'

Tableau 7 : Séquences et références des primers humains

Pour l'étude de l'expression de nos gènes d'intérêt dans les îlots de souris, les ARNm totaux ont été extraits avec le Kit « RNeasy Mini Kit » (Qiagen, Courtabœuf, France). Nous avons ensuite utilisé le même protocole de rétro-transcription et de PCR quantitative décrit ci-dessus en utilisant des primers spécifiques à la souris (**Tableau 8**). Nous avons utilisé la β -Actine comme gène de ménage dans les échantillons de souris.

Gène	Séquence primer
<i>Prc1</i>	Forward: 5'-AGC CTG TGG AGG CAA TTATG-3'
	Reverse: 5'-AAC CGT ACA ATC TCG GCA TC-3'
<i>Srr</i>	Forward: 5'-CCT GCA GTG ATA GCT GGA CA-3'
	Reverse: 5'-AAG CCA ATG CTG GAT TTG AC-3'
<i>Zfand3</i>	Forward: 5'-GGG GTC CAG CAA GAC TAT GA-3'
	Reverse: 5'-CTA CTA GTC GCG GTC GCT TC-3'
<i>Zfand6</i>	Forward: 5'-GAG ACA GAA GAC CTGCAA GGA-3'
	Reverse: 5'- ACG GTG CAC ACC ACA GTA AA-3'
<i>Ins2</i>	Forward: 5'-TCT AGT TGC AGT AGT TCT CCA-3'
	Reverse: 5'-TGG CTT CTT CTA CAC ACC CA-3'
β -Actine	Forward: 5'-CAG CAG ATG TGG ATC AGC AAG-3'
	Reverse: 5'-AGC TCA GTA ACA GTC CGC C-3'

Tableau 8 : Séquences des primers de souris

10. Isolement et Traitement des îlots pancréatiques de souris

10.1. Traitement des îlots à la streptozotocine

La streptozotocine ou 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido) -D-glucopyranose synthétisée par les bactéries gram positives *Streptomyces achromogenes* comme un agent anti-microbien, est un agent diabétogène utilisé pour des pancréatectomies chimiques. Elle est transportée dans les cellules β pancréatiques par le biais du transporteur de glucose GLUT2. La streptozotocine par l'alkylation de l'ADN induit directement une augmentation de la poly ADP-ribosylation ce qui cause une baisse de la concentration cellulaire en NAD⁺ (Nicotinamide adénine dinucléotide) et en ATP qui peut être toxique pour la cellule β (243,244) .

Pour l'isolement des îlots de souris C57BL/6J mâles de 10 mois, de petits morceaux de pancréas ont été digérés avec de la collagénase (1,5 mg/ml). Après des étapes de lavages, les îlots sont isolés en utilisant un gradient histopaque composé de solutions contenant du polysucrose et du diatrizoate de sodium à différentes densités (1,119 g/mL, 1,060 g/mL, 1,080/mL, 1,100g/mL). Les îlots sont ensuite maintenus dans du milieu (RPMI 1640; GIBCO Life Technologies) contenant du sérum (laboratoires FCS, PAA, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France), du pyruvate de sodium 1 mM, de la β -mercaptoéthanol 50 mM, de l'HEPES 10 mM et 100 U / ml de pénicilline et 100 mg / ml de streptomycine (Life Technologies) pour la condition contrôle.

Pour les îlots traités par la streptozotocine (STZ), 2 mM de STZ (Sigma S0130, Sigma-Aldrich) ont été ajoutés dans le milieu des îlots pendant 24 heures.

Toutes les procédures animales ont été menées conformément aux lignes directrices institutionnelles approuvées par le comité institutionnel des soins animaux et de l'éthique de l'Université de Lille 2.

10.2. Les souris *ob/ob*

Les souris *ob/ob* ont été découvertes en 1949 dans une colonie de souris dans un laboratoire du « Roscoe B. Jackson Memorial » dans la ville de Bar Harbor dans l'état du Maine aux Etats-Unis, leur génotype a ensuite été transféré dans les souris C57Black (245). Les souris *ob/ob* sont hyperphagiques, obèses, hyperinsuliniques et hyperglycémiques (**Figure 33**). Avec des îlots pouvant avoir un volume 10 fois supérieurs comparés à ceux des souris témoins, l'obésité apparaît à la quatrième semaine avec un poids pouvant être multiplié par trois (245).

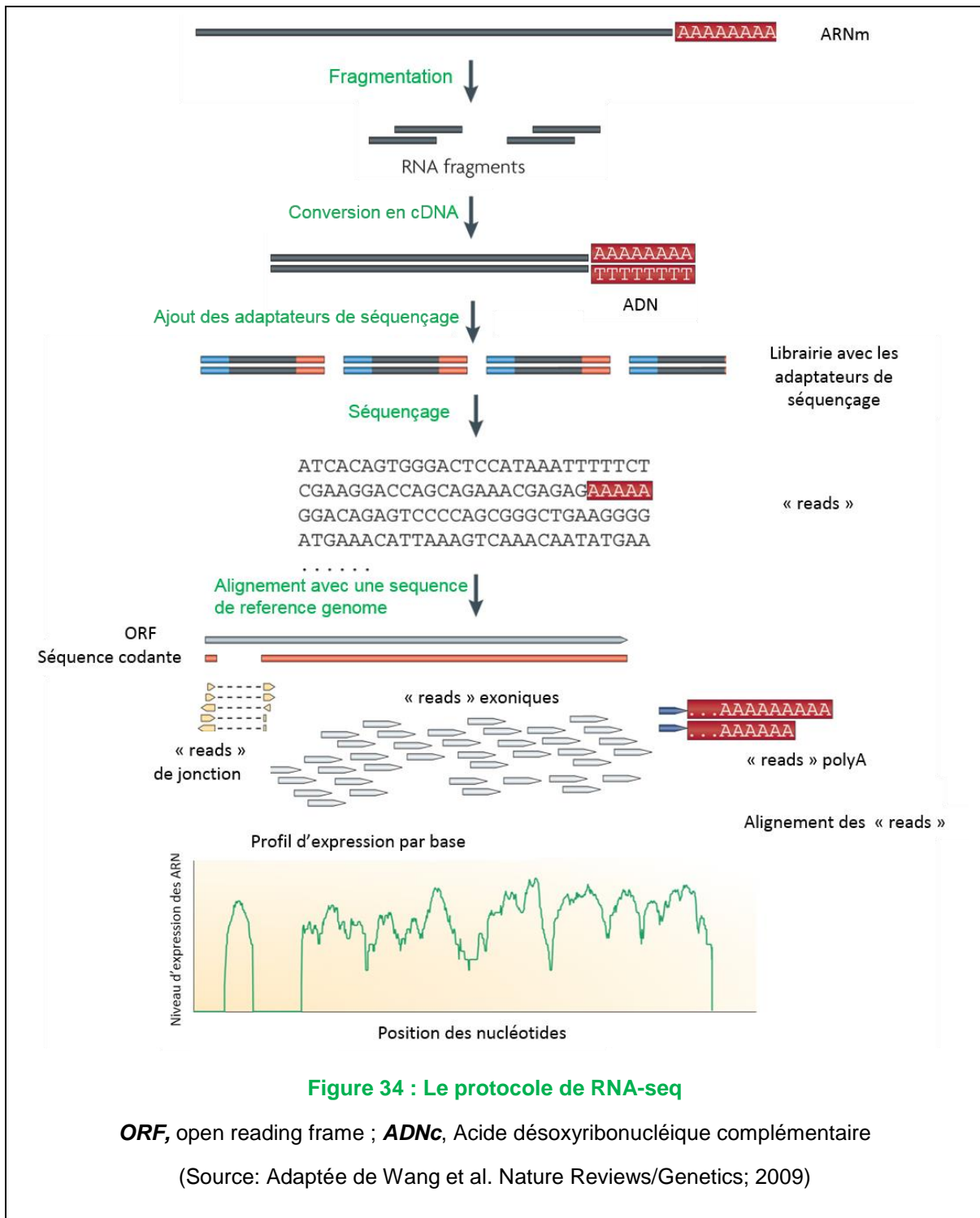
Pour nos expériences, les souris utilisées sont des femelles C57BL/6J achetées chez Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Le protocole d'élevage et d'isolement des îlots des souris *ob/ob* que nous avons utilisé est le même que dans l'article de BONNER et ses collaborateurs (246).



11. RNA-seq

Avant d'être séquencés, les longs ARN sont d'abord fragmentés par sonication ou avec des enzymes de restriction ; une rétrotranscription est ensuite effectuée pour les convertir en cDNA, et une bibliothèque de fragments d'ADNc est ensuite constituée. Des adaptateurs de séquençage (en bleu sur la **Figure 34**) sont ensuite ajoutés à chaque fragment d'ADNc et après séquençage des séquences appelées « reads » entre 30 et 400pb sont obtenues. Lorsque le séquençage est fait à partir d'une extrémité de l'ADNc, des séquences *single-end reads* sont obtenues. Par contre, un séquençage à partir des deux extrémités donne des *pair-end reads*. Les séquences résultantes sont alignées avec un génome de référence pour générer un profil d'expression pour chaque gène (exemple l'ORF de la levure dans la **Figure 34**).

Dans notre étude le RNA-seq a été réalisé sur des échantillons d'ARN extraits d'EndoC- β H1 transfectées soit avec le siNTP ou un siRNA dirigé contre l'un des quatre gènes suivants : *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6*. Pour chacun de ces gènes un triplicata expérimental a été utilisé pour le RNA-seq. La librairie pour notre expérience a été préparée avec le Kit RNA libraries « TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit » (Illumina, San Diego, CA, USA) selon le protocole d'Illumina, et le séquençage de la librairie a été fait avec l'HiSeq 4000 (Illumina). Une moyenne de 65 millions de « reads » de 75 pb en *pair-end* a été générée pour chaque échantillon. Pour l'alignement, nous avons utilisé le génome humain hg 19 avec le programme TopHat2 (247) avec 90% des « reads » qui ont été bien alignés sur le génome. Le « Bioconductor package Rsubread » (248) a été utilisé pour la quantification et l'annotation des « reads ». L'analyse bio-informatique de l'expression différentielle des gènes dans les EndoC- β H1 transfectées avec siNTP *versus* les EndoC- β H1 transfectées avec soit si*PRC1*, si*SRR*, si*ZFAND6* ou si*ZFAND3* a été fait en utilisant le « Bioconductor package DESeq2 » (249). Les gènes exprimés de manière différente ont été soumis à IPA (Ingenuity Pathway Analysis) pour déchiffrer les principales voies de signalisation biologiques, réseaux et maladies associées significativement à ces modifications significatives de l'expression génique (avec une p-value < 0,05).



12. Marquage par immunofluorescence

Les amas d'îlots β pancréatiques humains isolés et les fragments de pancréas entiers ont été collectés et fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant une nuit. Une étape de déparaffinage

avec du xylène et de réhydratation avec une série décroissante de solutions d'alcool (90, 70 et 50% respectivement) ont été faites avant immunomarquage. Les coupes ont ensuite été lavées au PBS 1X puis incubées sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS 1X avec au préalable une étape de saturation pour un blocage des sites aspécifiques où l'anticorps pourrait se fixer. Pour le double marquage, les lames ont été prétraitées pendant 20 minutes avec du Triton à 0,5% et 30 minutes avec BSA à 0,1%, à température ambiante. Elles ont été incubées avec un anticorps anti-insuline produit chez le cochon d'Inde (dilution 1/500^{ème} ; Abcam, Cambridge, UK) avec soit un anti-PRC1 (dilution 1/100^{ème}; Abcam), soit un anti-SRR (dilution 1/100^{ème}; Abcam), soit un anti-ZFAND3 (1/100^{ème}; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) ou un anti-ZFAND6 (1/100^{ème}; Novus Biologicals), tous produits chez le lapin. Après des lavages au PBS 1X, les lames ont été incubées pendant une heure avec l'anticorps secondaire, « Alexa fluor 594 conjugated » dirigé contre les anticorps de cochon d'Inde ou encore « Alexa fluor 488–conjugated » dirigé contre les anticorps de lapin (dilution 1/500^{ème} ; Thermo Fisher Scientific). Pour l'immunomarquage des EndoC-βH1, les étapes de déparaffinage et de réhydratation n'ont pas été nécessaires. Après une étape de saturation de 30 minutes avec du PBS 1X à 5% de BSA, les cellules ont été incubées pendant une heure avec les anticorps primaires à température ambiante.

13. Extraction protéique et Western Blot

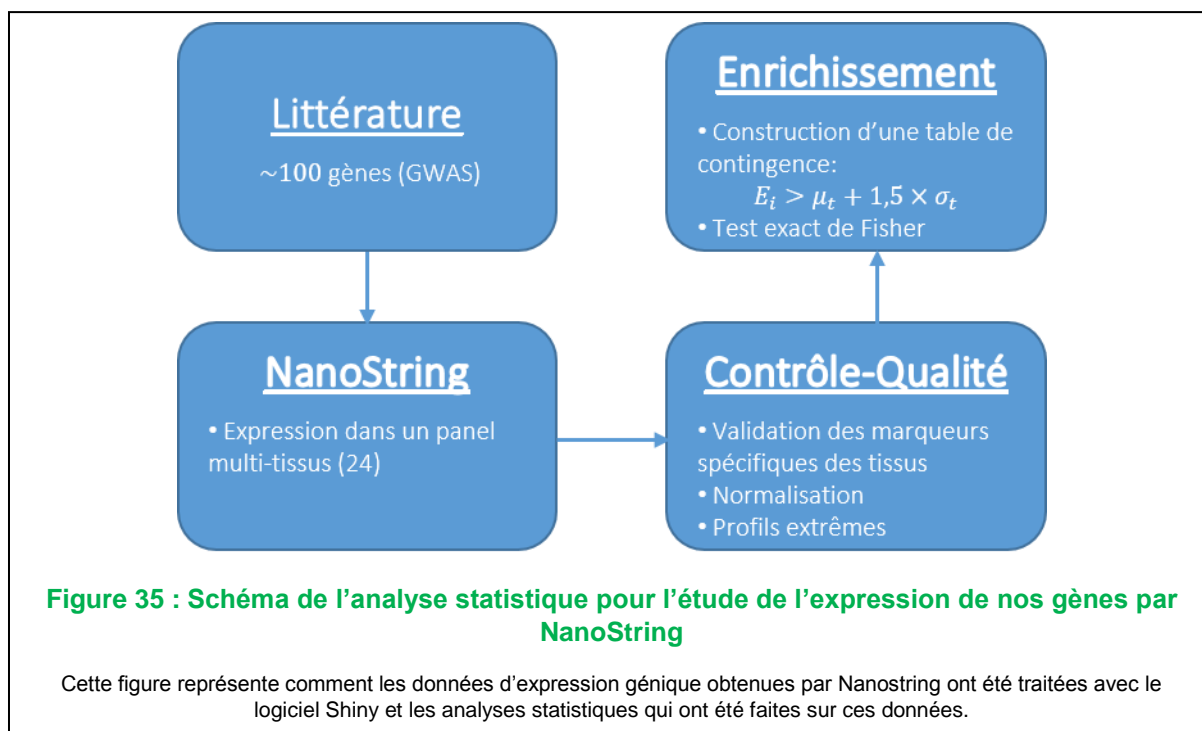
Les protéines totales ont été extraites avec un tampon à 20mM de Tris acétate, 0,27 M de sucrose, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 50mM de Sodium Fluoride (Sigma- Aldrich), anti-protéases « Complete » et anti-phosphatases « PhosStop » (Roche), et 1% de Triton 100X (Dutscher). Pour le western blot, une quantité de protéines (entre 50 et 70µg) a été déposée et séparée sur gel de polyacrylamide à 10 ou 12% selon la taille des protéines (Dutscher) contenant du SDS (Sigma L3771) puis transférée sur membrane de nitrocellulose (Bio-rad 1620112). Les protéines ont été ensuite détectées après une incubation sur la nuit de la membrane à 4°C dans un tampon avec l'anticorps primaire dirigé contre PRC1 (dilution 1/1000^{ème}, Abcam), SRR (dilution 1/1000^{ème}, Abcam), ZFAND3 (dilution 1/500^{ème}, Abcam ou Sigma ou Novus), ZFAND6 (dilution 1/1000^{ème}, Abcam), α-tubulin (1/1000^{ème}, Sigma), ou GAPDH (dilution 1/1000^{ème}, Santa-cruz) et contenant du Tween 20 (Dutscher 91585) dans du lait à 5%. Les protéines ont été visualisées grâce aux fluorochromes IRDye800 ou IRDye700

(Eurobio) couplés aux anticorps secondaires avec le système d'imagerie infrarouge Odyssey (Licor). La quantification des protéines a été ensuite faite avec le logiciel Image J.

14. Calculs statistiques

a. Données d'expression

Les valeurs d'expressions normalisées ont d'abord été obtenues en considérant le logarithme du rapport de l'expression d'un gène donné sur l'expression moyenne de l'ensemble des cinq gènes de ménage dans les échantillons correspondants. Les profils d'expression des groupes de gènes d'intérêt ont été analysés et représentés sous forme de heatmaps (**Annexe 3**). Une double hiérarchisation des tissus et de l'expression des gènes a été réalisée dans chaque groupe en utilisant la méthode de Ward. Dans les heatmaps les valeurs d'expression ont été représentées en logarithme base 2, centrées et mises à l'échelle. Chaque cellule a été colorée pour refléter quantitativement l'expression relative : en jaune si le gène est surexprimé dans le tissu par rapport à tous les autres tissus, ou en violet dans le cas contraire (**Annexe 3**). Pour les analyses des niveaux d'expression génique, nous avons établi un seuil d'expression pour classer les gènes « sous-exprimés » et « surexprimés » dans les groupes différents de gènes (gènes du diabète monogénique, gènes de susceptibilité au diabète de type 2, et les différents marqueurs) dans chaque tissu du panel. Dans ce but, le seuil a été défini comme étant l'expression du gène dans tous les tissus en moyenne, plus l'écart-type multiplié par 1,5. Nous avons fait un tableau pour compter le nombre de gènes sous exprimés et surexprimés dans le tissu testé et dans le reste des tissus du panel. Nous nous sommes ensuite intéressé aux gènes surexprimés et le test exact de Fisher a été appliqué pour vérifier si nos groupes de gènes d'intérêt sont significativement surexprimés dans chaque tissu testé dans le panel (**Figure 35**).

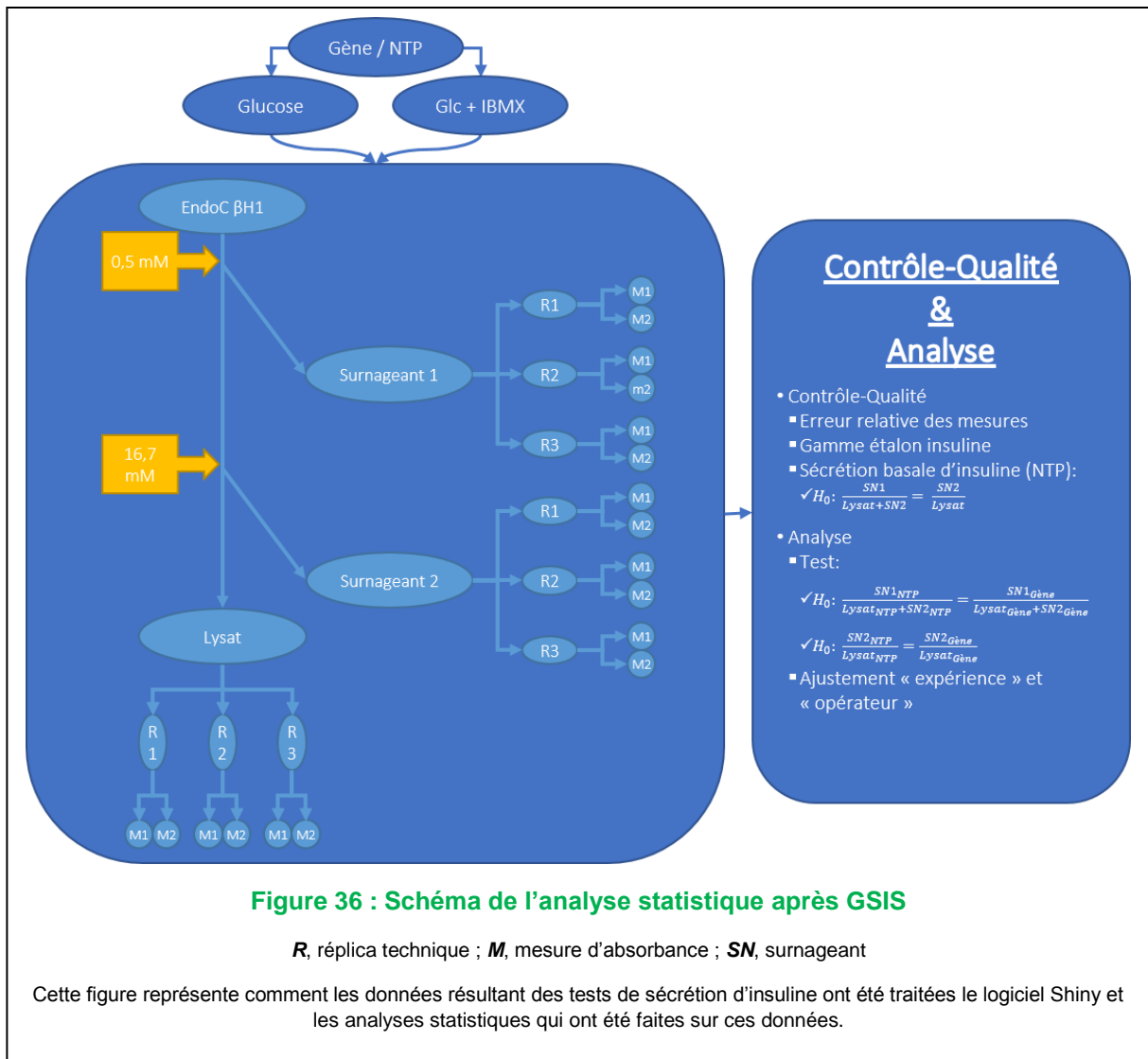


b. Sécrétion d'insuline dans les EndoC- β H1

Pour l'évaluation de la sécrétion d'insuline, les mesures d'absorbance après ELISA ont été utilisées. Pour chaque condition, nous avons réalisé au minimum un triplicata expérimental et pour chaque expérience nous avons réalisé un triplicata technique (**Figure 36**).

Avec l'équipe bio-statistique de notre équipe, nous avons développé une application pour le traitement des données d'absorbance de la sécrétion d'insuline de sorte à diminuer les biais liés aux conditions expérimentaux et aux erreurs techniques (**Figure 36**). Pour les triplicatas techniques nous avons fixé un seuil pour les erreurs relatives à 20% au maximum. Ce seuil est basé sur la distribution des erreurs relatives observée sur plus de 100 expériences.

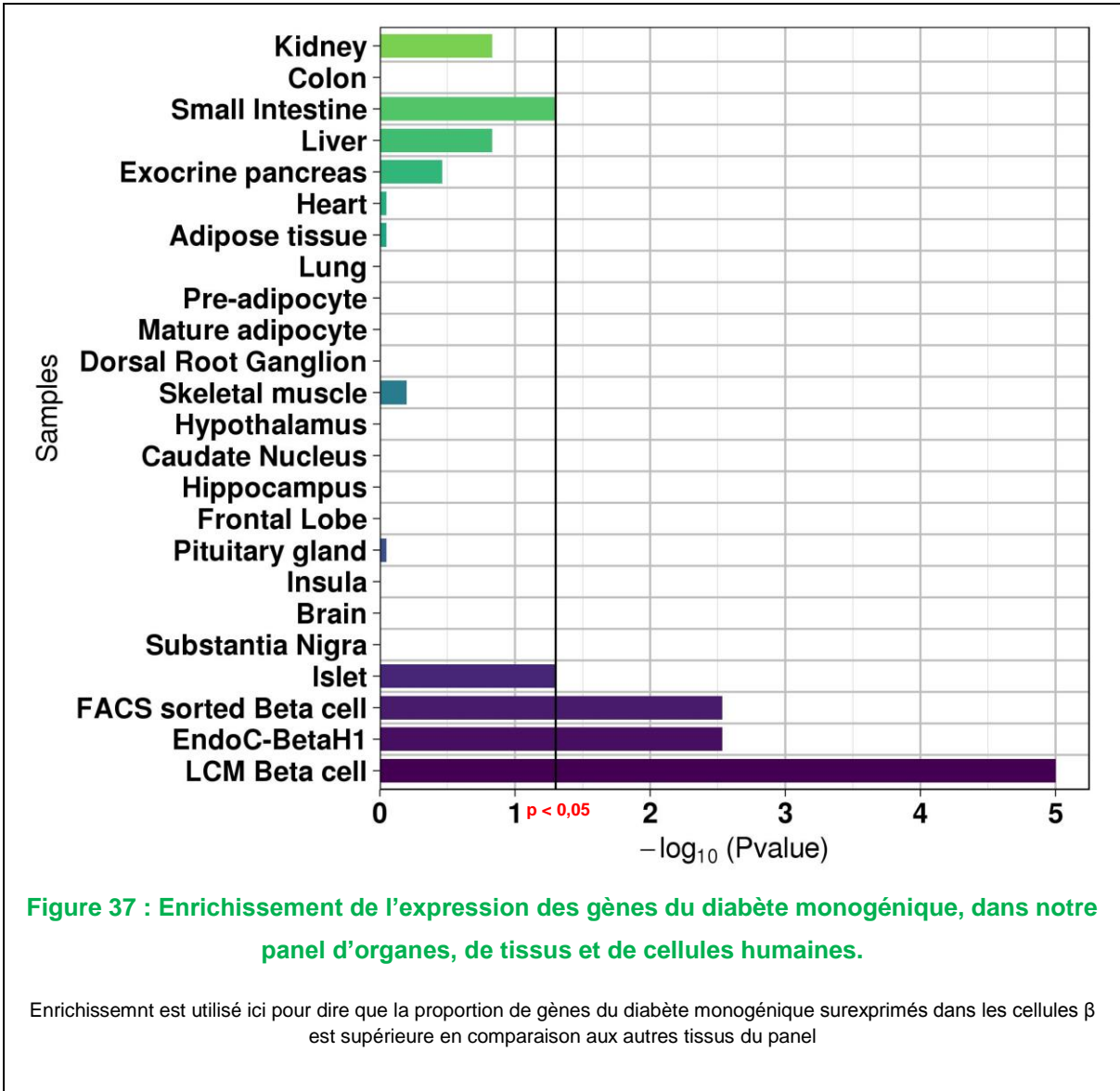
Nous avons ensuite évalué le « Fold Change » de la sécrétion d'insuline (sécrétion à haute concentration de glucose sur la sécrétion à faible concentration de glucose) ; pour chaque siRNA le « Fold Change » a été calculé en utilisant une régression linéaire ajustée aux conditions expérimentales (**Figure 36**). Les « Fold Change » des échantillons dans lesquels nos gènes d'intérêt ont été éteints sont ensuite comparés à ceux des échantillons traités avec le siRNA contrôle.

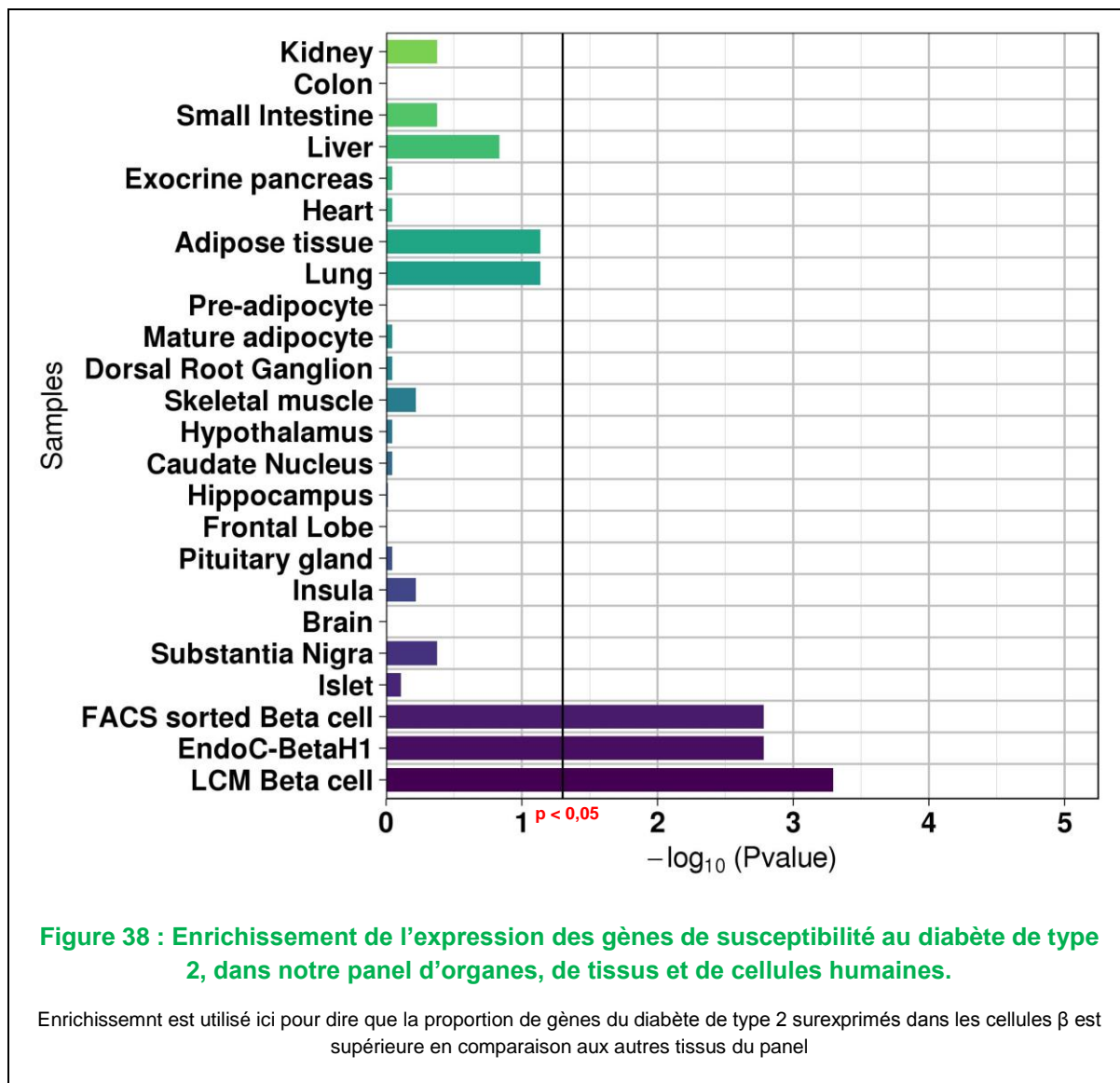


Résultats et Discussion de l'étude

1. Expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans un large panel d'organes, de tissus et de cellules humaines

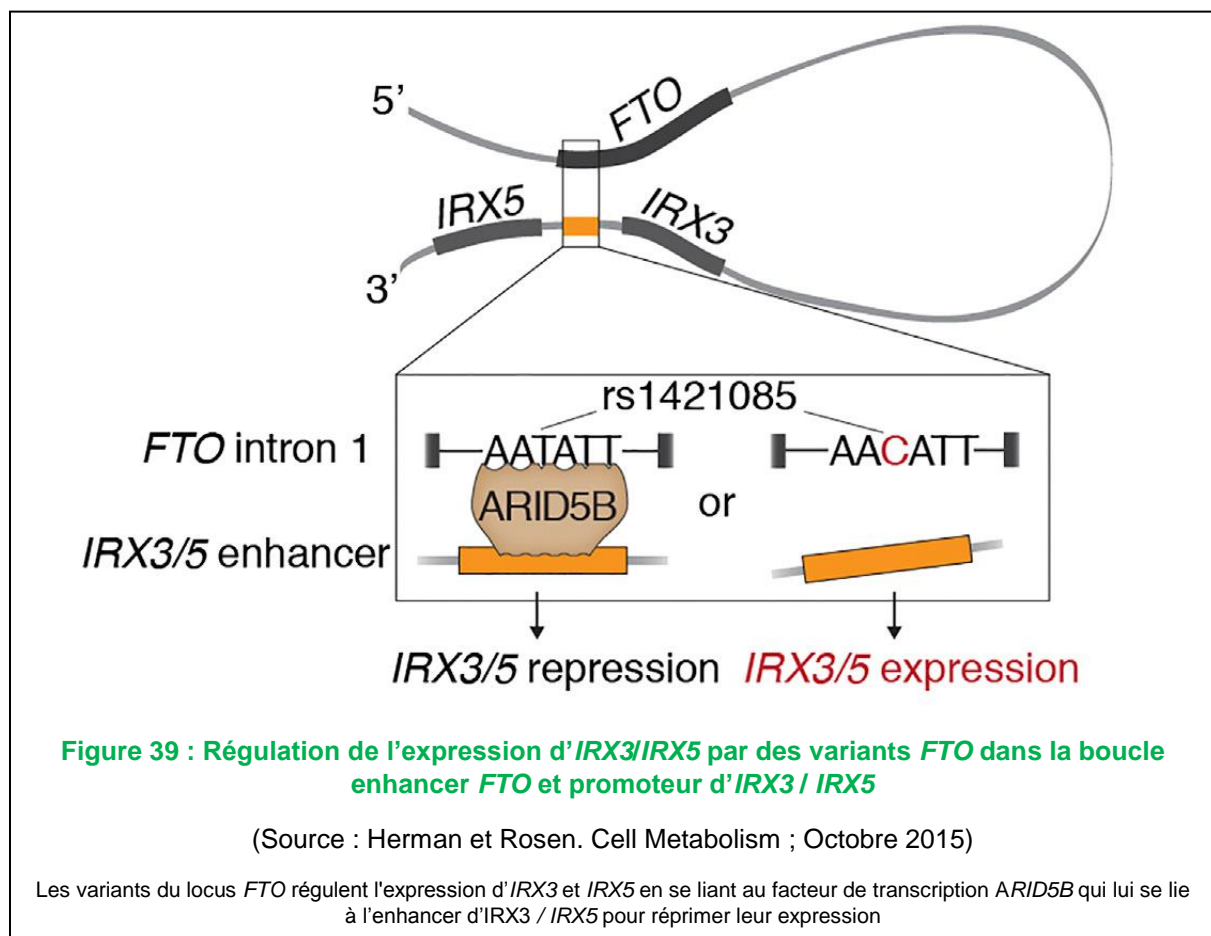
Dans notre étude de l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2, nous avons utilisé les gènes du diabète monogénique connus pour être majoritairement exprimés dans la cellule β pancréatique comme contrôles positifs. La quantification de l'expression de ces gènes du diabète monogénique a montré, comme attendu, que l'expression de ces gènes est significativement enrichie dans les cellules β pancréatiques incluant les cellules β isolées par LCM ($p = 3.4 \times 10^{-5}$), les cellules β isolées par FACS ($p = 8.1 \times 10^{-3}$), et les EndoC- β H1 ($p = 1.6 \times 10^{-3}$) (**Figure 37**). Pour ce qui est des gènes de susceptibilité au diabète de type 2, nous avons aussi observé que leur expression était significativement enrichie dans les cellules β pancréatiques incluant les cellules β isolées par LCM ($p = 5.9 \times 10^{-3}$), les cellules β isolées par FACS ($p = 5.9 \times 10^{-3}$), et les EndoC- β H1 ($p = 2.0 \times 10^{-3}$), ce qui n'était pas le cas dans les autres tissus incluant les tissus impliqués dans la résistance à insuline comme le foie, le muscle squelettique, le tissu adipeux ou encore le cerveau (**Figure 38**).





La technologie du Nanostring utilisée pour la quantification de l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 est une technique très sensible permettant la quantification de plusieurs ARN cibles simultanément (jusqu'à 800 gènes quantifiables). Elle est basée sur le comptage des molécules d'ARN cibles sans passer par une étape d'amplification par PCR, ce qui permet de s'affranchir des biais liés à l'amplification. Nous avons par cette technique montré que l'expression des 104 gènes de susceptibilité au diabète de type 2 était significativement enrichie dans les cellules β pancréatiques humaines incluant la lignée de cellule β pancréatique humaine EndoC- β H1. Et cette augmentation d'expression génique n'a pas été retrouvée au niveau des tissus insulino-sensibles. La limite principale de notre analyse spécifique est l'attribution des fonctions pathogéniques de certains SNP associés au risque de diabète de type 2 au gène le plus proche. Alors qu'il est possible qu'un SNP associé au risque de diabète de type

2 ait un impact sur l'expression de gènes situés à plusieurs méga bases (Mb) du SNP. Cela grâce à une boucle entre un enhancer distal où se situe le SNP et le promoteur du gène cible comme cela a été publié dans le cas de l'obésité pour les SNP de *FTO* qui semblent en fait réguler l'expression des gènes *IRX3* et *IRX5*, et non *FTO* (250,251) (**Figure 39**). Néanmoins il a été montré par PASQUALI et ses collaborateurs (252) que dans les îlots β pancréatiques humains, la large majorité des enhancers spécifiquement actifs se situent à moins de 500 kb des sites de démarrage de la transcription. La quantification des gènes de susceptibilité à l'obésité dans le même panel de tissus humains ne montre pas une augmentation de l'expression de ces gènes dans les cellules β pancréatiques alors que leur expression est significativement enrichie dans différentes régions du cerveau (cf infra **Perspectives**). Ce qui nous permet de croire que nos conclusions sur l'expression des gènes du diabète de type 2 dans les cellules β pancréatiques ne sont pas artéfactuelles et probablement représentatives des autres gènes de susceptibilité au diabète de type 2.

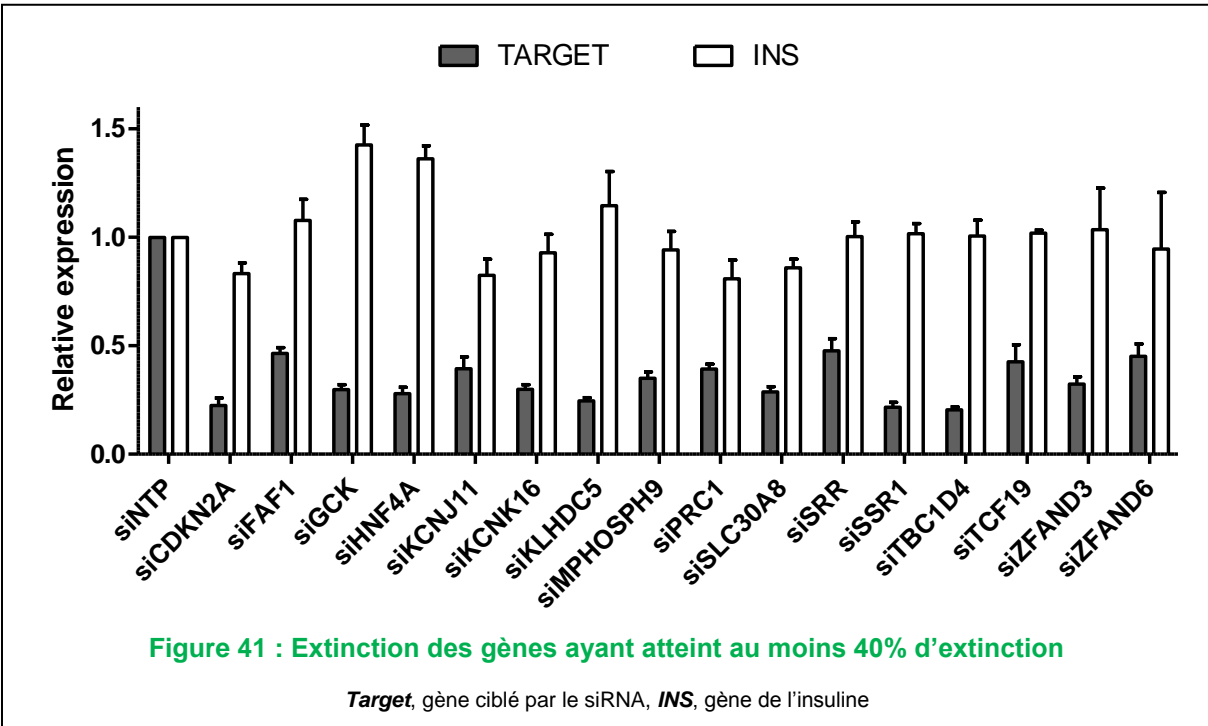


2. Effets de l'extinction des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 dans la lignée humaine EndoC-βH1

Après avoir identifié l'augmentation significative de l'expression des gènes associés au diabète de type 2 dans les cellules β pancréatiques humaines incluant la lignée cellulaire EndoC-βH1, nous avons cherché à investiguer le rôle de ces gènes dans la fonction de la cellule β pancréatique et plus particulièrement dans la sécrétion d'insuline en utilisant les EndoC-βH1 comme modèle cellulaire. Pour répondre à notre interrogation concernant leur rôle dans la fonction de la cellule β, nous avons d'abord réalisé une priorisation des gènes selon les critères suivants:

- La spécificité de leur expression dans les EndoC-βH1
- Leur niveau d'expression dans les EndoC-βH1
- Et pour certains gènes comme *SRR*, *GPSM1*, *ZBED3*, *ANK1*, *GRB14*, leur overlap entre le diabète de type 2 et des traits glycémiques a été un troisième critère de sélection (**Figure 14**)

Nous avons ainsi sélectionné la trentaine de gènes les plus exprimés dans les EndoC-βH1 (**Figure 40**), et avons ensuite baissé leur expression par ARN interférant (siRNA) dans les EndoC-βH1 avec un seuil d'extinction minimum fixé à 40%. Ce seuil d'extinction a été fixé afin de mimer au mieux l'éventuel effet « baisse d'expression » que les SNP associés au diabète de type 2 pourraient causer. Pour les gènes dont l'extinction a atteint ce seuil, nous avons évalué l'effet de cette baisse d'expression sur la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (GSIS) en présence ou en absence d'IBMX (**Figure 41**).



2.1. Effet de la baisse d'expression de nos contrôles positives sur la GSIS

Pour valider notre stratégie d'étude de l'effet de la baisse d'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 sur la sécrétion de l'insuline, nous avons utilisé trois gènes du diabète monogénique comme contrôles positifs. Nous avons utilisé la *GCK*, *HNF4A* et *KCNJ11* (cf supra, **II/2.1- Trois gènes du diabète monogénique et leur rôle dans la fonction de la cellule β**).

Comme nous l'attendions pour nos contrôles positifs, l'extinction de *GCK*, *HNF4A* et *KCNJ11* affecte de manière significative la sécrétion d'insuline. Après une diminution de leur expression d'au moins 50%, une baisse de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose a été observée pour *HNF4A* et *KCNJ11* ($p < 0,01$). Et pour *GCK* nous avons aussi observé une baisse de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose plus IBMX après extinction du gène ($p < 0,001$). Ces résultats confirment nos attentes et nous ont permis de valider notre stratégie (**Figure 42A ; B et C**).

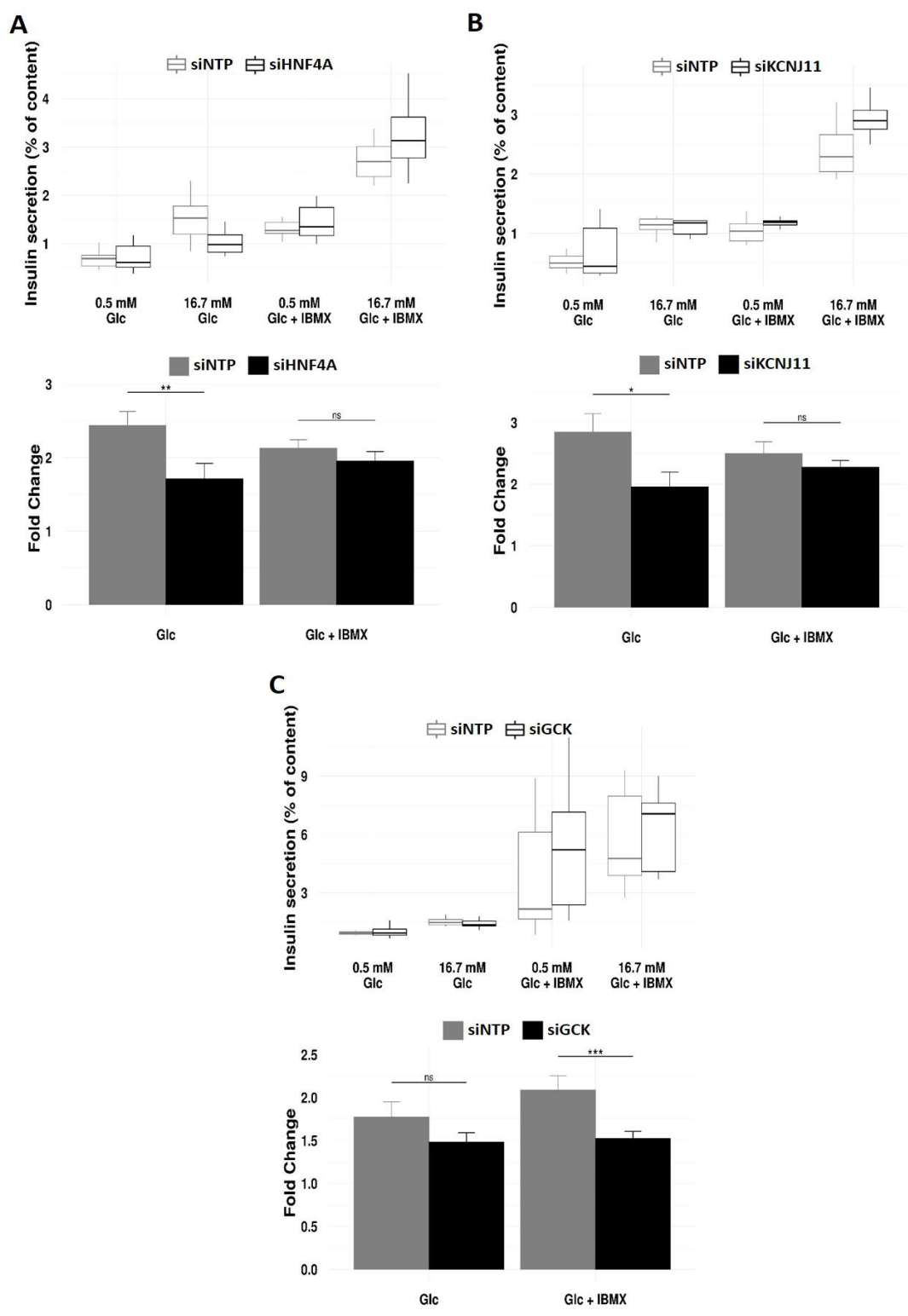


Figure 42 : Baisse de la sécrétion de l'insuline dans les EndoC-βH1 après extinction de *HNF4A* (A), *KCNJ11* (B) et *GCK* (C)

2.2. Résultats négatifs

Pour quatre gènes associés au diabète de type 2 commun, *MPHOSPH9*, *SSRI*, *FAF1* et *KLHDC5* nous n'avons pas observé de variations significatives de la sécrétion d'insuline bien que l'extinction de ces gènes ait été supérieure ou égale à 50% (**Figure 43A, B, C et D**).

MPHOSPH9 (M-phase phosphoprotein 9) code une phosphoprotéine intervenant pendant la phase M du cycle cellulaire et qui dans les phases non-mitotiques, est séquestrée dans l'appareil de Golgi (253). Elle est phosphorylée par la kinase cdc2/cycline B1 lors de la division cellulaire dans les neuroblastes humains (254). *MPHOSPH9* est associé à la sclérose et à la maladie d'Alzheimer (254–256). Sa phosphorylation est inhibée lors de la phase finale de différenciation du cerveau adulte (254). Cependant, dans la maladie d'Alzheimer les kinases et les phosphoprotéines de la phase M telle que *MPHOSPH9* apparaissent dans les neurones au sein des nœuds neurofibrillaires observés, ce qui suggère une association de leur présence avec la mort de ces neurones non mitotiques malades (254). Il a été montré que l'induction de *MPHOSPH9* dans la lignée de cellules neuronales SH-SY5Y pourrait avoir un rôle dans la régulation de la survie neuronale (255,256) ; *MPHOSPH9* pourrait avoir ce même rôle dans les cellules β pancréatiques.

SSRI (signal sequence receptor subunit 1) aussi appelé *TRAP α* (translocon-associated protein subunit alpha) code un récepteur composé de deux sous-unités (deux glycoprotéines de 34 kD et de 22 kD) associées à la translocation membranaire de protéines au niveau du réticulum endoplasmique. *SSRI* code différents transcripts grâce à sa polyadénylation alternative complexe. Il a été montré que la déplétion de l'isoforme *RREB1* (RAS responsive element binding protein 1) induit une baisse du développement des cellules β et de la sécrétion d'insuline (257,258). De même un variant de *RREB1* a aussi été associé au diabète gestationnel chez des femmes japonaises (258).

FAF1 (Fas-associated factor 1) est une protéine impliquée dans l'apoptose cellulaire associée à la maladie de Parkinson. Des modifications d'expression de *FAF1* sont liées à des dérégulations de l' α -Synucléine et à la perte de cellules nigrales spécifiques à la maladie de Parkinson. Les anomalies relatives à cette maladie comme l'inhibition du complexe I de la mitochondrie, le stress oxydatif et l'augmentation de l'expression de l' α -Synucléine induiraient une augmentation de l'expression de *FAF1*. Cette augmentation de l'expression de *FAF1* pourrait potentialiser les effets toxiques des facteurs causant un stress cellulaire lié à la maladie et

provoquer la mort cellulaire (259). Il a été rapporté que les porteurs de l'allèle G du SNP *FAFI*-rs17106184 présentent en moyenne un taux d'insuline à deux heures après HGPO plus élevé (6,4% de plus par allèle G) (260). L'action de *FAFI* sur l'insulinémie pourrait passer par un de ses gènes voisins appelé *ELAVL4* ou encore *HuD* qui est exprimé dans le pancréas et qui code une protéine capable de se lier à l'ARNm de l'insuline au niveau de sa région 5'UTR et réprimer sa traduction (261). Si le SNP *FAFI*-rs17106184 a un effet négatif sur l'expression de *HuD* cela pourrait baisser cette répression de la traduction de l'insuline par *HuD* et par conséquent augmenter la production et la sécrétion d'insuline, ce qui pourrait expliquer cette augmentation des taux d'insuline à deux heures après HGPO. Il est cependant inattendu qu'un allèle à risque pour le diabète de type 2 soit associé à une augmentation de la sécrétion d'insuline alors qu'il ne semble pas être associé à une augmentation de la résistance à l'insuline selon certaines études (260,262).

Le gène *KLHDC5* (Kelch Domain-Containing Protein 5) encore appelé *KLHL42* (Kelch Like Family Member 42) régule négativement la fonction de Dsh (Dishevelled protein) qui est une phosphoprotéine cytoplasmique impliquée dans la voie Wnt qui est importante dans la modulation de la prolifération cellulaire, la survie, la migration et la différenciation cellulaire lors du développement des organes. Il a aussi été rapporté que la voie Wnt semble médier la prolifération des cellules β induite par GLP-1 (263). La surexpression de *KLHDC5* conduit à une dérégulation de l'expression de la protéine Dsh et montre qu'elle pourrait agir comme un inhibiteur de la voie Wnt (264). Compte tenu du rôle de la voie Wnt dans le développement embryonnaire, mais aussi dans l'entretien et le renouvellement des tissus adultes (265), les variants pourraient donc agir sur le développement et le maintien de la masse de cellule β .

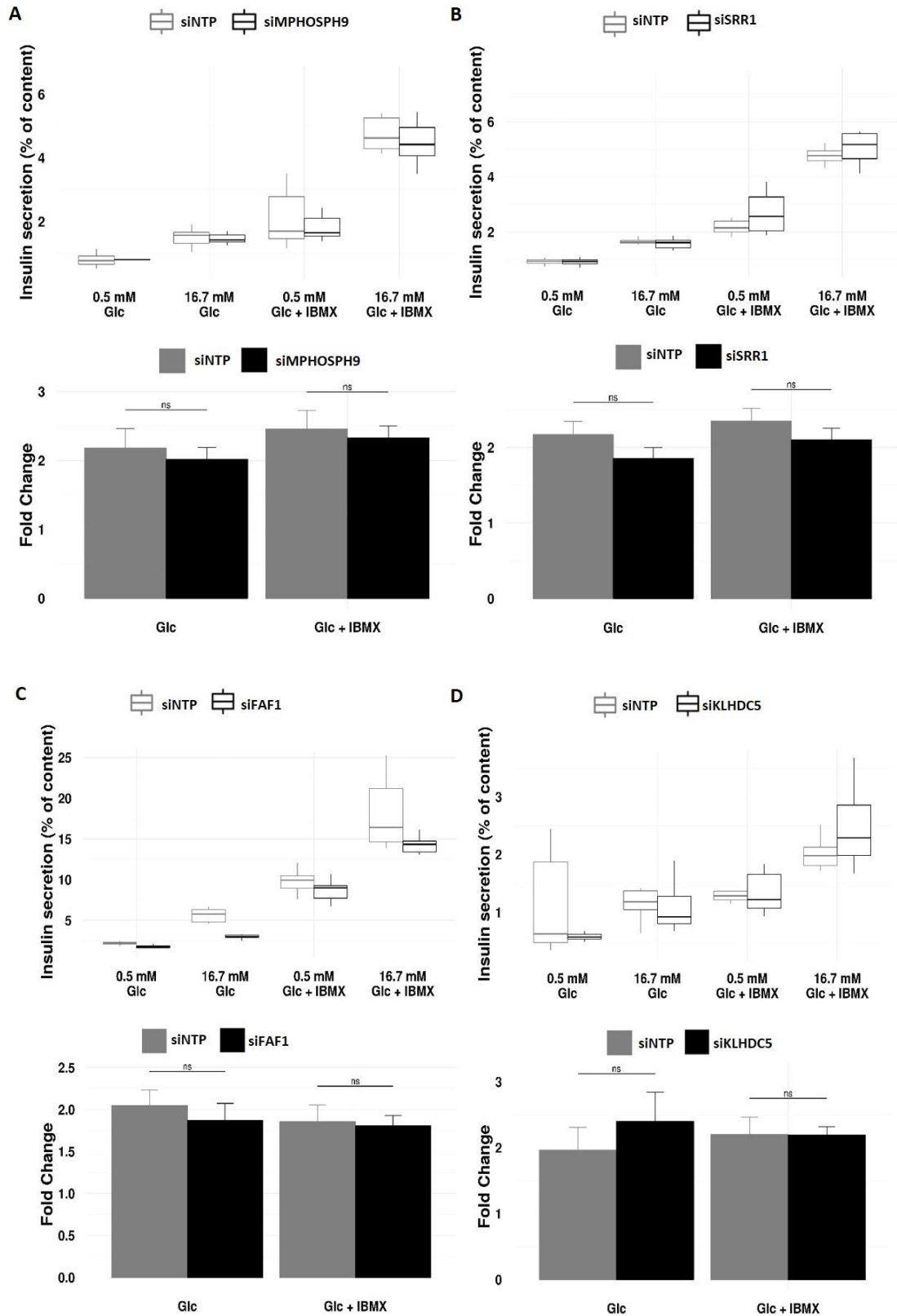
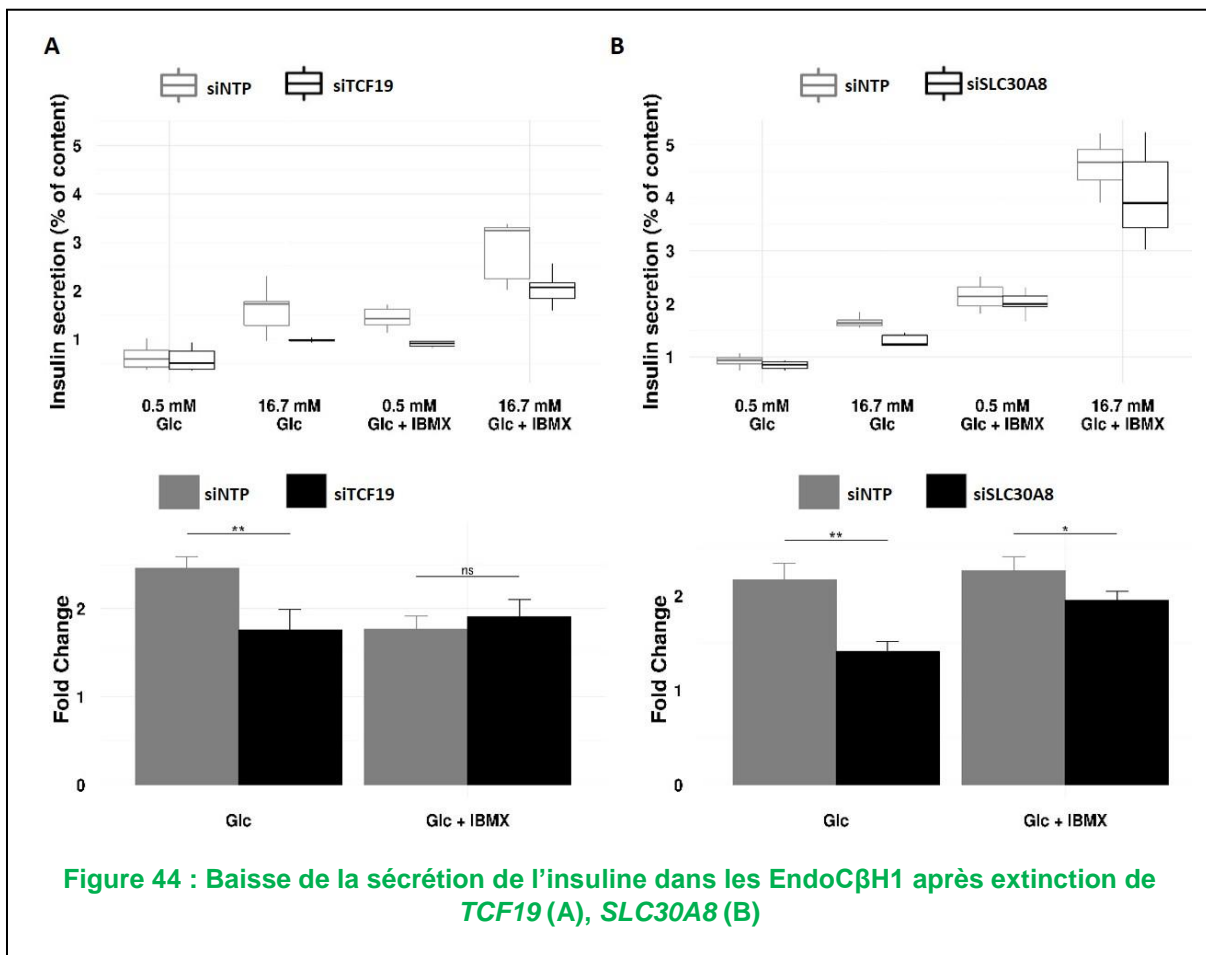
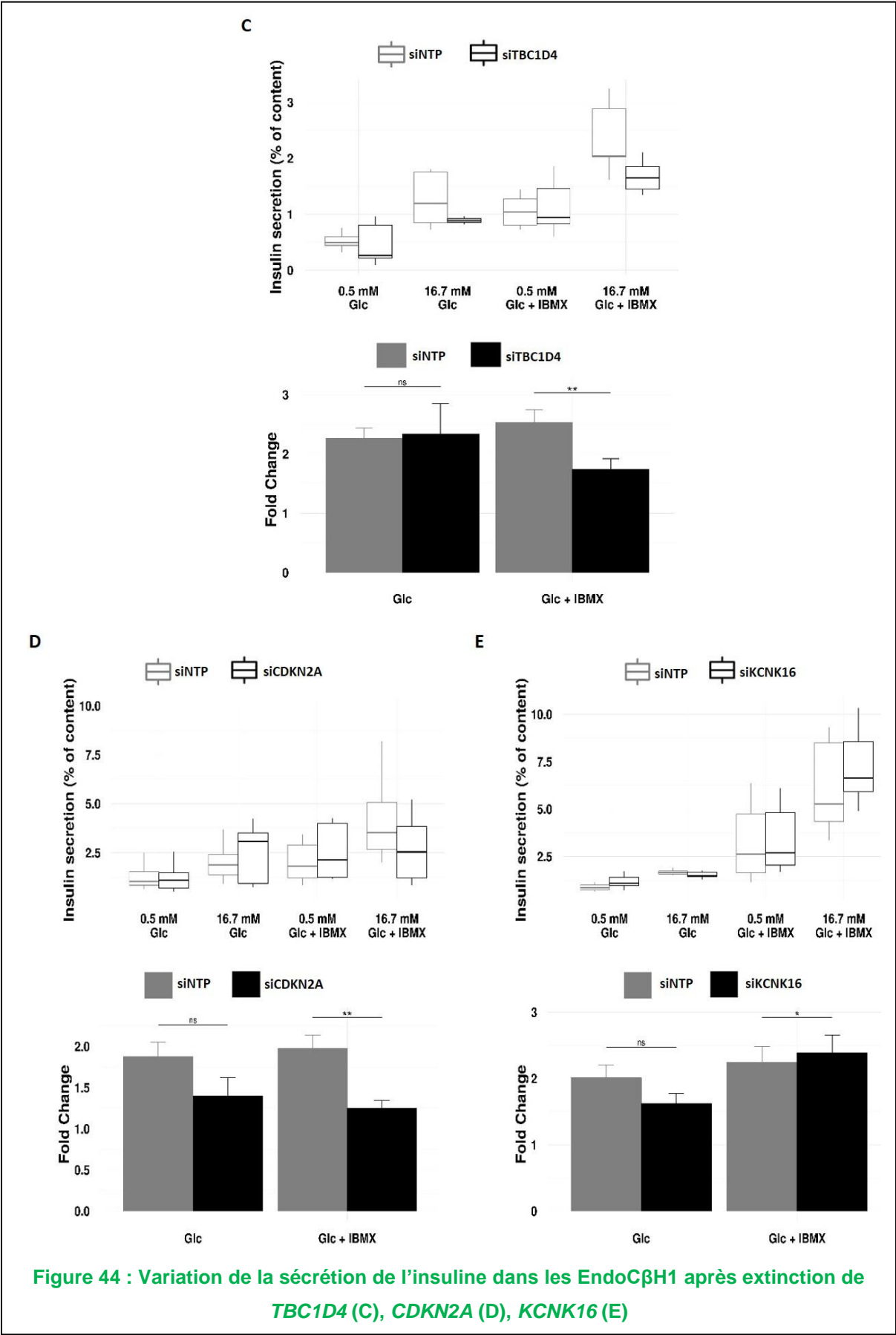


Figure 43 : Sécrétion de l'insuline dans les EndoC β H1 après la baisse de l'expression de MPHOSPH9 (A), SRR1 (B), FAF1 (C), KLHC5 (D)

2.3. Résultats positifs

Après l'extinction génique et l'étude de l'effet de cette extinction sur la sécrétion d'insuline dans la lignée EndoC- β H1, pour neuf gènes du diabète de type 2, nous avons obtenu des résultats positifs. Pour cinq de ces gènes de susceptibilité au diabète de type 2 (*TCF19*, *SLC30A8*, *TBC1D4*, *CDKN2A*, *KCNK16*) dont la fonction et/ou l'expression a déjà été décrite dans la littérature, nous avons trouvé une variation significative de la sécrétion d'insuline après leur baisse d'expression (**Figure 44A, B, C, D et E**).





Le knockdown de *TCF19* avec une baisse de 58% de son expression a produit une baisse significative de la sécrétion d'insuline en absence d'IBMX ($p < 0,01$) (**Figure 44A**). *TCF19* code un facteur de transcription à doigt de zinc de type PHD (Plant HomeoDomain) qui joue un rôle dans la prolifération et l'apoptose des cellules β pancréatiques (266). Un nouveau locus associé au diabète de type 1 a aussi été identifié sur le chromosome 6p avec *TCF19* comme effecteur potentiel dans l'étude du *Wellcome Trust Case Control Consortium* et du *T1D Genetics Consortium* (267). L'analyse de l'expression de *TCF19* dans des îlots pancréatiques humains de donneurs non diabétiques montre une corrélation positive de l'expression de *TCF19* avec l'IMC. En effet, une différence d'un facteur 4 a été trouvée en comparant l'expression de *TCF19* dans les îlots d'individus obèses non-diabétiques ($IMC \geq 30$) avec ceux d'individus non-obèses ($IMC < 25$) (266). Et cette différence d'expression est confirmée par la comparaison de l'expression de *TCF19* dans les îlots pancréatiques de souris obèses *versus* non-obèses (266). La baisse de la sécrétion d'insuline occasionnée par la baisse de l'expression de *TCF19* dans les EndoC- β H1 est donc en accord avec les résultats précédents ; de plus nos résultats complètent ce qui était déjà connu sur la fonction de *TCF19*, surtout dans la fonction de la cellule β .

La baisse de 72% de l'expression de *SLC30A8* dans les EndoC- β H1 a induit une baisse de la sécrétion d'insuline en présence et en absence d'IBMX ($p < 0,05$) (**Figure 44B**). *SLC30A8* code un transporteur de zinc quasi spécifique des îlots de Langerhans nécessaire à la cristallisation de l'insuline dans les granules de sécrétion et important pour la sécrétion d'insuline (268). Une réduction de 75% du contenu en zinc dans le pancréas des personnes diabétiques a été observée par rapport au pancréas de témoins (269). Chez les diabétiques de type 1 ou de type 2, une baisse significative du taux de zinc dans le sérum a été observée et s'accompagne d'une augmentation du taux de zinc dans les urines (268). La baisse de la sécrétion d'insuline que nous observons dans les EndoC- β H1 après l'extinction de *SLC30A8* est en accord avec l'effet perte de fonction du SNP R325W non-synonyme de *SLC30A8* (145) ayant un effet délétère pour ce transporteur de zinc (270,271). Nos résultats vont dans le sens de ce qui a été observé chez les souris délétées pour *Slc30a8* qui présentent une altération de la tolérance au glucose et une faible concentration en insuline circulant, alors que les souris surexprimant le gène présentent une amélioration de l'homéostasie glucidique (272). Une autre étude par séquençage et génotypage de 150 000 individus a suggéré que des mutations perte de fonction à faible fréquence sur *SLC30A8* protégeraient du diabète de type 2 (273), ce qui est en total désaccord avec nos résultats et les résultats précédents. Ce qui expliquerait cette contradiction selon

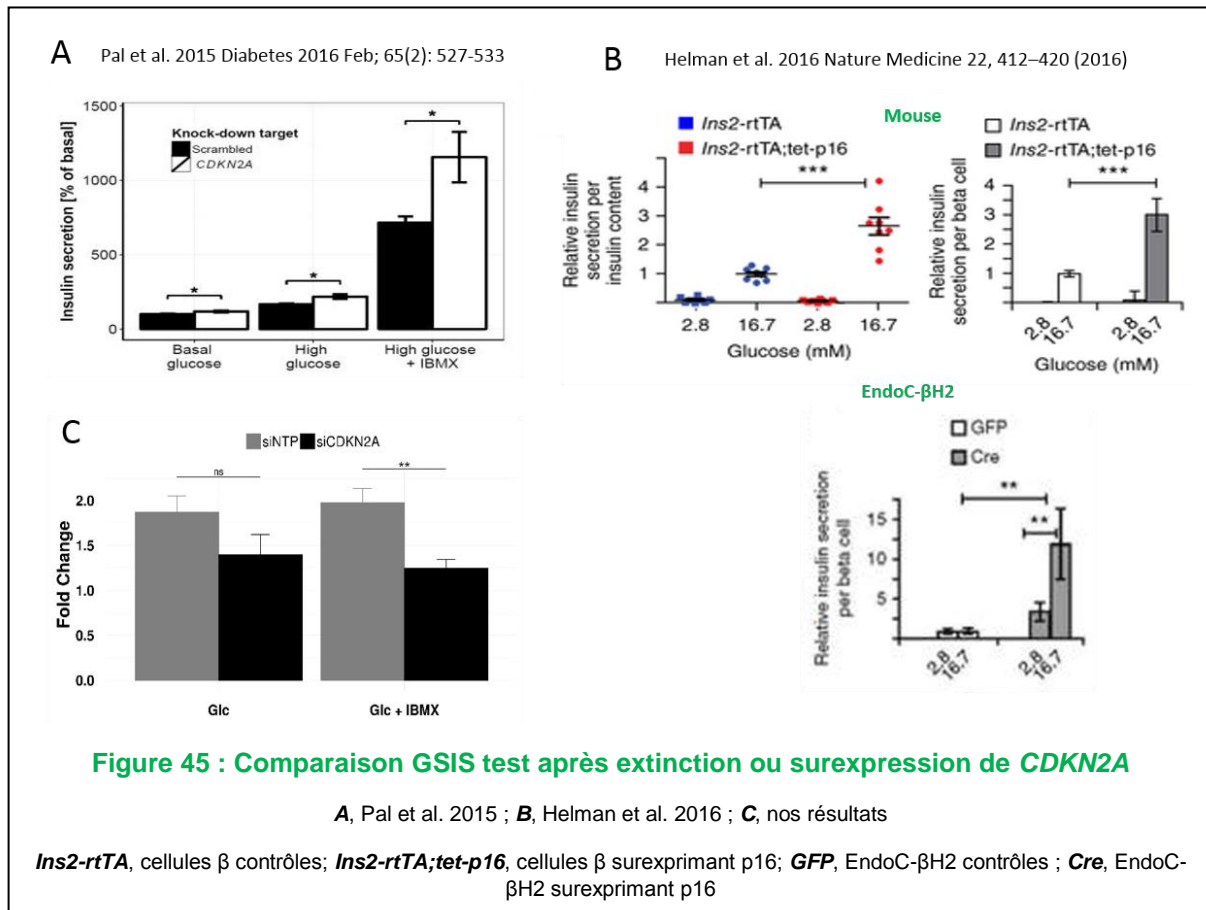
RUTTER et CHIMIANTI 2015 (274) serait que le degré d'inhibition de l'activité de SLC30A8 peut varier selon la fréquence du variant et que l'effet délétère peut dépendre de l'âge ou du stress hypoxique de la cellule β . Il n'en reste pas moins que l'extinction de 72% de l'expression de *SLC30A8* dans les EndoC- β H1 a un effet délétère sur la sécrétion d'insuline. Dans une étude parue récemment, une baisse de l'expression de *SLC30A8* a été observée dans le modèle de souris expérimentale « NONcNZO10/LtJ » qui est un modèle de souris du diabète de type 2 polygénique (275) ; ces résultats sont en parfait accord avec les nôtres.

Pour *TBC1D4* (TBC1 domain family member 4) avec une baisse de son expression de 80%, nous avons observé une baisse de la sécrétion d'insuline en présence d'IBMX ($p < 0,01$) (**Figure 44C**). *TBC1D4* encore appelé AS160 (Akt substrate of 160 kDa) code un activateur de Rab-GTPase, très étudié dans le tissu adipeux et le muscle squelettique qui sont des tissus insulino-sensibles impliqués dans la capture du glucose sous l'effet de l'insuline. *TBC1D4* intervient dans la transduction du signal de l'insuline par la voie de signalisation IRS-PI3-kinase permettant la translocation du récepteur au glucose GLUT4 des vésicules intracellulaires à la membrane cellulaire pour la capture du glucose (220,276,277). En effet *TBC1D4* lorsqu'il n'est pas phosphorylé se fixe sur les vésicules contenant GLUT4 et inhibe ainsi sa translocation ; cette inhibition est levée par sa phosphorylation (278). Un GWAS dans une population groenlandaise avait montré qu'un SNP au locus *TBC1D4* associé au diabète de type 2, cause la résistance à l'insuline au niveau du muscle squelettique (279). L'extinction de *TBC1D4* par siRNA dans la lignée β pancréatique murine (Min6) était connue pour baisser la sécrétion d'insuline. De même il a été montré que dans des îlots de patients diabétiques il y avait moins d'ARNm *TBC1D4* par rapport aux îlots d'individus non diabétiques (280). L'effet de la baisse d'expression de *TBC1D4* sur la sécrétion d'insuline pourrait s'expliquer par le fait que *TBC1D4* soit un effecteur en aval de la voie PI3K/Akt. Il a été montré que lorsque la voie PI3K/Akt est altérée dans la cellule β pancréatique, cela induit une réduction de la sécrétion d'insuline, une baisse de l'expression des protéines du complexe SNARE et une perte de leur synchronisation avec l'influx de calcium après dépolarisation de la membrane plasmique (281,282). La baisse d'expression de *TBC1D4* pourrait donc affecter le complexe SNARE qui est important pour l'exocytose des granules d'insuline (cf supra **Physiologie du pancréas et physiopathologie du diabète de type 2/1.2. La machinerie de sécrétion**). La baisse de la sécrétion d'insuline que nous avons obtenue dans la lignée de cellules β pancréatiques humaines EndoC- β H1 après extinction de *TBC1D4* confirme les résultats qui ont été obtenus dans la lignée de cellules β pancréatiques murines.

L'extinction de *CDKN2A*, avec une perte de 78% de son expression, produit une baisse significative de la sécrétion d'insuline en présence d'IBMX ($p < 0,01$) (**Figure 44D**). *CDKN2A* code les suppresseurs de tumeurs p16INK4a et p14ARF. Ces résultats sont en contradiction avec l'étude de PAL et ses collaborateurs (283) selon laquelle l'extinction de *CDKN2A* dans les EndoC- β H1 aurait un effet positif sur la sécrétion d'insuline (**Figure 45A**). Cette différence sur les résultats peut être justifiée par le fait que le protocole que nous utilisons pour la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose en présence ou en absence d'IBMX est différent de celui utilisé par cette étude. Dans cet article, le test de sécrétion d'insuline utilisé est statique ; les EndoC- β H1 n'étant pas toujours sensibles au glucose, un test de sécrétion statique peut conduire à des résultats positifs artefactuels. A l'opposé, dans notre protocole de sécrétion d'insuline, les stimulations en basal et à haute concentration de glucose ont été réalisées sur les mêmes cellules. Cela permet une première auto normalisation de la sécrétion d'insuline. Il est à noter que cette même équipe n'a pas confirmé ses résultats précédents sur la baisse d'expression de *CDKN2A* dans sa récente publication sur l'évaluation fonctionnelle systématique des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 (incluant *CDKN2A*) dans le même modèle cellulaire (EndoC- β H1). Une autre étude montre que l'activation de *CDKN2A* dans les cellules β pancréatiques chez la souris stimule la sécrétion d'insuline (284). Cette étude d'HELMAN et ses collaborateurs montre aussi que l'augmentation de l'expression de *CDKN2A* est un marqueur de sénescence de la cellule β pancréatique qui est associé à une amélioration de la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose comme dans le processus de vieillissement normal chez la souris (**Figure 45B**). Cette surexpression de *CDKN2A* induit la sénescence dans la lignée de cellules β pancréatiques humaines EndoC- β H2 et améliore leur sécrétion d'insuline (**Figure 45B**), ce qui est en contradiction avec les résultats de PAL et ses collaborateurs mais en accord avec nos résultats.

Dans notre étude, après une baisse de l'expression de *KCNK16* de 71%, nous avons observé une augmentation de la sécrétion d'insuline en présence d'IBMX ($p < 0,05$) (**Figure 44E**). *KCNK16* code un canal calcique exprimé dans les cellules β pancréatiques humaines et murines appelé TALK-1 (*TWIK-related alkaline pH-activated K2P*) ; cette protéine joue un rôle important dans l'excitabilité électrique de la cellule β et la sécrétion d'insuline (285). Les souris délétées pour ce gène présentent une amélioration du flux d'ions Ca^{2+} lors de la seconde phase de la sécrétion d'insuline (285). En outre, un polymorphisme non synonyme au niveau de *TALK-1* (rs1535500) entraînant la substitution d'une alanine à la position 277 avec un glutamate a été lié à une augmentation du risque de diabète de type 2 et améliore l'activité du canal

calcique (286). Les souris *knockout* (KO) pour *Kcnk16* spécifiquement dans les cellules β pancréatiques améliorent leur influx de Ca^{2+} lors de la seconde phase de la sécrétion d'insuline (285). Une méta-analyse de GWAS de différentes mesures de la première phase de sécrétion d'insuline a montré une association de *KCNK16* avec la première phase de la sécrétion d'insuline. Ces résultats sont en accord avec les nôtres, qui montrent une augmentation de la sécrétion d'insuline dans les EndoC- β H1 après extinction partielle de l'expression de *KCNK16*.



2.4. Mis en évidence de 4 gènes associés au diabète de type 2 auparavant inconnu dans la cellule β

Dans notre étude, nous avons mis en évidence la fonction de quatre gènes de susceptibilité au diabète de type 2 (*PRCI*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6*) qui à ce jour n'avaient aucune fonction connue dans la cellule β pancréatique et qui après leur extinction génique induisent une baisse significative de la sécrétion d'insuline (**Figure 46A, B, C et D**).

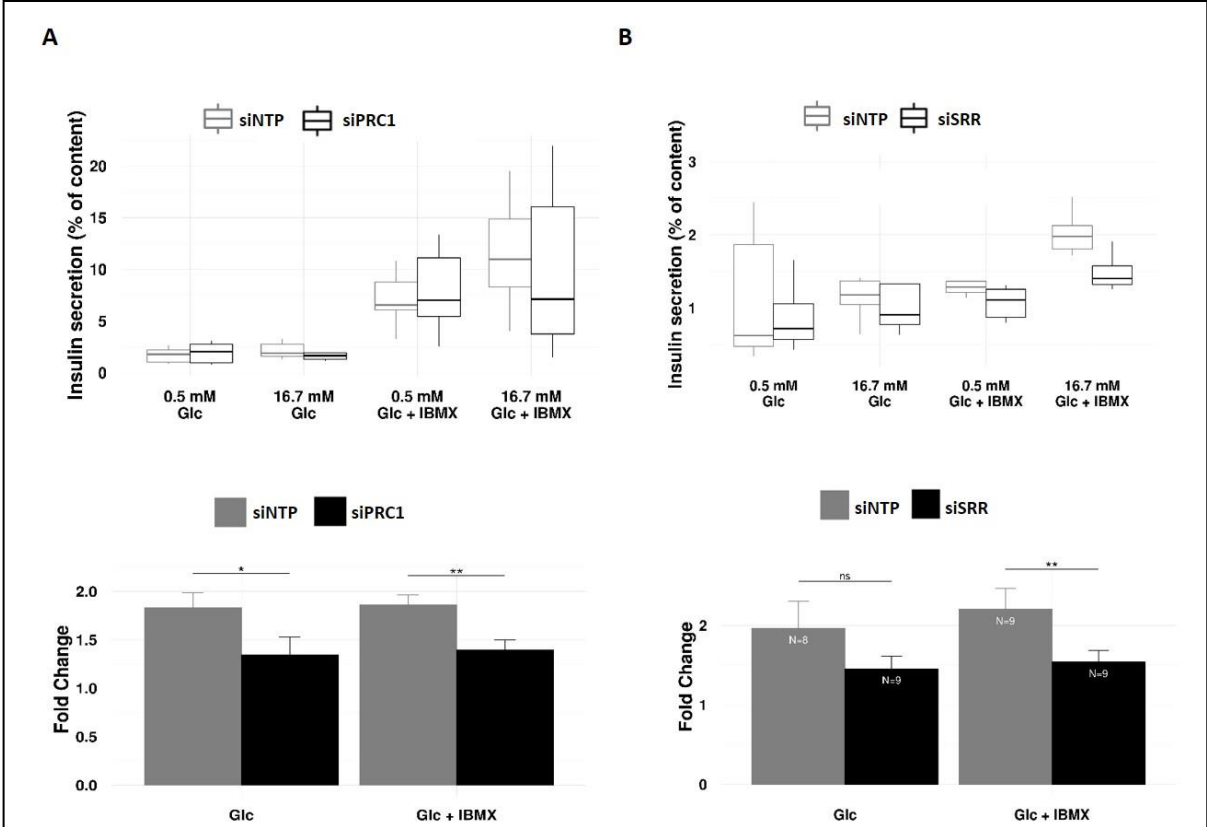


Figure 46 : Baisse de la sécrétion de l'insuline dans les EndoCβH1 après la baisse de l'expression de *PRC1* (A), *SRR* (B)

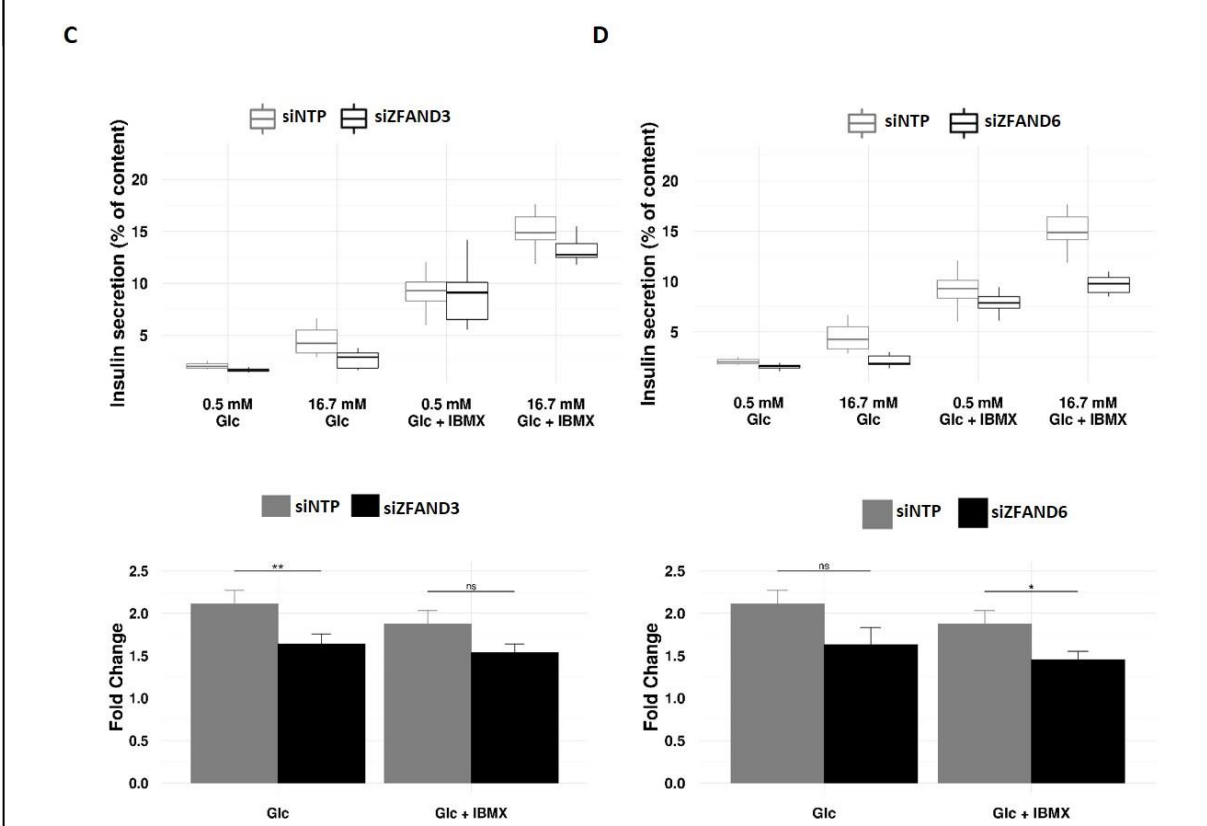


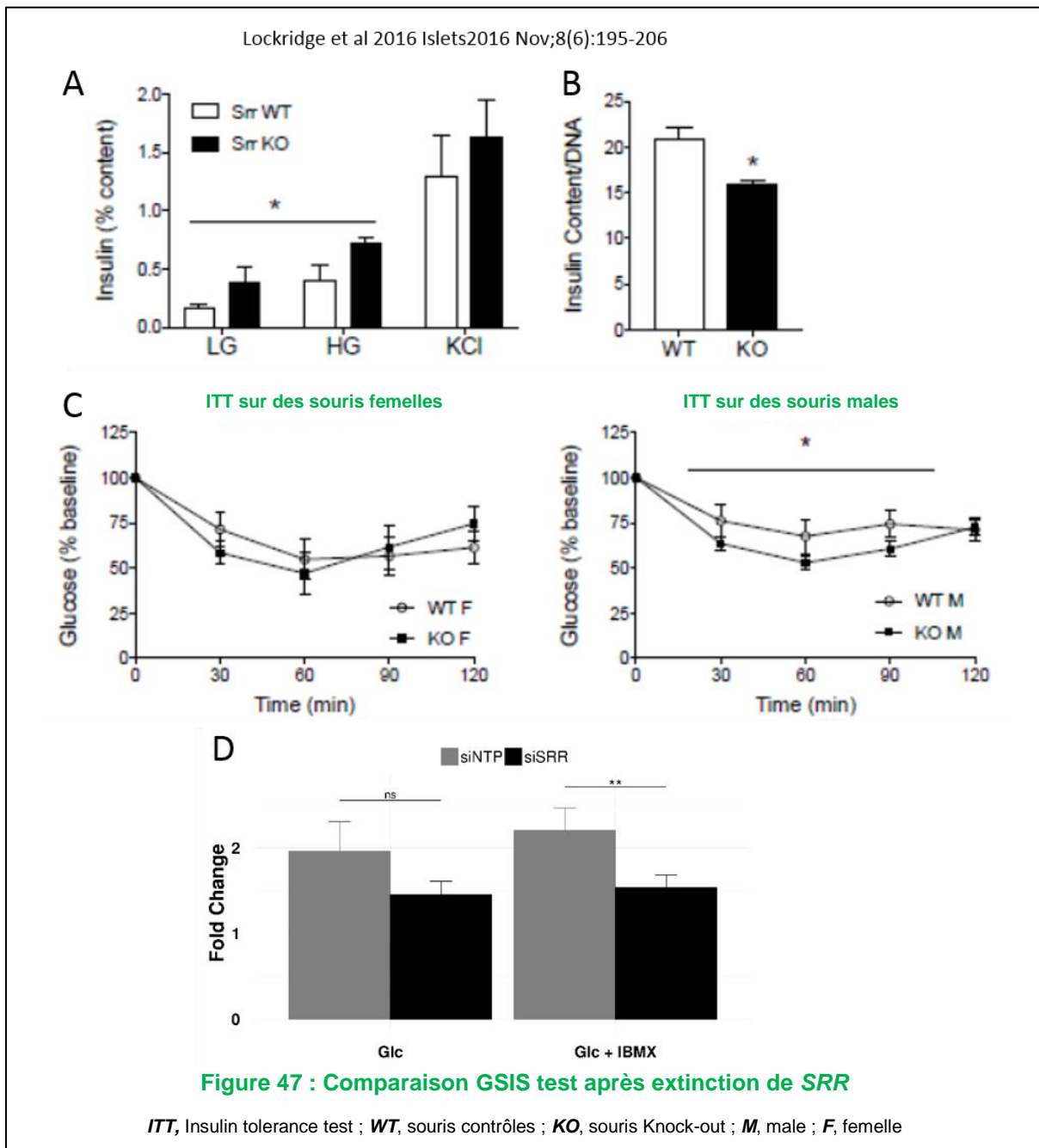
Figure 46 : Baisse de la sécrétion de l'insuline dans les EndoCβH1 après la baisse de l'expression de *ZFAND3* (C), *ZFAND6* (D)

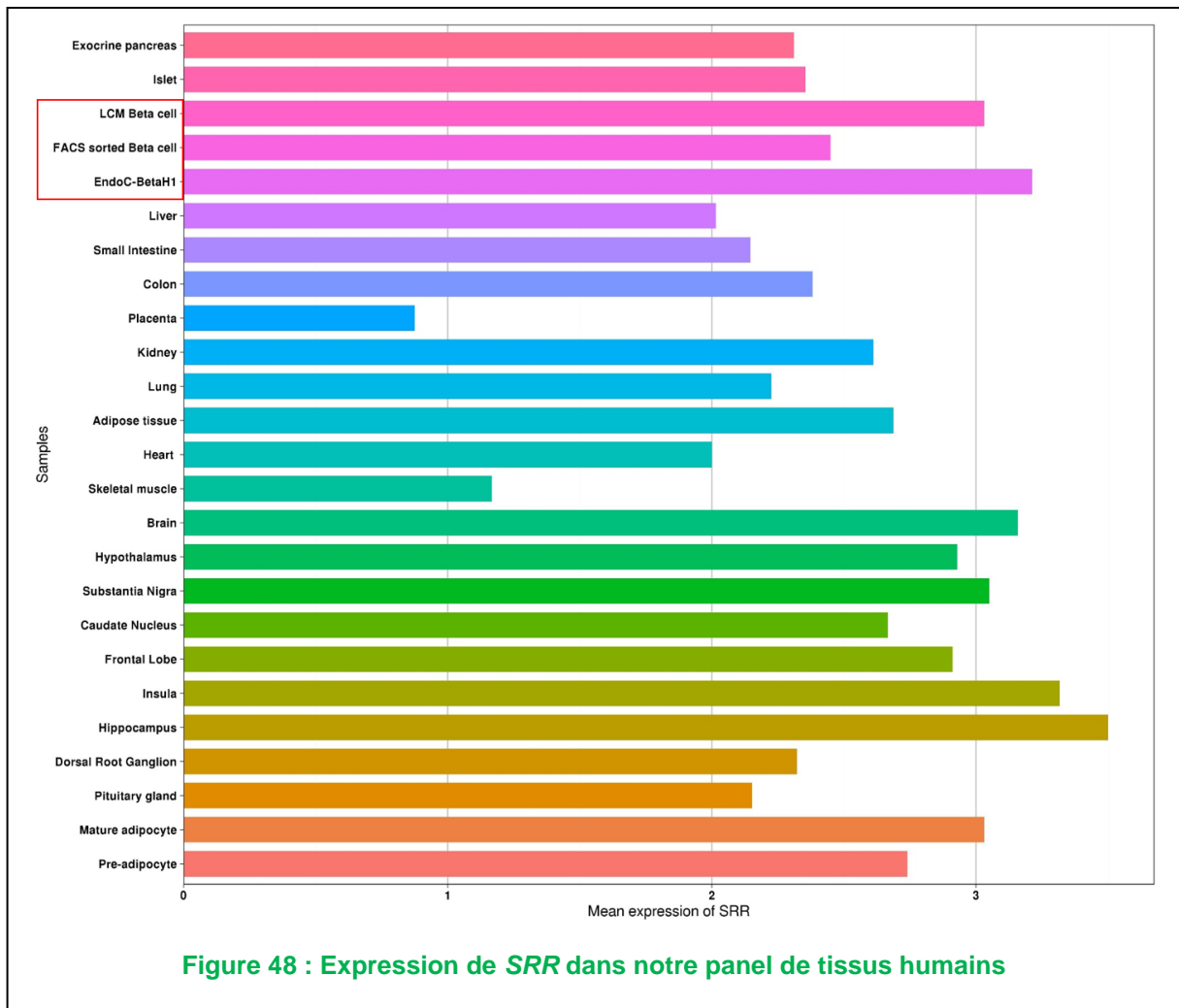
PRCI code un régulateur clé de la cytokinèse et est impliqué dans le cancer hépatocellulaire dans lequel il aurait un effet oncogénique boostant la prolifération des cellules cancéreuses, des métastases et donc de la tumorigénicité (287). Un SNP du gène *PRCI* associé au diabète de type 2 et au cancer du sein a été mis en évidence par GWAS (288). Une augmentation de l'expression de *PRCI* a été montrée au niveau de la tumeur pour le cancer du sein, avec deux SNP (rs10520699 et rs11852999) associés aux variations de l'expression de *PRCI* (289).

SRR code une sérine racémase qui génère de la D-sérine primordiale pour la neurotransmission à partir de L-sérine, et cette D-sérine est un co-agoniste du récepteur N-méthyl-D-aspartate (NMDAR). Des souris knockout pour *SRR* présentent des anomalies comportementales ressemblant à celles observées dans la schizophrénie, réversible par administration de D-sérine (290). Le SNP rs391300 de *SRR* a été montré dans une étude cas-témoin au sein d'une population chinoise comme associé à l'efficacité thérapeutique de la metformine chez des patients atteints de diabète de type 2 (291). Une autre étude très récente a aussi montré que *SRR* est fortement exprimée dans les cellules β primaires humaines et que les souris knockout globales pour *Srr* montrent une amélioration de la tolérance au glucose avec une augmentation de la sécrétion d'insuline (**Figure 47A**) et selon cette étude cela passerait par un effet de *Srr* sur l'expression et la fonction du NMDAR dans les îlots pancréatiques (292). Nous avons confirmé la forte expression de *SRR* dans les cellules β pancréatiques humaines et la lignée EndoC- β H1 par rapport aux autres tissus de notre panel (**Figure 48**). Mais les résultats de cette étude par rapport à la sécrétion d'insuline sont en contradiction avec les nôtres. En effet, dans cette même étude, il a été montré que leurs souris KO globales *Srr* deviennent plus sensibles à l'insuline, ce qui pourrait justifier l'amélioration de la tolérance au glucose observée (**Figure 47C**). Ces observations pourraient donc être liées à une meilleure capture du glucose par les tissus périphériques. La différence observée entre notre résultat et le leur sur la sécrétion d'insuline pourrait être liée aux différences des niveaux d'extinction du gène dans les deux modèles (53% d'extinction après notre siRNA dans les EndoC- β H1 *versus* extinction globale dans leurs souris KO globales). De plus, ces souris KO *Srr* présentent une diminution du contenu en insuline ce qui est contradictoire avec une augmentation de la sécrétion d'insuline (**Figure 47B**).

D'autre part les souris KO *Srr* sont généralement considérées comme un modèle « d'hypofonction » du NMDAR. Par exemple dans l'hippocampe de ces souris, les auteurs ont observé une suppression de la potentialisation à long terme, qui fait partie des similitudes physiologiques existant entre les cellules nerveuses et les cellules β (293). Dans la plupart des régions du cerveau, l'activation de la D-serine et des NMDAR favorise la libération vésiculaire

et le remodelage synaptique, de sorte que son absence aiguë entraîne une réponse de stimulation immédiate et adaptative plus faible (294,295). Ce modèle physiologique repose sur l'activation du NMDAR conduisant à une activation de la fonction cellulaire. En se basant sur ce modèle, une baisse de la D-sérine causée par l'extinction de *SRR* devrait dans les cellules β induire une baisse de la sécrétion d'insuline comme le montrent nos résultats.





Contrairement aux 2 gènes précédents, très peu de choses sont connues sur *ZFAND3* et *ZFAND6*.

ZFAND3 (Zing finger AN1-type domain 3) également appelé Tex27 (testis expressed sequence 27) est un gène ubiquitaire mais dont l'expression est plus importante dans les testicules. Sa fonction physiologique est pour le moment méconnue, mais il semblerait que *ZFAND3* ait des fonctions physiologiques liées à la maturation des cellules germinales (296,297). PASQUALI et collaborateurs (252) suggèrent qu'un SNP en aval de *ZFAND3* associé au risque du diabète de type 2 altérerait l'activité de son enhancer dans les îlots humains.

ZFAND6 (Zinc finger protein A20) a été identifié à l'origine comme un *tumor necrosis factor-responsive gene* dans les cellules endothéliales qui a une fonction cytoprotectrice des cellules endothéliales en les protégeant de l'apoptose et en régulant négativement les réponses inflammatoires par une inhibition du facteur de transcription NF- kappa B. Il a aussi été montré

que ZFAND6 serait un hépatoprotecteur pour l'allogreffe et que sa baisse d'expression pourrait constituer un facteur pathogène important dans la susceptibilité accrue aux lésions hépatiques par ischémie/reperfusion qui peuvent aboutir à la mort cellulaire. Par contre sa surexpression pourrait protéger les souris contre des lésions métaboliques dans le foie en augmentant l'expression de *PPARα* (peroxisome proliferator-activated receptor alpha) (298). Il a été montré que les souris *ob/ob* déficientes pour *PPARα* développaient une altération de la fonction de la cellule pancréatique caractérisée par une diminution de la taille moyenne des îlots et une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose *in vitro* et *in vivo* (299). L'action de ZFAND6 sur la sécrétion d'insuline pourrait être médiée par *PPARα*.

Pour certains de nos gènes tels que *CDKN2A* (**Figure 44D**), *TBC1D4* (**Figure 44C**), *KCNK16* (**Figure 44E**), *GCK* (**Figure 42C**), *SRR* (**Figure 46B**), *ZFAND6* (**Figure 46D**), la variation significative de la sécrétion d'insuline après leur extinction est observée en présence d'IBMX. Compte tenu du fait que la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose est biphasique, que l'AMP cyclique aurait un effet sur la deuxième phase de la sécrétion d'insuline (cf supra, **Physiologie du pancréas et physiopathologie du diabète de type 2/1.1- La sécrétion d'insuline stimulée par le glucose**), et que l'effet de l'IBMX sur la sécrétion de l'insuline serait médié par l'augmentation de la concentration en AMP cyclique dans la cellule β (cf supra **Matériels et Méthodes/ 7- Test de sécrétion d'insuline dans les EndoC- β H1**). Cela suggère que ces gènes dont la variation significative de la sécrétion est observée en présence d'IBMX auraient un effet lors de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline. Mais il est à noter que pour des gènes comme la *GCK*, *SRR*, *CDKN2A* et *ZFAND6* la tendance à la baisse de la sécrétion d'insuline en présence d'IBMX est assez forte dans la condition glucose seul. Ce qui suggère que comme pour les gènes dont la variation de la sécrétion d'insuline est observée dans les deux conditions (*SLC30A8* [**Figure 44B**], *PRC1* [**Figure 46A**]), ces gènes agiraient dans les deux phases de la sécrétion d'insuline.

3. Confirmation de l'expression de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6* et *ZFAND3* dans les cellules β pancréatiques humaines

Nous avons par immunomarquage fluorescent sur des coupes d'îlots humains fixés, confirmé l'expression de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6* dans les cellules β pancréatiques humains (**Figure 49**). Pour *SRR* et *ZFAND6* dont les marquages sont moins nets sur les coupes d'îlots nous avons reconfirmé leur expression par immunomarquage sur des coupes de pancréas

humains (**Figure 50**). Nous avons aussi confirmé l'expression dans les EndoC-βH1 (**Figure 51**) par immunomarquage de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6* et *ZFAND3* avant de passer à l'étude de transcriptomique par RNA-seq après leur extinction dans les EndoC-βH1.

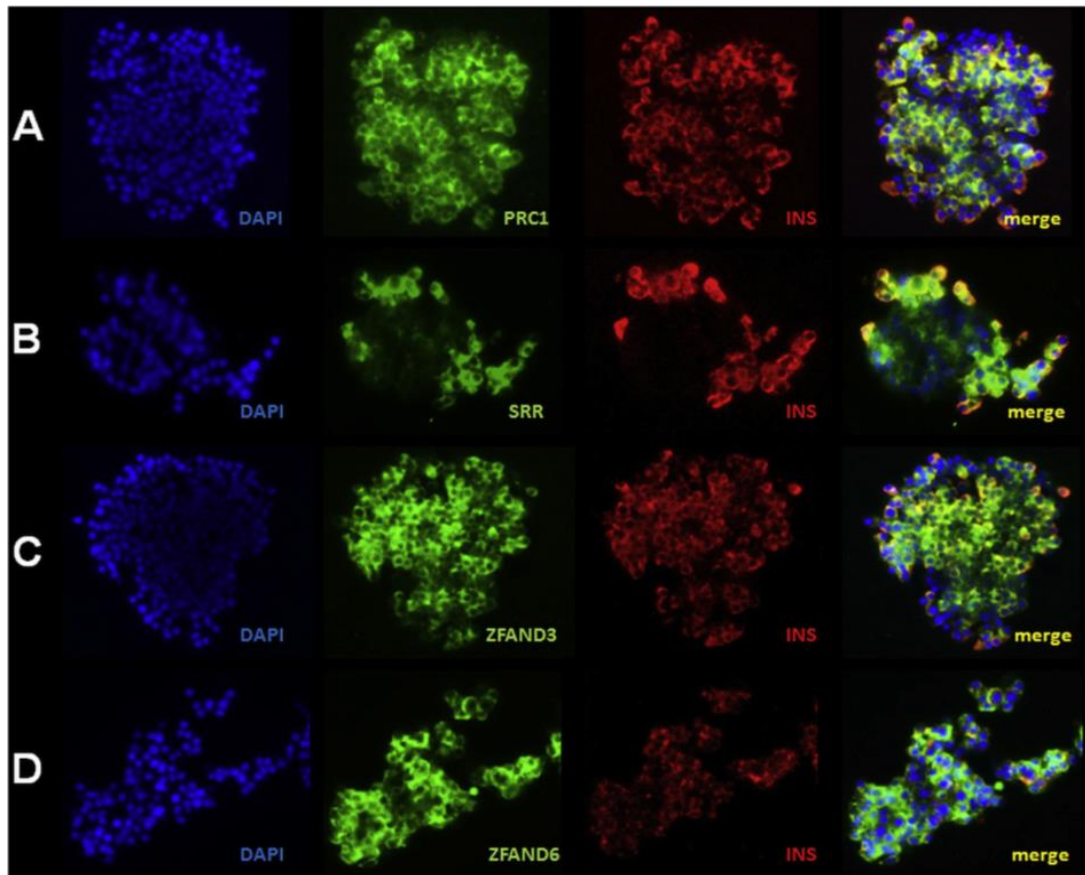


Figure 49 : Immunomarquage sur des coupes d'îlots pancréatiques humains

INS, Insuline ; **A**, *PRC1* ; **B**, *SRR* ; **C**, *ZFAND3* ; **D**, *ZDAND6* ; **Merge**, superposition du marquage au DAPI, à l'insuline et du gène

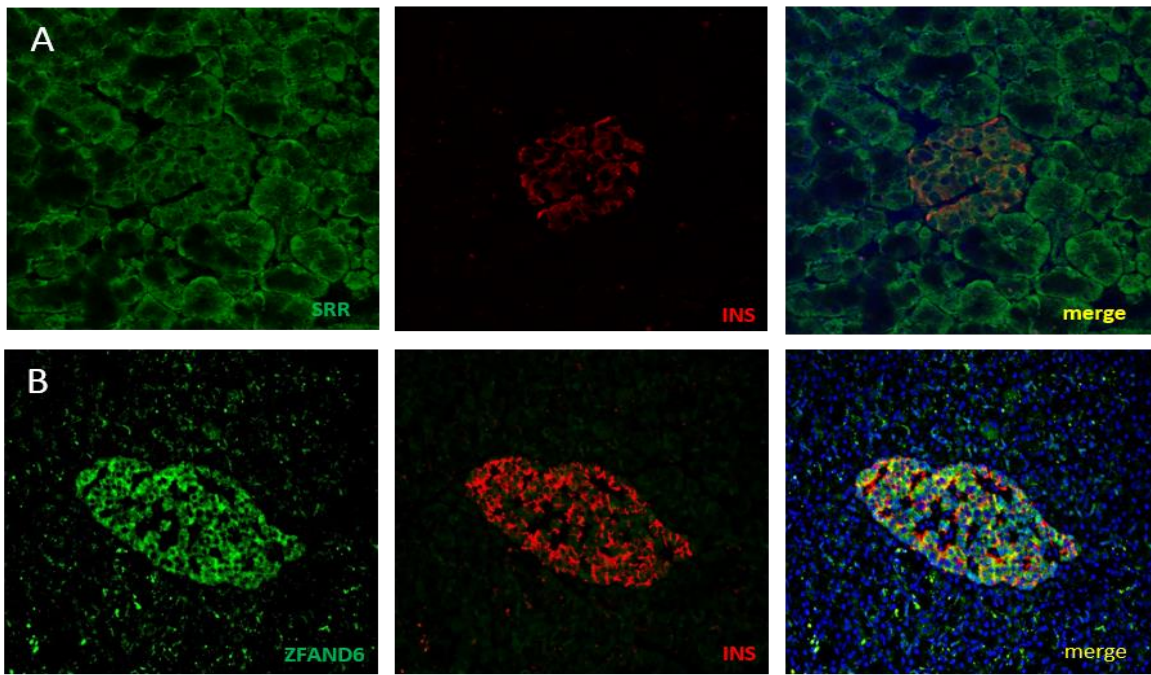


Figure 50 : Immunomarquage sur des coupes de pancréas humains

INS, Insuline ; **A**, SRR ; **B**, ZDAND6 ; *Merge*, superposition du marquage au DAPI, à l'insuline et du gène

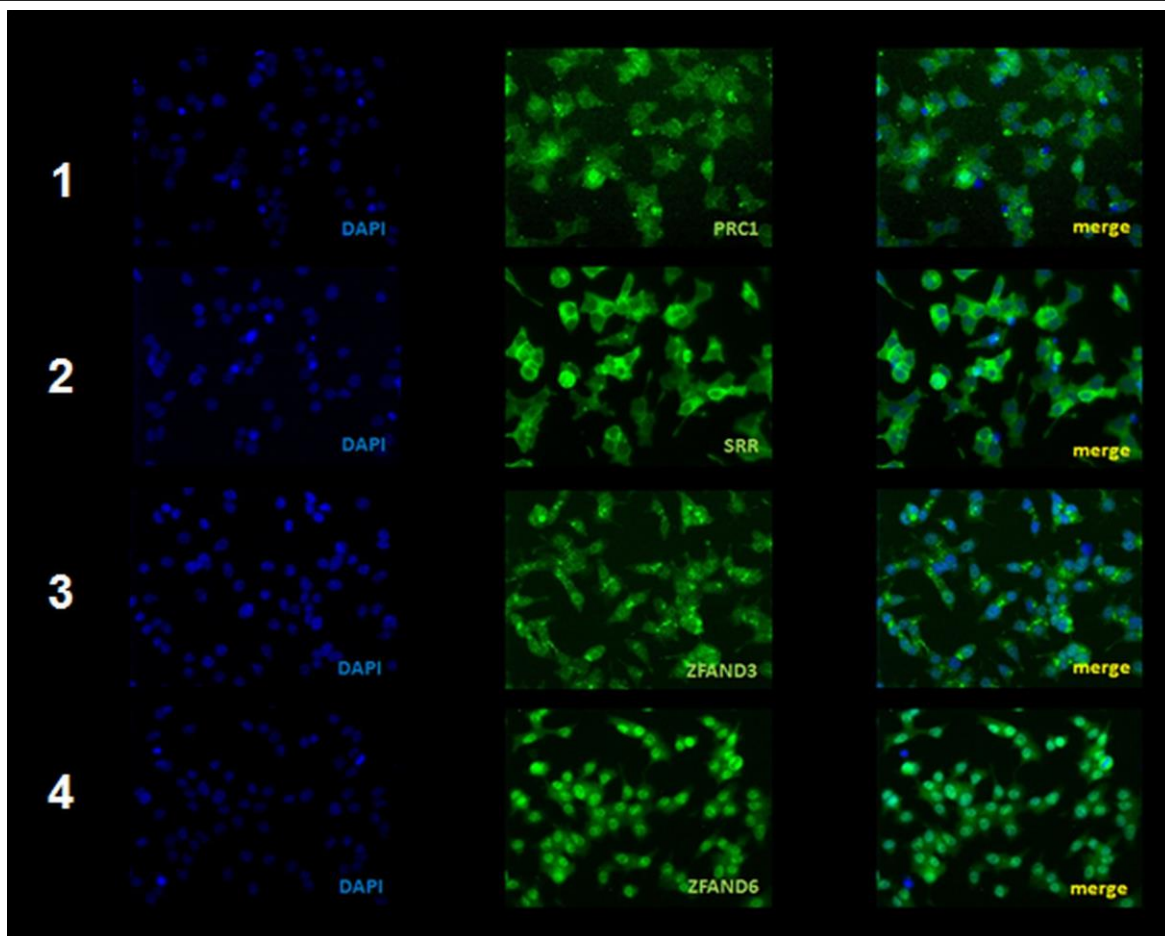


Figure 51 : Immunomarquage sur des EndoC-βH1

1, PRC1 ; 2, SRR ; 3, ZFAND3 ; 4, ZDAND6 ; *Merge*, superposition du marquage au DAPI et du gène

4. Déchiffrage des pathways et des networks biologiques affectés par la baisse d'expression de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6* et *ZFAND3* dans les EndoC-βH1

Après la baisse de sécrétion d'insuline observée suite à l'extinction partielle de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6*, nous avons voulu déchiffrer les mécanismes sous-jacents à cette baisse de la sécrétion d'insuline dans les EndoC-βH1. Pour répondre à nos interrogations, nous avons fait du RNA-seq sur des EndoC-βH1 où l'expression de ces gènes a été partiellement réduite en comparaison à des EndoC-βH1 témoins. Nous avons utilisé IPA pour l'analyse des données après RNA-seq.

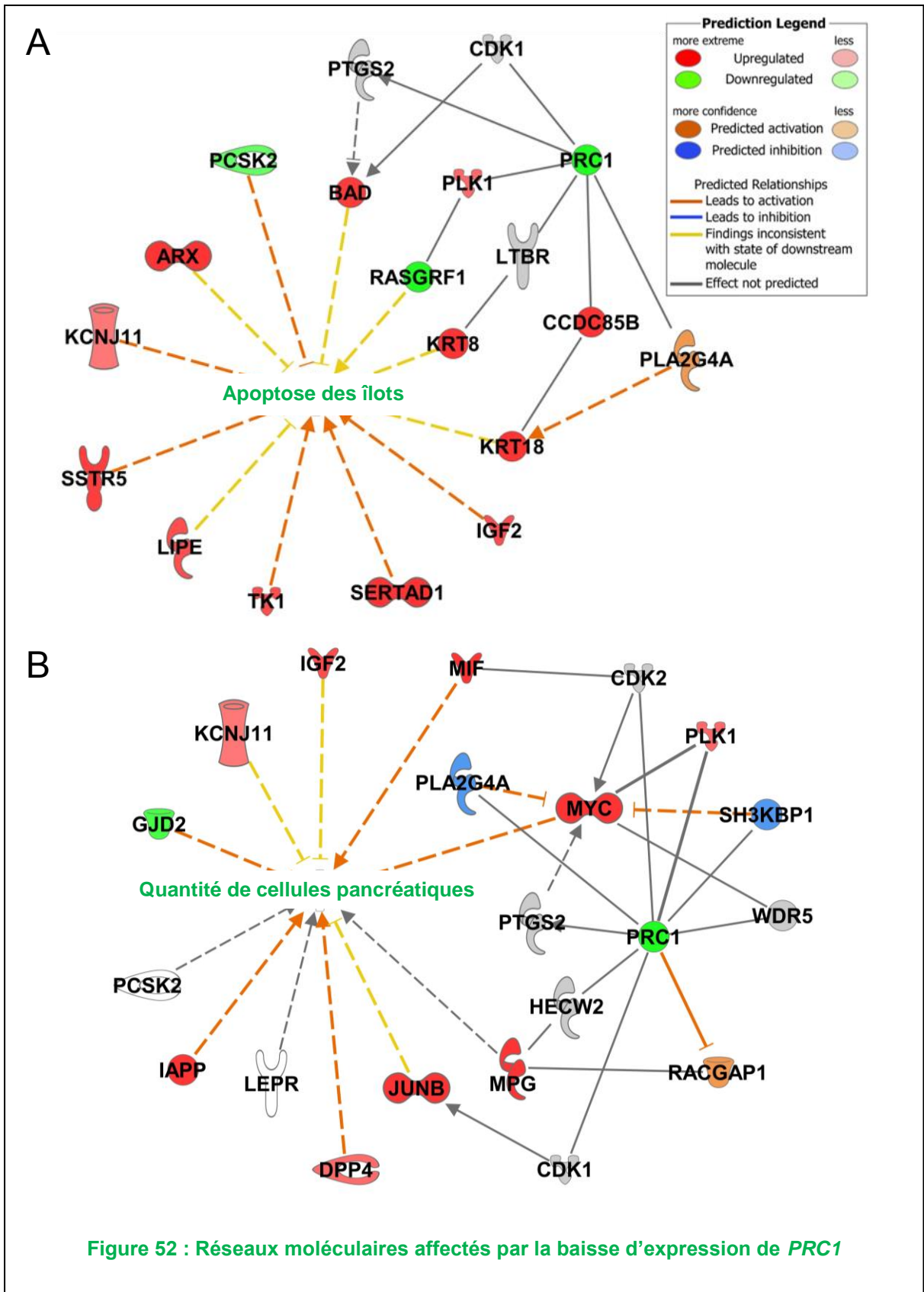
L'analyse du transcriptome des cellules dans lesquelles *PRC1* a été éteint *versus* les cellules contrôles, a montré l'implication de *PRC1* dans un réseau nommé « Cycle Cellulaire, Mobilité Cellulaire, Assemblage et Organisation Cellulaire » (cf infra **Annexe 1/Supplementary Data-Figure L.1**) comprenant une trentaine de molécules. Par ailleurs, l'analyse des maladies et/ou des fonctions associées au *knockdown* de *PRC1* a mis en évidence une association significative avec des réseaux liés au taux de carbohydrate ($p = 2,7 \cdot 10^{-4}$) (cf infra **Annexe 1/Supplementary Data-Figure L.2**), la quantité d'insuline dans le sang ($p = 4,8 \cdot 10^{-5}$) (cf infra **Annexe 1/Supplementary Data-Figure L.3**) et la concentration de D-glucose ($p = 4,6 \cdot 10^{-8}$) (cf infra **Annexe 1/Supplementary Data-Figure L.4**). La baisse d'expression de *PRC1* a été aussi associée à un réseau lié à l'apoptose ($p = 1,1 \cdot 10^{-4}$) en particulier dans les îlots de Langerhans ($p = 4,3 \cdot 10^{-3}$) (**Figure 52A**). De même, cette baisse d'expression de *PRC1* a aussi été associée à la masse de cellules pancréatiques ($p = 9,9 \cdot 10^{-4}$) (**Figure 52B**). Nous avons confirmé cette association entre le *Knockdown* de *PRC1* et l'apoptose cellulaire par des tests de viabilité cellulaire dans les EndoC-βH1 (**Figure 52C**). En effet lorsque l'expression du gène *PRC1* est éteint dans les EndoC-βH1, nous avons une baisse significative de la viabilité cellulaire comparé aux cellules traitées avec le siRNA contrôle. Il a déjà été montré que l'apoptose des cellules β est un facteur étiologique important dans le développement et la progression du diabète de type 2, et que cela n'est pas dissociable d'un défaut sécrétoire intrinsèque (193,194,300).

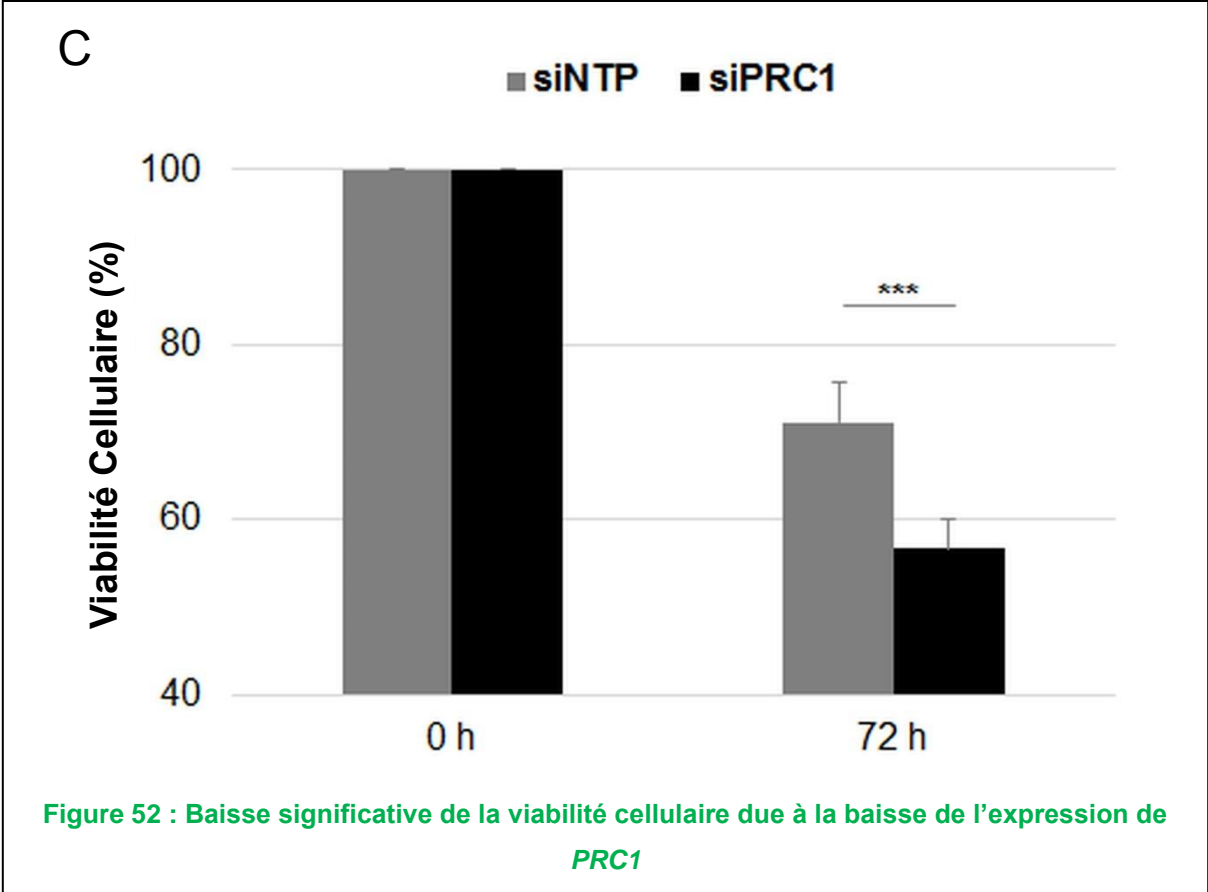
L'analyse du transcriptome des EndoC-βH1 après extinction partielle de l'expression de *SRR* a montré une association significative avec un réseau nommé « Phosphorylation de Sérine » ($p = 8,5 \cdot 10^{-7}$) (cf infra **Annexe 1/Supplementary Data-Figure M.1**) et en particulier la

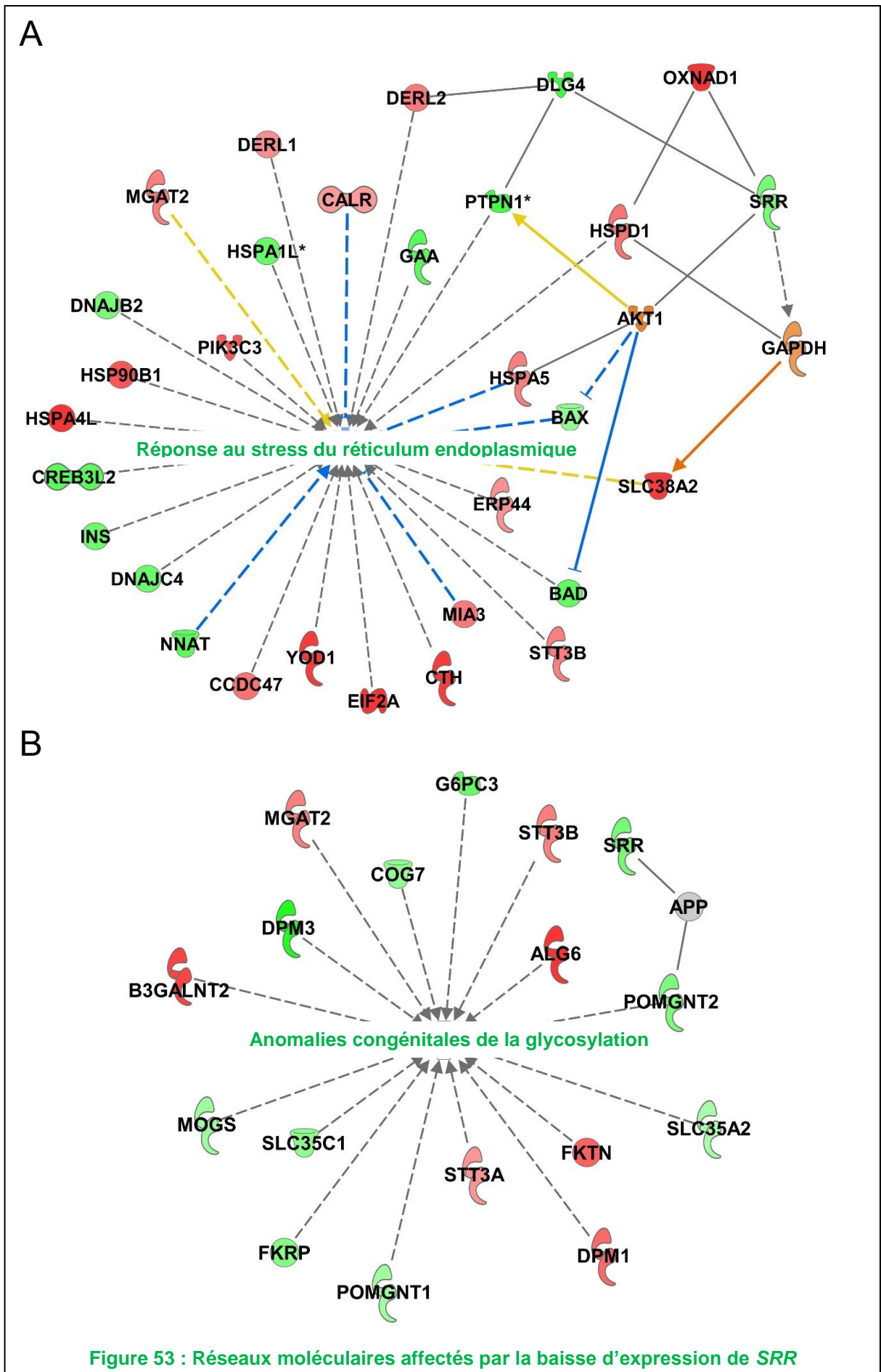
phosphorylation des sérines peptidiques ($p= 6,3.10^{-7}$) (cf infra **Annexe 1/Suplementary Data-Figure M.2**); la réponse au stress réticulaire ($p= 8,9.10^{-3}$) (**Figure 53A**) et les anomalies de glycosylation congénital ($p= 2,5.10^{-4}$) (**Figure 53B**). Il a été montré que le taux de sérine augmente de manière significative chez les femmes atteintes de diabète gestationnel comparées à celles dont la tolérance au glucose est normale (301). Et la réponse au stress réticulaire a été rapportée comme impliquée dans la baisse de la sécrétion d'insuline et le développement du diabète (302). Des études métabolomiques suggèrent qu'il serait possible grâce au taux de sérine de prédire l'incidence du diabète de type 2 commun ou encore du diabète gestationnel (303).

L'analyse du transcriptome des cellules, où l'expression de *ZFAND3* a été partiellement éteinte, a montré une association avec un réseau de 16 molécules intitulé « Assemblage et Organisation Cellulaire, Métabolisme lipidique et Transport moléculaire » (cf infra **Annexe 1/Suplementary Data-Figure O.1**). En outre l'analyse des maladies et/ou fonctions pouvant être touchées par le *knockdown* de *ZFAND3*, a montré une association significative avec le transport des alpha-amino acides ($p=8,9.10^{-4}$) (**Figure 54B**). McCLENAGHAN et ses collaborateurs ont rapporté que les acides aminés pourraient avoir une action stimulante sur la sécrétion d'insuline attribuable à trois mécanismes possibles: la génération d'ATP après leur métabolisation, l'entrée dans la cellule d'acides aminés cationiques pouvant entraîner une dépolarisation de la membrane ou encore la dépolarisation de la membrane par leur co-transport avec les ions sodium Na^+ (304).

Pour *ZFAND6*, l'analyse du transcriptome après extinction du gène a montré une association significative à un réseau de molécules nommé « Signalisation cellulaire ; Métabolisme des lipides ; Biochimie des petites molécules » (cf infra **Annexe 1/Suplementary Data-Figure N.1**). Et en regardant les maladies liées au *knockdown* de *ZFAND6* dans les EndoC- β H1, nous avons identifié une association significative avec la glycolyse ($p= 8.10^{-3}$) (**Figure 55C**), le taux d'insuline dans le sang ($p= 7,3.10^{-3}$) (**Figure 55B**), les anomalies morphologiques du pancréas ($p= 2,2.10^{-3}$) (cf infra **Annexe 1/Suplementary Data-Figure N.4**) et plus particulièrement ceux des îlots de Langerhans ($p= 1,8.10^{-2}$) (**Figure 55A**). Les pathways affectés par l'extinction de *ZFAND6* sont des voies qui sont bien connues dans le diabète de type 2.







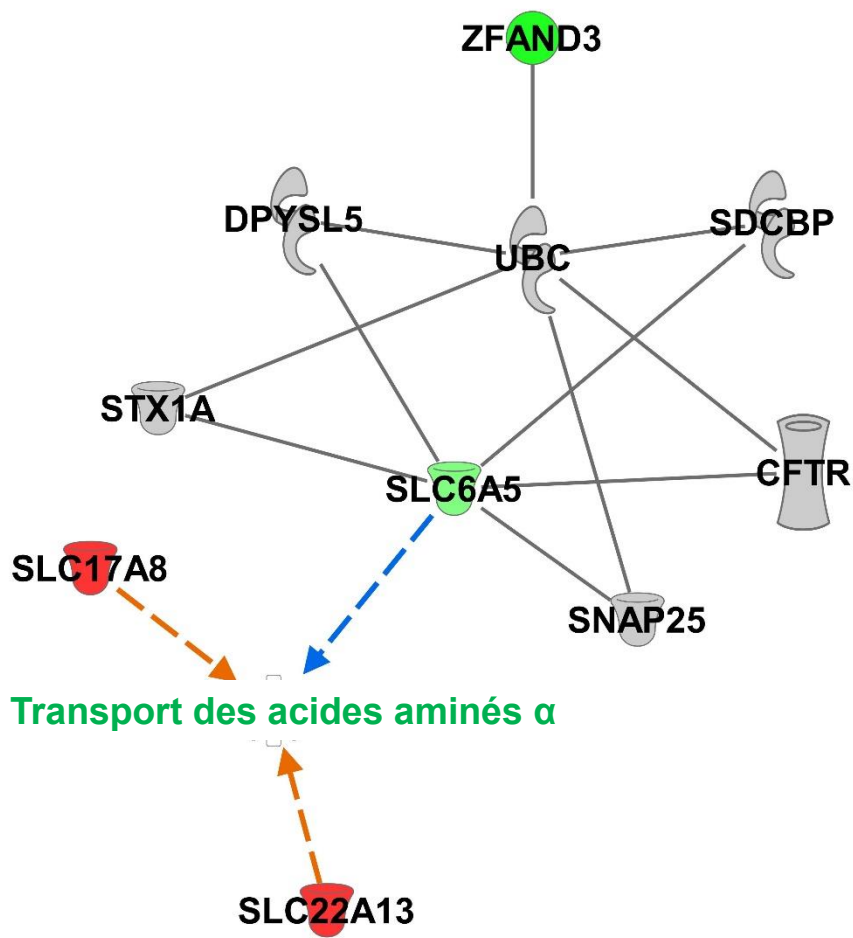
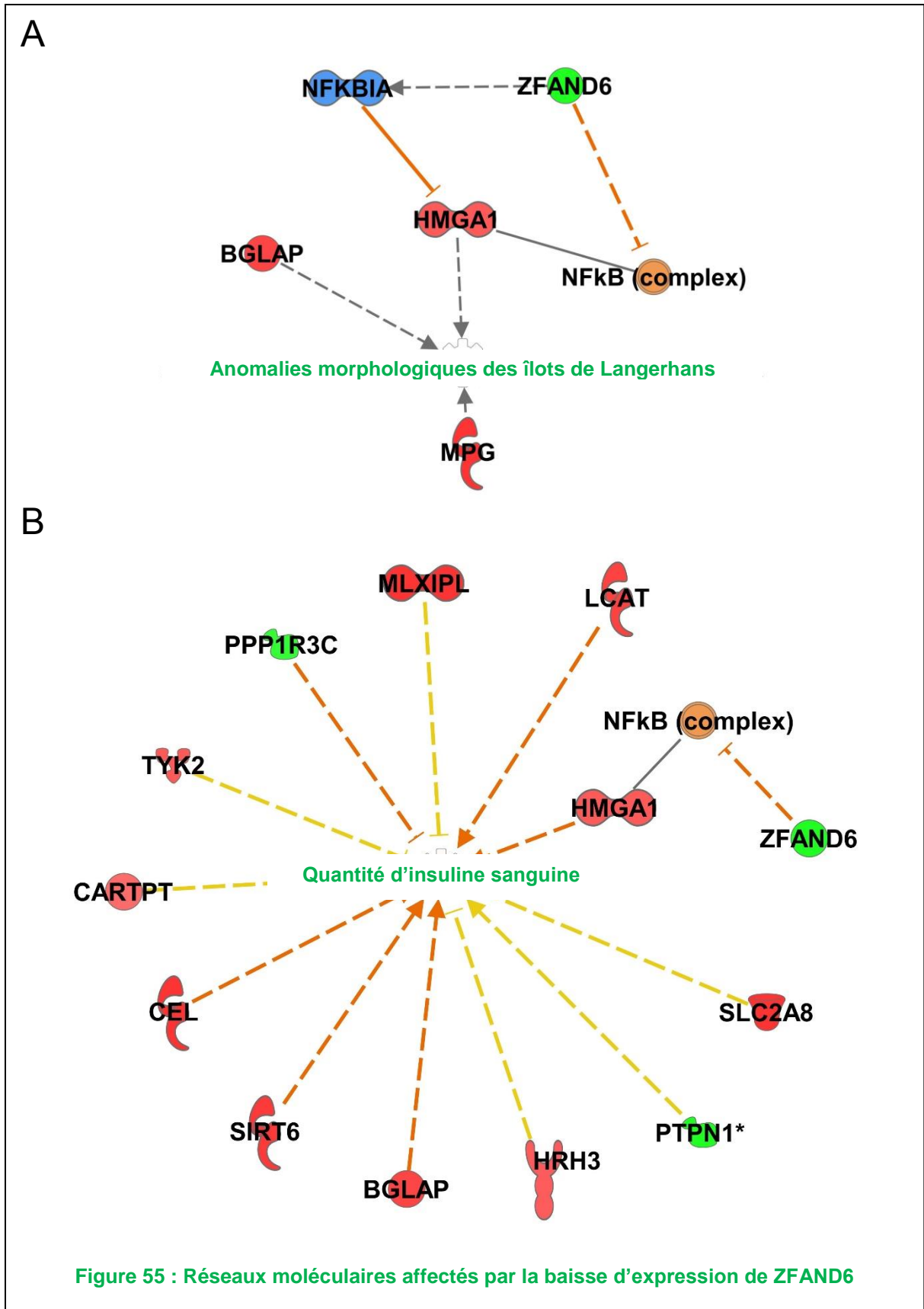


Figure 54 : Réseaux moléculaires affectés par la baisse d'expression de *ZFAND3*



C

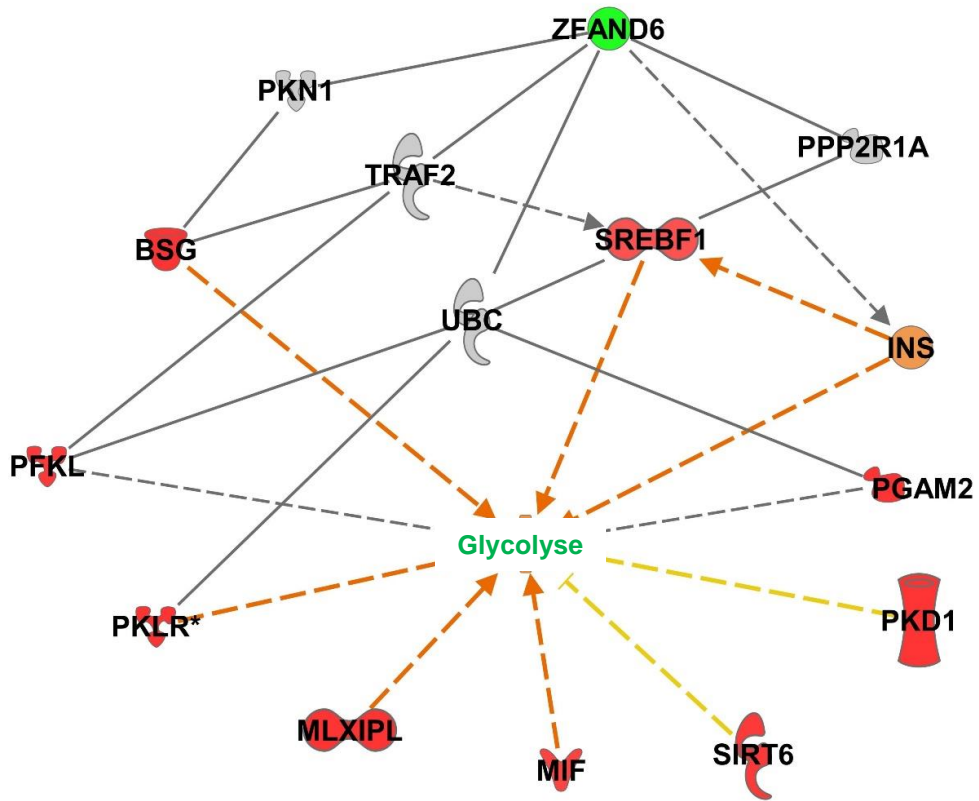


Figure 55 : Réseaux moléculaires affectés par la baisse d'expression de ZFAND6

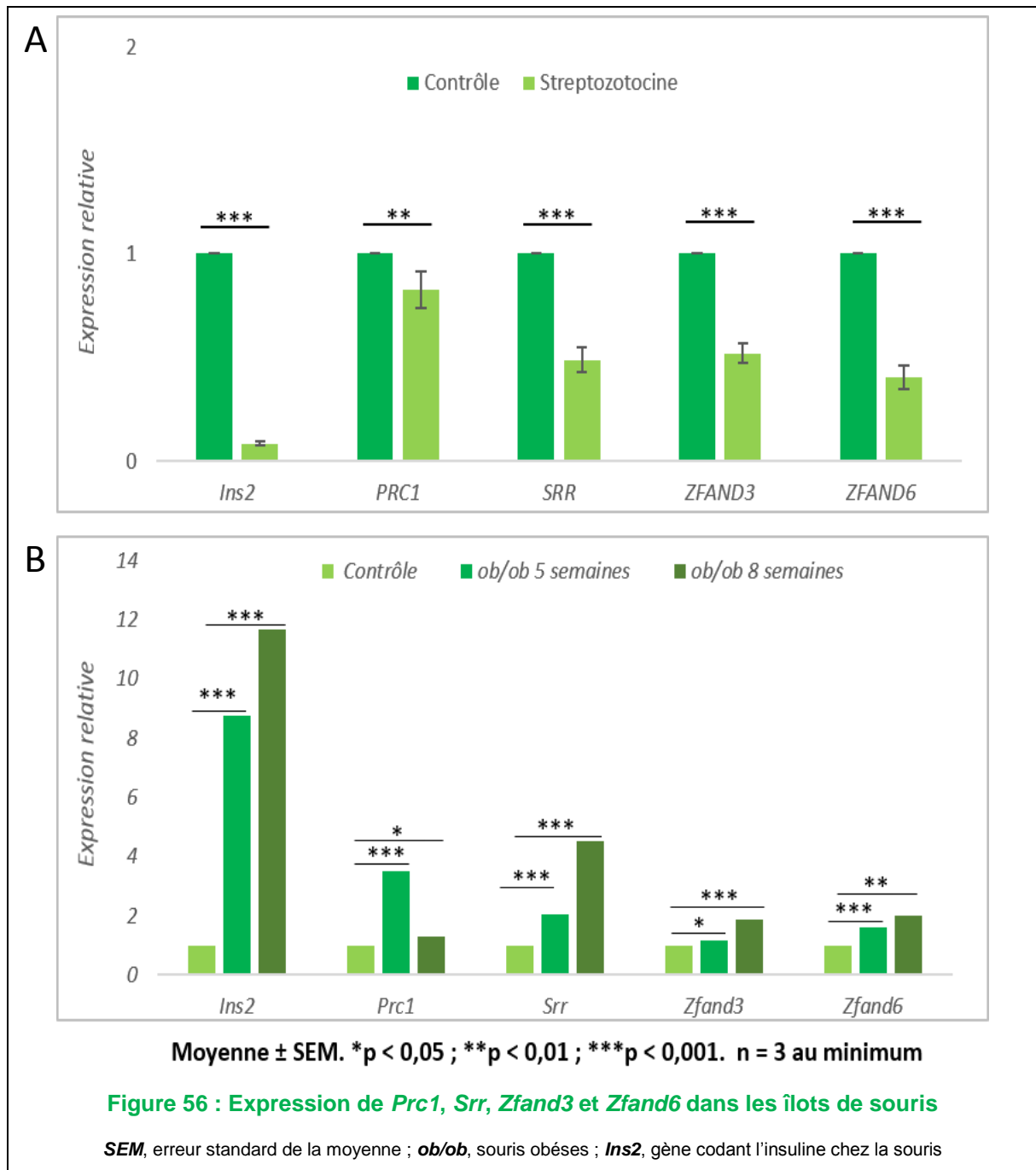
5. Evaluation de *PRC1*, *SRR*, *Zfand3* et *Zfand6* dans les îlots de souris avec une fonction β pancréatique altérée

Après nos résultats de RNA-sequencing, nous avons évalué l'expression de nos quatre gènes phares dans des îlots de souris dont la fonction β pancréatique est modifiée.

La quantification de l'expression de *Prc1*, *Srr*, *Zfand3* et *Zfand6* dans les îlots de souris traitées à la streptozotocine montre que leur expression a baissé de manière significative en corrélation avec la baisse d'expression de l'insuline (**Figure 56A**). Chez les rats rendus diabétiques par traitement à la streptozotocine, les signes cliniques observés sont une hyperglycémie persistante, un arrêt de la croissance pondérale, une perte de poids et une baisse de la sécrétion d'insuline accompagnée d'une polydipsie (prise de boisson multipliée par 10), d'une polyurie et d'une polyphagie (243). Ce qui est assez similaire à ce qui est observé chez les patients diabétiques non-traités (4).

Lorsque nous avons, par PCR quantitative, évalué l'expression de *Prc1*, *Srr*, *Zfand3* et *Zfand6* dans les îlots de souris obèses âgées de 5 et 8 semaines, nous avons observé une augmentation significative de l'expression de nos 4 gènes corrélée positivement à l'augmentation de l'expression du gène de l'insuline (**Figure 56B**). Comme rappelé plus haut (cf supra **Matériel et Méthode/10.2- Les souris *ob/ob***), les souris *ob/ob* présentent une hyperplasie des îlots pancréatiques, avec une sécrétion d'insuline augmentée. Ces souris portent une mutation autosomale récessive (Cytidine en Thymidine dans le codon 105 qui cause la modification d'une Arginine en un codon stop) sur le gène de la leptine qui génère une protéine tronquée et biologiquement inactive (305). La leptine est une hormone sécrétée en grande partie par les adipocytes matures du tissu adipeux ; elle régule la prise alimentaire, la satiété et donc le poids et la dépense énergétique. Beaucoup des effets physiologiques de la leptine sont médiés par le système nerveux central, en particulier l'hypothalamus (305–307), mais elle peut aussi avoir une action dans d'autres organes. Lorsqu'elle se lie à son récepteur exprimé par les cellules β pancréatiques, elle déclenche un signal aboutissant à l'inhibition de la sécrétion d'insuline ce qui pourrait expliquer l'amélioration de la fonction de la cellule β pancréatique chez les souris *ob/ob* (308).

Ces résultats confirment donc le rôle de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6* dans la survie et la fonction de la cellule β pancréatique.



6. Confirmation de la baisse d'expression de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6* au niveau protéique

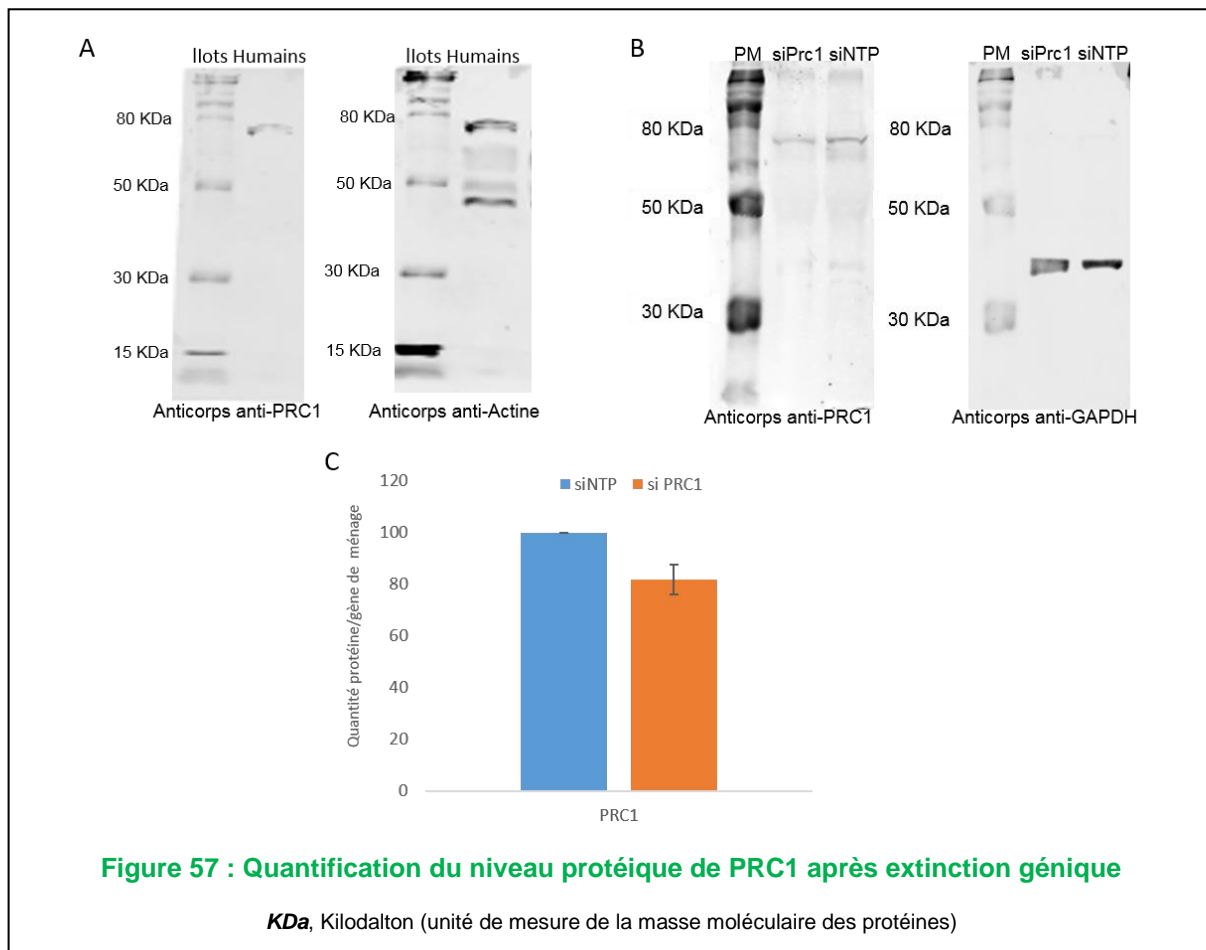
Nous avons voulu vérifier la baisse d'expression de nos quatre gènes phare *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6* au niveau protéique après extinction des gènes par siRNA. Pour cela nous avons fait du western blot. Après extinction génique par siRNA nous avons observé pour

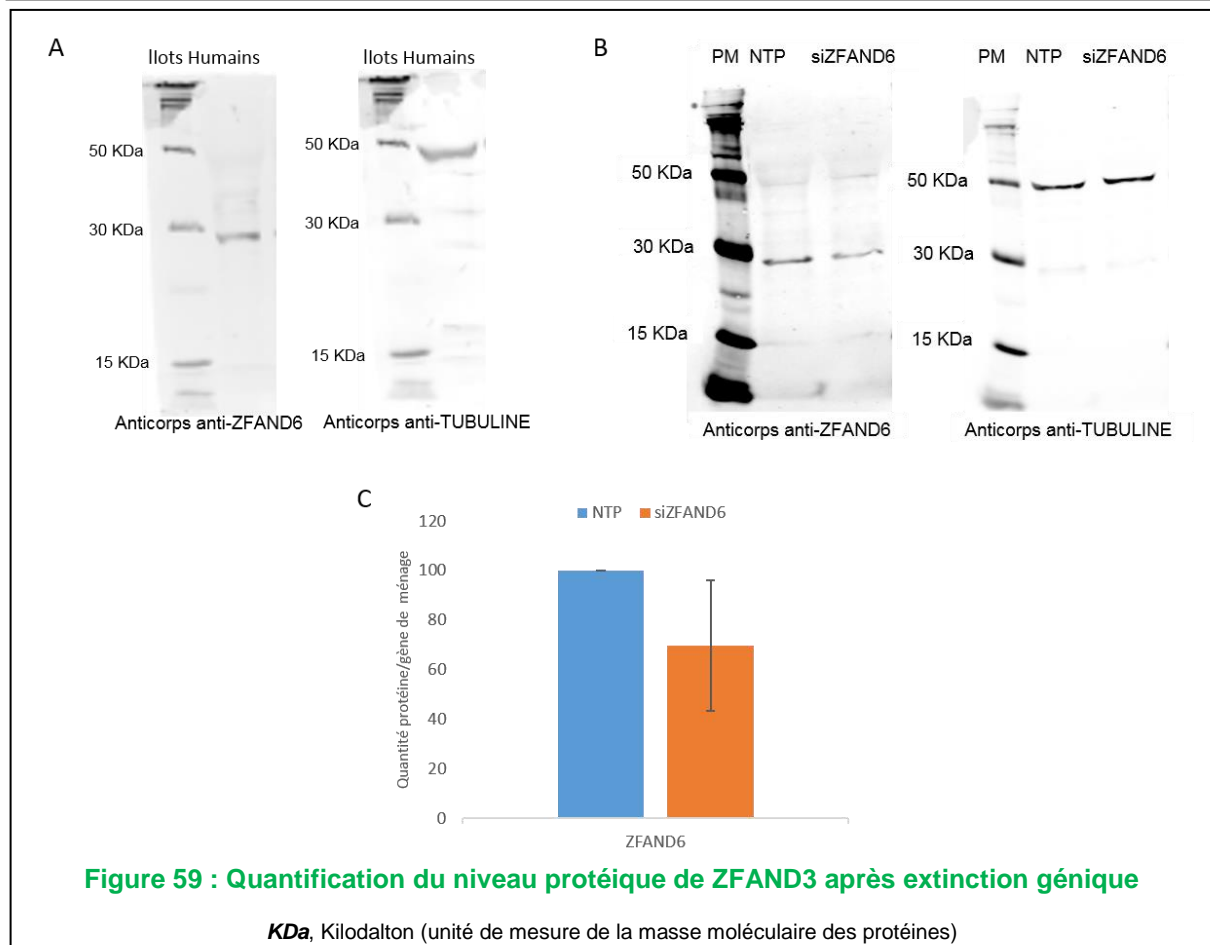
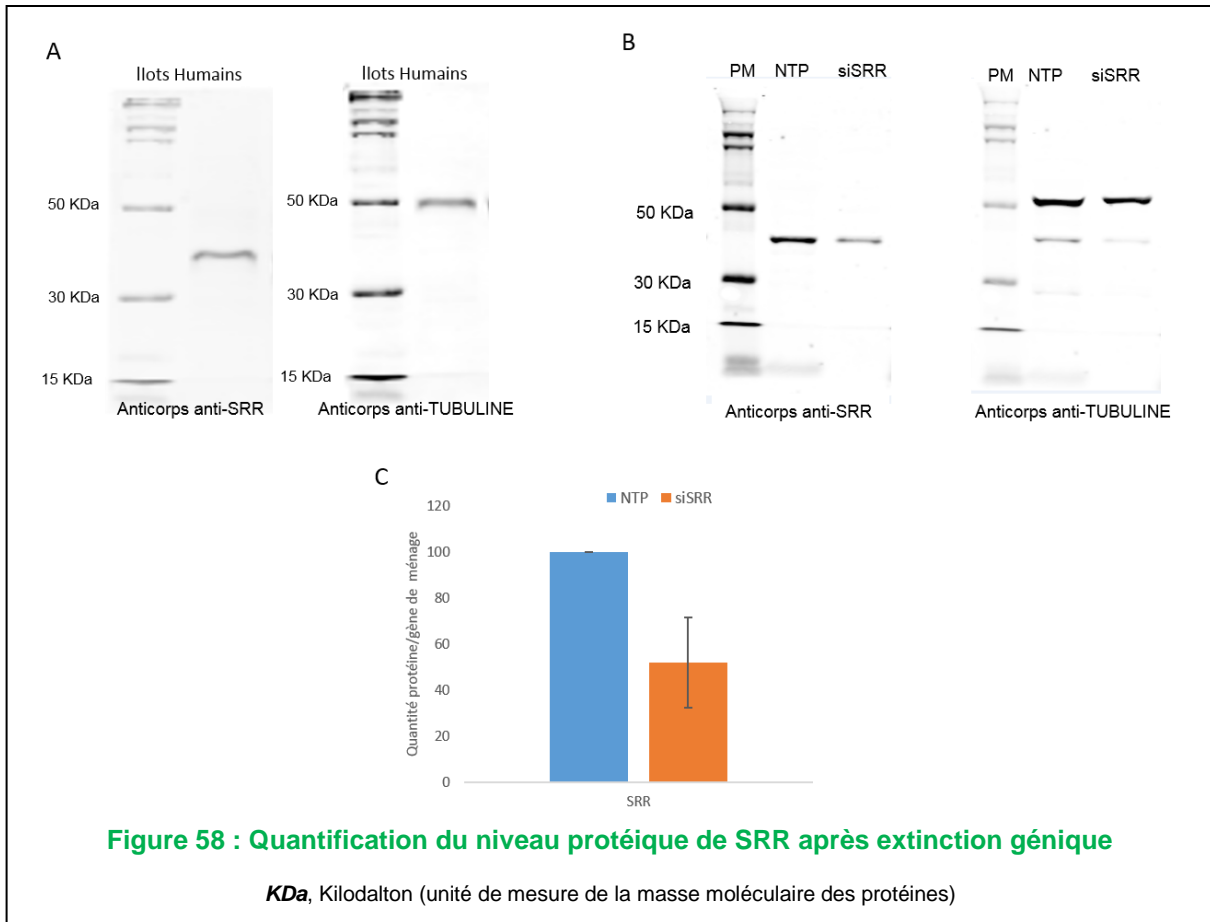
- *PRC1* une baisse moyenne de ~ 23% de la quantité de protéines (**Figure 57B, C**)

- SRR une baisse moyenne de ~ 49% de la quantité de protéines (**Figure 58B, C**)
- ZFAND6 une baisse moyenne de ~ 30% de la quantité de protéines (**Figure 59B, C**)

Pour *ZFAND3*, nous n'avons pas pu confirmer son extinction au niveau protéique par western blot faute d'anticorps spécifiques. En effet nous avons testé quatre anticorps différents poly et monoclonaux de différents fournisseurs, avec différentes mises au point, mais sans résultat satisfaisant. L'expression de *ZFAND3* dans les cellules β a toutefois été confirmée dans une étude transcriptomique de *single cell* dans des îlots pancréatiques humains (309) (**Figure 60**).

Nous avons aussi en parallèle reconfirmé l'expression de *PRC1* (**Figure 57A**), *SRR* (**Figure 58A**) et *ZFAND6* (**Figure 59A**) au niveau protéique dans des îlots pancréatiques humains par western blot.





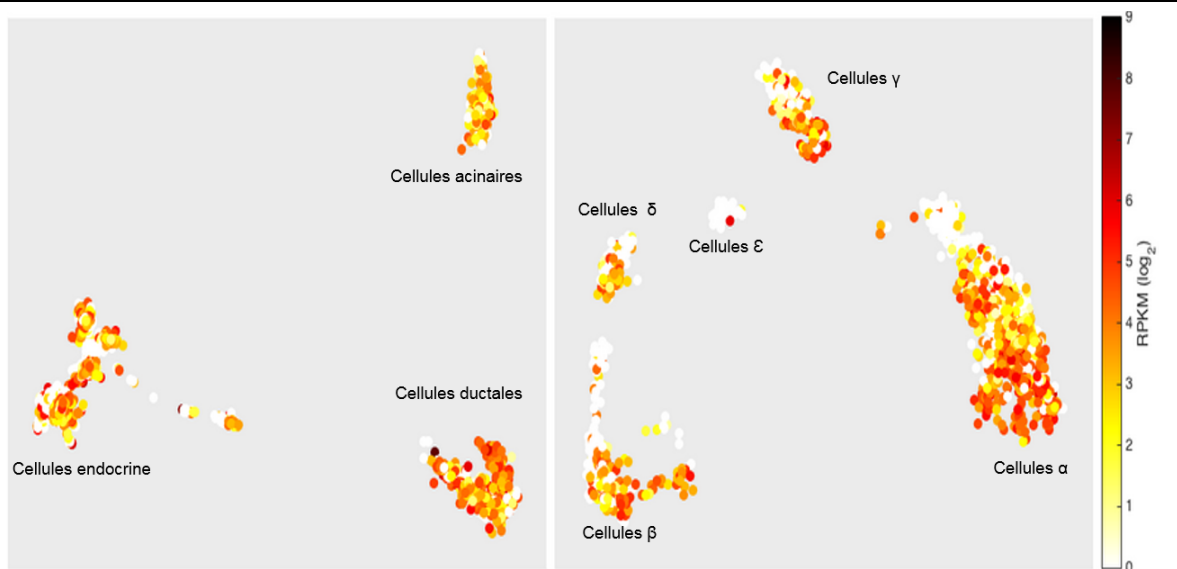


Figure 60 : Expression de ZFAND3 par RNAseq sur « *single cell* » dans différents types cellulaires du pancréas

(Source: Segerstolpe et al. Cell Metabolism; 2016 [<http://sandberg.cmb.ki.se/pancreas/>])

RPKM, read per kilobase per million mapped reads (unité permettant la quantification de l'expression génique après RNA-seq)

Conclusion et Discussion générale

Plusieurs loci ont été identifiés par les GWAS comme associés au diabète de type 2 mais leur lien de causalité avec la maladie n'avait pas été démontré auparavant pour la grande majorité d'entre eux. Nous avons par une étude d'expression non biaisée, montré que l'expression des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 est significativement enrichis dans les cellules β pancréatiques humaines. Ces premiers résultats d'expression nous ont permis une priorisation de ces gènes de susceptibilité au diabète de type 2 pour ensuite faire des études fonctionnelles. Pour certains de ces gènes associés au diabète de type 2, leur rôle dans la cellule β était inconnu, notre étude a permis de mettre en évidence leur rôle dans la fonction de la cellule β et notamment dans la sécrétion d'insuline. Elle a aussi permis de confirmer des résultats concernant l'effet sur la sécrétion d'insuline pour certains de ces gènes de susceptibilité au diabète de type 2 ou encore la clarification de résultats discordants. Mon travail de thèse a aussi montré l'importance des GWAS, qui ont mis en évidence des centaines de variants génétiques associés au risque de diabète de type 2. Mais, aussi que des études fonctionnelles post-GWAS de ces gènes sont importantes et permettent de définir leur lien de causalité avec la maladie, ce qui peut mener à des progrès sur la compréhension de la physiopathologie du diabète de type 2. Nous avons aussi mis en évidence par des analyses RNA-seq après invalidation partielle de *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6*, non connus dans la cellule β pancréatique, des réseaux moléculaires relatifs à des pathways physiologiques clés contribuant au diabète de type 2. La multiplicité des gènes qui contribuent au risque du diabète de type 2 commun rend difficile la détermination précise du risque ou encore le développement d'une stratégie thérapeutique ou préventive sélective basée sur le profil génétique. Des études comme la nôtre permettent de mettre en exergue des gènes potentiellement importants pour la recherche de traitement (exemple *SRR*).

Ces deux dernières années, d'autres études fonctionnelles ont été menées sur les gènes de susceptibilité au diabète de type 2 (310–312). Dans une de ces études, pour 75 régions associées au diabète de type 2, les auteurs ont cherché, pour les SNP associés au diabète de type 2 dans ces régions, lequel des trois gènes qui lui sont le plus proche serait affecté par l'effet du SNP (310). Les auteurs ont ensuite évalué l'effet de ces gènes sur la fonction de la cellule β pancréatique, et ont identifié 45 gènes impliqués dans la fonction de la cellule β avec 3 gènes (*ARL15*, *ZMIZ1* and *THADA*) ayant des rôles précédemment inconnus ou très peu décrits dans la cellule β pancréatique. Dans une autre étude, ZENG et ses collaborateurs ont pour trois gènes

de susceptibilité au diabète de type 2 (*CDKALI*, *KCNQ1* et *KCNJ11*) généré des cellules souches différenciées en cellules β et des souris knockout pour ces gènes, afin d'étudier leur effet sur la sécrétion d'insuline *in vitro* et *in vivo* (311). Les auteurs ont rapporté que les mutations bi-alléliques dans ces gènes, altèrent la sécrétion d'insuline que cela soit *in vivo* chez la souris et *in vitro* sur des cellules souches. Ils ont identifié le composé T5224, qui permettrait de corriger les altérations de la fonction de la cellule β pancréatique associées aux mutations de *CDKALI* en inhibant la voie FOS/JUN. Une dernière étude a également été faite chez le zebrafish. Et dans cette étude, les auteurs ont montré que certains des gènes de susceptibilité au diabète de type 2 auraient un effet sur la masse de cellules β (312). Sur 62 loci humains associés au diabète de type 2 testés, 25 gènes ont été identifiés nécessaires pour le maintien de la masse de cellules β , montrant ainsi leur rôle dans un phénotype physiologique directement lié au diabète de type 2. Parmi ces gènes, 16 n'avaient pas encore été reportés comme impliqués dans la régulation de la masse de cellules β .

Dans certains loci associés au diabète de type 2, il peut y avoir plusieurs gènes causaux potentiels. Le gène le plus proche du SNP est souvent choisi comme celui affecté par ce dernier, mais des études de la conformation spatiale de l'ADN permettraient de savoir réellement quel gène est affecté par ce SNP. En effet, la chromatine étant organisée sous la forme de boucles créant des liens entre des séquences physiquement éloignées, un variant pourrait affecter un gène qui est linéairement éloigné. Comme par exemple dans le cas de *FTO* dont les SNP associés à l'obésité semblent engendrer des modifications de l'expression ou de la régulation de gènes plus éloignés linéairement. L'utilisation de techniques comme le NG Capture-C « *Next Generation Capture-C* », le 3C-seq « *Chromosome Conformation Capture* » ou encore le Hi-C etc pourrait permettre de désigner de manière plus fiable les gènes de susceptibilité à la maladie. Un autre exemple sur l'attribution parfois erronée du gène affecté par un SNP dans un locus est le cas de *STARD10*. Des études initiales avaient désigné *ARAP1* comme le gène affecté du locus. Mais des études récentes contredisent cette hypothèse et proposent plutôt *STARD10* comme le gène associé au diabète de type 2 à ce locus (313–315). Les données de *fine mapping*, de capture de la conformation chromatinienne, des études promoteurs-rapporteurs dans des modèles de cellule β , des données de cis-eQTL dans des échantillons d'îlots et les modèles *knockout* globaux et spécifiques ont tous été utilisés pour générer des preuves complémentaires confirmant que *STARD10* était le gène affecté à ce locus (315). Cela montre aussi l'importance d'adopter une approche intégrative, qui certes ne peut pas être faite pour un grand nombre de

gènes mais qui pourrait être intéressante pour affiner les mécanismes par lesquels des gènes comme *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6* affectent la sécrétion d'insuline.

Perspectives

Notre approche pourrait être étendue à d'autres gènes de susceptibilité au diabète de type 2 et permettrait de progresser vers une meilleure stratification des patients. De même, les résultats de nos analyses fonctionnelles pourront être associés à des données complémentaires issues, de capture de conformation de la chromatine et d'études cis-eQTL afin de prioriser les gènes pour des études de suivi. Cela servirait aussi pour une future médecine de précision basée sur le génotypage des SNP dans des gènes partageant les mêmes signatures fonctionnelles.

Pour des gènes comme *FAF1*, *KLHDC5*, *MPHOSPH9* ou *KLHDC5* dont les extinctions n'ont pas d'effets significatifs sur la sécrétion d'insuline, ces gènes pourraient avoir une expression augmentée chez les diabétiques, ce qui expliquerait que nous n'ayons pas d'effet significatif après leur baisse d'expression.

Pour avoir le mécanisme exact par lequel *PRC1*, *SRR*, *ZFAND3* et *ZFAND6* affectent la sécrétion d'insuline, il serait intéressant de pousser ces études plus loin en générant par exemple des souris invalidées spécifiquement dans la cellule β pour ces gènes. Ce qui permettrait pour des cibles comme *SRR* de générer et de tester des molécules permettant de potentialiser son effet ce qui devrait avoir comme effet une augmentation de la D-serine et activation des NMDAR favorisant ainsi la sécrétion d'insuline dont l'altération est la cause principale du diabète.

Tout comme dans le cas du diabète, la susceptibilité génétique à l'obésité est hétérogène. Dans une fraction de la population, l'obésité est due à des mutations rares dans un gène ou des anomalies chromosomiques, ce qui entraîne généralement une apparition précoce et une obésité extrême. Des variations génétiques rares et à haut risque dans un peu plus d'une vingtaine de gènes, sont connues pour provoquer l'obésité monogénique (316,317). Pour la majorité de la population, l'obésité est multifactorielle et polygénique, avec de multiples variants génétiques fréquents ayant des effets modestes qui contribuent à la susceptibilité au gain de poids. Jusqu'à aujourd'hui, plus de 200 variants communs ont été identifiés comme associés à l'obésité polygénique, à l'IMC et aux mesures de la répartition de la masse grasse (317,318). Cependant, les mécanismes par lesquels la susceptibilité génétique à l'obésité fonctionne ne sont pas bien connus à ce jour. Les mécanismes potentiellement modifiables, y compris les comportements alimentaires, présentent un intérêt particulier pour la santé publique. Après l'étude des gènes

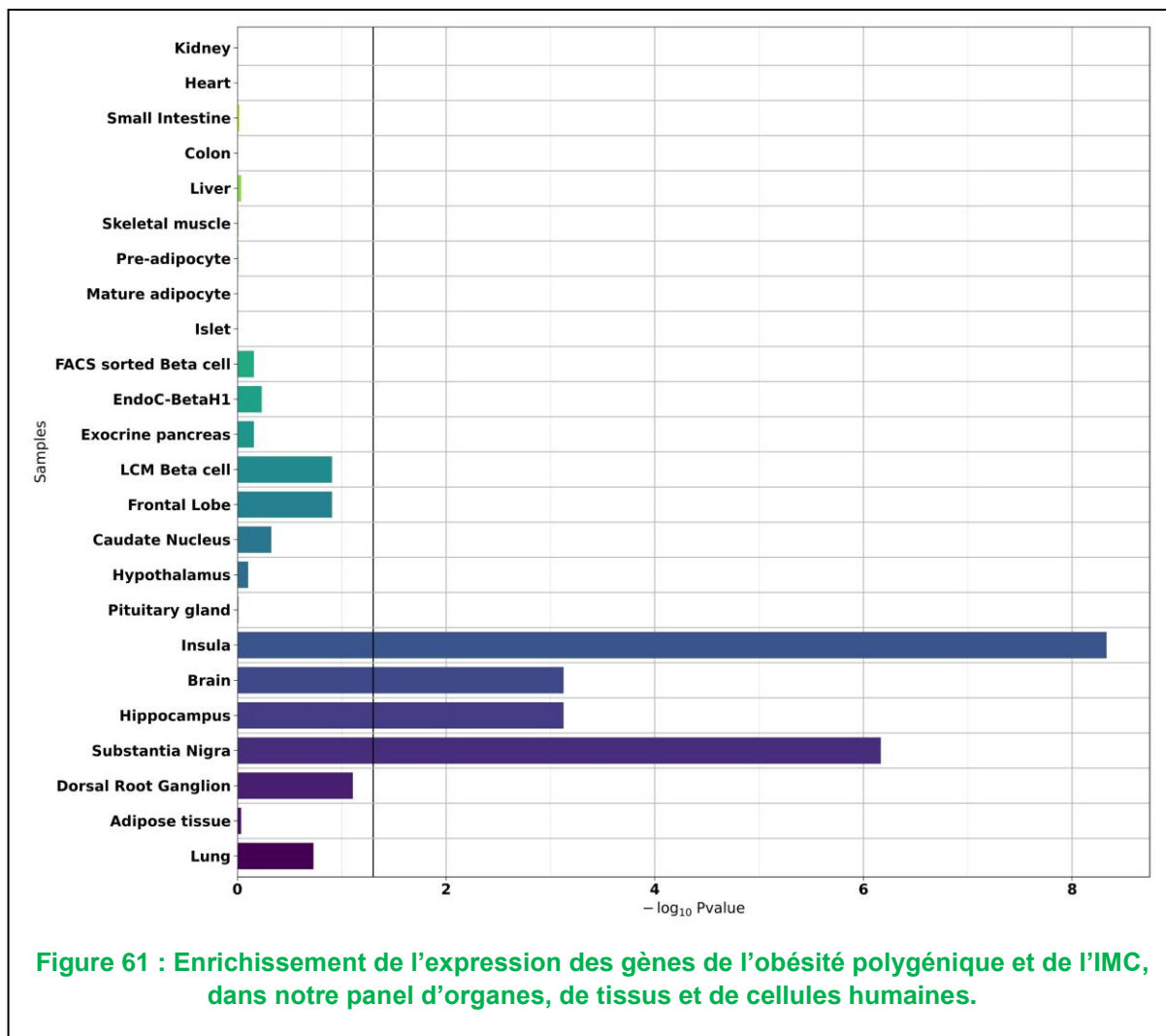
de susceptibilité au diabète de type 2, nous avons voulu étendre notre étude aux gènes de susceptibilité à l'obésité.

But de notre étude :

L'analyse de l'expression des gènes de susceptibilité à l'obésité par NanoString sur notre panel de tissus humains (cf supra **Matériel et Méthodes/1- Echantillons du panel de tissus humain**) a montré une augmentation significative de l'expression de ces gènes dans le cerveau entier, l'hippocampe mais aussi de manière intéressante dans des zones cérébrales particulières tel que l'insula et la substantia nigra qui sont des régions impliquées dans le système de récompense (**Figure 61**). Notre idée est de faire un score de risque génétique basé sur les SNP associés à l'IMC et situés à proximité des gènes fortement exprimés dans la substantia nigra et l'insula, et d'évaluer l'association entre ce GRS et le comportement alimentaire en utilisant les données de GWAS pour la génération du GRS dans trois cohortes utilisées dans l'étude de STUTZMANN et ses collaborateurs (319):

- La cohorte du centre national de la recherche scientifique et de l'Hôtel-Dieu (1004 enfants obèses et 313 enfants non-obèses, 2438 adultes obèses et 2009 adultes non-obèses)
- La cohorte DESIR "*Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome*" (2147 femmes et 2405 hommes volontaires assurés par la sécurité sociale âgés entre 30 et 65 ans à leur inclusion dans la cohorte)
- La NFBC "*Nothern Finland Birth cohort 1986*" (5612 enfants de types Caucasiens nés à Oulu et Lapland entre le 1^{er} juillet 1985 et 30 juin 1986)

La priorisation des gènes dans notre étude se fera en fonction de leur niveau d'expression dans l'insula et la substantia nigra.



Bibliographie

1. William T. Cefalu, Bakris G, Lawrence Blonde, Boulton AJM, David D'Alessio, Groot M de, et al. STANDARDS OF MEDICAL CARE IN DIABETES—2017. ISSN 0149-5992 J Clin Appl Res Educ. janv 2017;40.
2. Loriaux DL. Diabetes and The Ebers Papyrus: 1552 B.C. The Endocrinologist. mars 2006;16(2):55-6.
3. King K, Rubin G. A history of diabetes: from antiquity to discovering insulin. Br J Nurs. 2003;12(18).
4. DIETRICH VON ENGELHARDT. Diabetes It's Medical and Cultural History. Springer-Verlag. Berlin; 1989.
5. Macfarlane I. Mathew Dobson (1735-1784) and diabetes. Med Hist. 1993;(7):15–22.
6. Polonsky KS. The Past 200 Years in Diabetes. N Engl J Med. 4 oct 2012;367(14):1332-40.
7. Collaboration NRF, others. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4· 4 million participants. The Lancet. 2016;387(10027):1513–1530.
8. Tabish SA. Is diabetes becoming the biggest epidemic of the twenty-first century? Int J Health Sci. 2007;1(2):V.
9. Agardh E, Allebeck P, Hallqvist J, Moradi T, Sidorchuk A. Type 2 diabetes incidence and socio-economic position: a systematic review and meta-analysis. Int J Epidemiol. 1 juin 2011;40(3):804-18.
10. Sommer I, Griebler U, Mahlknecht P, Thaler K, Bouskill K, Gartlehner G, et al. Socioeconomic inequalities in non-communicable diseases and their risk factors: an overview of systematic reviews. BMC Public Health. déc 2015. DOI 10.1186/s12889-015-2227-y.
11. Hu FB. Globalization of Diabetes: The role of diet, lifestyle, and genes. Diabetes Care. 1 juin 2011;34(6):1249-57.
12. Chan JC, Malik V, Jia W, Kadowaki T, Yajnik CS, Yoon K-H, et al. Diabetes in Asia: epidemiology, risk factors, and pathophysiology. Jama. 2009;301(20):2129–2140.
13. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas. Brussels: International Diabetes Federation; 2015.
14. Taplin CE, Barker JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. Autoimmunity. janv 2008;41(1):11-8.
15. Pilla SJ, Maruthur NM, Schweitzer MA, Magnuson TH, Potter JJ, Clark JM, et al. The Role of Laboratory Testing in Differentiating Type 1 Diabetes from Type 2 Diabetes in Patients Undergoing Bariatric Surgery. Obes Surg. 10 juill 2017.DOI 10.1007/s11695-017-2804-5.

16. Bonifacio E, Vito Lampasona, Polly J. Bingley. IA-2 (Islet Cell Antigen 512) Is the Primary Target of Humoral Autoimmunity Against Type 1 Diabetes-Associated Tyrosine Phosphatase Autoantigens. *J Immunol.* 1998;161:2648–2654.
17. Bonifacio E, Lampasona V, Genovese S, Ferrari M, Bosi E. Identification of protein tyrosine phosphatase-like IA2 (islet cell antigen 512) as the insulin-dependent diabetes-related 37/40K autoantigen and a target of islet-cell antibodies. *J Immunol.* 1995;155(11):5419–5426.
18. Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR. Relationship of the 37,000-and 40,000-M (r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest.* 1995;96(3):1506.
19. Wenzlau JM, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, et al. The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(43):17040–17045.
20. Kumar A, de Leiva A. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) in Asian and European populations. *Diabetes Metab Res Rev.* juill 2017;33(5):e2890.
21. Furlanos S, Dotta F, Greenbaum CJ, Palmer JP, Rolandsson O, Colman PG, et al. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent. *Diabetologia.* nov 2005;48(11):2206-12.
22. Organization WH, others. Diagnostic criteria and classification of hyperglycaemia first detected in pregnancy. 2013.
23. HAPO Study Cooperative Research. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med.* 2008;2008(358):1991–2002.
24. Egeland GM, Meltzer SJ. Following in mother's footsteps? Mother-daughter risks for insulin resistance and cardiovascular disease 15 years after gestational diabetes. *Diabet Med.* mars 2010;27(3):257-65.
25. Lee H, Jang HC, Park HK, Cho NH. Early manifestation of cardiovascular disease risk factors in offspring of mothers with previous history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* nov 2007;78(2):238-45.
26. Lee H, Jang HC, Park HK, Metzger BE, Cho NH. Prevalence of type 2 diabetes among women with a previous history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* juill 2008;81(1):124-9.
27. Kim C, Newton KM, Knopp RH. Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(10):1862–1868.
28. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Consensus Panel. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care.* 1 mars 2010;33(3):676-82.

29. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 1 janv 2014;37(Supplement_1):S81-90.
30. Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*. 1989;44(3):388.
31. Kaplan J, Delpuch M. *Biologie moléculaire et médecine (2e édition)*. Médecine-Sciences Flammarion, Paris. Médecine-Sciences Flammarion, Paris (1993).
32. Plaetke R, Byerley WF, Koehle W. Programs for Determining Parameters in Complex Genetic Models for Linkage Analysis: GEN-PAR and EPI-PAR. *Genetic Epidemiology*. *Genetic Epidemiology* 8:425-427 (1991).
33. Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, G V, Zouali H, MO B, et al. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*. 12 mars 1992;3.
34. Jose C. Florez. *The Genetics of Type 2 Diabetes and Related Traits Biology, Physiology and Translation*. Springer. Jose C. Florez; 2014. 571 p.
35. Risch N, Merikangas K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Diseases. *Science*. sept 1996;1516-7.
36. Reich DE, Lander ES. On the allelic spectrum of human disease. *TRENDS Genet*. 2001;17(9):502-510.
37. Vaxillaire M, Bonnefond A, Froguel P. The lessons of early-onset monogenic diabetes for the understanding of diabetes pathogenesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. avr 2012;26(2):171-87.
38. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, et al. Familial Hyperglycemia Due to Mutations in Glucokinase -- Definition of a Subtype of Diabetes Mellitus. *The New England Journal of Medicine*. 1993. DOI 10.1056/NEJM199303113281005
39. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, et al. A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nature Genetics*. *Nat Genet*. 1995 Apr;9(4):418-23. 1995;418-23.
40. Yamagata K, Oda N, Kaisaki P, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*. 1996 Dec 5;384(6608):455-8.
41. Bell GI, Xiang K, Newman MV, Wu S, Wright LG, Fajans SS, et al. Gene for non-insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88(4):1484-1488.
42. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki P, Menzel S, Cox N, et al. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature*. 1996 Dec 5;384(6608):458-60.

43. Smith SB, Qu H-Q, Taleb N, Kishimoto NY, Scheel DW, Lu Y, et al. Rfx6 directs islet formation and insulin production in mice and humans. *Nature*. 11 févr 2010;463(7282):775-80.
44. Bonnefond A, Vaillant E, Philippe J, Skrobek B, Lobbens S, Yengo L, et al. Transcription factor gene MNX1 is a novel cause of permanent neonatal diabetes in a consanguineous family. *Diabetes & Metabolism*. 2013. DOI 10.1016/j.diabet.2013.02.007
45. Flanagan SE, De Franco E, Lango Allen H, Zerah M, Abdul-Rasoul MM, Edge JA, et al. Analysis of Transcription Factors Key for Mouse Pancreatic Development Establishes NKX2-2 and MNX1 Mutations as Causes of Neonatal Diabetes in Man. *Cell Metab*. janv 2014;19(1):146-54.
46. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Dechaume A, Huyvaert M, Montagne L, et al. Whole-Exome Sequencing and High Throughput Genotyping Identified KCNJ11 as the Thirteenth MODY Gene. *Brusgaard K, éditeur. PLoS ONE*. 11 juin 2012;7(6):e37423.
47. Allen HL, Flanagan SE, Shaw-Smith C, De Franco E, Akerman I, Caswell R, et al. GATA6 haploinsufficiency causes pancreatic agenesis in humans. *Nat Genet*. 11 déc 2011;44(1):20-2.
48. Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6. 2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1838-1849.
49. Beltrand J. Livre des résumés congrés SFD Lille 2017 (CO-42). *Société Francoph Diabète*. 2017;74.
50. Njølstad P al R, Søvik O, Cuesta-Muñoz A, Bjørkhaug L, Massa O, Barbetti F, et al. Neonatal diabetes mellitus due to complete glucokinase deficiency. *N Engl J Med*. 2001;344(21):1588-1592.
51. Bonnefond A, Froguel P. Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metab*. 3 mars 2015;21(3):357-68.
52. Velho G, Blanche H, Vaxillaire M, Bellanne-Chantelot C, Pardini VC, Timsit J, et al. Identification of 14 new glucokinase mutations and description of the clinical profile of 42 MODY-2 families. *Diabetologia*. 1997;40(2):217-224.
53. Feigerlová E, Pruhová š., Dittertová L, Lebl J, Pinterová D, Kološtová K, et al. Aetiological heterogeneity of asymptomatic hyperglycaemia in children and adolescents. *Eur J Pediatr*. juill 2006;165(7):446-52.
54. Steele AM, Shields BM, Wensley KJ, Colclough K, Ellard S, Hattersley AT. Prevalence of Vascular Complications Among Patients With Glucokinase Mutations and Prolonged, Mild Hyperglycemia. *JAMA*. 15 janv 2014;311(3):279.
55. Negahdar M, Aukrust I, Johansson BB, Molnes J, Molven A, Matschinsky FM, et al. GCK-MODY diabetes associated with protein misfolding, cellular self-association and degradation. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. nov 2012;1822(11):1705-15.

56. Negahdar M, Aukrust I, Molnes J, Solheim MH, Johansson BB, Sagen JV, et al. GCK-MODY diabetes as a protein misfolding disease: The mutation R275C promotes protein misfolding, self-association and cellular degradation. *Mol Cell Endocrinol.* janv 2014;382(1):55-65.
57. Steele AM, Wensley KJ, Ellard S, Murphy R, Shepherd M, Colclough K, et al. Use of HbA1c in the Identification of Patients with Hyperglycaemia Caused by a Glucokinase Mutation: Observational Case Control Studies. *Lin X (Erick), éditeur. PLoS ONE.* 14 juin 2013;8(6):e65326.
58. Stride A, Shields B, Gill-Carey O, Chakera AJ, Colclough K, Ellard S, et al. Cross-sectional and longitudinal studies suggest pharmacological treatment used in patients with glucokinase mutations does not alter glycaemia. *Diabetologia.* janv 2014;57(1):54-6.
59. Pearson ER, Boj SF, Steele AM, Barrett T, Stals K, Shield JP, et al. Macrosomia and Hyperinsulinaemic Hypoglycaemia in Patients with Heterozygous Mutations in the HNF4A Gene. *Group LC, éditeur. PLoS Med.* 3 avr 2007;4(4):e118.
60. Gupta RK, Vatamaniuk MZ, Lee CS, Flaschen RC, Fulmer JT, Matschinsky FM, et al. The MODY1 gene HNF-4 α regulates selected genes involved in insulin secretion. *J Clin Invest.* 1 avr 2005;115(4):1006-15.
61. Flanagan SE, Kapoor RR, Mali G, Cody D, Murphy N, Schwahn B, et al. Diazoxide-responsive hyperinsulinemic hypoglycemia caused by HNF4A gene mutations. *Eur J Endocrinol.* 1 mai 2010;162(5):987-92.
62. Fajans SS, Bell GI. Macrosomia and neonatal hypoglycaemia in RW pedigree subjects with a mutation (Q268X) in the gene encoding hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4A). *Diabetologia.* 5 nov 2007;50(12):2600-1.
63. Bacon S, Kyithar MP, Condrón EM, Vizzard N, Burke M, Byrne MM. Prolonged episodes of hypoglycaemia in HNF4A-MODY mutation carriers with IGT. Evidence of persistent hyperinsulinism into early adulthood. *Acta Diabetol.* déc 2016;53(6):965-72.
64. Kapoor RR, Locke J, Colclough K, Wales J, Conn JJ, Hattersley AT, et al. Persistent Hyperinsulinemic Hypoglycemia and Maturity-Onset Diabetes of the Young Due to Heterozygous HNF4A Mutations. *Diabetes.* 1 juin 2008;57(6):1659-63.
65. McGlacken-Byrne SM, Hawkes CP, Flanagan SE, Ellard S, McDonnell CM, Murphy NP. The evolving course of HNF4A hyperinsulinaemic hypoglycaemia-a case series. *Diabet Med.* janv 2014;31(1):e1-5.
66. Thomas PM, Cote GJ, Wohllk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, et al. Mutations in the sulfonylurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Sci-N Y THEN Wash-.* 1995;426-426.
67. Dunne MJ, Kane C, Shepherd RM, Sanchez JA, James RF, Johnson PR, et al. Familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy and mutations in the sulfonylurea receptor. *N Engl J Med.* 1997;336(10):703-706.

68. DeFronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, Alberti GMM, éditeurs. International Textbook of Diabetes Mellitus. In: International Textbook of Diabetes Mellitus. 2015 by John Wiley & Sons, Ltd. 2015.
69. Liu L, Nagashima K, Yasuda T, Liu Y, Hu H, He G, et al. Mutations in KCNJ11 are associated with the development of autosomal dominant, early-onset type 2 diabetes. *Diabetologia*. déc 2013;56(12):2609-18.
70. Lang veronica, Light PE. The molecular mechanisms and pharmacotherapy of ATP-sensitive potassium channel gene mutations underlying neonatal diabetes. *Pharmacogenomics Pers Med*. nov 2010;145.
71. Kolb H, Martin S. Environmental/lifestyle factors in the pathogenesis and prevention of type 2 diabetes. *BMC Med*. déc 2017;15(1). DOI 10.1186/s12916-017-0901-x.
72. Kusnik-Joinville O, Weill A, Ricordeau P, Allemand H. Diabète traité en France en 2007: un taux de prévalence proche de 4% et des disparités géographiques croissantes. *BEH*. 2008;43(2008):409–13.
73. Schulz LO, Bennett PH, Ravussin E, Kidd JR, Kidd KK, Esparza J, et al. Effects of Traditional and Western Environments on Prevalence of Type 2 Diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. *Diabetes Care*. 1 août 2006;29(8):1866-71.
74. WILLIAM C. KNOWLER, Pettitt DJ, Mohammed F. Saad, Peter H. Bennett. Diabetes Mellitus in the Pima Indians: Incidence, Risk Factors and Pathogenesis.
75. Kriska AM, Knowler WC, LaPorte RE, Drash AL, Wing RR, Blair SN, et al. Development of questionnaire to examine relationship of physical activity and diabetes in Pima Indians. *Diabetes Care*. 1990;13(4):401–411.
76. Esparza-Romero J, Valencia ME, Urquidez-Romero R, Chaudhari LS, Hanson RL, Knowler WC, et al. Environmentally Driven Increases in Type 2 Diabetes and Obesity in Pima Indians and Non-Pimas in Mexico Over a 15-Year Period: The Maycoba Project. *Diabetes Care*. nov 2015;38(11):2075-82.
77. Lyssenko V, Jonsson A, Almgren P, Pulizzi N, Isomaa B, Tuomi T, et al. Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2008;359(21):2220–2232.
78. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. août 2014;384(9945):766-81.
79. Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men. *Am J Clin Nutr*. 2005;81(3):555–563.
80. Mokdad AH, Bowman BA, Ford ES. The Continuing Epidemics of Obesity and Diabetes in the United States. *JAMA*. 2001;286(10):1195-1200.

81. Shah A, Laferrère B. Diabetes after Bariatric Surgery. *Can J Diabetes*. août 2017;41(4):401-6.
82. Neeland IJ, Turer AT, Ayers CR, Powell-Wiley TM, Vega GL, Farzaneh-Far R, et al. Dysfunctional adiposity and the risk of prediabetes and type 2 diabetes in obese adults. *Jama*. 2012;308(11):1150–1159.
83. Phillips CM. Metabolically healthy obesity: Definitions, determinants and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*. sept 2013;14(3):219-27.
84. Roberson LL, Aneni EC, Maziak W, Agatston A, Feldman T, Rouseff M, et al. Beyond BMI: The “Metabolically healthy obese” phenotype & its association with clinical/subclinical cardiovascular disease and all-cause mortality—a systematic review. *BMC Public Health*. 2014;14(1):14.
85. Bluher M. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: Are metabolically healthy obese individuals really healthy? *Eur J Endocrinol*. 6 nov 2014;171(6):R209-19.
86. Ballestri S, Zona S, Targher G, Romagnoli D, Baldelli E, Nascimbeni F, et al. Nonalcoholic fatty liver disease is associated with an almost twofold increased risk of incident type 2 diabetes and metabolic syndrome. Evidence from a systematic review and meta-analysis: NAFLD foreruns metabolic syndrome. *J Gastroenterol Hepatol*. mai 2016;31(5):936-44.
87. Sattar N, Gill JM. Type 2 diabetes as a disease of ectopic fat? *BMC Med*. 2014;12(1):123.
88. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants. *Lancet* 2016; 387: 1513–30.
89. Hardoon SL, Morris RW, Thomas MC, Wannamethee SG, Lennon LT, Whincup PH. Is the Recent Rise in Type 2 Diabetes Incidence From 1984 to 2007 Explained by the Trend in Increasing BMI?: Evidence from a prospective study of British men. *Diabetes Care*. 1 juill 2010;33(7):1494-6.
90. Jannasch F, Kröger J, Schulze MB. Dietary Patterns and Type 2 Diabetes: A Systematic Literature Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. *J Nutr*. juin 2017;147(6):1174-82.
91. Schwingshackl L, Hoffmann G, Lampousi A-M, Knüppel S, Iqbal K, Schwedhelm C, et al. Food groups and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Eur J Epidemiol*. mai 2017;32(5):363-75.
92. DiPietro L, Gribok A, Stevens MS, Hamm LF, Rumpler W. Three 15-min Bouts of Moderate Postmeal Walking Significantly Improves 24-h Glycemic Control in Older People at Risk for Impaired Glucose Tolerance. *Diabetes Care*. 1 oct 2013;36(10):3262-8.
93. Parker L, Shaw CS, Banting L, Levinger I, Hill KM, McAinch AJ, et al. Acute Low-Volume High-Intensity Interval Exercise and Continuous Moderate-Intensity Exercise Elicit a Similar Improvement in 24-h Glycemic Control in Overweight and Obese Adults. *Front Physiol*. 9 janv 2017;7.DOI 10.3389/fphys.2016.00661.

94. Kriska AM. Physical Activity, Obesity, and the Incidence of Type 2 Diabetes in a High-Risk Population. *Am J Epidemiol.* 1 oct 2003;158(7):669-75.
95. Weinstein AR, Sesso HD, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, et al. Relationship of physical activity vs body mass index with type 2 diabetes in women. *Jama.* 2004;292(10):1188–1194.
96. Helmrich S, Ragland D, Leung R, Paffenbarger RJ. Physical activity and reduced occurrence of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine.* 1991 Jul 18;325(3):147-52.
97. Grøntved A, Pan A, Mekary RA, Stampfer M, Willett WC, Manson JE, et al. Muscle-Strengthening and Conditioning Activities and Risk of Type 2 Diabetes: A Prospective Study in Two Cohorts of US Women. *PLoS Med.* 14 janv 2014;11(1):e1001587.
98. Steinbrecher A, Erber E, Grandinetti A, Nigg C, Kolonel LN, Maskarinec G. Physical activity and risk of type 2 diabetes among Native Hawaiians, Japanese Americans, and Caucasians: the Multiethnic Cohort. *J Phys Act Health.* 2012;9(5):634–641.
99. Fretts AM, Howard BV, Kriska AM, Smith NL, Lumley T, Lee ET, et al. Physical Activity and Incident Diabetes in American Indians: The Strong Heart Study. *Am J Epidemiol.* 1 sept 2009;170(5):632-9.
100. Burchfiel CM, Sharp DS, Curb JD, Rodriguez BL, Hwang L-J, Marcus EB, et al. Physical activity and incidence of diabetes: the Honolulu Heart Program. *Am J Epidemiol.* 1995;141(4):360–368.
101. Siegel LC, Sesso HD, Bowman TS, Lee I-M, Manson JE, Gaziano JM. Physical Activity, Body Mass Index, and Diabetes Risk in Men: A Prospective Study. *Am J Med.* déc 2009;122(12):1115-21.
102. Grøntved A, Rimm EB, Willett WC, Andersen LB, Hu FB. A Prospective Study of Weight Training and Risk of Type 2 Diabetes Mellitus in Men. *Arch Intern Med.* 24 sept 2012;172(17):1306.
103. Caplan LS, May DS, Richardson LC. Time to diagnosis and treatment of breast cancer: results from the National Breast and Cervical Cancer Early Detection Program, 1991-1995. *Am J Public Health.* 2000;90(1):130.
104. James SA, Jamjoom L, Raghunathan TE, Strogatz DS, Furth ED, Khazanie PG. Physical activity and NIDDM in African-Americans: the Pitt County study. *Diabetes Care.* 1998;21(4):555–562.
105. Krishnan S, Rosenberg L, Palmer JR. Physical Activity and Television Watching in Relation to Risk of Type 2 Diabetes: The Black Women’s Health Study. *Am J Epidemiol.* 13 déc 2008;169(4):428-34.
106. Monterrosa AE, Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP. Sex difference in lifestyle factors predictive of diabetes in Mexican-Americans. *Diabetes Care.* 1995;18(4):448–456.

107. Villegas R, Shu X-O, Li H, Yang G, Matthews CE, Leitzmann M, et al. Physical activity and the incidence of type 2 diabetes in the Shanghai women's health study. *Int J Epidemiol.* 7 nov 2006;35(6):1553-62.
108. Nakanishi N, Takatorige T, Suzuki K. Daily life activity and risk of developing impaired fasting glucose or Type 2 diabetes in middle-aged Japanese men. *Diabetologia.* oct 2004;47(10):1768-75.
109. Fan S, Chen J, Huang J, Li Y, Zhao L, Liu X, et al. Physical Activity Level and Incident Type 2 Diabetes among Chinese Adults: *Med Sci Sports Exerc.* avr 2015;47(4):751-6.
110. Okado K, Tsumura K, Hayashit T, Suematsut G, Endot G, Fujii S. Leisure-time physical activity at weekends and the risk of Type 2 diabetes mellitus in Japanese men: the Osaka Health Survey. *Diabetic Medicine.* 2000 Jan;17(1):53-8. 2000. DOI 10.1046/j.1464-5491.2000.00229.x.
111. Chien K-L, Chen M-F, Hsu H-C, Su T-C, Lee Y-T. Sports activity and risk of type 2 diabetes in Chinese. *Diabetes Res Clin Pract.* juin 2009;84(3):311-8.
112. Lee D -c., Park I, Jun T-W, Nam B-H, Cho S -i., Blair SN, et al. Physical Activity and Body Mass Index and Their Associations With the Development of Type 2 Diabetes in Korean Men. *Am J Epidemiol.* 1 juill 2012;176(1):43-51.
113. Magliano DJ, Barr ELM, Zimmet PZ, Cameron AJ, Dunstan DW, Colagiuri S, et al. Glucose Indices, Health Behaviors, and Incidence of Diabetes in Australia: The Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle Study. *Diabetes Care.* 1 févr 2008;31(2):267-72.
114. Ding D, Chong S, Jalaludin B, Comino E, Bauman AE. Risk factors of incident type 2-diabetes mellitus over a 3-year follow-up: Results from a large Australian sample. *Diabetes Res Clin Pract.* mai 2015;108(2):306-15.
115. Lynch J, Helmrigh SP, Lakka TA, Kaplan GA, Cohen RD, Salonen R, et al. Moderately intense physical activities and high levels of cardiorespiratory fitness reduce the risk of non-insulin-dependent diabetes mellitus in middle-aged men. *Arch Intern Med.* 1996;156(12):1307-1314.
116. HAAPANEN N, MIILUNPALO S, VUORI I, OJA P, PASANEN M. Association of Leisure Time Physical Activity with the Risk of Coronary Heart Disease, Hypertension and Diabetes in Middle-Aged Men and Women. *International Journal of Epidemiology.* Vol. 26, No. 4. 1997.
117. Meisinger C, Löwel H, Thorand B, Döring A. Leisure time physical activity and the risk of type 2 diabetes in men and women from the general population: The MONICA/KORA Augsburg Cohort Study. *Diabetologia.* janv 2005;48(1):27-34.
118. The InterAct Consortium. Physical activity reduces the risk of incident type 2 diabetes in general and in abdominally lean and obese men and women: the EPIC-InterAct Study. *Diabetologia.* juill 2012;55(7):1944-52.

119. Carlsson S, Midthjell K, Tesfamarian MY, Grill V. Age, overweight and physical inactivity increase the risk of latent autoimmune diabetes in adults: results from the Nord-Trøndelag health study. *Diabetologia*. 28 déc 2006;50(1):55-8.
120. Wannamethee SG, Shaper AG, Alberti KGMM. Physical Activity, Metabolic Factors, and the Incidence of Coronary Heart Disease and Type 2 Diabetes. *Archives of internal medicine*. 2000 Jul 24;160(14):2108-16.
121. Hu G, Lindström J, Valle, Timo T. Physical Activity, Body Mass Index, and Risk of Type 2 Diabetes in Patients With Normal or Impaired Glucose Regulation. *Archives of internal medicine*. 2004 Apr 26;164(8):892-6.
122. Demakakos P, Hamer M, Stamatakis E, Steptoe A. Low-intensity physical activity is associated with reduced risk of incident type 2 diabetes in older adults: evidence from the English Longitudinal Study of Ageing. *Diabetologia*. sept 2010;53(9):1877-85.
123. Smith AD, Crippa A, Woodcock J, Brage S. Physical activity and incident type 2 diabetes mellitus: a systematic review and dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetologia*. déc 2016;59(12):2527-45.
124. Aune D, Norat T, Leitzmann M, Tonstad S, Vatten LJ. Physical activity and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose–response meta-analysis. *Eur J Epidemiol*. juill 2015;30(7):529-42.
125. Hamilton MT, Hamilton DG, Zderic TW. Sedentary Behavior as a Mediator of Type 2 Diabetes. In: Goedecke JH, Ojuka EO, éditeurs. *Medicine and Sport Science*. 2014. p. 11-26. DOI 10.1159/000357332.
126. Rockette-Wagner B, Edelstein S, Venditti EM, Reddy D, Bray GA, Carrion-Petersen ML, et al. The impact of lifestyle intervention on sedentary time in individuals at high risk of diabetes. *Diabetologia*. juin 2015;58(6):1198-202.
127. Pirart J. Diagnosis of diabetes; with reference to unrecognized & false diabetes. *Scalpel (Brux)*. 1959 May 16;112(20):483-9.
128. Zimmet P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes—an epidemiological overview. *Diabetologia*. 1982;22(6):399–411.
129. Neel J., Creutzfeldt W, Kobberling J. Geneticist’s Nightmare. In *The Genetics of Diabetes Mellitus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg Heidelberg, pp 1-11. 1976.
130. Vffter K. Diabetes mellitus. WHO Technical Report Series 727. 113 Seiten. World Health Organization, Geneva 1985. Preis: 9.00 Sw. fr. *Mol Nutr Food Res*. 1986;30(7):700.
131. Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins. *Diabetologia*. 1981;20(2):87–93.
132. Moore AF, Florez JC. Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes and Implications for Antidiabetic Therapy. *Annu Rev Med*. févr 2008;59(1):95-111.

133. Poulsen P, Ohm Kyvik K, Vaag A, Beck-Nielsen H. Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance—a population-based twin study. *Diabetologia*. 1999;42(2):139–145.
134. Almgren P, Lehtovirta M, Isomaa B, Sarelin L, Taskinen MR, Lyssenko V, et al. Heritability and familiarity of type 2 diabetes and related quantitative traits in the Botnia Study. *Diabetologia*. nov 2011;54(11):2811–9.
135. Silander K, Mohlke KL, Scott LJ, Peck EC, Hollstein P, Skol AD, et al. Genetic variation near the hepatocyte nuclear factor-4 α gene predicts susceptibility to type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53(4):1141–1149.
136. Grant SFA, Gudmar Thorleifsson, Reynisdottir I, Rafn Benediktsson, Manolescu A, Andrei Manolescu. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*. volume 38 number 3. mars 2006;320–3.
137. Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamäki J, Mykkänen L, Kuusisto J, et al. A Pro12Ala substitution in PPAR γ 2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*. 1998;20(3).
138. David Altshuler, Hirschhorn JN, Mia Klannemark, Lindgren CM, Vohl M-C, James Nemesh, et al. The common PPAR γ Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nature Genetics*. sept 2000;76–80.
139. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet*. févr 2003;33(2):177–82.
140. GLOYN A. Large-Scale Association Studies of Variants in Genes Encoding the Pancreatic beta Cell KATP Channel Subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) Confirm That the KCNJ11 E23K Variant Is Associated With Type 2 Diabetes. févr 2003;568–72.
141. Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffman M, Mayorga R, et al. Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with NIDDM in Caucasians. *Diabetes*. 1996;45(6):825–831.
142. Sakura H, Wat N, Horton V, Millns H, Turner RC, Ashcroft FM. Sequence variations in the human Kir6. 2 gene, a subunit of the beta-cell ATP-sensitive K-channel: no association with NIDDM in white Caucasian subjects or evidence of abnormal function when expressed in vitro. *Diabetologia*. 1996;39(10):1233–1236.
143. Hansen L, Echwald SM, Hansen T, Urhammer SA, Clausen JO, Pedersen O. Amino acid polymorphisms in the ATP-regulatable inward rectifier Kir6. 2 and their relationships to glucose- and tolbutamide-induced insulin secretion, the insulin sensitivity index, and NIDDM. *Diabetes*. 1997;46(3):508–512.
144. Hani EH, Boutin P, Durand E, Inoue H, Permutt MA, Velho G, et al. Missense mutations in the pancreatic islet beta cell inwardly rectifying K⁺ channel gene (KIR6. 2/BIR): a meta-analysis suggests a role in the polygenic basis of Type II diabetes mellitus in Caucasians. *Diabetologia*. 1998;41(12):1511–1515.

145. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 22 févr 2007;445(7130):881-5.
146. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, et al. Genome-Wide Association Analysis Identifies Loci for Type 2 Diabetes and Triglyceride Levels. *Science*. *Science* 316 (5829), 1331-1336. 2007.
147. Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS, Lango H, et al. Replication of Genome-Wide Association Signals in UK Samples Reveals Risk Loci for Type 2 Diabetes. *Science*. 1 juin 2007;316(5829):1336-41.
148. Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y, Duren WL, et al. A Genome-Wide Association Study of Type 2 Diabetes in Finns Detects Multiple Susceptibility Variants. *Science*. 1 juin 2007;316(5829):1341-5.
149. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet*. mai 2008;40(5):638-45.
150. 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*. 12 août 2012;44(9):981-90.
151. Marullo L, El-Sayed Moustafa JS, Prokopenko I. Insights into the Genetic Susceptibility to Type 2 Diabetes from Genome-Wide Association Studies of Glycaemic Traits. *Curr Diab Rep*. nov 2014;14(11). DOI 10.1007/s11892-014-0551-8.
152. Dupuis J, Langenberg C, Prokopenko I, Saxena R, Soranzo N, Jackson AU, et al. New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk. *Nat Genet*. févr 2010;42(2):105-16.
153. Scott RA, Lagou V, Welch RP, Wheeler E, Montasser ME, Luan J, et al. Large-scale association analyses identify new loci influencing glycemic traits and provide insight into the underlying biological pathways. *Nat Genet*. 12 août 2012;44(9):991-1005.
154. 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*. juill 2010;42(7):579-89.
155. D.E.S.I.R. Study Group, the DIAGRAM Consortium, Albrechtsen A, Grarup N, Li Y, Sparsø T, et al. Exome sequencing-driven discovery of coding polymorphisms associated with common metabolic phenotypes. *Diabetologia*. févr 2013;56(2):298-310.
156. Estrada K, Aukrust I, Bjørkhaug L, Burt NP, Mercader JM, García-Ortiz H, et al. Association of a Low-Frequency Variant in *HNF1A* With Type 2 Diabetes in a Latino Population. *JAMA*. 11 juin 2014;311(22):2305.
157. 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*. 26 janv 2014;46(3):294-8.

158. Meigs JB, Shrader P, Sullivan LM, McAteer JB, Fox CS, Dupuis J, et al. Genotype score in addition to common risk factors for prediction of type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2008;359(21):2208–2219.
159. van Hoek M, Dehghan A, Witteman JCM, van Duijn CM, Uitterlinden AG, Oostra BA, et al. Predicting Type 2 Diabetes Based on Polymorphisms From Genome-Wide Association Studies: A Population-Based Study. *Diabetes.* 1 nov 2008;57(11):3122–8.
160. Hivert M-F, Vassy JL, Meigs JB. Susceptibility to type 2 diabetes mellitus—from genes to prevention. *Nat Rev Endocrinol.* 18 févr 2014;10(4):198–205.
161. Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, et al. Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA. *Science.* 7 sept 2012;337(6099):1190–5.
162. Florez JC. Newly identified loci highlight beta cell dysfunction as a key cause of type 2 diabetes: Where are the insulin resistance genes? *Diabetologia.* juill 2008;51(7):1100–10.
163. Wang X, Meloche M, Verchere CB, Ou D, Mui A, Warnock GL. Improving Islet Engraftment by Gene Therapy. *J Transplant.* 2011;2011:1–7.
164. Schlamowitz P, Halberg T, Warnoe O, Wilstrup F, Rytting K. Treatment of mild to moderate hypertension with dietary fibre. *The Lancet.* 1987;330(8559):622–623.
165. Reetz A, Solimena M, Matteoli M, Folli F, Takei K, De Camilli P. GABA and pancreatic beta-cells: colocalization of glutamic acid decarboxylase (GAD) and GABA with synaptic-like microvesicles suggests their role in GABA storage and secretion. *EMBO J.* 1991;10(5):1275.
166. Feng AL, Xiang Y-Y, Gui L, Kaltsidis G, Feng Q, Lu W-Y. Paracrine GABA and insulin regulate pancreatic alpha cell proliferation in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia.* DOI 10.1007/s00125-017-4239-x.
167. Vieira A, Ben-Othman N, Collombat P. GABA triggers pancreatic β -like cell neogenesis. *Cell Cycle.* 18 avr 2017;16(8):727–8.
168. Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren P-O, Caicedo A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(7):2334–2339.
169. Banting F., Best C., Collip J., Campbell W., Fletcher AA. Pancreatic extracts in the treatment of diabetes mellitus: preliminary report. *Canadian Medical Association Journal* 1991; 145 (10).
170. Sanger F. The free amino groups of insulin. *Biochemical Journal.* 1945; 39(5): 507–515.
171. ULLRICH A, SHINE J, CHIRGWIN J, PICTET R, TISCHER E, RUTTER WJ, et al. Rat Insulin Genes: Construction of Plasmids Containing the Coding Sequences. *SCIENCE, VOL. 196.* 1977. DOI 10.1126/science.325648.

172. Yan N. A Glimpse of Membrane Transport through Structures—Advances in the Structural Biology of the GLUT Glucose Transporters. *J Mol Biol.* août 2017;429(17):2710-25.
173. De Vos A, Heimberg H, Quartier E, Huypens P, Bouwens L, Pipeleers D, et al. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest.* 1 nov 1995;96(5):2489-95.
174. Dalle S. Effets du glucose sur la cellule bêtapancréatique mature. *Métabolismes Horm Diabètes Nutr.* 2009;13(1):29-35.
175. Matschinsky FM. A lesson in metabolic regulation inspired by the glucokinase glucose sensor paradigm. *Diabetes.* 1996;45(2):223-241.
176. Chon S, Riveline J-P, Blondeau B, Gautier J-F. Incretin-based therapy and pancreatic beta cells. *Diabetes & Metabolism.* 21 mai 2014;411-2.
177. Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia.* 1 août 2003;46(8):1029-45.
178. Kasai H, Takahashi N, Tokumaru H. Distinct Initial SNARE Configurations Underlying the Diversity of Exocytosis. *Physiol Rev.* 1 oct 2012;92(4):1915-64.
179. Gerber SH, Südhof TC. Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes.* 2002;51(suppl 1):S3-S11.
180. Pang ZP, Südhof TC. Cell Biology of Ca²⁺-Triggered Exocytosis. *Curr Opin Cell Biol.* 2010 August ; 22(4): 496-505. 2010.
181. Oh E, Kalwat MA, Kim M-J, Verhage M, Thurmond DC. Munc18-1 Regulates First-phase Insulin Release by Promoting Granule Docking to Multiple Syntaxin Isoforms. *J Biol Chem.* 27 juill 2012;287(31):25821-33.
182. Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, et al. Rim2 α Determines Docking and Priming States in Insulin Granule Exocytosis. *Cell Metab.* août 2010;12(2):117-29.
183. Kang L, He Z, Xu P, Fan J, Betz A, Brose N, et al. Munc13-1 is required for the sustained release of insulin from pancreatic β cells. *Cell Metab.* juin 2006;3(6):463-8.
184. Regazzi R, Ravazzola M, Iezzi M, Lang J, Zahraoui A, Anderegg E, et al. Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells. *J Cell Sci.* 1996;109(9):2265-2273.
185. Yi Z, Yokota H, Torii S, Aoki T, Hosaka M, Zhao S, et al. The Rab27a/Granuphilin Complex Regulates the Exocytosis of Insulin-Containing Dense-Core Granules. *Mol Cell Biol.* 15 mars 2002;22(6):1858-67.
186. Ozaki N, Shibasaki T, Kashima Y, Miki T, Takahashi K, Ueno H, et al. cAMP-GEFII is a direct target of cAMP in regulated exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2000;2(11):805.

187. Wang J, Takeuchi T, Yokota H, Izumi T. Novel rabphilin-3-like protein associates with insulin-containing granules in pancreatic beta cells. *J Biol Chem.* 1999;274(40):28542–28548.
188. Gomi H, Mizutani S, Kasai K, Itohara S, Izumi T. Granophilin molecularly docks insulin granules to the fusion machinery. *J Cell Biol.* 10 oct 2005;171(1):99-109.
189. Daniel Porte Jr. Clinical importance of insulin secretion and its interaction with insulin resistance in the treatment of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 17^e éd. 29 nov 2000;181-8.
190. Prentki M, Joly, E, El-Assaad, W, Roduit R. Malonyl-CoA Signaling, Lipid Partitioning, and Glucolipotoxicity Role in beta -Cell Adaptation and Failure in the Etiology of Diabetes. *DIABETES, VOL. 51, SUPPLEMENT 3, DECEMBER 2002.* DOI 10.2337/diabetes.51.2007.S405.
191. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM: genetic and clinical implications. *Diabetes.* 1995;44(8):863–870.
192. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in β -cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes.* 2003;52(3):581–587.
193. Poitout V, Amyot J, Semache M, Zarrouki B, Hagman D, Fontés G. Glucolipotoxicity of the pancreatic beta cell. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Biol Lipids.* mars 2010;1801(3):289-98.
194. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity: Fuel Excess and β -Cell Dysfunction. *Endocr Rev.* mai 2008;29(3):351-66.
195. Holmes D. Why β cells fail in T2DM. *Nature Reviews Endocrinology.* 2017. DOI 10.1038/nrendo.2017.82
196. Axelsson AS, Mahdi T, Nenonen HA, Singh T, Hänzelmann S, Wendt A, et al. Sox5 regulates beta-cell phenotype and is reduced in type 2 diabetes. *Nat Commun.* 6 juin 2017;8:15652.
197. Diedisheim M, Oshima M, Albagli O, Chimienti F, Scharfmann R. Livre des résumés congrès SFD Lille 2017 (CO-7). Société Francophone Diabète. 2017;14.
198. Himsworth HP. Diabetes mellitus: its differentiation into insulin-sensitive and insulin-insensitive types. *The Lancet.* 1936;227(5864):127–130.
199. Maianu L, Keller SR, Garvey WT. Adipocytes exhibit abnormal subcellular distribution and translocation of vesicles containing glucose transporter 4 and insulin-regulated aminopeptidase in type 2 diabetes mellitus: implications regarding defects in vesicle trafficking. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(11):5450–5456.
200. Vollenweide P. Insulin Resistant States and Insulin Signaling. *Clin Chem Lab Med.* *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(9):1107 – 1119.

201. Capeau J. Voies de signalisation de l'insuline: mécanismes affectés dans l'insulino-résistance. *médecine/sciences*. 2003;19(8-9):834-839.
202. Barquissau V, Morio B. Physiopathologie de l'insulino-résistance dans le muscle squelettique et implication des fonctions mitochondriales. *Nutr Clin Métabolisme*. sept 2011;25(3):114-30.
203. Pan X-R, Li G-W, Hu Y-H, Wang J-X, Yang W-Y, An Z-X, et al. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: the Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*. 1997;20(4):537-544.
204. Boden G, Jadali F. Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. *Diabetes*. 1991;40(6):686-692.
205. Han D-H, Hansen PA, Host HH, Holloszy JO. Insulin resistance of muscle glucose transport in rats fed a high-fat diet: a reevaluation. *Diabetes*. 1997;46(11):1761-1767.
206. Kim JK, Wi JK, Youn JH. Metabolic impairment precedes insulin resistance in skeletal muscle during high-fat feeding in rats. *Diabetes*. 1996;45(5):651-658.
207. Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S, Cline GW, et al. Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999;103(2):253.
208. Ritov VB, Menshikova EV, He J, Ferrell RE, Goodpaster BH, Kelley DE. Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):8-14.
209. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004;350(7):664-671.
210. Kim J-Y, Hickner RC, Cortright RL, Dohm GL, Houmard JA. Lipid oxidation is reduced in obese human skeletal muscle. *Am J Physiol-Endocrinol Metab*. 2000;279(5):E1039-E1044.
211. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. juin 2005;48(6):1229-37.
212. Samuel VT, Liu Z-X, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al. Mechanism of Hepatic Insulin Resistance in Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *J Biol Chem*. 30 juill 2004;279(31):32345-53.
213. Steinberg HO, Chaker H, Leaming R, Johnson A, Brechtel G, Baron AD. Obesity/insulin resistance is associated with endothelial dysfunction. Implications for the syndrome of insulin resistance. *J Clin Invest*. 1996;97(11):2601.
214. Gao Z, Zhang X, Zuberi A, Hwang D, Quon MJ, Lefevre M, et al. Inhibition of Insulin Sensitivity by Free Fatty Acids Requires Activation of Multiple Serine Kinases in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Endocrinol*. août 2004;18(8):2024-34.

215. Kim F. Free Fatty Acid Impairment of Nitric Oxide Production in Endothelial Cells Is Mediated by IKK. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24 févr 2005;25(5):989-94.
216. Frattali AL, Treadway JL, Pessin JE. Transmembrane Signaling by the Human Insulin Receptor Kinase RELATIONSHIP BETWEEN INTRAMOLECULAR p SUBUNIT tram- AND cis-AUTOPHOSPHORYLATION AND SUBSTRATE KINASE ACTIVATION. *The journal of Biological Chemistry.* Vol. 261, No. 21, Issue of September 25, PP. 19521-19528, 1992.
217. Kasuga M, Fujita-Yamaguchi Y, Blithe DL, Kahn CR. Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1983;80(8):2137–2141.
218. Birkenfeld AL, Shulman GI. Nonalcoholic fatty liver disease, hepatic insulin resistance, and type 2 diabetes. *Hepatology.* 2014;59(2):713–723.
219. Samuel VT, Shulman GI. The pathogenesis of insulin resistance: integrating signaling pathways and substrate flux. *J Clin Invest.* 4 janv 2016;126(1):12-22.
220. Govers R. Molecular mechanisms of GLUT4 regulation in adipocytes. *Diabetes Metab.* 2014;40:400-10. DOI 4973559977540731.
221. Abdul-Ghani MA, DeFronzo RA. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:1-19.
222. Andreasson K, Galuska D, Thörne A, Sonnenfeld T, WALLBERG-HENRIKSSON H. Decreased insulin-stimulated 3-O-methylglucose transport in in vitro incubated muscle strips from type II diabetic subjects. *Acta Physiol.* 1991;142(2):255–260.
223. Garvey WT, Maianu L, Zhu J-H, Brechtel-Hook G, Wallace P, Baron AD. Evidence for defects in the trafficking and translocation of GLUT4 glucose transporters in skeletal muscle as a cause of human insulin resistance. *J Clin Invest.* 1998;101(11):2377.
224. Kelley DE, He J, Menshikova EV, Ritov VB. Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2002;51(10):2944–2950.
225. Simoneau J, Veerkamp JH, Turcotte LP, Kelley DE. Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss. *FASEB J.* 1999;13(14):2051–2060.
226. Rondinone CM, Wang L-M, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate (IRS) 1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci.* 1997;94(8):4171–4175.
227. Garvey WT, Maianu L, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Ciaraldi TP. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest.* 1 mars 1991;87(3):1072-81.

228. Rondinone CM, Carvalho E, Wesslau C, Smith UP. Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from subjects with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1999;42(7):819–825.
229. Petersen PS, Lei X, Wolf RM, Rodriguez S, Tan SY, Little HC, et al. CTRP7 deletion attenuates obesity-linked glucose intolerance, adipose tissue inflammation, and hepatic stress. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2017 Apr 1;312(4):E309-E325. DOI 10.1152/ajpendo.00344.2016.
230. Bonnefond A, Lomberk G, Buttar N, Busiah K, Vaillant E, Lobbens S, et al. Disruption of a Novel Krüppel-like Transcription Factor p300-regulated Pathway for Insulin Biosynthesis Revealed by Studies of the c.-331 *INS* Mutation Found in Neonatal Diabetes Mellitus. *J Biol Chem*. 12 août 2011;286(32):28414-24.
231. Martino L, Masini M, Bugliani M, Marselli L, Suleiman M, Boggi U, et al. Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*. nov 2015;58(11):2554-62.
232. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, Sgroi DC, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Gene Expression Profiles of Beta-Cell Enriched Tissue Obtained by Laser Capture Microdissection from Subjects with Type 2 Diabetes. *Westermarck P, éditeur. PLoS ONE*. 13 juill 2010;5(7):e11499.
233. Lukowiak B, Vandewalle B, Riachy R, Kerr-Conte J, Gmyr V, Belaich S, et al. Identification and purification of functional human β -cells by a new specific zinc-fluorescent probe. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(4):519–527.
234. Hu P, Zhang W, Xin H, Deng G. Single Cell Isolation and Analysis. *Front Cell Dev Biol*. 25 oct 2016;4. DOI 10.3389/fcell.2016.00116.
235. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends Genet*. oct 2013;29(10):569-74.
236. Melé M, Ferreira PG, Reverter F, DeLuca DS, Monlong J, Sammeth M, et al. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science*. 5 août 2015;348(6235):660-5.
237. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol*. 2009;10(11):R130.
238. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest*. 1 sept 2011;121(9):3589-97.
239. Weir GC, Bonner-Weir S. Finally! A human pancreatic β cell line. *J Clin Invest*. 1 sept 2011;121(9):3395-7.
240. Levin AA. Targeting Therapeutic Oligonucleotides. *New England Journal of Medicine*. n engl j med 376;1 January 5, 2017. 2017;86-8.

241. D'AMBRA R, Surana M, Efrat S, Starr RG, Fleischer N. Regulation of insulin secretion from β -cell lines derived from transgenic mice insulinomas resembles that of normal β -cells. *Endocrinology*. 1990;126(6):2815–2822.
242. Christie MR, Ashcroft SJ. Cyclic AMP-dependent protein phosphorylation and insulin secretion in intact islets of Langerhans. *Biochem J*. 1984;218(1):87–99.
243. Wattiez A-S, Dupuis A, Courteix C. Le rat STZ-diabétique: modèle adapté à l'étude de la neuropathie diabétique douloureuse ? *Douleur Analgésie*. mars 2012;25(1):38-45.
244. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*. 2001;50(6):537–546.
245. Lindström P. The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [*ob/ob* Mice]. *Sci World J*. 2007;7:666-85.
246. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med*. 20 avr 2015;21(5):512-7.
247. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013;14(4):1.
248. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res*. 1 mai 2013;41(10):e108-e108.
249. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. déc 2014;15(12). DOI 10.1186/s13059-014-0550-8.
250. Smemo S, Tena JJ, Kim K-H, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gómez-Marín C, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*. 12 mars 2014;507(7492):371-5.
251. Herman MA, Rosen ED. Making Biological Sense of GWAS Data: Lessons from the FTO Locus. *Cell Metab*. oct 2015;22(4):538-9.
252. Pasquali L, Gaulton KJ, Rodríguez-Seguí SA, Mularoni L, Miguel-Escalada I, Akerman I, et al. Pancreatic islet enhancer clusters enriched in type 2 diabetes risk-associated variants. *Nat Genet*. 12 janv 2014;46(2):136-43.
253. Matsumoto-Taniura N, Pirollet F, Monroe R, Gerace L, Westendorf JM. Identification of novel M phase phosphoproteins by expression cloning. *Mol Biol Cell*. 1996;7(9):1455–1469.
254. Vincent I, Jicha G, Rosado M, Dickson DW. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. *J Neurosci*. 1997;17(10):3588–3598.

255. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PIW, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* juill 2009;41(7):776-82.
256. Ward GR, Franklin SO, Gerald TM, Dempsey KT, Clodfelter DE, Krissinger DJ, et al. *Cell Mol Neurobiol.* 6 juill 2007;27(5):651-60.
257. Ray SK, Li HJ, Metzger E, Schule R, Leiter AB. CtBP and Associated LSD1 Are Required for Transcriptional Activation by NeuroD1 in Gastrointestinal Endocrine Cells. *Mol Cell Biol.* 15 juin 2014;34(12):2308-17.
258. Kasuga Y, Hata K, Tajima A, Ochiai D, Saisho Y, Matsumoto T, et al. Association of common polymorphisms with gestational diabetes mellitus in Japanese women: A case-control study. *Endocrine Journal* 2017, 64 (4), 463-475.
259. Betarbet R, Anderson LR, Gearing M, Hodges TR, Fritz JJ, Lah JJ, et al. Fas-associated factor 1 and Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* sept 2008;31(3):309-15.
260. Harder MN, Appel EVR, Grarup N, Gjesing AP, Ahluwalia TS, Jørgensen T, et al. The Type 2 Diabetes Risk Allele of TMEM154-rs6813195 Associates with Decreased Beta Cell Function in a Study of 6,486 Danes. *Kronenberg F, éditeur. PLOS ONE.* 23 mars 2015;10(3):e0120890.
261. Lee EK, Kim W, Tominaga K, Martindale JL, Yang X, Subaran SS, et al. RNA-Binding Protein HuD Controls Insulin Translation. *Mol Cell.* mars 2012;45(6):826-35.
262. Mahajan A, Go MJ, Zhang W, Below JE, Gaulton KJ, Ferreira T, et al. Genome-wide trans-ancestry meta-analysis provides insight into the genetic architecture of type 2 diabetes susceptibility. *Nat Genet.* 9 févr 2014;46(3):234-44.
263. Liu Z, Habener JF. Glucagon-like Peptide-1 Activation of TCF7L2-dependent Wnt Signaling Enhances Pancreatic Beta Cell Proliferation. *J Biol Chem.* 28 mars 2008;283(13):8723-35.
264. Angers S, Thorpe CJ, Biechele TL, Goldenberg SJ, Zheng N, MacCoss MJ, et al. The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt- β -catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol.* avr 2006;8(4):348-57.
265. Song JL, Nigam P, Tektas SS, Selva E. microRNA regulation of Wnt signaling pathways in development and disease. *Cell Signal.* juill 2015;27(7):1380-91.
266. Krautkramer KA, Linnemann AK, Fontaine DA, Whillock AL, Harris TW, Schleis GJ, et al. Tcf19 is a novel islet factor necessary for proliferation and survival in the INS-1 -cell line. *AJP Endocrinol Metab.* 1 sept 2013;305(5):E600-10.
267. Cheung YH, Watkinson J, Anastassiou D. Conditional meta-analysis stratifying on detailed HLA genotypes identifies a novel type 1 diabetes locus around TCF19 in the MHC. *Hum Genet.* févr 2011;129(2):161-76.
268. Chabosseau P, Rutter GA. Zinc and diabetes. *Arch Biochem Biophys.* juin 2016. DOI 10.1016/j.abb.2016.05.022.

269. Scott DA, Fisher AM. THE INSULIN AND THE ZINC CONTENT OF NORMAL AND DIABETIC PANCREAS. *J Clin Invest.* 1 nov 1938;17(6):725-8.
270. Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekara N, Loder MK, Baldwin JM, Gyulkhandanyan AV, et al. Insulin Storage and Glucose Homeostasis in Mice Null for the Granule Zinc Transporter ZnT8 and Studies of the Type 2 Diabetes-Associated Variants. *Diabetes.* 1 sept 2009;58(9):2070-83.
271. Kim I, Kang ES, Yim YS, Ko SJ, Jeong SH, Rim JH, et al. A low-risk ZnT-8 allele (W325) for post-transplantation diabetes mellitus is protective against cyclosporin A-induced impairment of insulin secretion. *Pharmacogenomics J.* 2011;11(3):191-198.
272. Mitchell RK, Hu M, Chabosseau PL, Cane MC, Meur G, Bellomo EA, et al. Molecular Genetic Regulation of *Slc30a8* /ZnT8 Reveals a Positive Association With Glucose Tolerance. *Mol Endocrinol.* janv 2016;30(1):77-91.
273. Flannick J, Thorleifsson G, Beer NL, Jacobs SBR, Grarup N, Burtt NP, et al. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2 mars 2014;46(4):357-63.
274. Rutter GA, Chimienti F. SLC30A8 mutations in type 2 diabetes. *Diabetologia.* janv 2015;58(1):31-6.
275. Hirata T, Yoshitomi T, Inoue M, Iigo Y, Matsumoto K, Kubota K, et al. Pathological and gene Sladexpression analysis of a polygenic diabetes model, NONcNZO10/LtJ mice. *Gene.* sept 2017;629:52-8.
276. Sano H, Kane S, Sano E, Miinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-activating Protein Regulates GLUT4 Translocation. *J Biol Chem.* 25 avr 2003;278(17):14599-602.
277. Klip A, Sun Y, Chiu TT, Foley KP. Signal transduction meets vesicle traffic: the software and hardware of GLUT4 translocation. *AJP Cell Physiol.* 15 mai 2014;306(10):C879-86.
278. Tan S-X, Ng Y, Burchfield JG, Ramm G, Lambright DG, Stockli J, et al. The Rab GTPase-Activating Protein TBC1D4/AS160 Contains an Atypical Phosphotyrosine-Binding Domain That Interacts with Plasma Membrane Phospholipids To Facilitate GLUT4 Trafficking in Adipocytes. *Mol Cell Biol.* 15 déc 2012;32(24):4946-59.
279. Moltke I, Grarup N, Jørgensen ME, Bjerregaard P, Treebak JT, Fumagalli M, et al. A common Greenlandic TBC1D4 variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 18 juin 2014;512(7513):190-3.
280. Bouzakri K, Ribaux P, Tomas A, Parnaud G, Rickenbach K, Halban PA. Rab GTPase-Activating Protein AS160 Is a Major Downstream Effector of Protein Kinase B/Akt Signaling in Pancreatic -Cells. *Diabetes.* 1 mai 2008;57(5):1195-204.

281. Kaneko K, Ueki K, Takahashi N, Hashimoto S, Okamoto M, Awazawa M, et al. Class IA Phosphatidylinositol 3-Kinase in Pancreatic β Cells Controls Insulin Secretion by Multiple Mechanisms. *Cell Metab.* déc 2010;12(6):619-32.
282. Leibiger B, Moede T, Uhles S, Barker CJ, Creveaux M, Domin J, et al. Insulin-feedback via PI3K-C2 activated PKB /Akt1 is required for glucose-stimulated insulin secretion. *FASEB J.* 1 juin 2010;24(6):1824-37.
283. Pal A, Potjer TP, Thomsen SK, Ng HJ, Barrett A, Scharfmann R, et al. Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans. *Diabetes.* 5 nov 2015;db150602.
284. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, et al. p16Ink4a-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature Medecine.* 2016 April ; 22(4): 412-420. DOI 10.1038/nm.4054.
285. Vierra NC, Dadi PK, Jeong I, Dickerson M, Powell DR, Jacobson DA. Type 2 Diabetes-Associated K^+ Channel TALK-1 Modulates β -Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis. *Diabetes.* nov 2015;64(11):3818-28.
286. Dickerson MT, Vierra NC, Milian SC, Dadi PK, Jacobson DA. Osteopontin activates the diabetes-associated potassium channel TALK-1 in pancreatic β -cells. Attali B, éditeur. *PLOS ONE.* 12 avr 2017;12(4):e0175069.
287. Chen J, Rajasekaran M, Xia H, Zhang X, Kong SN, Sekar K, et al. The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut.* sept 2016;65(9):1522-34.
288. Zhao Z, Wen W, Michailidou K, Bolla MK, Wang Q, Zhang B, et al. Association of genetic susceptibility variants for type 2 diabetes with breast cancer risk in women of European ancestry. *Cancer Causes Control.* mai 2016;27(5):679-93.
289. Brynychova V, Ehrlichova M, Hlavac V, Nemcova-Furstova V, Pecha V, Leva J, et al. Genetic and functional analyses do not explain the association of high PRC1 expression with poor survival of breast carcinoma patients. *Biomed Pharmacother.* oct 2016;83:857-64.
290. Hagiwara H, Iyo M, Hashimoto K. Neonatal Disruption of Serine Racemase Causes Schizophrenia-Like Behavioral Abnormalities in Adulthood: Clinical Rescue by D-Serine. Zhang XY, éditeur. *PLoS ONE.* 22 avr 2013;8(4):e62438.
291. Dong M, Gong Z-C, Dai X-P, Lei G-H, Lu H-B, Fan L, et al. Serine racemase rs391300 G/A polymorphism influences the therapeutic efficacy of metformin in Chinese patients with diabetes mellitus type 2: SRR polymorphism and metformin efficacy. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* déc 2011;38(12):824-9.
292. Lockridge AD, Baumann DC, Akhaphong B, Abrenica A, Miller RF, Alejandro EU. Serine racemase is expressed in islets and contributes to the regulation of glucose homeostasis. *Islets.* 2016;8(6):195-206.

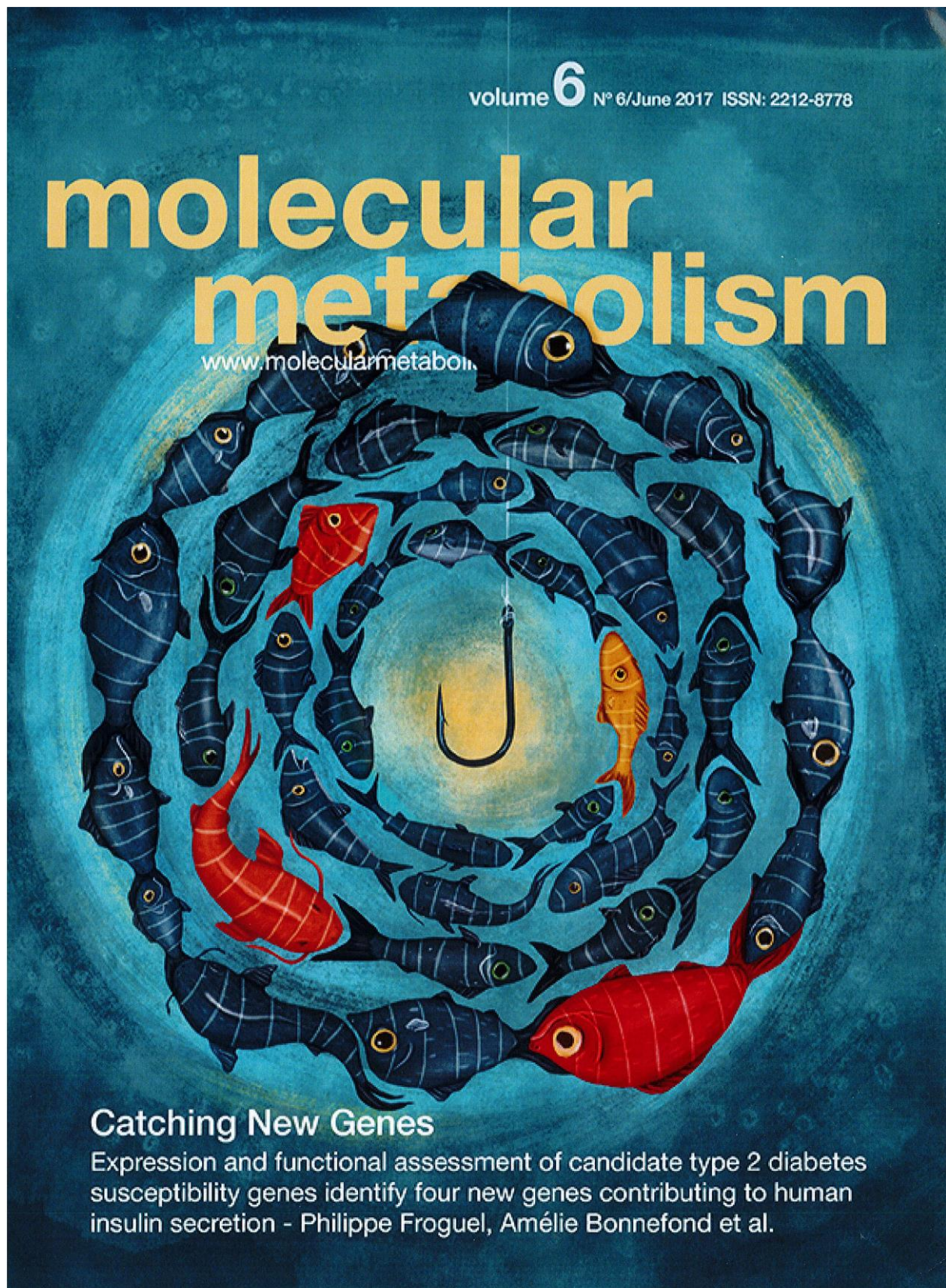
293. Balu DT, Li Y, Puhl MD, Benneyworth MA, Basu AC, Takagi S, et al. Multiple risk pathways for schizophrenia converge in serine racemase knockout mice, a mouse model of NMDA receptor hypofunction. *Proc Natl Acad Sci.* 25 juin 2013;110(26):E2400-9.
294. Basu AC, Tsai GE, Ma C-L, Ehmsen JT, Mustafa AK, Han L, et al. Targeted disruption of serine racemase affects glutamatergic neurotransmission and behavior. *Mol Psychiatry.* 2009;14(7):719.
295. Bardaweel SK, Alzweiri M, Ishaqat AA. D-serine in neurobiology: CNS neurotransmission and neuromodulation. *Can J Neurol Sci.* 2014;41(2):164-176.
296. Otake S, Endo D, Park MK. Molecular characterization of two isoforms of ZFAND3 cDNA from the Japanese quail and the leopard gecko, and different expression patterns between testis and ovary. *Gene.* nov 2011;488(1-2):23-34.
297. López-Fernández LA, Del Mazo J. Characterization of genes expressed early in mouse spermatogenesis, isolated from a subtractive cDNA library. *Mamm Genome.* 1996;7(9):698-700.
298. Dai F-Z, Yang J, Chen X-B, Xu M-Q. Zinc finger protein A20 inhibits maturation of dendritic cells resident in rat liver allograft. *J Surg Res.* août 2013;183(2):885-93.
299. Lalloyer F, Vandewalle B, Percevault F, Torpier G, Kerr-Conte J, Oosterveer M, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Improves Pancreatic Adaptation to Insulin Resistance in Obese Mice and Reduces Lipotoxicity in Human Islets. *Diabetes.* 1 juin 2006;55(6):1605-13.
300. Donath MY, Ehses JA, Maedler K, Schumann DM, Ellingsgaard H, Eppler E, et al. Mechanisms of β -cell death in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2005;54(suppl 2):S108-S113.
301. Bentley-Lewis R, Huynh J, Xiong G, Lee H, Wenger J, Clish C, et al. Metabolomic profiling in the prediction of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia.* 7 mars 2015;58(6):1329-32.
302. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science.* 25 nov 2011;334:1081-86.
303. Cobb J, Eckhart A, Perichon R, Wulff J, Mitchell M, Adam K-P, et al. A novel test for IGT utilizing metabolite markers of glucose tolerance. *J Diabetes Sci Technol.* 2015;9(1):69-76.
304. McClenaghan NH, Barnett CR, O'Harte FPM, Flatt PR. Mechanisms of amino acid-induced insulin secretion from the glucose-responsive BRIN-BD11 pancreatic B-cell line. *J Endocrinol.* 1996;151(3):349-357.
305. Wang B, Charukeshi Chandrasekera P, J Pippin J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2014;10(2):131-145.

306. Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*. 1996;84(3):491–495.
307. Elmquist JK, Björbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *J Comp Neurol*. 1998;395(4):535–547.
308. Kieffer TJ, Heller RS, Habener JF. Leptin receptors expressed on pancreatic β -cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;224(2):522–527.
309. Segerstolpe Å, Palasantza A, Eliasson P, Andersson E-M, Andréasson A-C, Sun X, et al. Single-Cell Transcriptome Profiling of Human Pancreatic Islets in Health and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. oct 2016;24(4):593–607.
310. Thomsen SK, Ceroni A, van de Bunt M, Burrows C, Barrett A, Scharfmann R, et al. Systematic Functional Characterization of Candidate Causal Genes for Type 2 Diabetes Risk Variants. *Diabetes*. 2016;db160361.
311. Zeng H, Guo M, Zhou T, Tan L, Chong CN, Zhang T, et al. An Isogenic Human ESC Platform for Functional Evaluation of Genome-wide-Association-Study-Identified Diabetes Genes and Drug Discovery. *Cell Stem Cell*. août 2016. DOI 10.1016/j.stem.2016.07.002.
312. O'Hare EA, Yerges-Armstrong LM, Perry JA, Shuldiner AR, Zaghoul NA. Assignment of Functional Relevance to Genes at Type 2 Diabetes-Associated Loci Through Investigation of β -Cell Mass Deficits. *Mol Endocrinol*. avr 2016;30(4):429–45.
313. van de Bunt M, Manning Fox JE, Dai X, Barrett A, Grey C, Li L, et al. Transcript Expression Data from Human Islets Links Regulatory Signals from Genome-Wide Association Studies for Type 2 Diabetes and Glycemic Traits to Their Downstream Effectors. *Stranger BE, éditeur. PLOS Genet*. 1 déc 2015;11(12):e1005694.
314. Kulzer JR, Stitzel ML, Morken MA, Huyghe JR, Fuchsberger C, Kuusisto J, et al. A Common Functional Regulatory Variant at a Type 2 Diabetes Locus Upregulates ARAP1 Expression in the Pancreatic Beta Cell. *Am J Hum Genet*. févr 2014;94(2):186–97.
315. Carrat GR, Hu M, Nguyen-Tu M-S, Chabosseau P, Gaulton KJ, van de Bunt M, et al. Decreased STARD10 Expression Is Associated with Defective Insulin Secretion in Humans and Mice. *Am J Hum Genet*. févr 2017;100(2):238–56.
316. Chung WK. An overview of monogenic and syndromic obesities in humans. *Pediatr Blood Cancer*. janv 2012;58(1):122–8.
317. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci*. 6 mai 2016;130(12):943–86.
318. Loos RJJ, Janssens ACJW. Predicting Polygenic Obesity Using Genetic Information. *Cell Metab*. mars 2017;25(3):535–43.

319. Stutzmann F, Cauchi S, Durand E, Calvacanti-Proenca C, Pigeyre M, Hartikainen AL, et al. Common genetic variation near MC4R is associated with eating behaviour patterns in European populations. *Int J Obes.* 2009;33(3):373.
320. Marullo L, El-Sayed Moustafa JS, Prokopenko I. Insights into the genetic susceptibility to type 2 diabetes from genome-wide association studies of glycaemic traits. *Curr Diab Rep.* nov 2014;14(11):551.
321. Pasquali L, Gaulton KJ, Rodríguez-Seguí SA, Mularoni L, Miguel-Escalada I, Akerman I, et al. Pancreatic islet enhancer clusters enriched in type 2 diabetes risk-associated variants. *Nat Genet.* févr 2014;46(2):136-43.
322. Warren HR, Evangelou E, Cabrera CP, Gao H, Ren M, Mifsud B, et al. Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. *Nat Genet.* 2017 Mar;49(3):403-415. DOI 10.1038/ng.3768.
323. Bonnefond A, Lomberk G, Buttar N, Busiah K, Vaillant E, Lobbens S, et al. Disruption of a novel Kruppel-like transcription factor p300-regulated pathway for insulin biosynthesis revealed by studies of the c.-331 INS mutation found in neonatal diabetes mellitus. *J Biol Chem.* 12 août 2011;286(32):28414-24.
324. Martino L, Masini M, Bugliani M, Marselli L, Suleiman M, Boggi U, et al. Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia.* 15 août 2015;58(11):2554-62.
325. Marselli L, Thorne J, Dahiya S, SgROI DC, Sharma A, Bonner-Weir S, et al. Gene Expression Profiles of Beta-Cell Enriched Tissue Obtained by Laser Capture Microdissection from Subjects with Type 2 Diabetes. *Westermarck P, éditeur. PLoS ONE.* 13 juill 2010;5(7):e11499.
326. Lukowiak B, Vandewalle B, Riachy R, Kerr-Conte J, Gmyr V, Belaich S, et al. Identification and Purification of Functional Human β -cells by a New Specific Zinc-fluorescent Probe. *J Histochem Cytochem.* 1 avr 2001;49(4):519-27.
327. Eisenberg E, Levanon EY. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics.* oct 2013;29(10):569-74. DOI 10.1016/j.tig.2013.05.010.
328. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 2009;10(11):R130. ISSN 01689525.
329. Ravassard P, Hazhouz Y, Pechberty S, Bricout-Neveu E, Armanet M, Czernichow P, et al. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *J Clin Invest.* 1 sept 2011;121(9):3589-97.
330. Bonner C, Kerr-Conte J, Gmyr V, Queniat G, Moerman E, Thévenet J, et al. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nat Med.* mai 2015;21(5):512-7.

331. Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol.* 2013;14(4):R36.
332. Liao Y, Smyth GK, Shi W. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Res.* 1 mai 2013;41(10):e108.
333. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550.
334. Postic C, Shiota M, Niswender KD, Jetton TL, Chen Y, Moates JM, et al. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *J Biol Chem.* 1 janv 1999;274(1):305-15.
335. Miura A, Yamagata K, Kakei M, Hatakeyama H, Takahashi N, Fukui K, et al. Hepatocyte nuclear factor-4alpha is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 24 févr 2006;281(8):5246-57.
336. Bouzakri K, Ribaux P, Tomas A, Parnaud G, Rickenbach K, Halban PA. Rab GTPase-Activating Protein AS160 Is a Major Downstream Effector of Protein Kinase B/Akt Signaling in Pancreatic -Cells. *Diabetes.* 1 mai 2008;57(5):1195-204.
337. Helman A, Klochendler A, Azazmeh N, Gabai Y, Horwitz E, Anzi S, et al. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nat Med.* avr 2016;22(4):412-20.
338. Krautkramer KA, Linnemann AK, Fontaine DA, Whillock AL, Harris TW, Schleis GJ, et al. Tcf19 is a novel islet factor necessary for proliferation and survival in the INS-1 -cell line. *AJP Endocrinol Metab.* 1 sept 2013;305(5):E600-10.
339. Vierra NC, Dadi PK, Jeong I, Dickerson M, Powell DR, Jacobson DA. The type-2 diabetes-associated K⁺ channel TALK-1 modulates beta-cell electrical excitability, 2nd-phase insulin secretion, and glucose homeostasis. *Diabetes.* 3 août 2015;db150280. ISSN 0012-1797, 1939-327X.
340. Rutter GA, Chimienti F. SLC30A8 mutations in type 2 diabetes. *Diabetologia.* janv 2015;58(1):31-6. DOI 10.1007/s00125-014-3405-7.
341. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 22 févr 2007;445(7130):881-5.
342. Kim I, Kang ES, Yim YS, Ko SJ, Jeong S-H, Rim JH, et al. A low-risk ZnT-8 allele (W325) for post-transplantation diabetes mellitus is protective against cyclosporin A-induced impairment of insulin secretion. *Pharmacogenomics J.* juin 2011;11(3):191-8.
343. Nicolson TJ, Bellomo EA, Wijesekara N, Loder MK, Baldwin JM, Gyulkhandanyan AV, et al. Insulin Storage and Glucose Homeostasis in Mice Null for the Granule Zinc Transporter ZnT8 and Studies of the Type 2 Diabetes-Associated Variants. *Diabetes.* 1 sept 2009;58(9):2070-83.

344. Flannick J, Thorleifsson G, Beer NL, Jacobs SBR, Grarup N, Burt NP, et al. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nat Genet.* avr 2014;46(4):357-63.
345. Sano H, Kane S, Sano E, Mîinea CP, Asara JM, Lane WS, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *J Biol Chem.* 25 avr 2003;278(17):14599-602.
346. Moltke I, Grarup N, Jørgensen ME, Bjerregaard P, Trebak JT, Fumagalli M, et al. A common Greenlandic TBC1D4 variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature.* 14 août 2014;512(7513):190-3.
347. Pal A, Potjer TP, Thomsen SK, Ng HJ, Barrett A, Scharfmann R, et al. Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans. *Diabetes.* févr 2016;65(2):527-33.
348. Thomsen SK, Ceroni A, van de Bunt M, Burrows C, Barrett A, Scharfmann R, et al. Systematic Functional Characterization of Candidate Causal Genes for Type 2 Diabetes Risk Variants. *Diabetes.* déc 2016;65(12):3805-11.
349. Chen J, Rajasekaran M, Xia H, Zhang X, Kong SN, Sekar K, et al. The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut.* sept 2016;65(9):1522-34.
350. Zhao Z, Wen W, Michailidou K, Bolla MK, Wang Q, Zhang B, et al. Association of genetic susceptibility variants for type 2 diabetes with breast cancer risk in women of European ancestry. *Cancer Causes Control.* 6 avr 2016;1-15. DOI 10.1007/s10552-016-0741-6.
351. Hagiwara H, Iyo M, Hashimoto K. Neonatal disruption of serine racemase causes schizophrenia-like behavioral abnormalities in adulthood: clinical rescue by d-serine. *PLoS One.* 2013;8(4):e62438.
352. Cobb J, Eckhart A, Perichon R, Wulff J, Mitchell M, Adam K-P, et al. A novel test for IGT utilizing metabolite markers of glucose tolerance. *J Diabetes Sci Technol.* janv 2015;9(1):69-76.
353. Bentley-Lewis R, Huynh J, Xiong G, Lee H, Wenger J, Clish C, et al. Metabolomic profiling in the prediction of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia.* juin 2015;58(6):1329-32.
354. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science.* 25 nov 2011;334(6059):1081-6.



Catching New Genes

Expression and functional assessment of candidate type 2 diabetes susceptibility genes identify four new genes contributing to human insulin secretion - Philippe Froguel, Amélie Bonnefond et al.

Expression and functional assessment of candidate type 2 diabetes susceptibility genes identify four new genes contributing to human insulin secretion

Fatou K Ndiaye^{1,6}, Ana Ortalli^{1,6}, Mickaël Canouil^{1,6}, Marlène Huyvaert¹, Clara Salazar-Cardozo¹, Cécile Lecoeur¹, Marie Verbanck¹, Valérie Pawlowski¹, Raphaël Boutry¹, Emmanuelle Durand¹, Iandry Rabearivelo¹, Olivier Sand¹, Lorella Marselli², Julie Kerr-Conte³, Vikash Chandra⁴, Raphaël Scharfmann⁴, Odile Poulain-Godefroy¹, Piero Marchetti², François Pattou³, Amar Abderrahmani^{1,5}, Philippe Froguel^{1,5,7*} & Amélie Bonnefond^{1,5,7*}

¹CNRS UMR 8199, European Genomic Institute for Diabetes (EGID), Institut Pasteur de Lille, University of Lille, 59000 Lille, France; ²Department of Clinical and Experimental Medicine, Islet Cell Laboratory, University of Pisa, 56100 Pisa, Italy; ³Inserm U1190, EGID, CHU Lille, University of Lille, 59000 Lille, France; ⁴Inserm U1016, Institut Cochin, Faculté de Médecine, Paris Descartes University, Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France; ⁵Department of Genomics of Common Disease, Imperial College London, W12 0NN London, United Kingdom; ⁶Co-first authors; ⁷Co-senior authors.

***Corresponding authors:** Amélie Bonnefond (amelie.bonnefond@inserm.fr) & Philippe Froguel (p.froguel@imperial.ac.uk). CNRS UMR8199; Institut Pasteur de Lille; 1 Rue du Professeur Calmette B.P. 245; F-59019 Lille Cedex France.

Tel: +33 3 20 87 10 41.

The authors have declared that no conflict of interest exists.

Abstract

Objectives: Genome-wide association studies (GWAS) have identified >100 loci independently contributing to type 2 diabetes (T2D) risk. However, translational implications for precision medicine and for the development of novel treatments have been disappointing, due to poor knowledge of how these loci impact T2D pathophysiology. Here, we aimed to measure the expression of genes located nearby T2D associated signals and to assess their effect on insulin secretion from pancreatic beta cells.

Methods: The expression of 104 candidate T2D susceptibility genes was measured in a human multi-tissue panel, through PCR-free expression assay. The effects of the knockdown of beta-cell enriched genes were next investigated on insulin secretion from the human EndoC- β H1 beta-cell line. Finally, we performed RNA-sequencing (RNA-seq) so as to assess the pathways affected by the knockdown of the new genes impacting insulin secretion from EndoC- β H1, and we analyzed the expression of the new genes in mouse models with altered pancreatic beta-cell function.

Results: We found that the candidate T2D susceptibility genes' expression is significantly enriched in pancreatic beta cells obtained by laser capture microdissection or sorted by flow cytometry and in EndoC- β H1 cells, but not in insulin sensitive tissues. Furthermore, the knockdown of seven T2D-susceptibility genes (*CDKN2A*, *GCK*, *HNF4A*, *KCNK16*, *SLC30A8*, *TBC1D4*, and *TCF19*) with already known expression and/or function in beta cells changed insulin secretion, supporting our functional approach. We showed first evidence for a role in insulin secretion of four candidate T2D-susceptibility genes (*PRC1*, *SRR*, *ZFAND3*, and *ZFAND6*) with no previous knowledge of presence and function in beta cells. RNA-seq in EndoC- β H1 cells with decreased expression of *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6*, or *ZFAND3* identified specific gene networks related to T2D pathophysiology. Finally, a positive correlation between the expression of *Ins2* and the expression of *Prc1*, *Srr*, *Zfand6*, and *Zfand3* was found in mouse pancreatic islets with altered beta-cell function.

Conclusions: This study showed the ability of post-GWAS functional studies to identify new genes and pathways involved in human pancreatic beta-cell function and in T2D pathophysiology.

Highlights

- Expression of genes located nearby T2D associated signals is enriched in β cells.
- Knockdown of 7 T2D genes with known role in β cell changes insulin secretion.
- Knockdown of 4 T2D genes with unknown role in β cell impairs insulin secretion.
- RNA-seq in cells with knockdown of these 4 genes detected T2D-related networks.

Keywords

EndoC- β H1; Expression analysis; Genome-wide association study; Insulin secretion; RNAi screening; Type 2 diabetes

1. Introduction

Type 2 diabetes (T2D) is a complex, multifactorial disorder with an estimated heritability ranging between 40 and 70% (51). Genetic studies have identified 28 genes causing monogenic diabetes due to impaired insulin secretion. These genes are critically important for pancreatic beta-cell lineage, phenotype, and function (51). Genome-wide association studies (GWAS) have shown that common T2D is highly polygenic, with more than 100 loci contributing to T2D risk. GWAS of related quantitative traits have shown that a significant part of the T2D-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs) also modulates fasting plasma glucose levels and the homeostatic model assessment (HOMA) of beta-cell function in non-diabetic individuals, suggesting that their main diabetogenic impact was on insulin secretion and not on insulin resistance (320). Surprisingly indeed, only a few T2D-associated SNPs were found to have an effect on fasting serum insulin levels, the HOMA of insulin resistance, or the insulin sensitivity index in general populations. About half of the T2D susceptibility SNPs did not have any apparent effect on glucose homeostasis in non-diabetics (320).

Elucidating the function of T2D-associated SNPs (and target genes) and their involvement in T2D pathophysiology may have major translational implications for precision medicine and for the development of novel treatments. Post-GWAS studies are challenging due to the fact that the vast majority of these SNPs are non-coding and often intergenic, which has not facilitated functional investigations of genes located in these chromosome regions. In this context, a recent study has demonstrated that T2D-associated SNPs are significantly enriched in clusters of enhancers that are active in human pancreatic islets, and most of these enhancers map less than 500 kb from transcription start sites (TSS) of nearby genes (321). Moreover, it has been recently shown that most genes located nearby loci associated with blood pressure (systolic, diastolic, pulse pressure) are highly expressed in vascular tissues (322). These data suggested that focusing the expression studies and functional investigations on genes nearby GWAS-identified SNPs may be a good first strategy, as they may drive pathways involved in disease pathophysiology.

Here, we aimed to identify novel genes contributing to T2D risk through a dominant effect on insulin secretion in human. To do so, we first performed a comprehensive expression study of candidate T2D susceptibility genes closest to all GWAS-identified T2D SNPs in a large panel of human organs, tissues, and cells, followed by the functional analysis of the knockdown of these genes in human pancreatic beta-cell lines. Using this strategy, we first found that the expression of tested candidate T2D susceptibility genes was significantly and specifically

enriched in pancreatic beta cells, and we reported functional evidence for a role in insulin secretion of four T2D susceptibility genes (*PRC1*, *SRR*, *ZFAND3*, and *ZFAND6*) with previously unknown presence and function in pancreatic beta cells.

2. Material and Methods

2.1. Samples included in the panel expression study. Total RNA from human colon, liver, kidney, adipose tissue, lung, skeletal muscle, heart, brain, small intestine, substantia nigra, hippocampus, dorsal root ganglion, and insula, and Poly A+ RNA from human hypothalamus, pituitary gland, caudate nucleus, and frontal lobe were purchased from Clontech Laboratories (Palo Alto, CA, USA). Pancreatic islets ($n = 8$; average purity: 70.0%; average viability: 94.3%) and exocrine pancreas ($n = 2$) were isolated from adult brain-dead donors without diabetes, in accordance with French and Italian local ethics committee approval (323,324). Pancreatic beta cells were obtained by laser capture microdissection (LCM beta cells; $n = 2$) (325) or were sorted by flow cytometry (FACS sorted beta cells; $n = 5$), as previously described (326). Primary pre-adipocytes (Lonza, Basel, Switzerland) came from subcutaneous fat of a non-diabetic Caucasian female patient. These pre-adipocytes were differentiated into mature adipocytes in PBM-2 medium supplemented with insulin, dexamethasone, phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), and indomethacin (all supplied by Lonza) for 10 days according to the manufacturer's recommendations. RNA samples from human EndoC- β H1 cells ($n = 3$), pre-adipocytes, and mature adipocytes were extracted as described below (see **section 2.9**).

2.2. Probe design and selection for the panel expression study. Capture probes (containing a biotin affinity tag) and reporter probes (containing a color-coded molecular barcode) were designed to detect 148 targets, including five housekeeping genes for normalization, genes whose expression is known to be enriched ('markers') in pancreatic islet including beta cell ($n = 13$), gut ($n = 3$), kidney ($n = 4$), lung ($n = 3$), and adipose tissue ($n = 3$), 28 genes known to be involved in monogenic diabetes, and 104 genes located nearby GWAS-identified SNPs associated with T2D risk (**Table A**) (51). The expression of the present housekeeping genes was previously shown to be uniform across a large panel of human tissues using RNA-sequencing (RNA-seq) (327). Here, we found that the expression of the five housekeeping genes was highly correlated across the present panel of human tissues ($R^2 > 0.85$). The genes for which expression is known to be enriched in specific tissues were chosen according to the literature, the GTEx portal (236) and/or the BioGPS portal (328).

2.3. Panel gene expression study and statistical analysis. The detection of transcripts was carried out in multiplexed hybridization reactions using NanoString Technologies (Seattle, WA, USA), following manufacturer's protocol. Each hybridization reaction contained 25-100 ng total RNA or 5 ng Poly A+ RNA at a final concentration of 0.8-3.3 ng/ul and 0.16 ng/ul

respectively. Reagents were mixed and incubated at 65 °C in a thermocycler block with a heated lid for 16 h. All post-hybridization steps were handled robotically on a custom liquid-handling robot (Prep Station, NanoString Technologies). Finally, samples were loaded into a microfluidic chamber (nCounter Cartridge, NanoString Technologies) and imaged in a Digital Analyzer (NanoString Technologies). Barcodes were counted in 555 fields of view per sample. Experimental quality control was performed with nSolver (NanoString Technologies) to flag failed samples. Normalized expression values were first obtained by considering the logarithm of the ratio of the expression of a given gene over the average expression of the set of five housekeeping genes (**Table A**) in corresponding samples. The expression profiles of relevant gene sets were analyzed through heat map representations. A double hierarchical clustering of the tissues and gene expressions in each set was performed, using Ward's method. Log₂ expression was centered and scaled. Each cell was colored to quantitatively reflect the relative expression: from green if the gene is over-expressed in the tissue compared to all other tissues, to red otherwise. For enrichment analyses, we established an expression threshold to classify 'under-expressed' and 'over-expressed' sets of genes (*i.e.* genes involved in monogenic diabetes, candidate susceptibility genes for T2D, and the different markers) in each panel tissue. For this purpose, the threshold was defined as the average gene expression across all tissues, plus 1.5 standard deviation (SD). We built a contingency table to count the number of genes from each set that were under- and over-expressed in the tested tissue and in the rest of the panel tissues. Fisher's exact test was applied to test whether the gene set was significantly over-expressed in each tested tissue from the panel.

2.4. Culture of EndoC-βH1 cells. EndoC-βH1 cells (329) were cultured in low-glucose (5.6 mM) Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 2% BSA fraction V (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), 50 μM 2-mercaptoethanol, 10 mM nicotinamide (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), 5.5 mg/ml human transferrin (Sigma-Aldrich), 6.7 ng/ml sodium selenite (Sigma-Aldrich), 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cells were seeded at a density of 2.5×10^6 on Matrigel (1%)/fibronectin (2 mg/ml; Sigma-Aldrich) coated plates and cultured at 37 °C and 5% CO₂.

2.5. Transfection of siRNA into EndoC-βH1 cells. SiRNA were transfected into EndoC-βH1 cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Freshly trypsinized EndoC-βH1 (1.5×10^6 cells) were incubated in suspension with Lipofectamine-siRNA complex in Opti-MEM (Invitrogen) for 10 min and then were plated onto Matrigel-fibronectin-coated culture wells. Six hours later, the medium was replaced. We used ON-TARGETplus siRNA

SMARTpool for each gene (20-30 nM) and ON-TARGETplus nontargeting pool for controls (siNTP; Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were analyzed 72 hours post transfection.

2.6. Assessment of insulin secretion from EndoC- β H1 cells. Transfected EndoC- β H1 cells were seeded onto Matrigel-fibronectin-coated 96-well plates at 5×10^4 cells/well. Three days post transfection, cells were incubated overnight in culture medium that contained 2.8 mM glucose and then in HEPES-buffered Krebs-Ringer Buffer (KRB; 116 mmol/l NaCl, 5.06 mmol/l KCl, 1.007 mmol/l CaCl₂, 1.01 mmol/l MgCl₂, 23.96 mmol/l NaHCO₃, 10 mmol/l HEPES, pH 7.4, and 0.2% BSA solution) that contained 0.5 mM glucose \pm 0.5 mM IBMX (Sigma Aldrich) for 60 minutes. This supernatant was subsequently collected (supernatant 1) and replaced with 16.7 mM glucose KRB \pm 0.5 mM IBMX for 60 minutes at 37 °C and then collected (supernatant 2). For insulin content measurement, cells were lysed with TETG buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 137 mM NaCl, 1% Triton X-100, 10% Glycerol, 2 mM EGTA with protease inhibitors; Roche). Lysate and supernatants were centrifuged for 5 minutes at 700 g. Samples were kept frozen at -20 °C before use. Insulin concentration in the supernatants and intracellular content of the EndoC- β H1 cells were measured by ELISA according to manufacturer's instructions using the Human Insulin Kit (Merckodia, Uppsala, Sweden). Insulin content was used for normalization.

2.7. Statistical analysis of insulin secretion from EndoC- β H1 cells. Absorbance data were measured, with technical duplicates of experimental triplicates, leading to six measurements maximum per experimental conditions (that were subsequently repeated). To ensure a reduced technical bias from the absorbance data, the technical duplicates' average absorbance was kept when the relative error was lower than 20% among the technical duplicates (this threshold being based on the observed distribution of the technical relative errors over 100 experiments). Fold changes of insulin secretion (*i.e.* secretion at stimulatory glucose levels divided by secretion at basal glucose levels) were then computed for each siRNA. Fold change of insulin secretion for each siRNA was analyzed using a linear regression adjusted for experimental conditions (operator and date).

2.8. Measurement of cell viability of EndoC- β H1 cells. Cell viability was measured by quantifying the amount of ATP present, which indicates the presence of metabolically active cells, through the CellTiter-Glo 2.0 Assay (Promega, Madison, WI, USA), following manufacturer's protocol. Luminescence measurement was performed at baseline and 72 hours after transfection of siRNA.

2.9. Mice and mouse islet isolation. Control female C57BL/6J mice and obese (ob/ob) female mice of the C57BL/6J background were obtained from Elevage Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France). Isolation and islet cultures were performed as previously described (330). Briefly, mouse islets were maintained in islets medium (RPMI 1640; GIBCO Life Technologies) with serum (FCS; PAA laboratories, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France), 1mM sodium pyruvate, 50 μ M β -mercaptoethanol, 10 mM Hepes and 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (Life Technologies). For the streptozotocin (STZ) treated islets (from control mice), 2 mM of Streptozocin Sigma S0130 (Sigma-Aldrich) were added in the islet medium for 24 hours. All animal procedures were conducted in accordance with the institutional guidelines approved by the institutional Animal Care and Ethical Use Committee of the University of Lille, France.

2.10. RNA isolation, reverse transcription, and quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted 72 hours post transfection from EndoC- β H1 cell using the NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. Total RNA from mouse pancreatic islets was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtabœuf, France).

The assessment of purity and quantity of extracted RNA was performed using NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher). cDNA was synthesized from 400 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

RT-qPCR was performed using Brilliant III QRT-PCR SYBR Green Low ROX Master Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and was analyzed through the ViiA 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Knockdown efficiency was assessed by RT-qPCR of the target genes using the following PrimeTime qPCR Primers or designed primers (Integrated DNA Technologies): *ZFAND3* (Hs.PT.58.1283673), *ZFAND6* (Hs.PT.58.14433903), *PRC1* (Hs.PT.58.50434811), *SRR* (Hs.PT.58.25800883), *KCNK16* (Hs.PT.58.20909681), *CDKN2A* (Hs.PT.58.40743463g), *SLC30A8* (Hs.PT.56a.14618432), *TBC1D4* (Hs.PT.58.45499), *TCF19* (Hs.PT.58.23138597), *HNF4A* (Forward: 5'-GCC ATC ATC TTC TTT GAC CCA-3'; Reverse: 5'-GAT GTA GTC CTC CAA GCT CAC-3'), *GCK* (Forward: 5'-TGA AGG TGG GAG AAG GTG AG-3'; Reverse: 5'-GAT GCA CTC AGA GAT GTA GTC G-3'), *MPHOSPH9* (Hs.PT.58.3849657), *SSRI* (Hs.PT.58.2437881), *FAF1* (Hs.PT.58.39097947), *KLHDC5* (Hs.PT.58.21065180), in triplicate on 384-well plates. *PSMB2* (Forward: 5'-TTG TCC AGA TGA AGG ACG ATC A-3'; Reverse: 5'-AGC CTC TCC AAC ACA CAG GA-3') endogenous control gene was used to normalize gene expression by $\Delta\Delta$ Ct method, where the final

normalized quantity was expressed as $2^{(Ct_{target} - Ct_{siNTP})}$. For the gene expression study in mouse pancreatic islets, we followed the same methods and used the following primers: *Prc1* (Forward: 5'-AGC CTG TGG AGG CAA TTATG-3'; Reverse: 5'-AAC CGT ACA ATC TCG GCA TC-3'), *Srr* (Forward: 5'-CCT GCA GTG ATA GCT GGA CA-3'; Reverse: 5'-AAG CCA ATG CTG GAT TTG AC-3'), *Zfand3* (Forward: 5'-GGG GTC CAG CAA GAC TAT GA-3'; Reverse: 5'-CTA CTA GTC GCG GTC GCT TC-3'), *Zfand6* (Forward: 5'-GAG ACA GAA GAC CTG CAA GGA-3'; Reverse: 5'-ACG GTG CAC ACC ACA GTA AA-3') and *Ins2* (Forward: 5'-TCT AGT TGC AGT AGT TCT CCA-3'; Reverse: 5'-TGG CTT CTT CTA CAC ACC CA-3'). *Actb* (Forward: 5'-CAG CAG ATG TGG ATC AGC AAG-3'; Reverse: 5'-AGC TCA GTA ACA GTC CGC C-3') endogenous control gene was used to normalize gene expression.

2.11. RNA-seq. RNA-seq was performed in RNA samples that were extracted from EndoC- β H1 cells transfected with either siNTP, siPRC1, siSRR, siZFAND6, or siZFAND3, from at least three independent transfections. RNA libraries were prepared using the TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) following the manufacturer's instructions. The libraries were sequenced using the HiSeq 4000 (Illumina). A mean of 65 million paired-end reads of 75 bp were generated for each sample. More than 90% of the reads for each library were effectively mapped to the hg19 human genome assembly using TopHat2 (331). Subsequently, both quantification and annotation of the reads were performed using Bioconductor package Rsubread (332). Finally, the differential gene expression analyses (*i.e.* EndoC- β H1 cells transfected with siNTP *versus* EndoC- β H1 cells transfected with either siPRC1, siSRR, siZFAND6, or siZFAND3) were performed using Bioconductor package DESeq2 (333). The differentially expressed genes were subjected to Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Hilden, Germany) to decipher the major biological pathways, networks, and diseases emphasized by the significantly deregulated genes (with a *p*-value < 0.05).

2.12. Immunofluorescence. Isolated human islet clusters or tissue sections from normal human pancreases were collected and fixed in 4% (v/v) paraformaldehyde overnight. Before immunofluorescence, sections were deparaffinized with xylene and rehydrated with a series of alcohol solutions of decreasing concentration (90-70-50%). Sections and cells attached to chambers were then washed with PBS. Antibody dilutions and rinsing steps were performed in PBS. Incubations with primary antibodies were done at 4 °C overnight. For double staining, slides were pre-treated 20 minutes with 0.5% Triton X-100 and 30 minutes with 0.1% BSA at room temperature. Slides were then incubated with a guinea pig anti-insulin antibody (1:500; Abcam, Cambridge, UK) and either rabbit anti-PRC1 (1:100; Abcam), rabbit anti-SRR (1:100;

Abcam), rabbit anti-ZFAND3 (1:100; Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), or rabbit anti-ZFAND6 (1:100; Novus Biologicals) antibodies. After rinsing with PBS, slides were incubated for 1 hour with either an Alexa fluor 594–conjugated anti-guinea antibody (1:500; Thermo Fisher Scientific) or Alexa fluor 488–conjugated anti-rabbit antibody (1:500; Thermo Fisher Scientific). For immunofluorescence of EndoC-βH1 cells, after blocking with PBS 5% BSA for 30 minutes, cells were incubated with the primary antibodies for 1 hour. Immunofluorescence staining in tissue sections from normal human pancreases was performed when the immunofluorescence staining in isolated human islet clusters was not clear enough.

3. Results

3.1. Expression of candidate T2D susceptibility genes in a large panel of human organs, tissues, and cells

We analyzed the expression profile of 104 candidate T2D susceptibility genes (**Table A**) located nearby GWAS-identified SNPs associated with T2D risk (51) in a panel of human organs, tissues, and cells including colon, small intestine, liver, kidney, adipose tissue, pre-adipocytes, mature adipocytes, lung, skeletal muscle, heart, whole brain, substantia nigra, hippocampus, insula, hypothalamus, pituitary gland, caudate nucleus, frontal lobe, dorsal root ganglion, pancreatic islets, LCM beta cells, FACS sorted beta cells, exocrine pancreas, and the human pancreatic beta-cell line EndoC-βH1 (329). For this purpose, we used the PCR-free NanoString technology enabling the count of messenger RNA molecules without any biases due to amplification step. The heat map representation reporting the expression profile of 104 candidate susceptibility genes for T2D in the panel of human tissues is shown in **Figure A**.

In order to validate this methodology, we first explored in the same panel of human samples the expression of genes (*i.e.* ‘markers’) known to be highly (or even specifically) expressed in the gut (**Figure B1**), adipose tissue (**Figure C1**), kidney (**Figure D1**), lung (**Figure E1**), and pancreatic islet (**Figure F1**). Furthermore, we investigated the expression of 28 genes known to be involved in monogenic diabetes (**Figure G**), as the proteins encoded by these genes have a well-known role in the function and/or development of pancreatic beta cells (51). As expected, we confirmed a significant enrichment of our gut markers expression in small intestine ($p = 6.7 \times 10^{-5}$; **Figure B2**), of adipose tissue markers expression in mature adipocytes and adipose tissue ($p = 3.4 \times 10^{-4}$; and $p = 3.4 \times 10^{-4}$, respectively; **Figure C2**), of kidney markers expression in kidney ($p = 1.5 \times 10^{-6}$; **Figure D2**), and of lung markers expression in lung ($p = 1.7 \times 10^{-5}$;

Figure E2). Importantly, we found that the expression of the pancreatic islet markers is significantly enriched in pancreatic islets, FACS sorted beta cells, LCM beta cells, and EndoC- β H1 cells ($p = 2.3 \times 10^{-4}$; $p = 1.9 \times 10^{-5}$; $p = 2.3 \times 10^{-11}$; and $p = 5.0 \times 10^{-8}$, respectively; **Figure F2**), but is not significantly enriched in exocrine pancreas ($p > 0.05$; **Figure F2**).

Secondly, we found that the expression of the genes causing monogenic diabetes is significantly enriched in LCM beta cells, FACS sorted beta cells and EndoC- β H1 cells ($p = 2.1 \times 10^{-3}$; $p = 2.1 \times 10^{-3}$; and $p = 3.0 \times 10^{-4}$, respectively; **Figure 1**). Altogether these results validated the accuracy of our methodology.

Interestingly, the expression of the 104 candidate T2D susceptibility genes was also significantly enriched in LCM beta cells, FACS sorted beta cells and EndoC- β H1 cells ($p = 5.1 \times 10^{-4}$; $p = 1.6 \times 10^{-3}$; and $p = 1.6 \times 10^{-3}$, respectively; **Figure 2**), but not in the main insulin-target tissues including liver, adipose tissue, or skeletal muscle ($p > 0.05$; **Figure 2**).

3.2. Effect of candidate T2D susceptibility genes knockdown on insulin secretion from human EndoC- β H1 cells

Our present expression results prompted us to investigate the effect of candidate T2D susceptibility gene knockdown by siRNA on insulin secretion from human pancreatic EndoC- β H1 beta-cell line. We selected genes to be silenced based on at least one of these two criteria: i) a high expression in EndoC- β H1 cells, and/or ii) an enriched expression in EndoC- β H1 cells compared to all non-pancreatic tissues. We subsequently obtained 15 genes in which decreased expression by siRNA in EndoC- β H1 cells was above 50% (**Figure H**). Among these genes, there were *GCK* encoding glucokinase and *HNF4A* encoding hepatocyte nuclear factor 4 alpha. These two genes are known to be mutated in patients presenting with monogenic diabetes and to play a key role in insulin secretion from pancreatic beta cells (51). Furthermore, mice with either a global *Gck* deletion or beta cell-specific *Gck* deletion die within a few days of birth from severe hyperglycemia (334); mice with beta cell-specific *Hnf4a* deletion exhibit impairment of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS) (335). Therefore, we expected that the decreased expression of *GCK* or *HNFA4* also would have significantly impaired insulin secretion from EndoC- β H1 cells. We found that the decreased expression of *HNF4A* significantly reduces glucose-stimulated insulin secretion (GSIS; $p < 0.01$, **Figure 3A**), and *GCK* knockdown significantly decreases GSIS evoked by IBMX ($p < 0.001$; **Figure 3B**). These results validated our protocol.

We did not find any significant effect of the decreased beta-cell expression of *MPHOSPH9*, *SSRI1*, *FAF1* or *KLHDC5* on GSIS evoked or not by IBMX ($p > 0.05$; **Figures I1, I2, I3, and I4**, respectively).

In contrast, insulin secretion from EndoC- β H1 cells was significantly changed by the decreased expression of five T2D susceptibility genes already suggested to be expressed and/or to contribute to beta-cell function (272,336–339): the knockdown of *TCF19* was found to significantly decrease GSIS ($p < 0.01$; **Figure 4A**); the decreased expression of *SLC30A8* affected GSIS evoked or not by IBMX ($p < 0.05$; **Figure 4B**); the knockdown of *TBC1D4* was found to significantly reduce GSIS evoked by IBMX ($p < 0.01$; **Figure 4C**); the decreased expression of *CDKN2A* was found to decrease GSIS evoked by IBMX ($p < 0.01$; **Figure 4D**); and the knockdown of *KCNK16* was found to stimulate GSIS evoked by IBMX ($p < 0.05$; **Figure 4E**).

Furthermore, we found that the decreased expression of four other candidate T2D susceptibility genes, with no evidence of expression and role in beta cells, significantly affects insulin secretion from EndoC- β H1 cells: the *PRC1* knockdown was found to significantly reduce GSIS evoked or not by IBMX ($p < 0.05$; **Figure 5A**); the *SRR* knockdown was found to significantly decrease GSIS evoked by IBMX ($p < 0.01$; **Figure 5B**); the *ZFAND3* knockdown was found to significantly affect GSIS ($p < 0.01$; **Figure 5C**); and the *ZFAND6* knockdown was found to reduce GSIS evoked by IBMX ($p < 0.05$; **Figure 5D**).

As *PRC1* (encoding protein regulator of cytokinesis 1), *SRR* (encoding serine racemase), *ZFAND3* (encoding zinc finger AN1-type containing 3), and *ZFAND6* (encoding zinc finger AN1-type containing 6) have never been described in pancreatic islets and beta cells, we confirmed their expression at protein level by immunofluorescence staining in human pancreatic islets (**Figures 6A, 6B, 6C, 6D, J1, and J2**) and in EndoC- β H1 cells (**Figures K1, K2, K3, and K4**).

3.3. Deciphering the major biological pathways and networks emphasized by the decreased expression of *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6*, and *ZFAND3* in EndoC- β H1 cells

We next performed RNA-seq in EndoC- β H1 cells with decreased expression of *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6*, or *ZFAND3*, compared to control cells, to decipher the major biological pathways and networks associated with those genes with yet unknown function in pancreatic beta cells.

When we analyzed the transcriptome of EndoC- β H1 cells transfected with si*PRC1* versus the transcriptome of control cells using Ingenuity Pathway Analysis (IPA), we found that *PRC1* was included in a network of 28 molecules entitled “Cell Cycle, Cellular Movement, Cellular

Assembly and Organization” (**Figure L1**). Subsequently, we analyzed the diseases and/or functions emphasized by the *PRCI* knockdown in EndoC-βH1 cells. Among the significant outputs, we found networks related to the “quantity of carbohydrates” ($p = 2.7 \times 10^{-8}$; **Figure L2**), “quantity of insulin in blood” ($p = 4.8 \times 10^{-5}$; **Figure L3**), or “concentration of D-glucose” ($p = 4.6 \times 10^{-8}$; **Figure L4**). Furthermore, we found a network related to “apoptosis” ($p = 1.1 \times 10^{-4}$; **Table B**), in particular “apoptosis of islets of Langerhans” ($p = 4.3 \times 10^{-3}$; **Figure 7A**), and a network related to “quantity of pancreatic cells” ($p = 9.9 \times 10^{-4}$; **Figure 7B**). When we analyzed the viability of the EndoC-βH1 cells transfected with si*PRCI* compared to control cells, we found that *PRCI* knockdown significantly decreased the viability of EndoC-βH1 cells ($p = 1.4 \times 10^{-6}$; **Figure 7C**).

When we analyzed the diseases and/or functions emphasized by the *SRR* knockdown in EndoC-βH1 cells, we found a significant network related to “serine phosphorylation” ($p = 8.5 \times 10^{-7}$; **Figure M1**), in particular “serine phosphorylation of peptide” ($p = 6.3 \times 10^{-7}$; **Figure M2**), a network related to “endoplasmic reticulum stress response” ($p = 8.9 \times 10^{-3}$; **Figure M3**) and a network related to “congenital disorders of glycosylation” ($p = 2.5 \times 10^{-4}$; **Figure M4**).

When we analyzed the transcriptome of EndoC-βH1 cells transfected with si*ZFAND6* versus the transcriptome of control cells, we found that ZFAND6 was included in a network of 27 molecules entitled “Cell Signaling, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry” (**Figure N1**). Furthermore, among the top diseases and/or functions emphasized by the *ZFAND6* knockdown in EndoC-βH1 cells, we found significant networks related to “glycolysis” ($p = 8.0 \times 10^{-3}$; **Figure N2**) and to “quantity of insulin in blood” ($p = 7.3 \times 10^{-3}$; **Figure N3**). We found a significant network related to “abnormal morphology of pancreas” ($p = 2.2 \times 10^{-3}$; **Figure N4**), in particular “abnormal morphology of small islets of Langerhans” ($p = 1.8 \times 10^{-2}$; **Figure N5**). We subsequently analyzed the transcriptome of EndoC-βH1 cells transfected with si*ZFAND3* versus the transcriptome of control cells. We found that ZFAND3 is included in a network of 16 molecules entitled “Cellular Assembly and Organization, Lipid Metabolism, Molecular Transport” (**Figure O1**). Furthermore, among the top diseases and/or functions emphasized by the *ZFAND3* knockdown in EndoC-βH1 cells, we found a significant network related to “transport of alpha-amino acid” ($p = 8.9 \times 10^{-4}$; **Figure O2**).

3.4. Positive correlation between the expression of *Ins2* and the expression of *Prc1*, *Srr*, *Zfand6*, and *Zfand3* in mouse pancreatic islets with altered beta-cell function

We finally investigated the expression of the four genes in mouse models with defective pancreatic beta-cell function due to STZ treatment or with compensatory islet cell function in

ob/ob mice carrying a non-sense mutation in the leptin gene. In two pools of pancreatic islets treated or not with STZ from eight 10-week old mice, we found a strong positive correlation between the expression of *Ins2* and the expression of *Prc1*, *Srr*, *Zfand3*, and *Zfand3*: the expression of these five genes was significantly reduced in pancreatic islets treated with STZ (**Figures P1** and **P2**). Furthermore, in pancreatic islets from five 5-week old mice or from five 8-week old mice, we also found this positive correlation: the expression of *Ins2*, *Prc1*, *Srr*, *Zfand3*, and *Zfand6* was strongly increased in ob/ob mice when compared to control mice (**Figures P3** and **P4**).

4. Discussion

4.1. Enrichment of GWAS-identified candidate T2D susceptibility genes in human pancreatic beta cells

Our first objective was to select candidate genes for putative insulin secretion defect associated with T2D from the list of genes closest to GWAS-identified SNPs associated with T2D risk. During the course of this analysis, we demonstrated that the expression of these 104 genes was enriched in human pancreatic beta cells. Surprisingly perhaps, we did not find any similar enrichment of their expression in insulin sensitive skeletal muscle, liver, adipose tissue, and in the gut and brain. An obvious limitation of our specific analysis is the fact that we analyzed the expression of the genes closest to GWAS-identified T2D SNPs, while one cannot rule out that a given T2D-associated SNP may also impact expression of gene(s) located several megabases away from the SNP, through a loop between a distal enhancer (where this SNP maps) and the target gene promoter. However, the majority of GWAS-identified T2D genes map in DNA sequences of enhancer specifically active in human pancreatic islets, which are usually located in the vicinity of the cis-regulated gene transcription start sites (321). In support of our result, when we assessed in the same panel of human tissues the expression of candidate obesity susceptibility genes closest to GWAS-identified obesity SNPs, we did not identify any enrichment of gene expression in beta cells while we found significant enrichment of gene expression in several regions of the brain (data not shown). Therefore, we believe that our conclusion on the enrichment of the expression of our selection of T2D genes in beta cells is not artefactual and is probably representative of other T2D genes, if they exist.

4.2. Decreased expression of seven genes (*GCK*, *HNF4A*, *TCF19*, *SLC30A8*, *TBC1D4*, *CDKN2A*, and *KCNK16*) already suggested to be expressed in beta cells and/or to contribute to beta-cell function significantly modifies insulin secretion from EndoC- β H1 cells

Subsequently, in the human EndoC- β H1 beta-cell line, we investigated the effect on insulin secretion of the knockdown of the 15 T2D susceptibility genes with the highest and/or the most specific expression in beta cells (with successful RNA interference). We first found that the decreased expression of the seven genes that were already suggested to be expressed and/or to contribute to beta-cell function (including *GCK*, *HNF4A*, *TCF19*, *SLC30A8*, *TBC1D4*, *CDKN2A* and *KCNK16*) is significantly associated with modified insulin secretion.

Indeed, as discussed above (**Section 3.2**), both *GCK* and *HNF4A* are known to be mutated in patients presenting with monogenic diabetes and to play a key role in insulin secretion from pancreatic beta cells (51).

TCF19 encodes the transcription factor 19 and has been reported to be expressed in human pancreatic islets (338). Furthermore, TCF19 was found to be a transcription factor necessary for proliferation and survival in the rat pancreatic INS-1 beta-cell line (338). Our data complement the current knowledge about this gene role, as we found that *TCF19* knockdown significantly decreased GSIS in human beta-cell lines.

SLC30A8 encodes the solute carrier family 30 member 8, which is a zinc transporter almost exclusively expressed in pancreatic alpha cells and beta cells and involved in the accumulation of zinc within insulin or glucagon secretory granules (340). Here, we found that *SLC30A8* knockdown significantly decreases GSIS in human beta cells. Importantly, this result was in line with previous data showing that the GWAS-identified nonsynonymous SNP associated with increased T2D risk (341) was deleterious for SLC30A8 zinc transport activity (342,343). Our data also supported previous results based on mice models which showed that mice deleted for *Slc30a8* present with significant impairments in glucose tolerance and that, in contrast, transgenic mice over-expressing *Slc30a8* display improved glucose homeostasis (272). However, our result did not support the hypothesis generated through the sequencing or genotyping of ~150,000 individuals that suggested that low-frequency loss-of-function mutations in *SLC30A8* protect against T2D (344). In order to reconcile this apparent contradiction, Rutter and Chimienti have recently suggested that the degrees of overall inhibition of SLC30A8 activity might be different according to the variant frequency, and that the resulting deleterious effect might be dependent on age or hypoxic beta-cell stress (340). Still, our data showed that decreasing *SLC30A8* expression by 70% in human beta cells is apparently deleterious for insulin secretion.

TBC1D4 encodes the Tre-2/BUB2/CDC16 domain family member 4 that is a Rab-GTPase-activating protein. This protein has been actively explored in skeletal muscle and adipose tissue and was found to play a key role in insulin-stimulated glucose uptake in these metabolic tissues (345). Importantly, the GWAS-identified T2D-associated *TBC1D4* SNP in Greenlandic individuals was shown to cause insulin resistance in skeletal muscle (346). However, this protein was also identified in human and mouse pancreatic beta cells, and *TBC1D4* mRNA expression was found to be downregulated in pancreatic islets from individuals with T2D (336). Furthermore, *Tbc1d4* knockdown by siRNA strongly decreased GSIS from mouse pancreatic MIN6 beta-cell line (336), which was in line with our present result in human EndoC- β H1 cells.

In conclusion, our data on *TBC1D4* have fully complemented previous observational studies in human islets and experimental studies in animal models and cell lines.

CDKN2A encodes the cyclin dependent kinase inhibitor 2A, also known as the tumor suppressor protein P16-INK4A. Here, we found that *CDKN2A* knockdown significantly decreases GSIS evoked by IBMX from EndoC- β H1 cells. This result was inconsistent with a previous study, which reported that *CDKN2A* knockdown significantly enhances GSIS evoked by IBMX from the same cell model (347). These opposite results might be explained by the different experimental conditions. In the present study, we performed a stimulation step (16.7 mM glucose \pm IBMX) subsequent to basal incubation (0.5 mM glucose \pm IBMX) in the same wells, while Pal and colleagues performed static insulin secretion assays, namely basal incubation and stimulation step were performed in different wells (347). As EndoC- β H1 cells are not always sensitive to glucose, the static protocol may lead to artefactual positive results. The same team did not confirm their results on *CDKN2A* knockdown in their recent systematic functional screening of candidate T2D susceptibility genes in the same EndoC- β H1 cells (348). In support of our conclusions, mice beta-cell specific activation of *Cdkn2a* enhanced GSIS, and increased *Cdkn2a* expression was found to be a marker of beta-cell senescence, associated with enhanced GSIS during mice normal aging (337). Importantly, Helman and colleagues also showed that *CDKN2A*-induced senescence in human EndoC- β H2 cells enhances GSIS (337). Thus, we believe from our data and others that decreased *CDKN2A* expression probably decreases GSIS and increases T2D risk (and not the opposite).

KCNK16 encodes the potassium two-pore domain channel subfamily K member 16 (also known as TALK1). This channel was shown to be expressed in mouse and human pancreatic beta cells and to play a key role in cell electrical excitability and in GSIS (339). The GWAS-identified nonsynonymous SNP associated with increased T2D risk was found to enhance the channel activity, and *Kcnk16* knockout in mouse beta cells enhanced Ca^{2+} influx and second-phase GSIS (339), which was in line with our present results in EndoC- β H1 cells demonstrating that *KCNK16* knockdown increases insulin secretion in humans.

4.3. Decreased expression of four genes (*PRC1*, *SRR*, *ZFAND6*, and *ZFAND3*) with no evidence of expression and role in pancreatic beta cells significantly modifies insulin secretion from EndoC- β H1 cells

We also found for the first time that the decreased expression of four T2D susceptibility genes (*PRC1*, *SRR*, *ZFAND6*, and *ZFAND3*, respectively), with no evidence of expression and role in beta cells, significantly affects insulin secretion from human EndoC- β H1 cells. Although *PRC1*, *SRR*, *ZFAND6*, and *ZFAND3* were ubiquitously expressed according to our panel of

human tissues (**Figures Q1, Q2, Q3, and Q4**, respectively) and to the Genotype-Tissue Expression (GTEx) portal (236), they were highly expressed and/or enriched in FACS sorted human beta-cells and in EndoC- β H1. Furthermore, the investigation of mouse pancreatic islets with altered beta-cell function demonstrated a positive correlation between the expression of insulin and the expression of *Prc1*, *Srr*, *Zfand3*, and *Zfand6*, confirming a role of these genes in pancreatic beta-cell function.

4.3.1. *PRC1*, a new gene involved in beta-cell function

PRC1 is a key regulator of cytokinesis and involved in many cancers. In hepatocellular carcinoma, PRC1 has an oncogenic effect through the enhancement of cancer proliferation, metastasis, and tumorigenesis (349). Importantly, the GWAS-identified *PRC1* SNP associated with T2D risk was also found to contribute to breast cancer risk (350). Our RNA-seq data from EndoC- β H1 cells with *PRC1* knockdown compared to control human cell line identified a network of genes related to cell cycle, cellular movement, cellular assembly and organization, as well as other gene networks related to glucose homeostasis and two networks related to apoptosis, especially one specific to pancreatic islets. We believe these results based on next-generation sequencing are sound as we found that *PRC1* knockdown in EndoC- β H1 cells significantly decreased their viability compared to control cells, which validated our RNA-seq analyses.

4.3.2. *SRR*, a new gene involved in beta-cell function

SRR is an enzyme generating D-serine from L-serine that is an endogenous co-agonist of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. Adult mice deleted for *Srr* presented with schizophrenia-like behavioral abnormalities, which could be rescued by D-Serine administration (351). Our RNA-seq data from EndoC- β H1 cells with *SRR* knockdown compared to control EndoC- β H1 cells emphasized a network related to serine phosphorylation (in particular serine phosphorylation of peptides). Importantly, metabolomics studies have suggested that serine predicted T2D incidence (352) and gestational diabetes mellitus incidence (353). Furthermore, the transcriptome of EndoC- β H1 cells with *SRR* knockdown identified a network related to endoplasmic reticulum stress response, which has been reported to be involved in decreased insulin secretion and in T2D development (354). Altogether, our data emphasized the interest of serine metabolism in T2D and human beta cells, opening potential avenues for prevention, in particular in high risk populations such as women with history of gestational diabetes mellitus.

4.3.3. ZFAND3 and ZFAND6, two new genes involved in beta-cell function

Very little is known about ZFAND3 and ZFAND6. Interestingly, the GWAS-identified SNP at ZFAND3 locus associated with T2D risk was precisely altering the related human islet enhancer activity bringing mechanistic explanation of its functional impact (321).

4.4. Conclusion

In conclusion, our staged post-GWAS functional study has several implications for further T2D pathophysiological investigations. First, it demonstrated that the expression of candidate T2D susceptibility genes closest to GWAS-identified T2D SNPs (usually named as T2D genes by consortia) is strongly enriched in human beta cells. We believe our study is useful for T2D pathophysiology, but we acknowledge that our study was far from being exhaustive as we did not, for feasibility reasons, systematically test the several hundreds of genes located in the same topologically associating domain (TAD) as GWAS-identified T2D SNPs, namely all genes that may, in theory, be regulated by these SNPs (as located in the same regulatory loop. Furthermore, we chose not to systematically test the genes located in the so-called linkage disequilibrium (LD) blocks around T2D SNPs, as regulatory regions are different from LD blocks that are only units of similar genetic recombination. Nevertheless, our data provide original information about the consequences of the partial inactivation of analyzed T2D genes on human beta-cell function, which contribute to the elucidation of conflicting functional data obtained for some T2D genes such as *SLC30A8* or *CDKN2A*. We agree that further validation in human mature islets would be of importance, but, unfortunately, it was impossible for us to have enough islet material for a study of this scale. We hope that the progress made in the protocol of beta-cell differentiation of human induced pluripotent stem cells soon will unlock this limitation. In addition, we showed the interest of unbiased multi-tissue gene expression analysis to prioritize challenging human beta-cell investigation. Furthermore, our RNA-seq analyses of the partial invalidation of four T2D susceptibility genes with no previously known function in beta cell identified specific gene networks related to key physiology pathways. When extended to other T2D susceptibility genes, this approach may bring progress towards better patient stratification and future precision medicine based on the genotyping of SNPs in genes sharing same functional signatures. A recent study has also reported the feasibility of systematic screening of T2D susceptibility genes in human beta cell lines without prior step of selection on enriched beta cell genes and suggested some plausible T2D causing genes (348). As different protocols have been used, the two studies provide complementary results and guarantee that future in-depth investigations of T2D susceptibility genes in pancreatic beta cell should be very fruitful.

Acknowledgments

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-46 [European Genomics Institute for Diabetes] and ANR-10-EQPX-07-01 [LIGAN-PM], to PF), from the European Research Council (ERC GEPIDIAB – 294785, to PF), from FEDER (to PF) and from the '*Région Nord Pas-de-Calais*' (to PF and to FKN). AB was supported by Inserm.

References

- [1] Bonnefond, A., Froguel, P., 2015. Rare and common genetic events in type 2 diabetes: what should biologists know? *Cell Metabolism* 21(3): 357–68, Doi: 10.1016/j.cmet.2014.12.020.
- [2] Marullo, L., El-Sayed Moustafa, J.S., Prokopenko, I., 2014. Insights into the genetic susceptibility to type 2 diabetes from genome-wide association studies of glycaemic traits. *Current Diabetes Reports* 14(11): 551, Doi: 10.1007/s11892-014-0551-8.
- [3] Pasquali, L., Gaulton, K.J., Rodríguez-Seguí, S.A., Mularoni, L., Miguel-Escalada, I., Akerman, I., et al., 2014. Pancreatic islet enhancer clusters enriched in type 2 diabetes risk-associated variants. *Nature Genetics* 46(2): 136–43, Doi: 10.1038/ng.2870.
- [4] Warren, H.R., Evangelou, E., Cabrera, C.P., Gao, H., Ren, M., Mifsud, B., et al., 2017. Genome-wide association analysis identifies novel blood pressure loci and offers biological insights into cardiovascular risk. *Nature Genetics* advance online publication, Doi: 10.1038/ng.3768.
- [5] Bonnefond, A., Lomberk, G., Buttar, N., Busiah, K., Vaillant, E., Lobbens, S., et al., 2011. Disruption of a novel Kruppel-like transcription factor p300-regulated pathway for insulin biosynthesis revealed by studies of the c.-331 INS mutation found in neonatal diabetes mellitus. *The Journal of Biological Chemistry* 286(32): 28414–24, Doi: 10.1074/jbc.M110.215822.
- [6] Martino, L., Masini, M., Bugliani, M., Marselli, L., Suleiman, M., Boggi, U., et al., 2015. Mast cells infiltrate pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia* 58(11): 2554–62, Doi: 10.1007/s00125-015-3734-1.
- [7] Marselli, L., Thorne, J., Dahiya, S., Sgroi, D.C., Sharma, A., Bonner-Weir, S., et al., 2010. Gene Expression Profiles of Beta-Cell Enriched Tissue Obtained by Laser Capture Microdissection from Subjects with Type 2 Diabetes. *PLoS ONE* 5(7): e11499, Doi: 10.1371/journal.pone.0011499.
- [8] Lukowiak, B., Vandewalle, B., Riachy, R., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Belaich, S., et al., 2001. Identification and Purification of Functional Human β -cells by a New Specific Zinc-fluorescent Probe. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49(4): 519–27, Doi: 10.1177/002215540104900412.
- [9] Eisenberg, E., Levanon, E.Y., 2013. Human housekeeping genes, revisited. *Trends in Genetics: TIG* 29(10): 569–74, Doi: 10.1016/j.tig.2013.05.010.
- [10] Melé, M., Ferreira, P.G., Reverter, F., DeLuca, D.S., Monlong, J., Sammeth, M., et al., 2015. The human transcriptome across tissues and individuals. *Science* 348(6235): 660–5, Doi: 10.1126/science.aaa0355.
- [11] Wu, C., Orozco, C., Boyer, J., Leglise, M., Goodale, J., Batalov, S., et al., 2009. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biology* 10(11): R130, Doi: 10.1186/gb-2009-10-11-r130.

- [12] Ravassard, P., Hazhouz, Y., Pechberty, S., Bricout-Neveu, E., Armanet, M., Czernichow, P., et al., 2011. A genetically engineered human pancreatic β cell line exhibiting glucose-inducible insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation* 121(9): 3589–97, Doi: 10.1172/JCI58447.
- [13] Bonner, C., Kerr-Conte, J., Gmyr, V., Queniat, G., Moerman, E., Thévenet, J., et al., 2015. Inhibition of the glucose transporter SGLT2 with dapagliflozin in pancreatic alpha cells triggers glucagon secretion. *Nature Medicine* 21(5): 512–7, Doi: 10.1038/nm.3828.
- [14] Kim, D., Pertea, G., Trapnell, C., Pimentel, H., Kelley, R., Salzberg, S.L., 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology* 14(4): R36, Doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- [15] Liao, Y., Smyth, G.K., Shi, W., 2013. The Subread aligner: fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research* 41(10): e108, Doi: 10.1093/nar/gkt214.
- [16] Love, M.I., Huber, W., Anders, S., 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* 15(12): 550, Doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
- [17] Postic, C., Shiota, M., Niswender, K.D., Jetton, T.L., Chen, Y., Moates, J.M., et al., 1999. Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase. *The Journal of Biological Chemistry* 274(1): 305–15.
- [18] Miura, A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takahashi, N., Fukui, K., et al., 2006. Hepatocyte nuclear factor-4 α is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry* 281(8): 5246–57, Doi: 10.1074/jbc.M507496200.
- [19] Bouzakri, K., Ribaux, P., Tomas, A., Parnaud, G., Rickenbach, K., Halban, P.A., 2008. Rab GTPase-Activating Protein AS160 Is a Major Downstream Effector of Protein Kinase B/Akt Signaling in Pancreatic β -Cells. *Diabetes* 57(5): 1195–204, Doi: 10.2337/db07-1469.
- [20] Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., et al., 2016. p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature Medicine* 22(4): 412–20, Doi: 10.1038/nm.4054.
- [21] Krautkramer, K.A., Linnemann, A.K., Fontaine, D.A., Whillock, A.L., Harris, T.W., Schleis, G.J., et al., 2013. Tcf19 is a novel islet factor necessary for proliferation and survival in the INS-1 β -cell line. *AJP: Endocrinology and Metabolism* 305(5): E600–10, Doi: 10.1152/ajpendo.00147.2013.
- [22] Mitchell, R.K., Hu, M., Chabosseau, P.L., Cane, M.C., Meur, G., Bellomo, E.A., et al., 2016. Molecular Genetic Regulation of *Slc30a8* /ZnT8 Reveals a Positive Association With Glucose Tolerance. *Molecular Endocrinology* 30(1): 77–91, Doi: 10.1210/me.2015-1227.
- [23] Vierra, N.C., Dadi, P.K., Jeong, I., Dickerson, M., Powell, D.R., Jacobson, D.A., 2015. The type-2 diabetes-associated K⁺ channel TALK-1 modulates beta-cell electrical excitability, 2nd-phase insulin secretion, and glucose homeostasis. *Diabetes*: db150280, Doi: 10.2337/db15-0280.

- [24] Rutter, G.A., Chimienti, F., 2015. SLC30A8 mutations in type 2 diabetes. *Diabetologia* 58(1): 31–6, Doi: 10.1007/s00125-014-3405-7.
- [25] Sladek, R., Rocheleau, G., Rung, J., Dina, C., Shen, L., Serre, D., et al., 2007. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature* 445(7130): 881–5, Doi: 10.1038/nature05616.
- [26] Kim, I., Kang, E.S., Yim, Y.S., Ko, S.J., Jeong, S.-H., Rim, J.H., et al., 2011. A low-risk ZnT-8 allele (W325) for post-transplantation diabetes mellitus is protective against cyclosporin A-induced impairment of insulin secretion. *The Pharmacogenomics Journal* 11(3): 191–8, Doi: 10.1038/tpj.2010.22.
- [27] Nicolson, T.J., Bellomo, E.A., Wijesekara, N., Loder, M.K., Baldwin, J.M., Gyulhandanyan, A.V., et al., 2009. Insulin Storage and Glucose Homeostasis in Mice Null for the Granule Zinc Transporter ZnT8 and Studies of the Type 2 Diabetes-Associated Variants. *Diabetes* 58(9): 2070–83, Doi: 10.2337/db09-0551.
- [28] Flannick, J., Thorleifsson, G., Beer, N.L., Jacobs, S.B.R., Grarup, N., Burt, N.P., et al., 2014. Loss-of-function mutations in SLC30A8 protect against type 2 diabetes. *Nature Genetics* 46(4): 357–63, Doi: 10.1038/ng.2915.
- [29] Sano, H., Kane, S., Sano, E., Mîinea, C.P., Asara, J.M., Lane, W.S., et al., 2003. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation. *The Journal of Biological Chemistry* 278(17): 14599–602, Doi: 10.1074/jbc.C300063200.
- [30] Moltke, I., Grarup, N., Jørgensen, M.E., Bjerregaard, P., Treebak, J.T., Fumagalli, M., et al., 2014. A common Greenlandic TBC1D4 variant confers muscle insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 512(7513): 190–3, Doi: 10.1038/nature13425.
- [31] Pal, A., Potjer, T.P., Thomsen, S.K., Ng, H.J., Barrett, A., Scharfmann, R., et al., 2016. Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans. *Diabetes* 65(2): 527–33, Doi: 10.2337/db15-0602.
- [32] Thomsen, S.K., Ceroni, A., van de Bunt, M., Burrows, C., Barrett, A., Scharfmann, R., et al., 2016. Systematic Functional Characterization of Candidate Causal Genes for Type 2 Diabetes Risk Variants. *Diabetes* 65(12): 3805–11, Doi: 10.2337/db16-0361.
- [33] Chen, J., Rajasekaran, M., Xia, H., Zhang, X., Kong, S.N., Sekar, K., et al., 2016. The microtubule-associated protein PRC1 promotes early recurrence of hepatocellular carcinoma in association with the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *Gut* 65(9): 1522–34, Doi: 10.1136/gutjnl-2015-310625.
- [34] Zhao, Z., Wen, W., Michailidou, K., Bolla, M.K., Wang, Q., Zhang, B., et al., 2016. Association of genetic susceptibility variants for type 2 diabetes with breast cancer risk in women of European ancestry. *Cancer Causes & Control*: 1–15, Doi: 10.1007/s10552-016-0741-6.
- [35] Hagiwara, H., Iyo, M., Hashimoto, K., 2013. Neonatal disruption of serine racemase causes schizophrenia-like behavioral abnormalities in adulthood: clinical rescue by d-serine. *PloS One* 8(4): e62438, Doi: 10.1371/journal.pone.0062438.

- [36] Cobb, J., Eckhart, A., Perichon, R., Wulff, J., Mitchell, M., Adam, K.-P., et al., 2015. A novel test for IGT utilizing metabolite markers of glucose tolerance. *Journal of Diabetes Science and Technology* 9(1): 69–76, Doi: 10.1177/1932296814553622.
- [37] Bentley-Lewis, R., Huynh, J., Xiong, G., Lee, H., Wenger, J., Clish, C., et al., 2015. Metabolomic profiling in the prediction of gestational diabetes mellitus. *Diabetologia* 58(6): 1329–32, Doi: 10.1007/s00125-015-3553-4.
- [38] Walter, P., Ron, D., 2011. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science* 334(6059): 1081–6, Doi: 10.1126/science.1209038.

Figure Legends

Figure 1. Enrichment analysis of the expression of the genes causing monogenic diabetes in the panel of human organs, tissues, and cells.

The black vertical line denotes a p -value of 0.05.

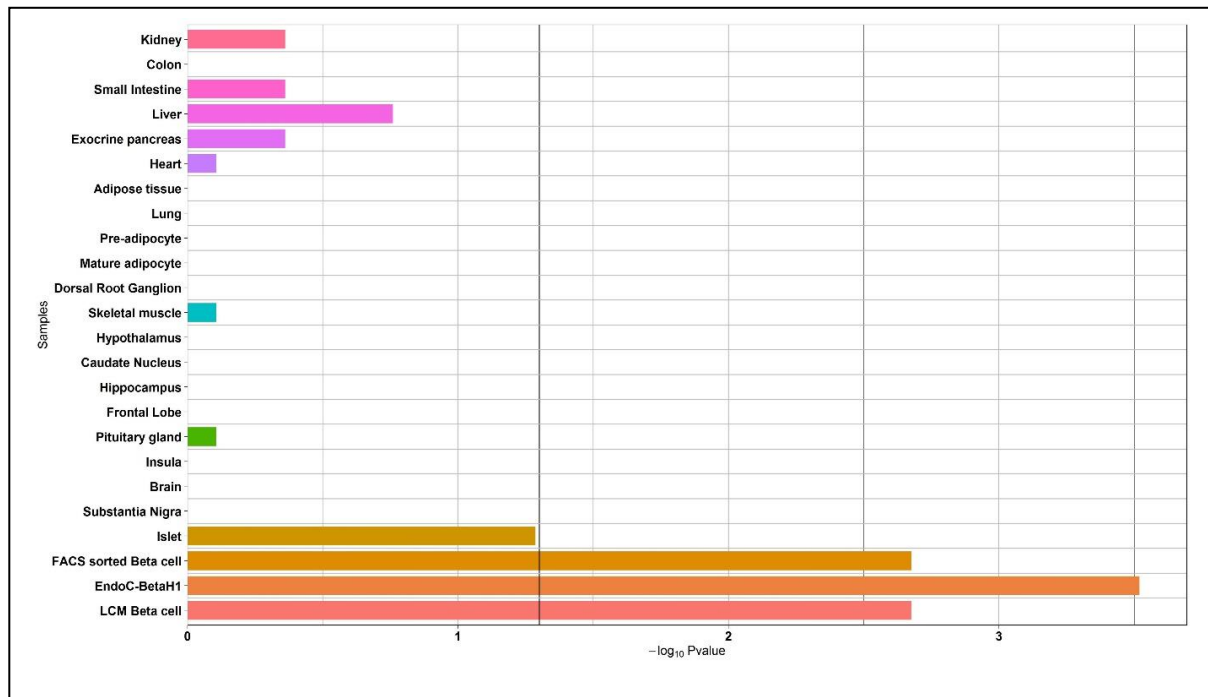


Figure 2. Enrichment analysis of the expression of candidate T2D-susceptibility genes in the panel of human organs, tissues, and cells. The black vertical line denotes a p -value of 0.05.

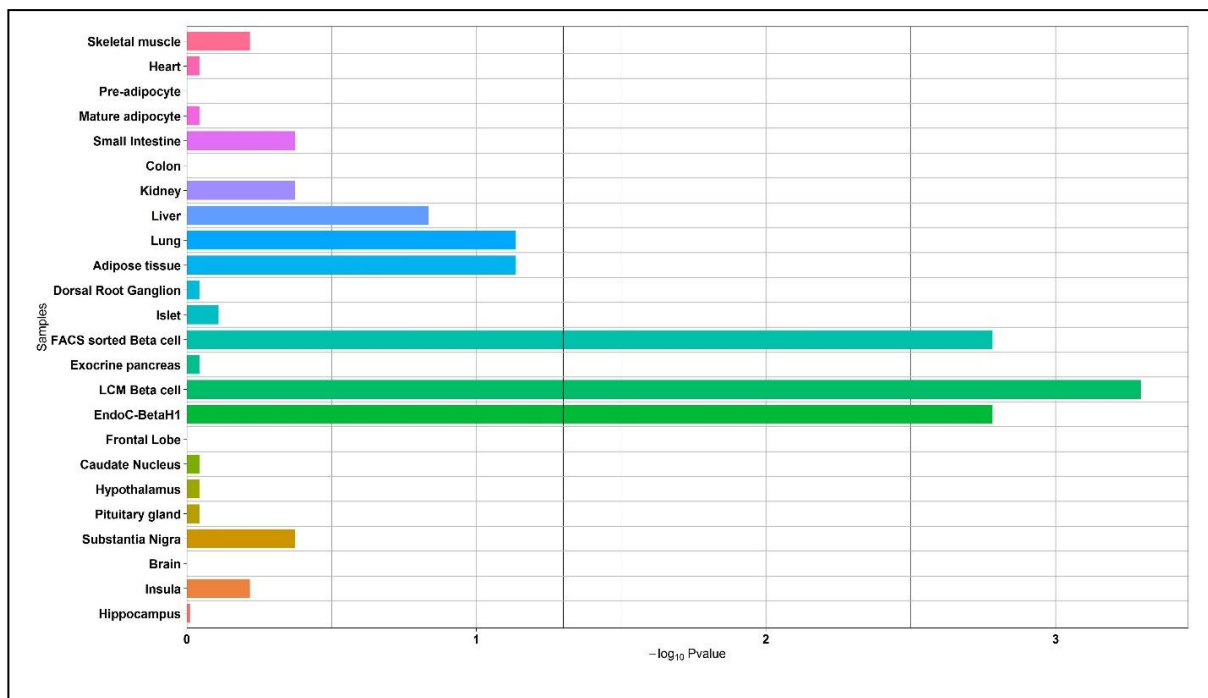


Figure 3. Decreased expression of *HNF4A* (A) or *GCK* (B), causing monogenic diabetes, leads to impaired insulin secretion from EndoC-βH1 cells.

EndoC-βH1 cells were transfected with control non-targeting pool siRNA (siNTP) or target gene siRNA and were analyzed 72 hours post-transfection. Insulin secretion (percentage of secretion of the total insulin content) was analyzed in response to 60 minutes incubation with 0.5 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX), followed by 60 minutes incubation with 16.7 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX). Data represent mean values \pm SEM of at least three independent experiments. $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; *ns*, not significant. *Glc*, glucose; *IBMX*, phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine.

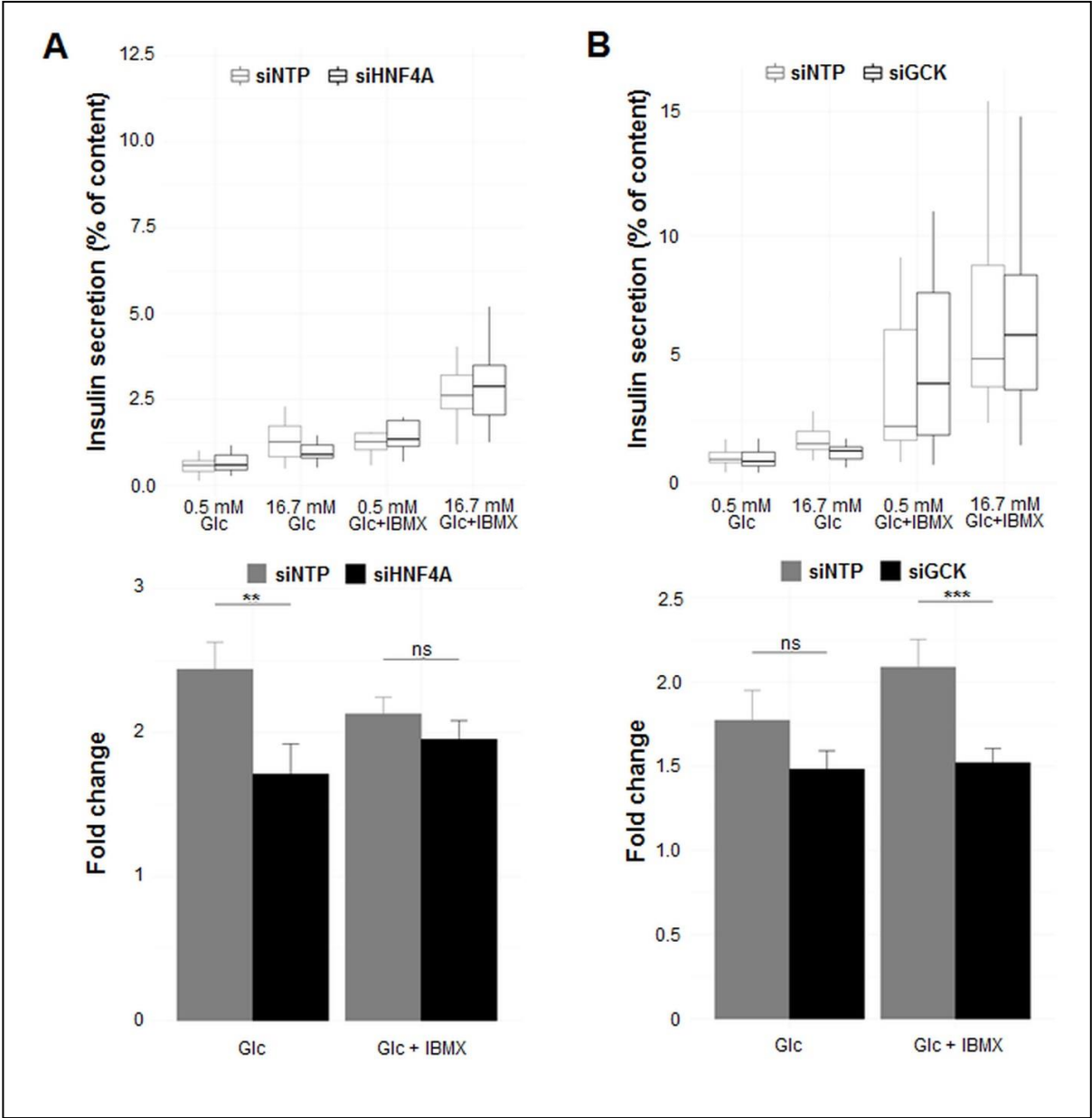


Figure 4. Decreased expression of *TCF19* (A), *SLC30A8* (B), *TBC1D4* (C), *CDKN2A* (D), or *KCNK16* (E), already suggested to be expressed in beta cell and/or to contribute to beta-cell function, significantly modifies insulin secretion from EndoC- β H1 cells.

EndoC- β H1 cells were transfected with control non-targeting pool siRNA (siNTP) or target gene siRNA and were analyzed 72 hours post-transfection. Insulin secretion (percentage of secretion of the total insulin content) was analyzed in response to 60 minutes incubation with 0.5 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX), followed by 60 minutes incubation with 16.7 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX). Data represent mean values \pm SEM of at least three independent experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01; ns, not significant. *Glc*, glucose; *IBMX*, phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine.

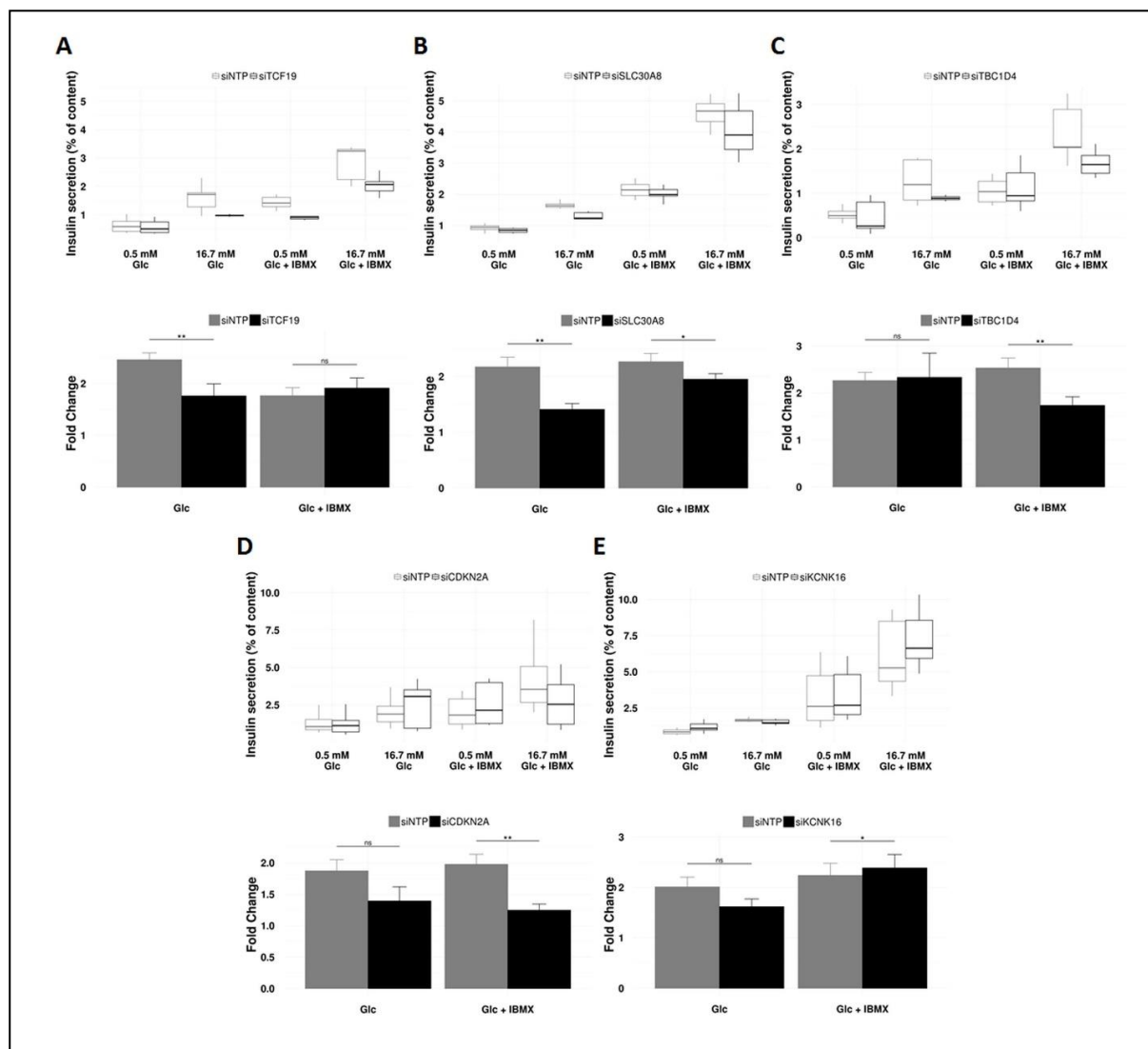


Figure 5. Decreased expression of *PRC1* (A), *SRR* (B), *ZFAND3* (C), or *ZFAND6* (D), with no evidence of expression and role in pancreatic beta cells, leads to impaired insulin secretion from EndoC-βH1 cells.

EndoC-βH1 cells were transfected with control non-targeting pool siRNA (siNTP) or target gene siRNA and were analyzed 72 hours post-transfection. Insulin secretion (percentage of secretion of the total insulin content) was analyzed in response to 60 minutes incubation with 0.5 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX), followed by 60 minutes incubation with 16.7 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX). Data represent mean values \pm SEM of at least three independent experiments. * p < 0.05; ** p < 0.01; *ns*, not significant. *Glc*, glucose; *IBMX*, phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine.

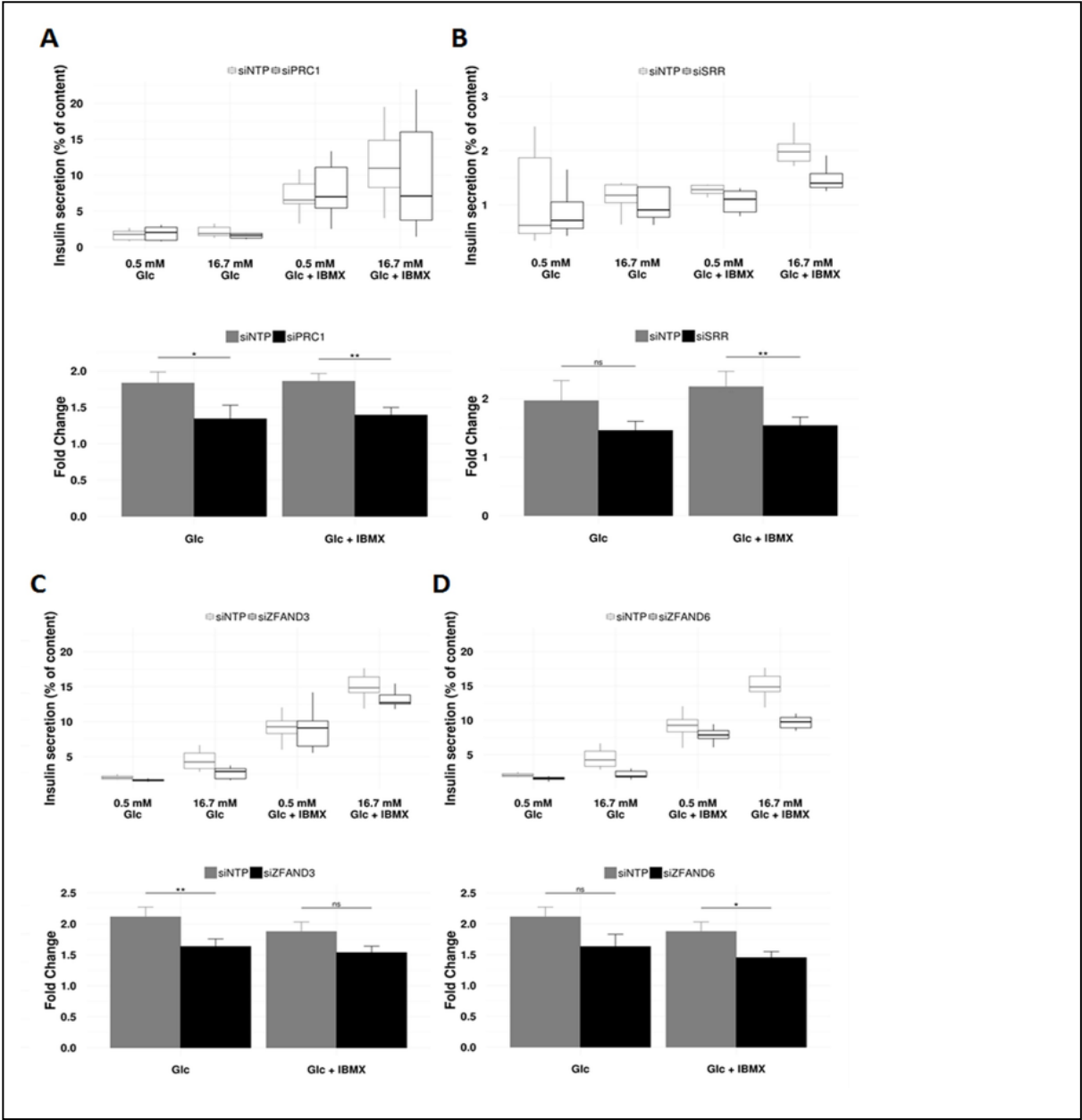


Figure 6. PRC1 (A), SRR (B), ZFAND3 (C), and ZFAND6 (D) are expressed in human pancreatic islets and beta cells.

Representative images of immunofluorescence staining for PRC1 (green; A), SRR (green; B), ZFAND3 (green; C), ZFAND6 (green, D), and insulin (red) performed on fixed isolated human islet clusters. Yellow (merged images) indicates co-localization of PRC1, SRR, ZFAND3, or ZFAND6 with insulin. Blue, DAPI.

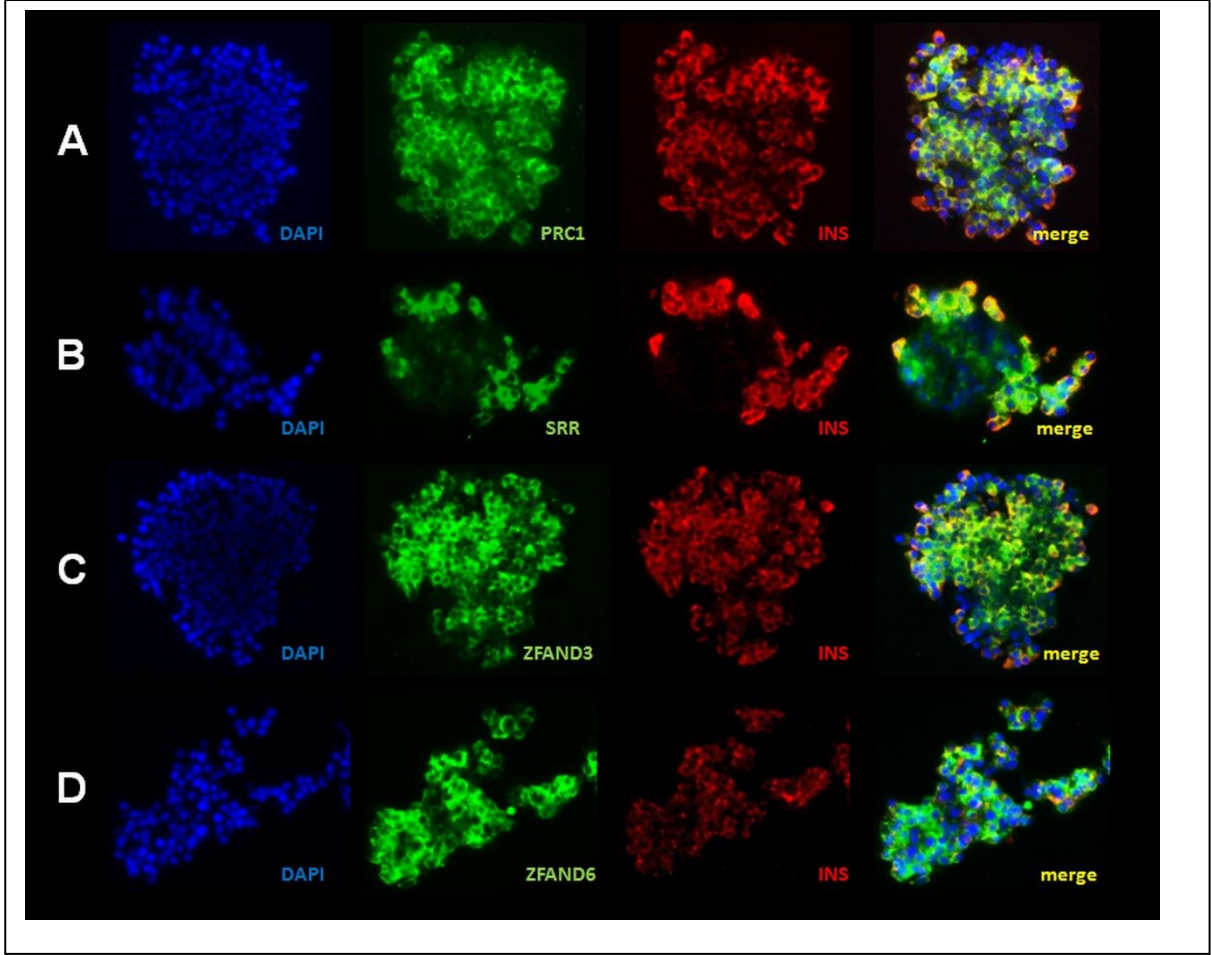
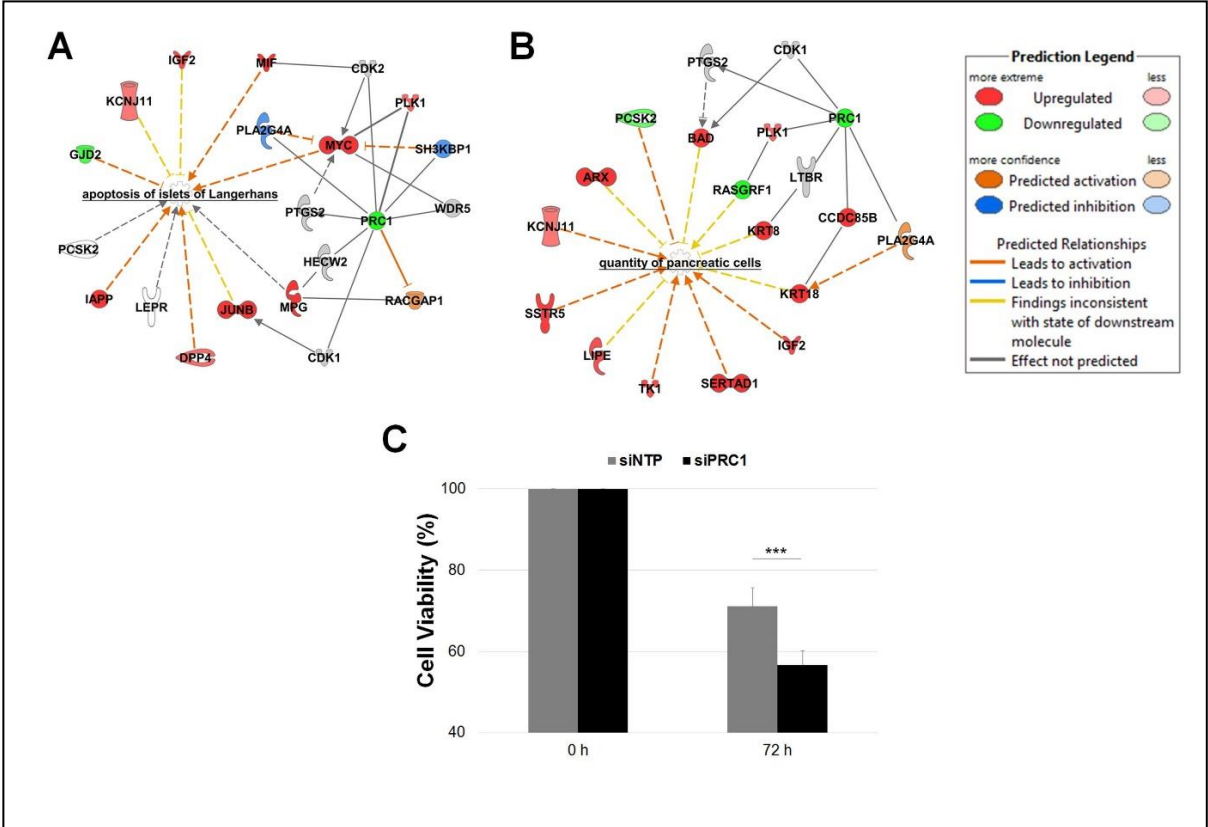


Figure 7. Decreased *PRC1* expression in EndoC-βH1 cells leads to increased apoptosis and decreased cell viability.

List of deregulated genes emphasized by the decreased expression of *PRC1* in EndoC-βH1 cells within the network related to apoptosis of islets of Langerhans (A) and the quantity of pancreatic cells (B) through IPA. Cell viability measurement (C) performed at baseline (100%) and 72 hours post transfection of siRNA (% compared to baseline). Data at 72 hours represent mean values ± SEM of at least five independent experiments. ****p* < 0.001.



Supplementary Data

Figure A. Heat map representing the expression of each T2D-susceptibility gene in the panel of human organs, tissues and cells. (cf infra **Annexe 3**)

Figure B. (1) Heat map representing the expression of three genes known to be highly expressed in gut in the panel of human organs, tissues and cells; **(2)** Enrichment analysis of gut markers expression in the panel of human organs, tissues and cells. The black vertical line denotes a p -value of 0.05.

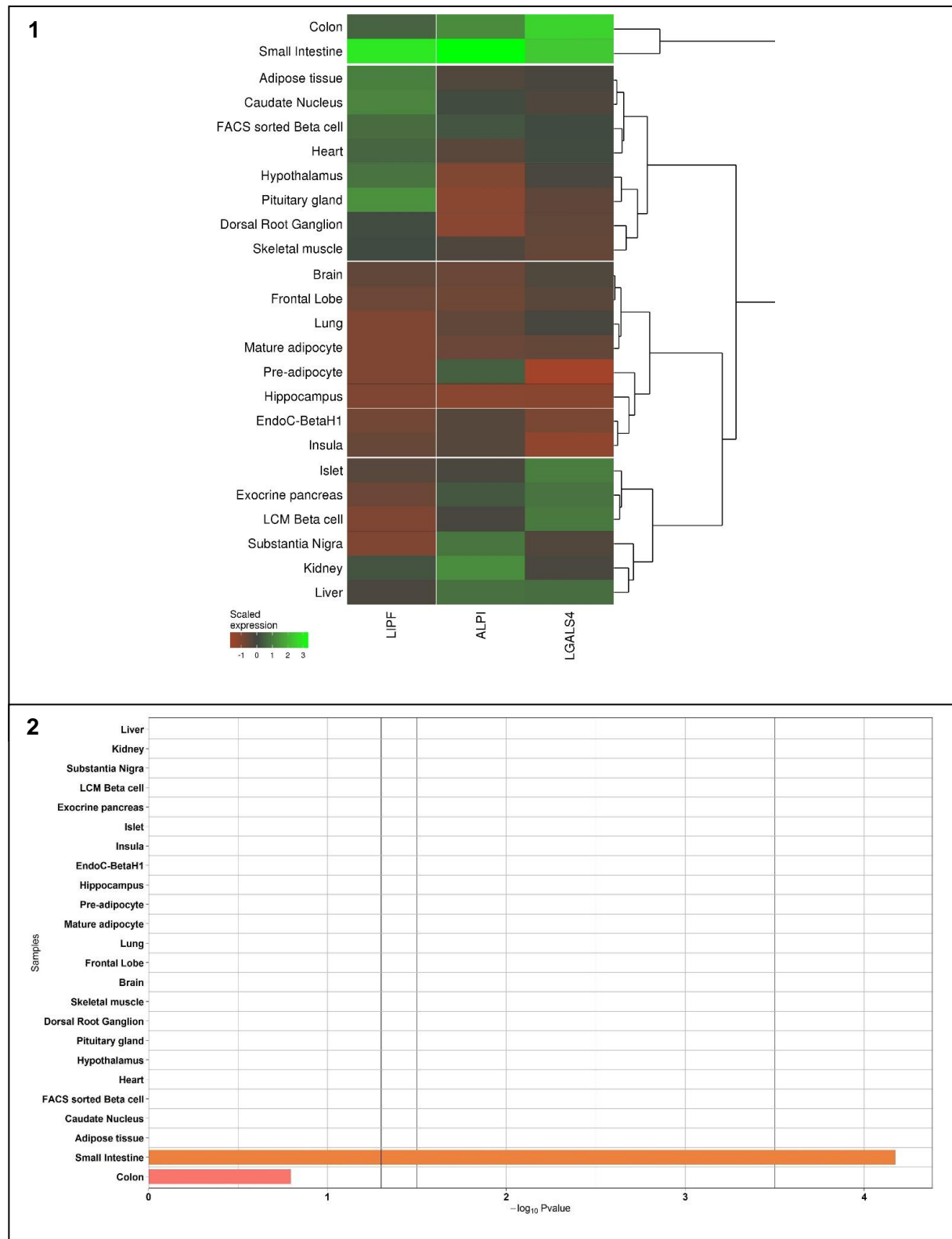


Figure C. (1) Heat map representing the expression of three genes known to be highly expressed in adipose tissue in the panel of human organs, tissues and cells; (2) Enrichment analysis of adipose tissue markers expression in the panel of human organs, tissues and cells. The black vertical line denotes a *p*-value of 0.05.

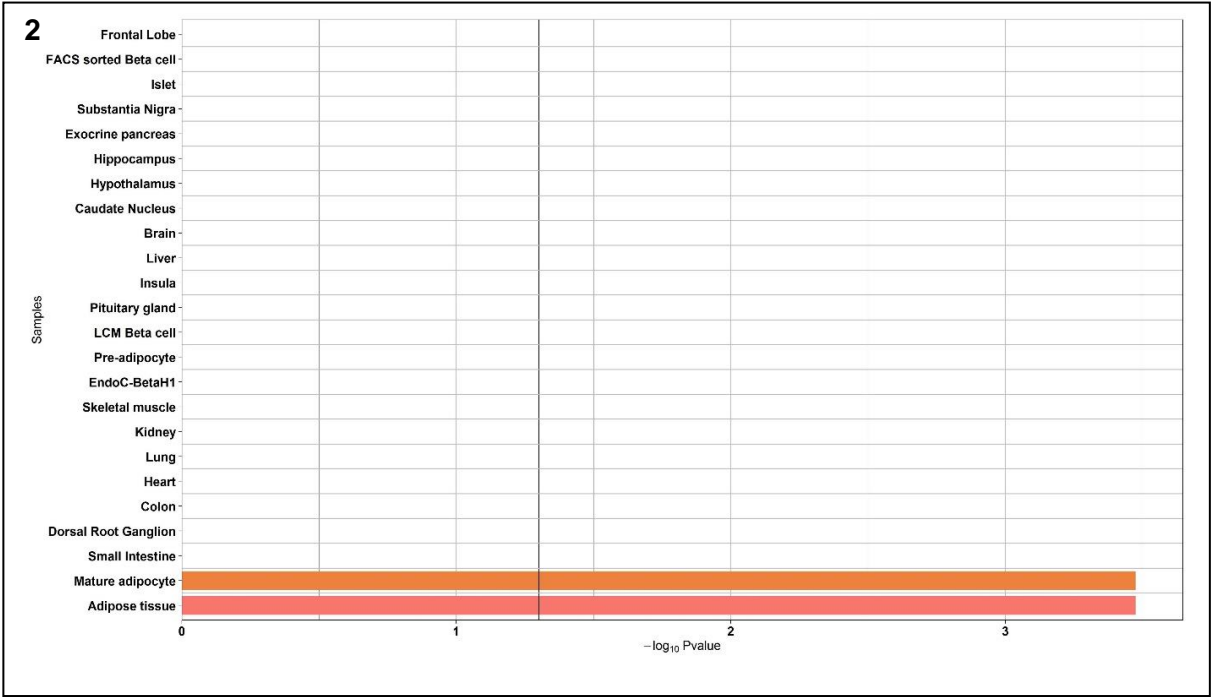
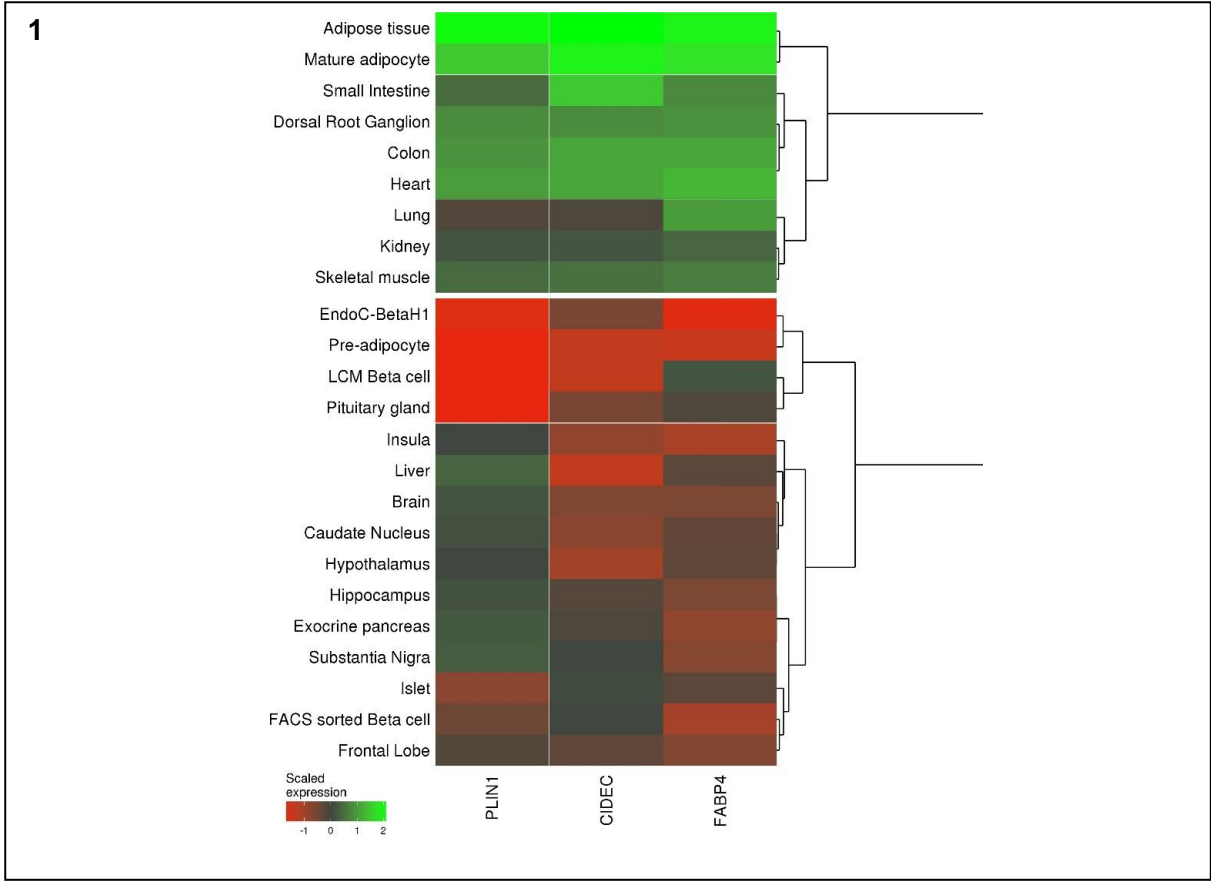


Figure D. (1) Heat map representing the expression of four genes known to be highly expressed in kidney in the panel of human organs, tissues and cells; (2) Enrichment analysis of kidney markers expression in the panel of human organs, tissues and cells. The black vertical line denotes a p -value of 0.05.

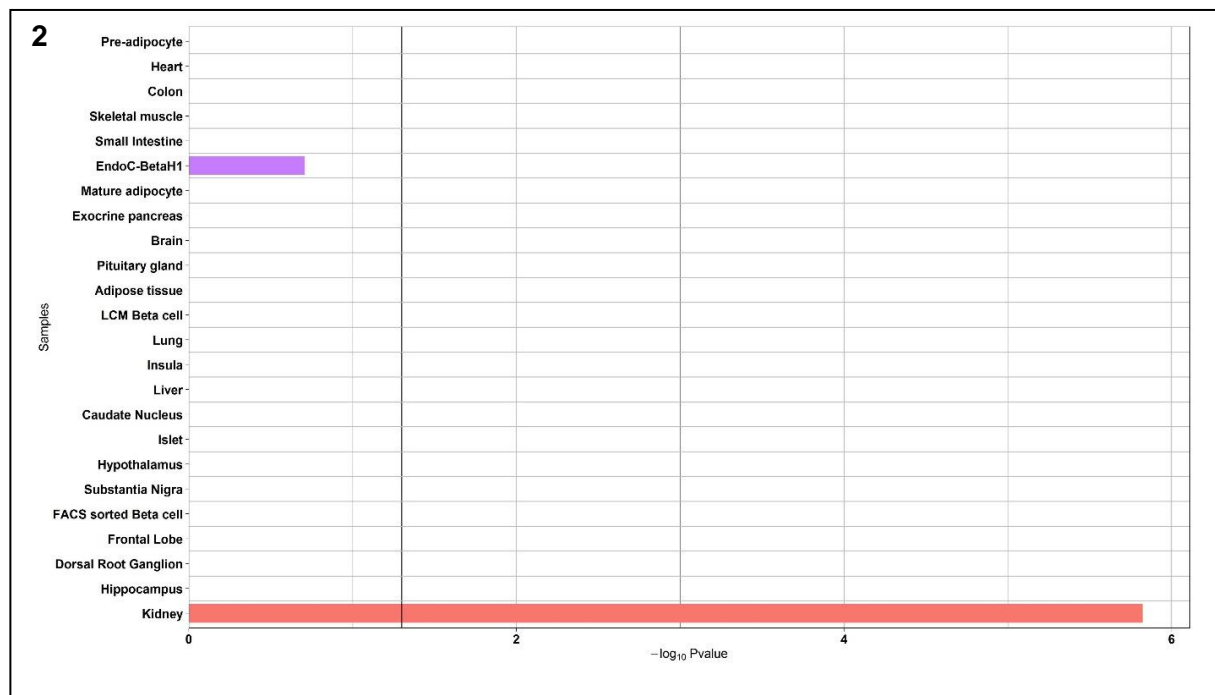
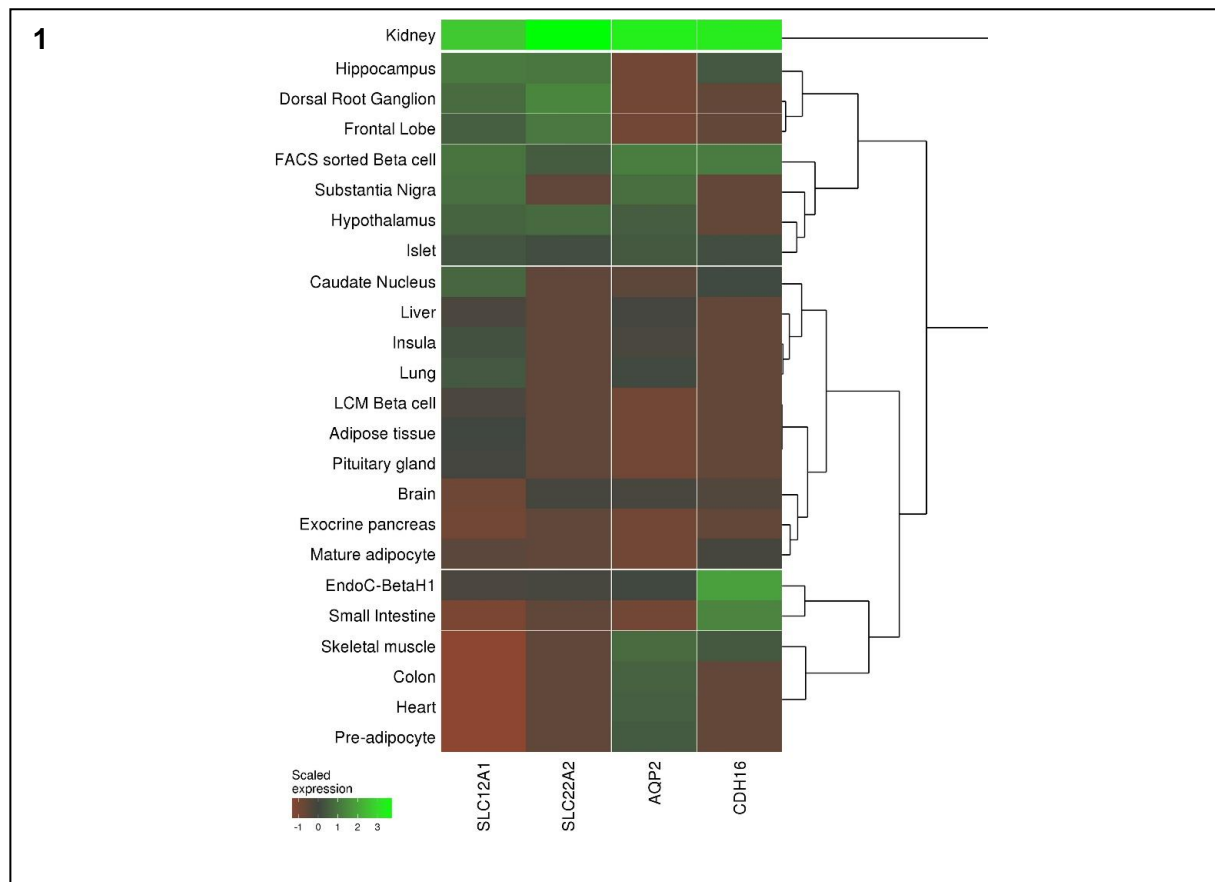


Figure E. (1) Heat map representing the expression of three genes known to be highly expressed in lung in the panel of human organs, tissues and cells; (2) Enrichment analysis of lung markers expression in the panel of human organs, tissues and cells. The black vertical line denotes a p -value of 0.05.

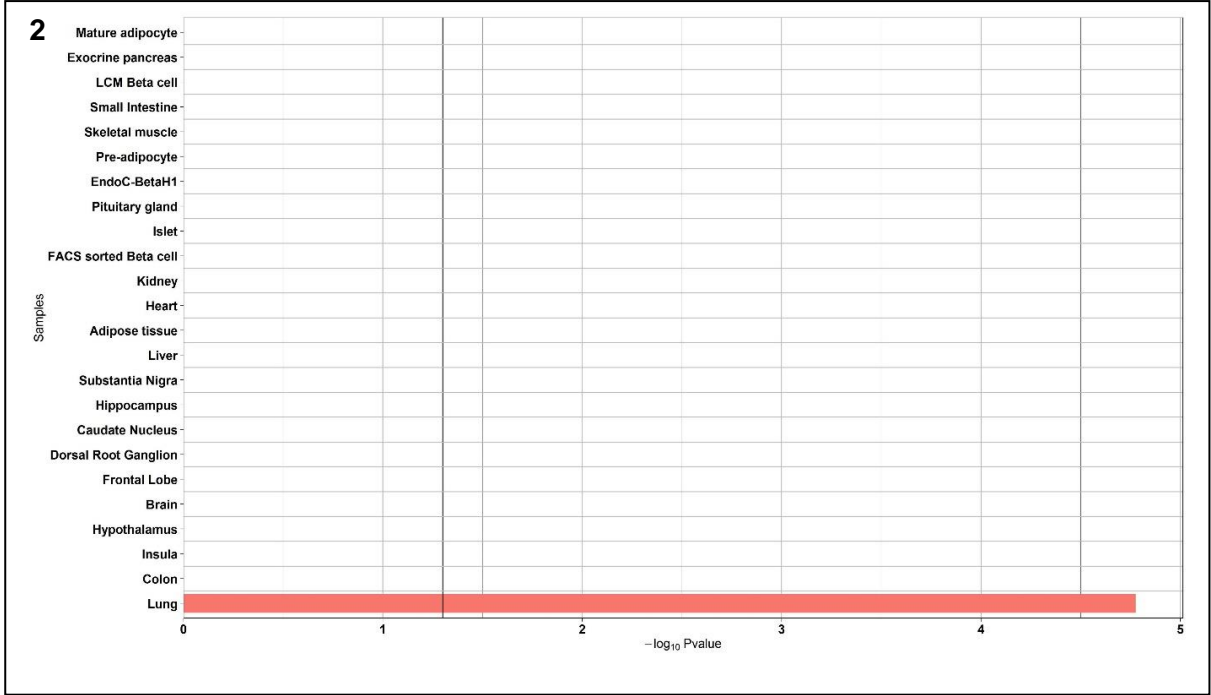
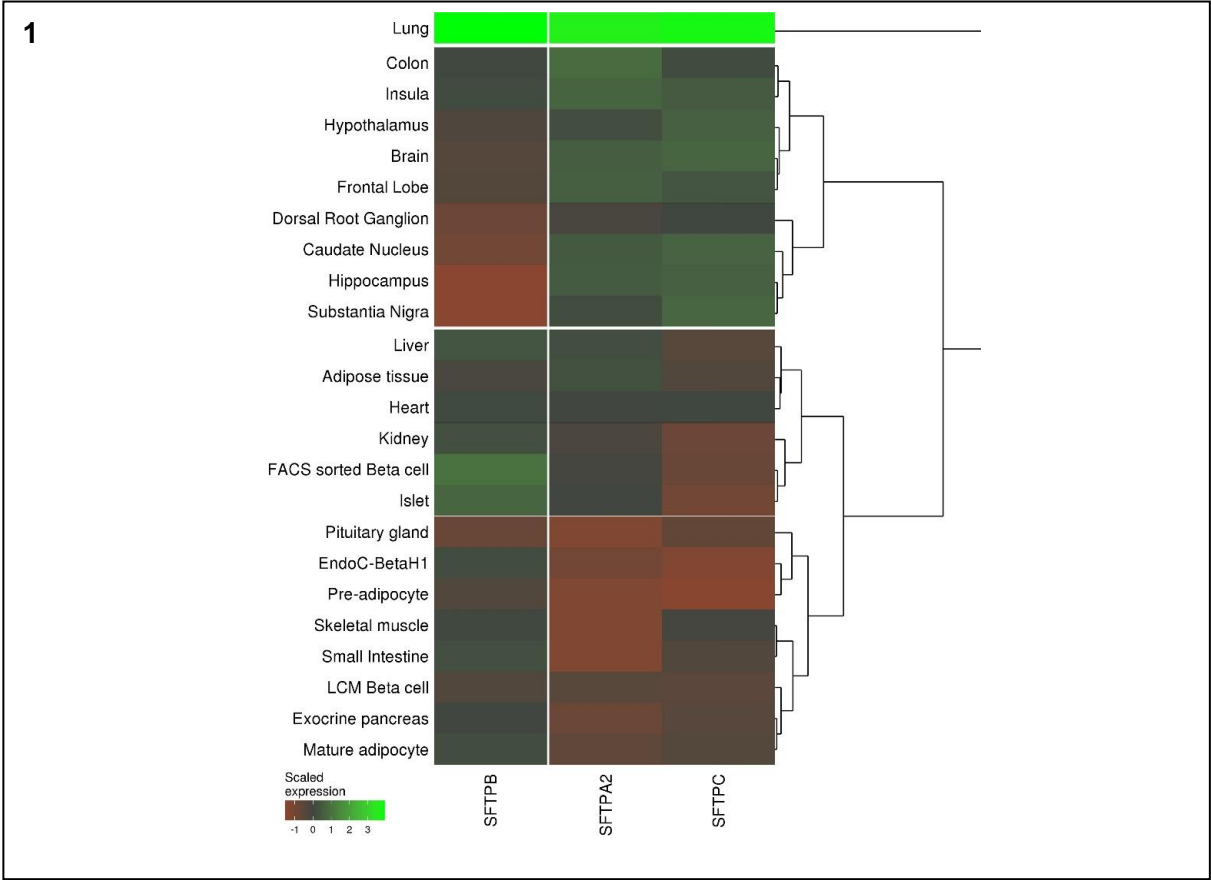


Figure F. (1) Heat map representing the expression of 13 genes known to be highly expressed in pancreatic islets in the panel of human organs, tissues and cells; (2) Enrichment analysis of pancreatic islet markers expression in the panel of human organs, tissues and cells. The black vertical line denotes a p -value of 0.05.

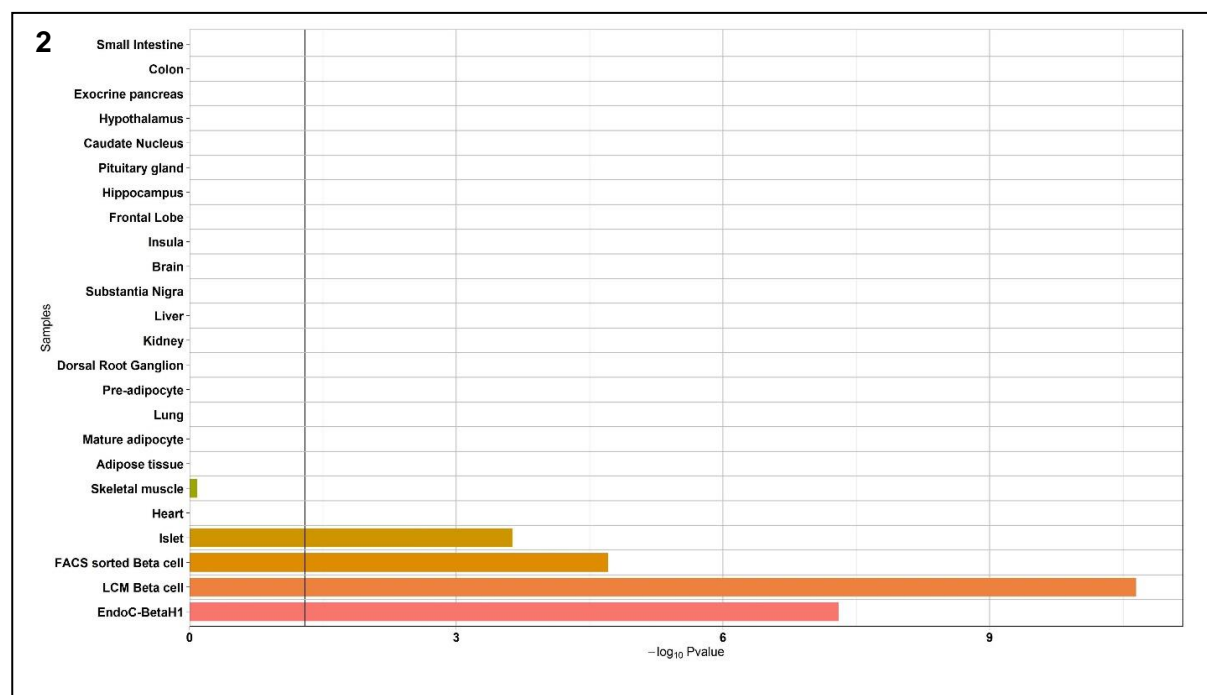
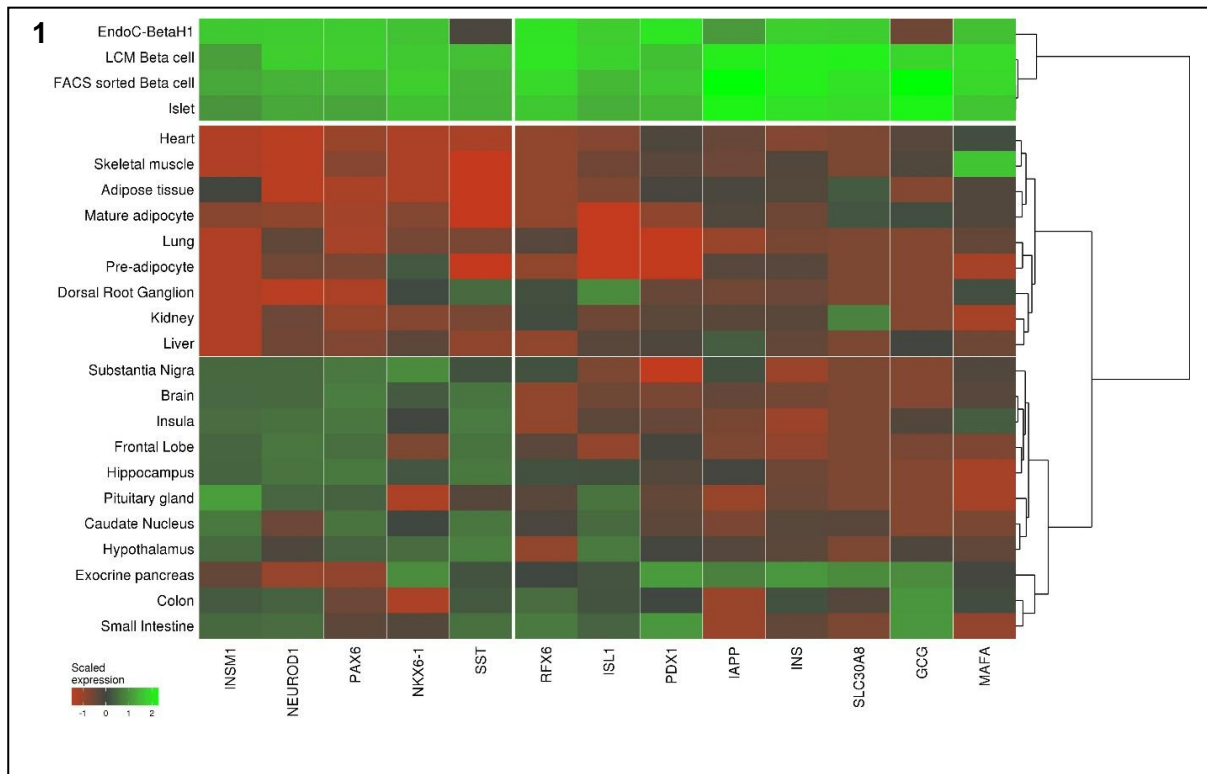


Figure I. Decreased expression of *MPHOSPH9* (1), *SSR1* (2), *FAF1* (3) or *KLHDC5* (4) do not lead to impaired insulin secretion from EndoC- β H1 cells. EndoC- β H1 cells were transfected with control non-targeting pool siRNA (siNTP) or target gene siRNA, and were analyzed 72 hours post-transfection. Insulin secretion (percentage of secretion of the total insulin content) was analyzed in response to 60 minutes incubation with 0.5 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX), followed by 60 minutes incubation with 16.7 mM glucose (\pm 0.5 mM IBMX). Data are mean values \pm SEM of at least three independent experiments. *ns*, not significant. *Glc*, glucose; *IBMX*, phosphodiesterase inhibitor 3-isobutyl-1-methylxanthine.

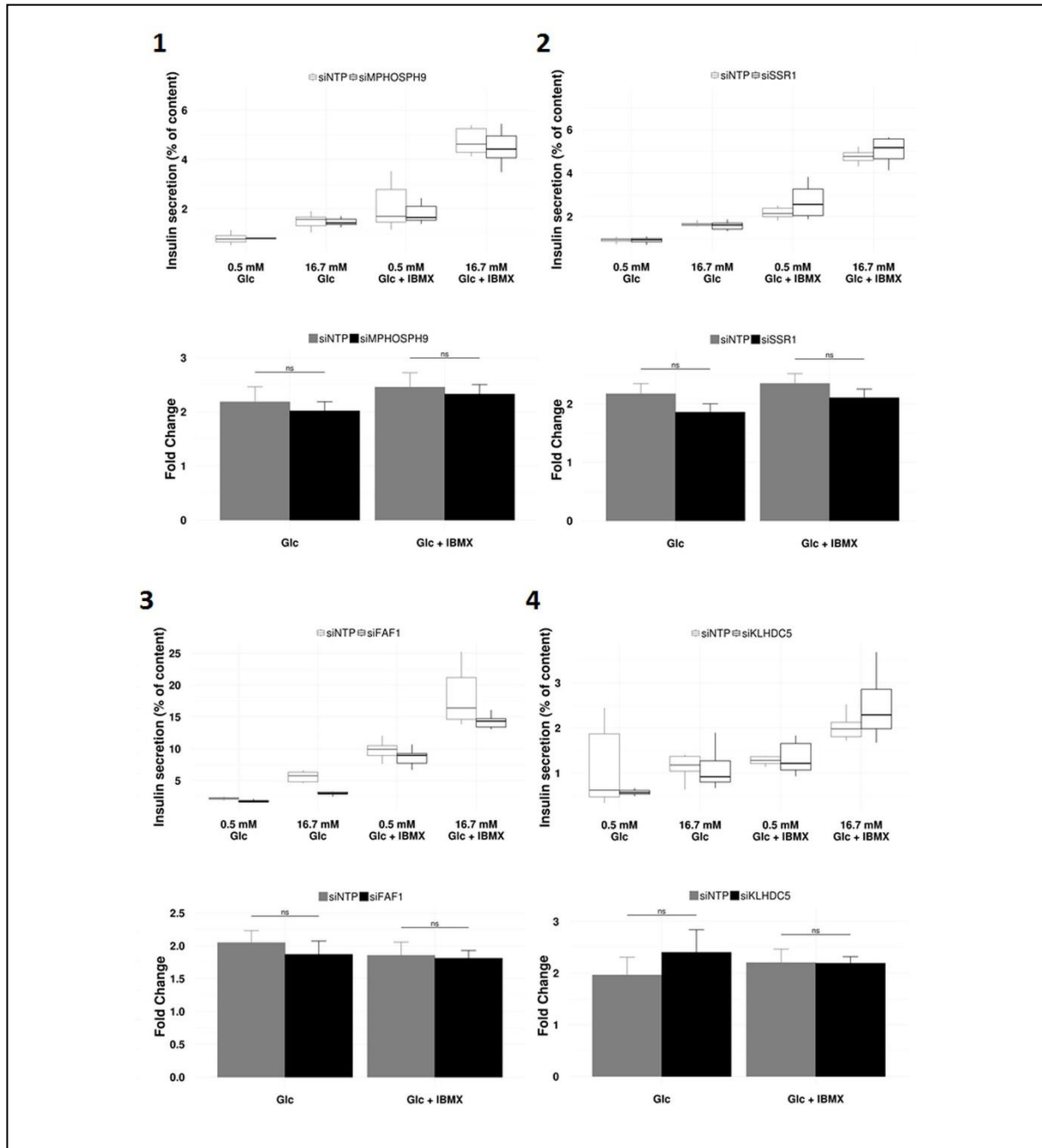


Figure J. SRR (1) and ZFAND6 (2) are expressed in pancreatic islets. Representative images of immunofluorescence staining for SRR (green; A), ZFAND6 (green, B) and insulin (red) performed on fixed tissue sections from normal human pancreases. Yellow (merged images) indicates co-localization of SRR or ZFAND6 with insulin. Blue, DAPI.

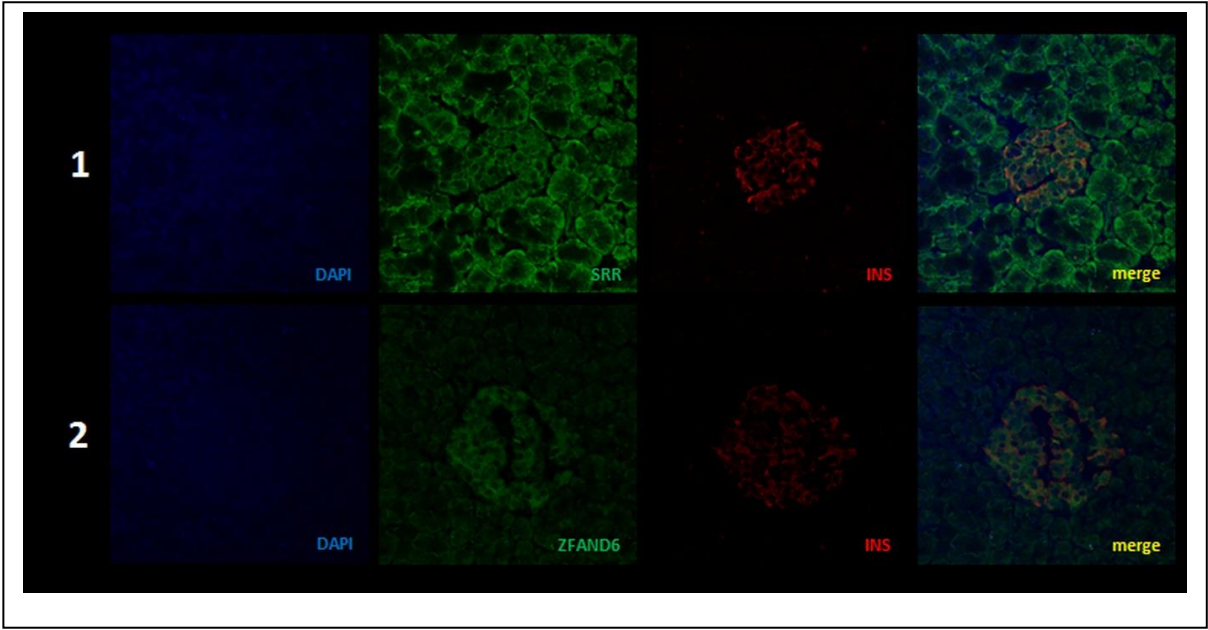


Figure K. PRC1 (1), SRR (2), ZFAND3 (3) and ZFAND6 (4) are expressed in EndoC-βH1 cells. Representative images of immunofluorescence staining for PRC1 (green; 1), SRR (green; 2), ZFAND3 (green; 3), ZFAND6 (green, 4) performed on fixed EndoC-βH1 cells. Blue, DAPI.

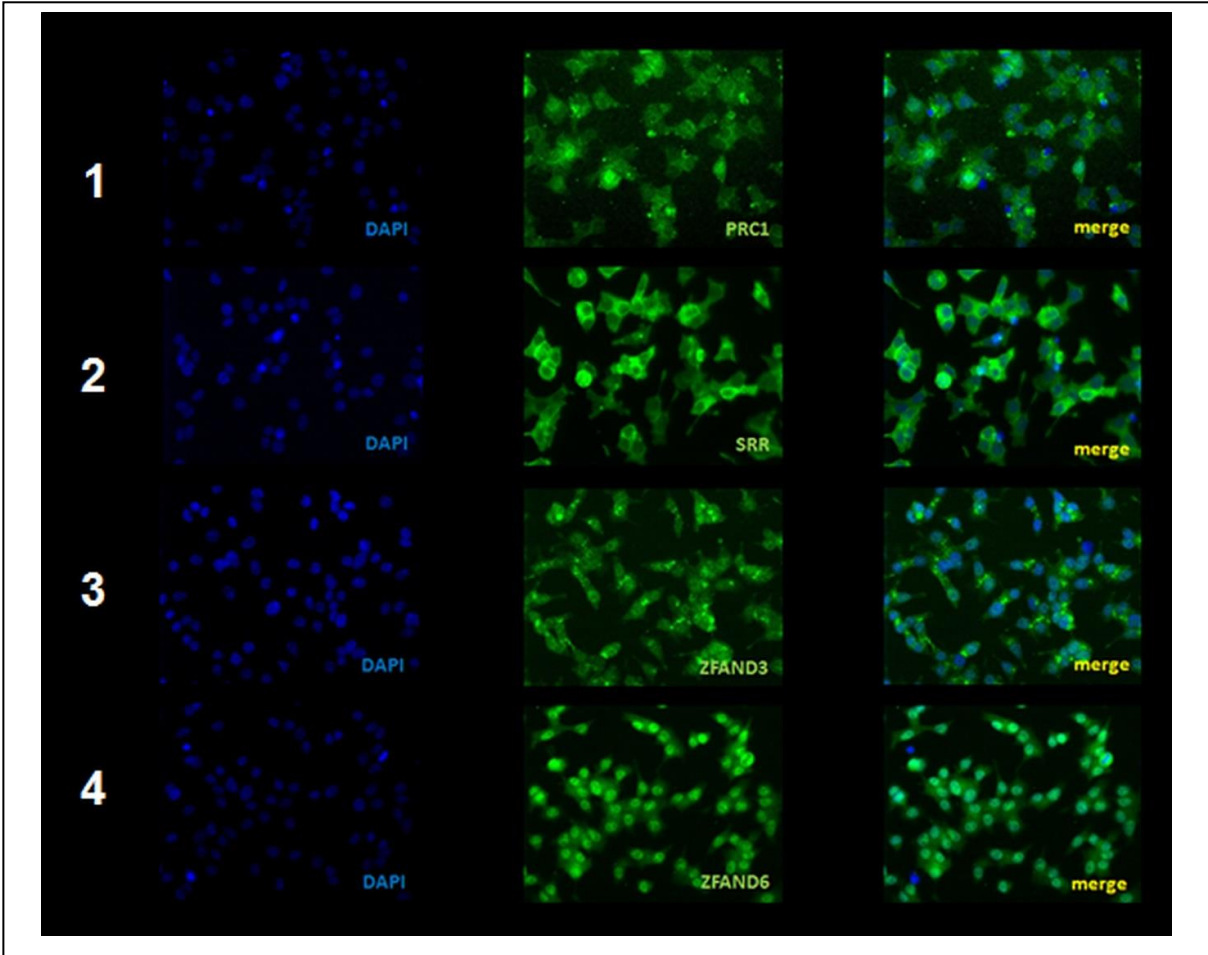


Figure L. Decreased *PRC1* expression in EndoC- β H1 cells emphasizes several networks found by IPA: (1) a network of 28 molecules entitled “Cell Cycle, Cellular Movement, Cellular Assembly and Organization”; (2) a network related to the quantity of carbohydrates; (3) a network related to the quantity of insulin in blood; (4) a network related to the concentration of D-glucose. The legends used in each figure are denoted in Figure 7.

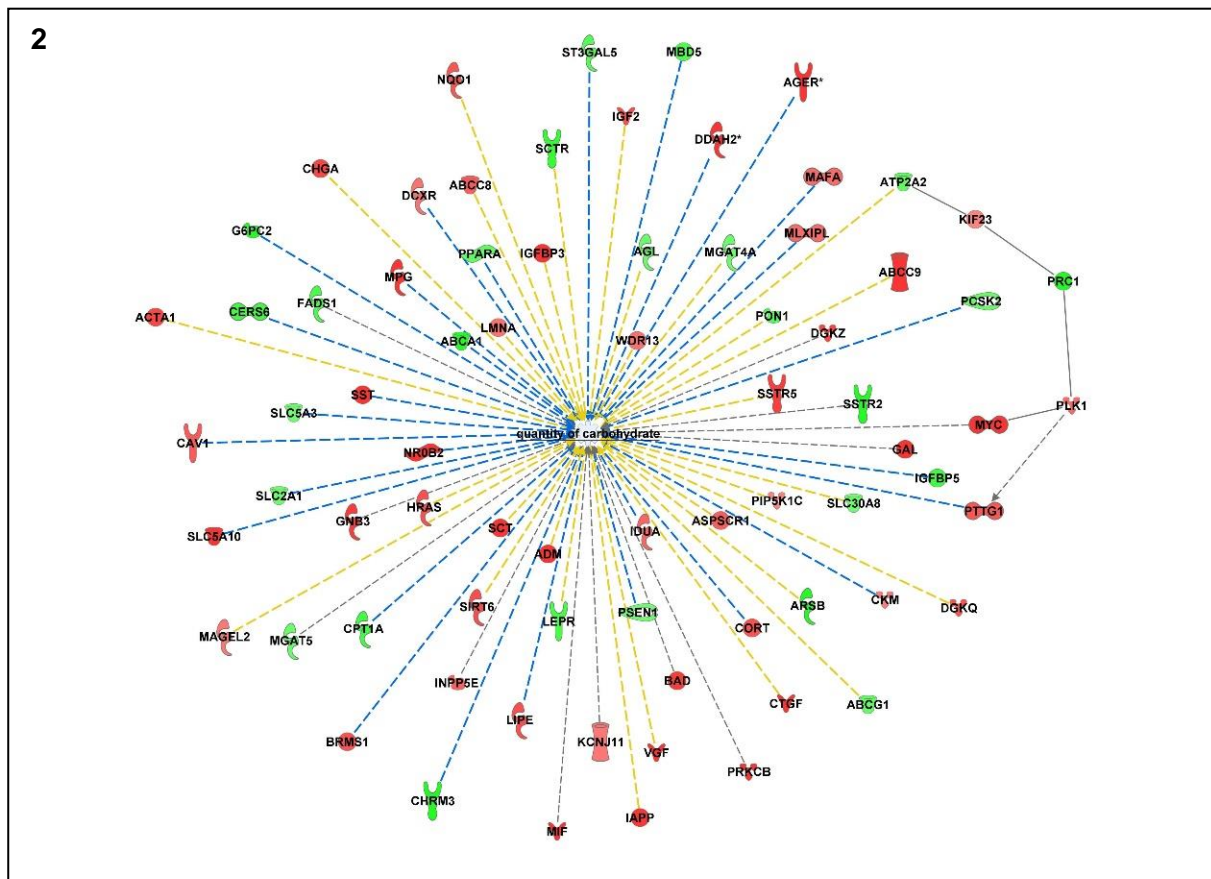
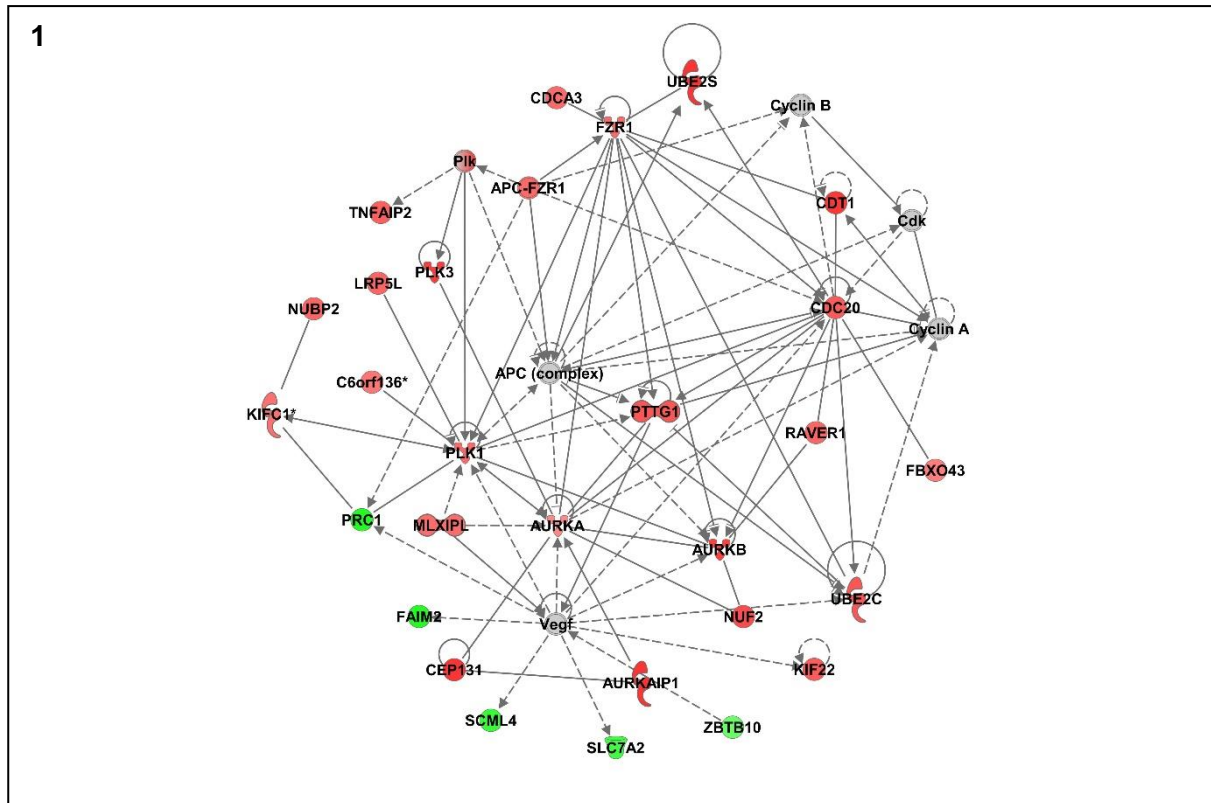
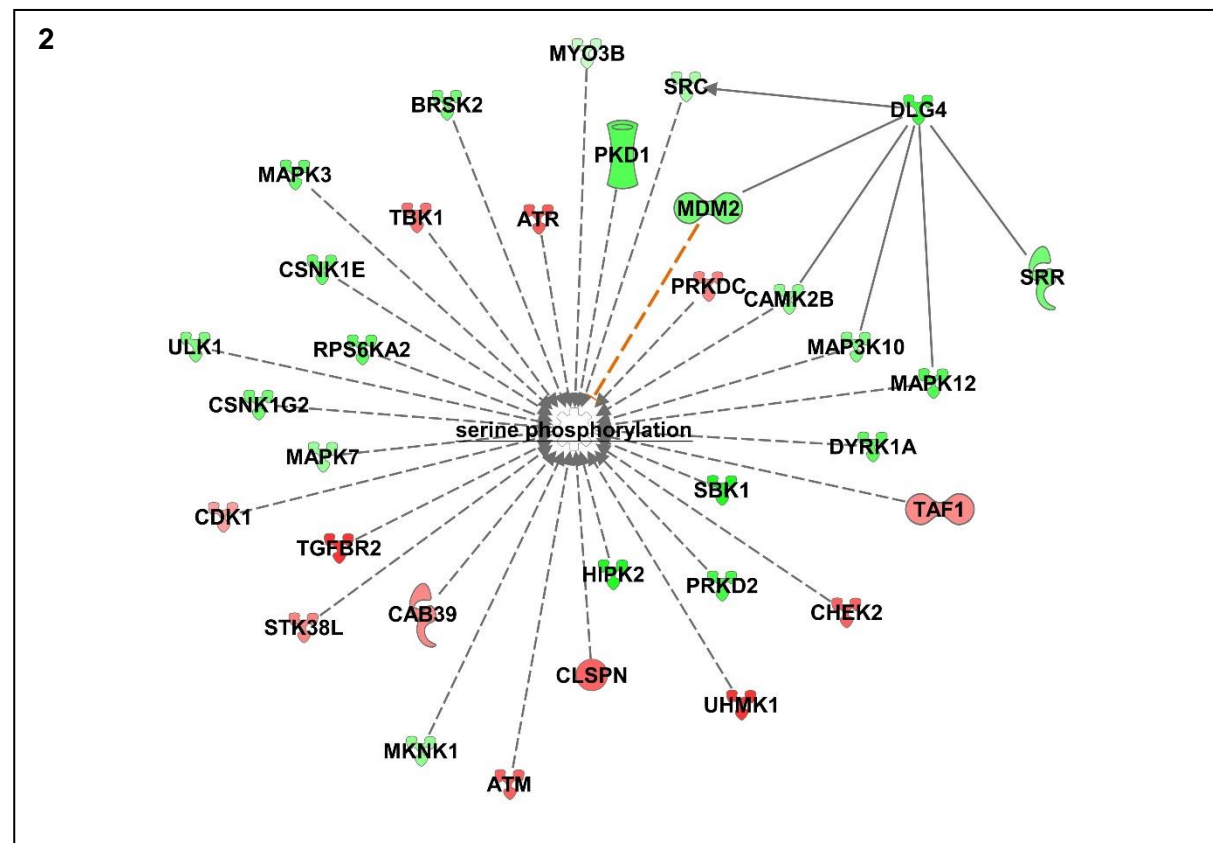
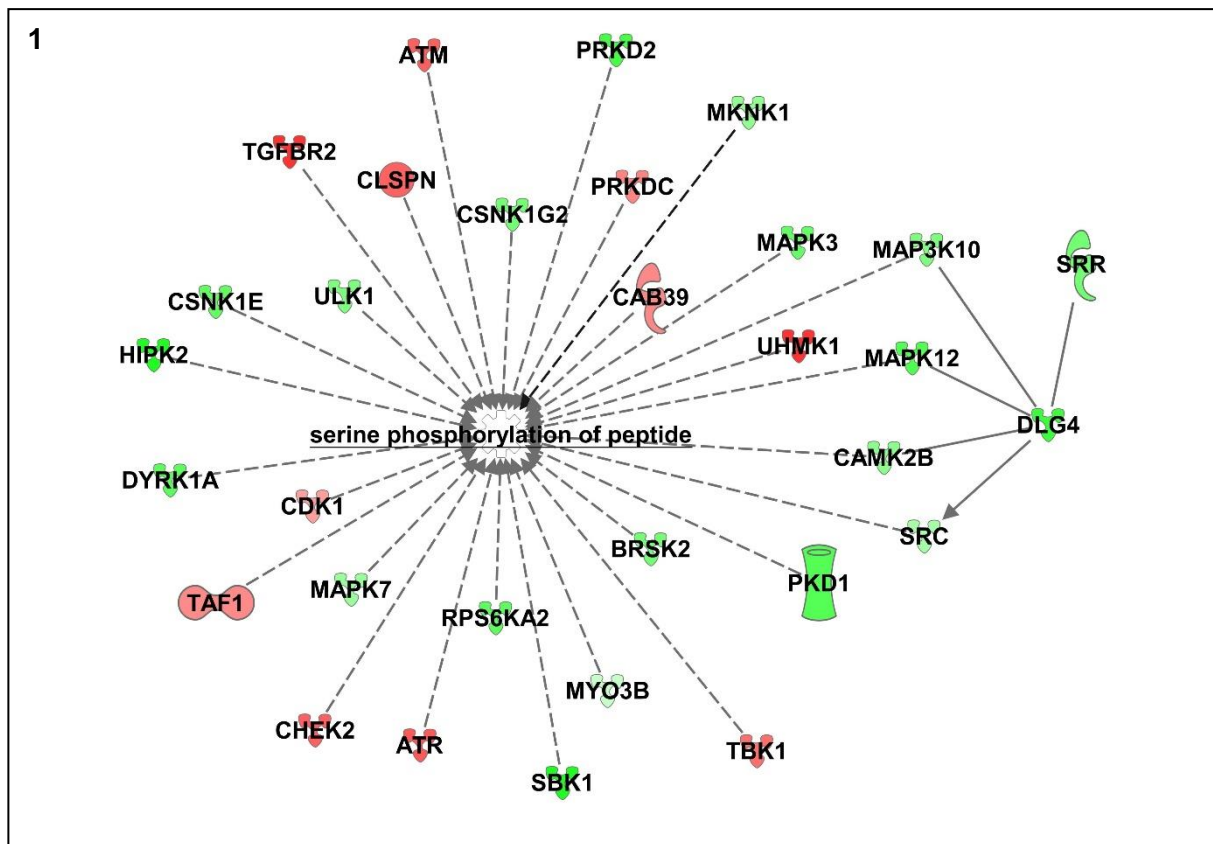


Figure M. Decreased *SRR* expression in EndoC- β H1 cells emphasizes several networks found by IPA: (1) a network related to serine phosphorylation; (2) a network related to serine phosphorylation of peptide; (3) a network related to endoplasmic reticulum stress response; (4) a network related to congenital disorders of glycosylation. The legends used in each figure are denoted in Figure 7.



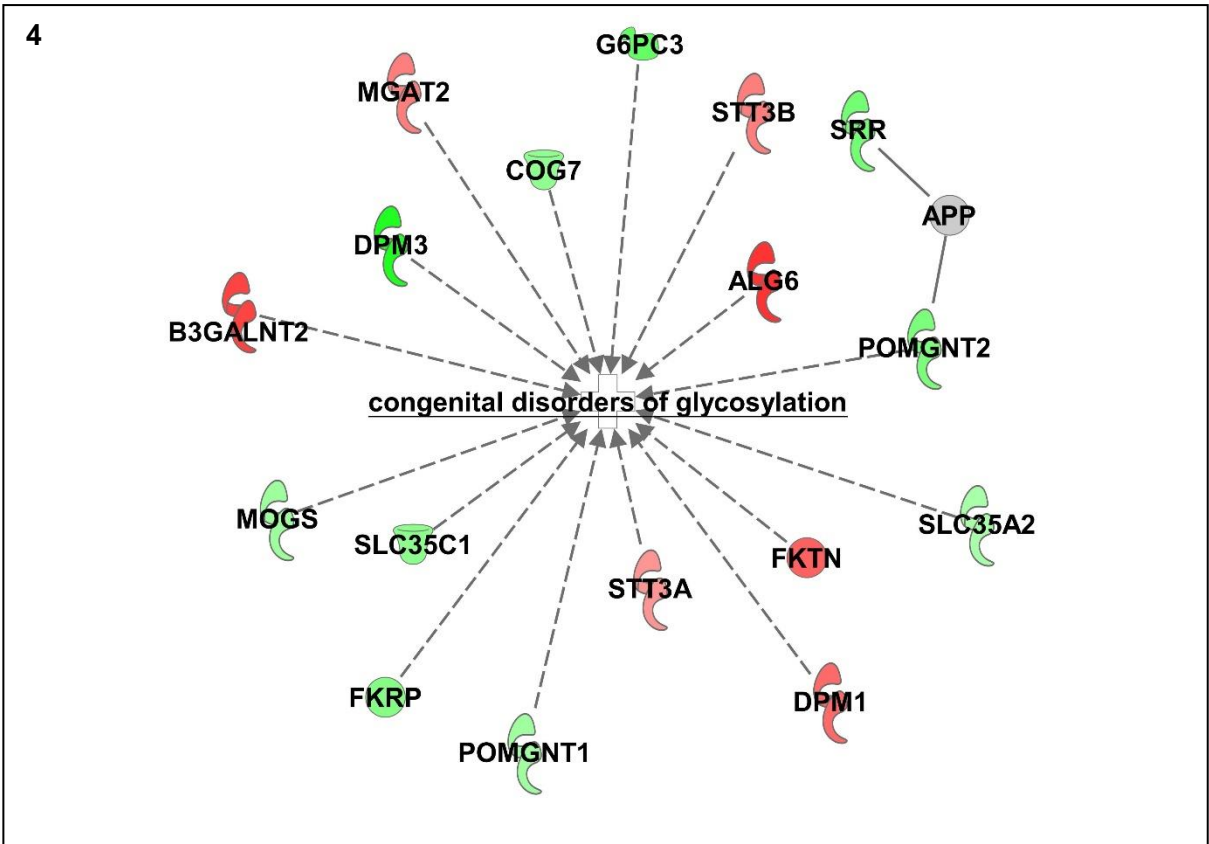
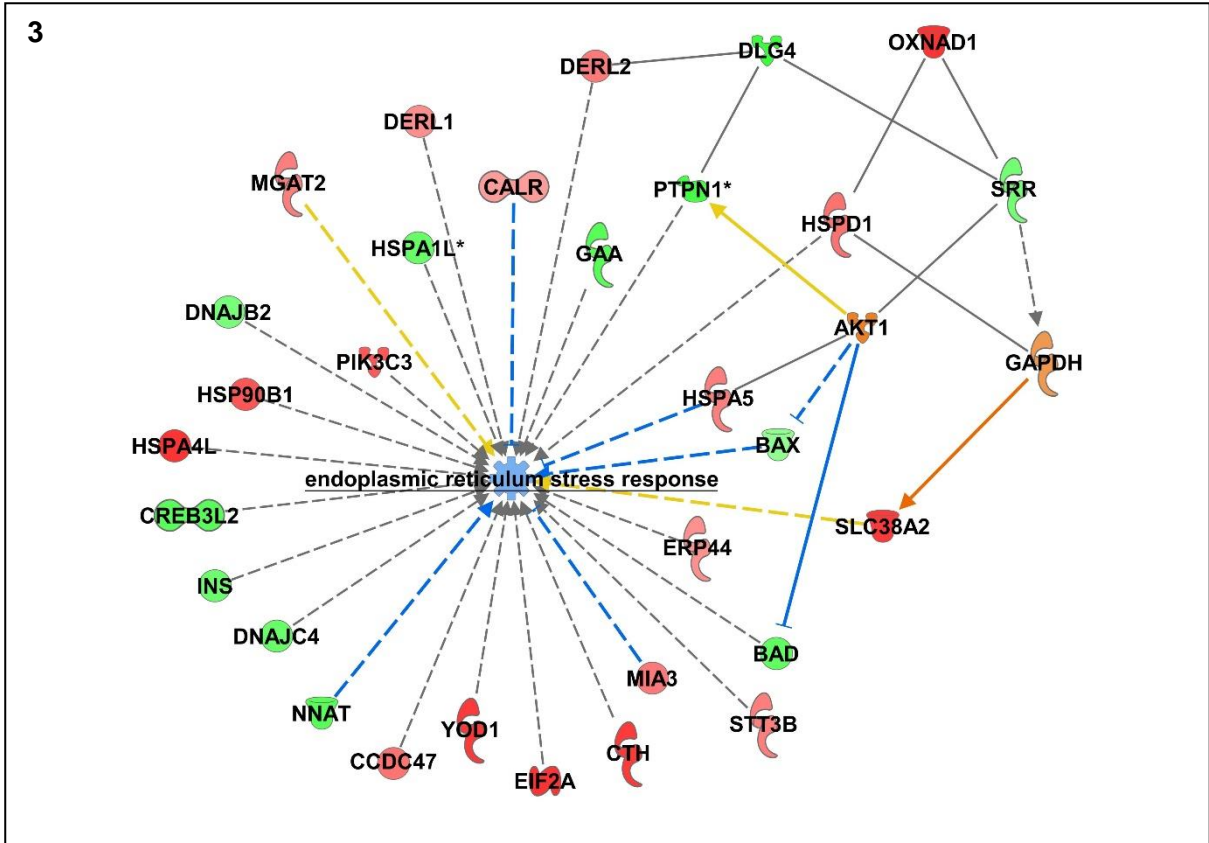
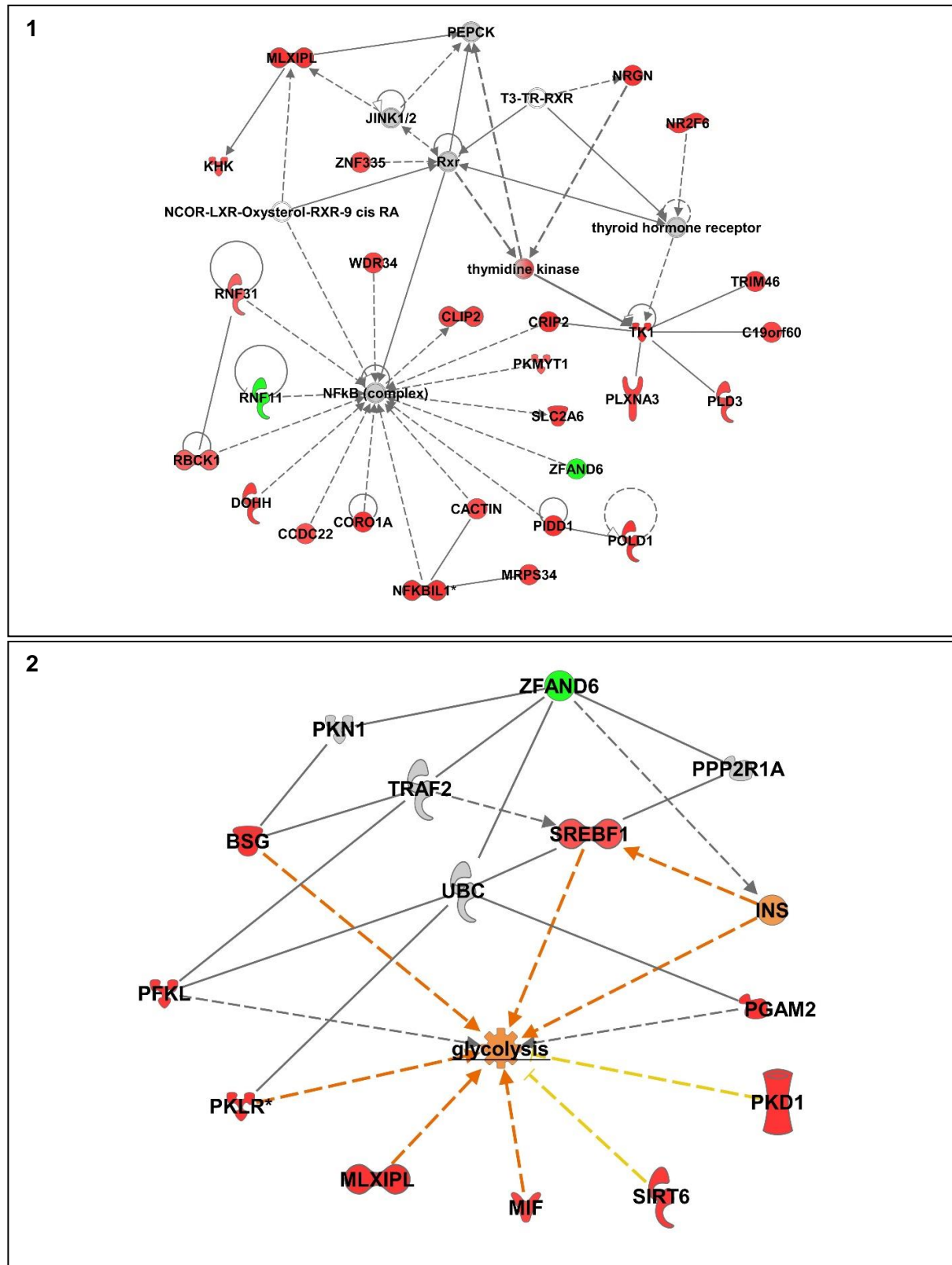


Figure N. Decreased *ZFAND6* expression in EndoC-βH1 cells emphasizes several networks found by IPA: (1) a network of 27 molecules entitled “Cell Signaling, Lipid Metabolism, Small Molecule Biochemistry”; (2) a network related to glycolysis; (3) a network related to the quantity of insulin in blood; (4) a network related to abnormal morphology of pancreas; (5) a network related to abnormal morphology of small islets of Langerhans. The legends used in each figure are denoted in Figure 7.



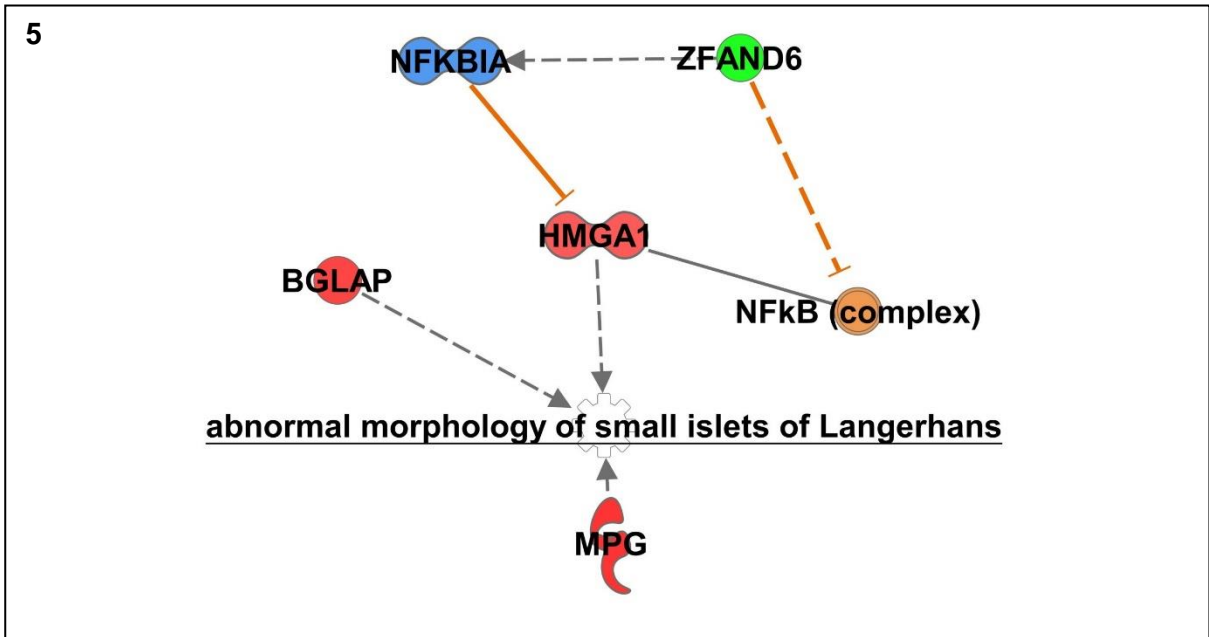
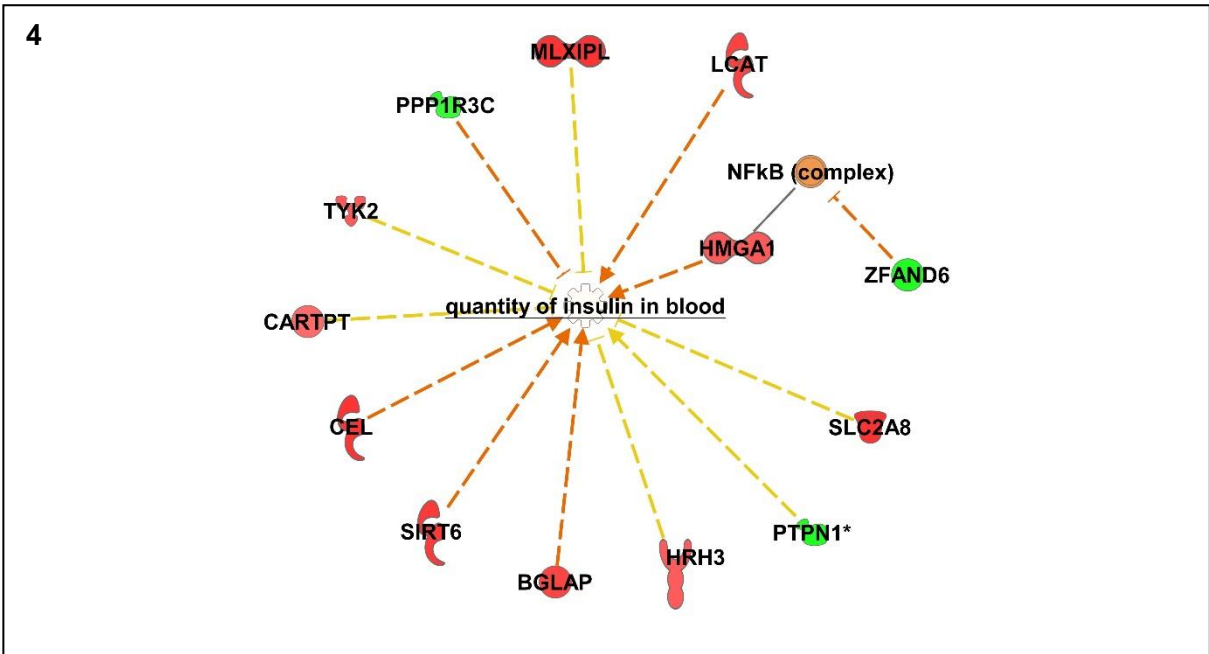
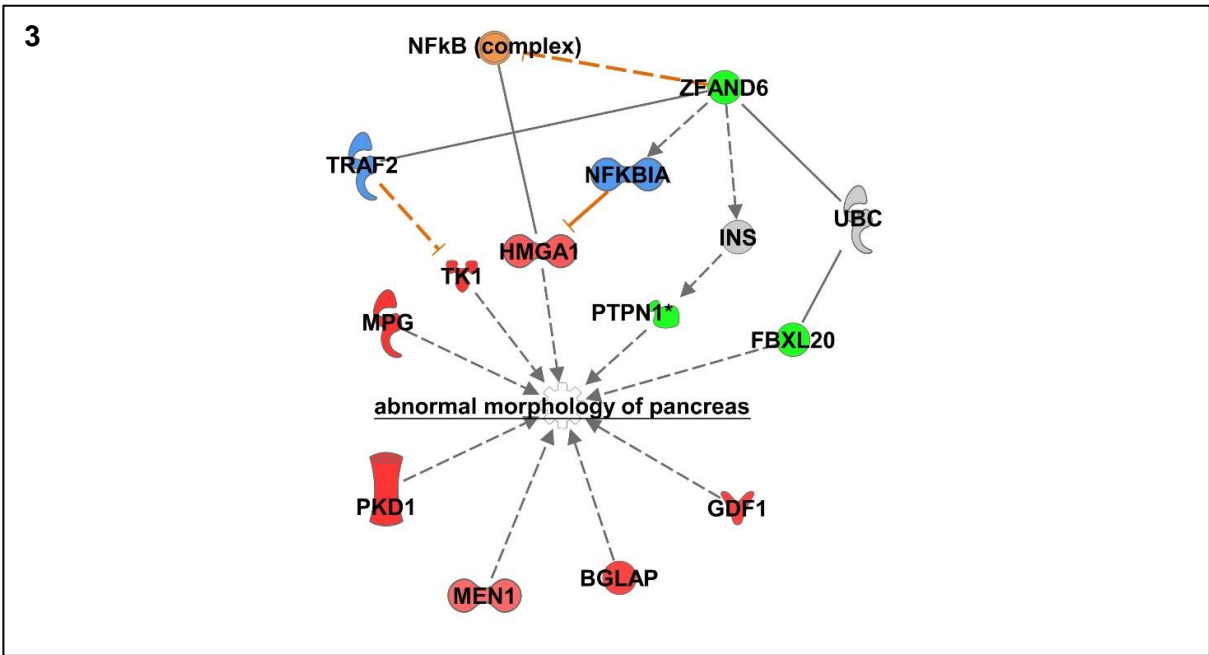


Figure O. Decreased *ZFAND3* expression in EndoC- β H1 cells emphasizes several networks found by IPA: (1) a network of 16 molecules entitled “Cellular Assembly and Organization, Lipid Metabolism, Molecular Transport”; (2) a network related to the transport of alpha-amino acid. The legends used in each figure are denoted in Figure 7.

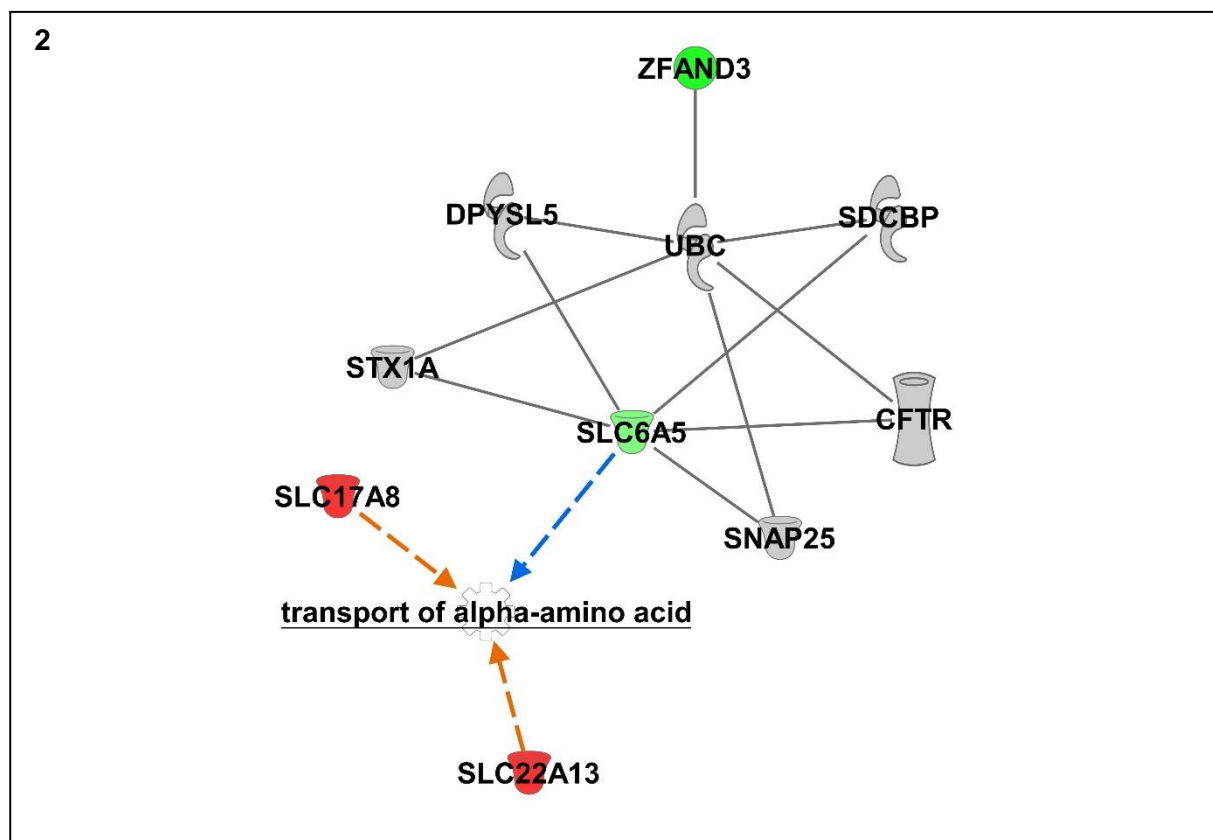
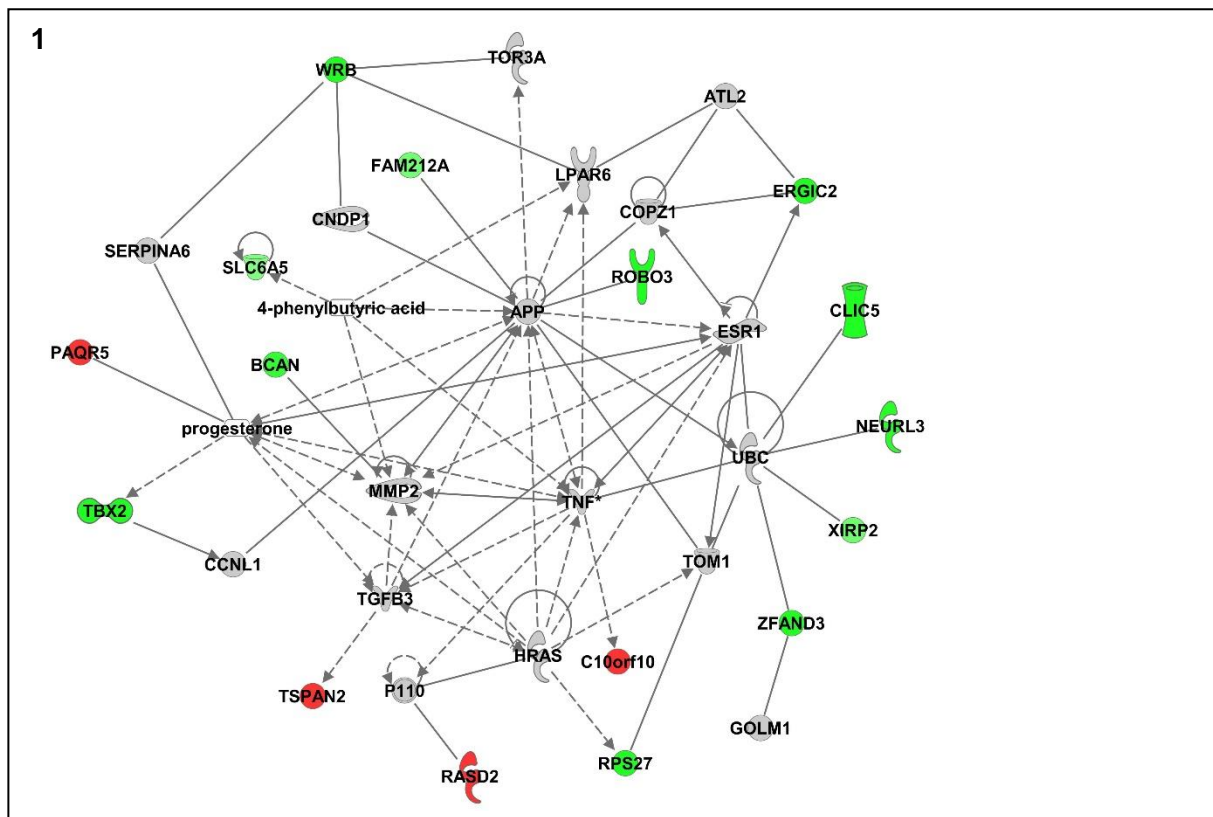


Figure P. Positive correlation between the expression of *Ins2* and the expression of *Prc1*, *Srr*, *Zfand6* and *Zfand3* in mouse pancreatic islets with altered beta-cell function. The expression of the five genes were investigated through quantitative RT-PCR (housekeeping genes: *Actb*) in pancreatic islets from mouse models with altered pancreatic beta-cell function due to STZ treatment (two pools of pancreatic islets treated or not with STZ from eight 10-week old mice; **P1**, **P2**) or to a non-sense mutation in the leptin gene in *ob/ob* mice (pancreatic islets from five 5-week old mice or from five 8-week old mice; **P3**, **P4**). Data represent mean values \pm SD. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; *ns*, not significant; *STZ*, streptozotocin; *wk*, week.

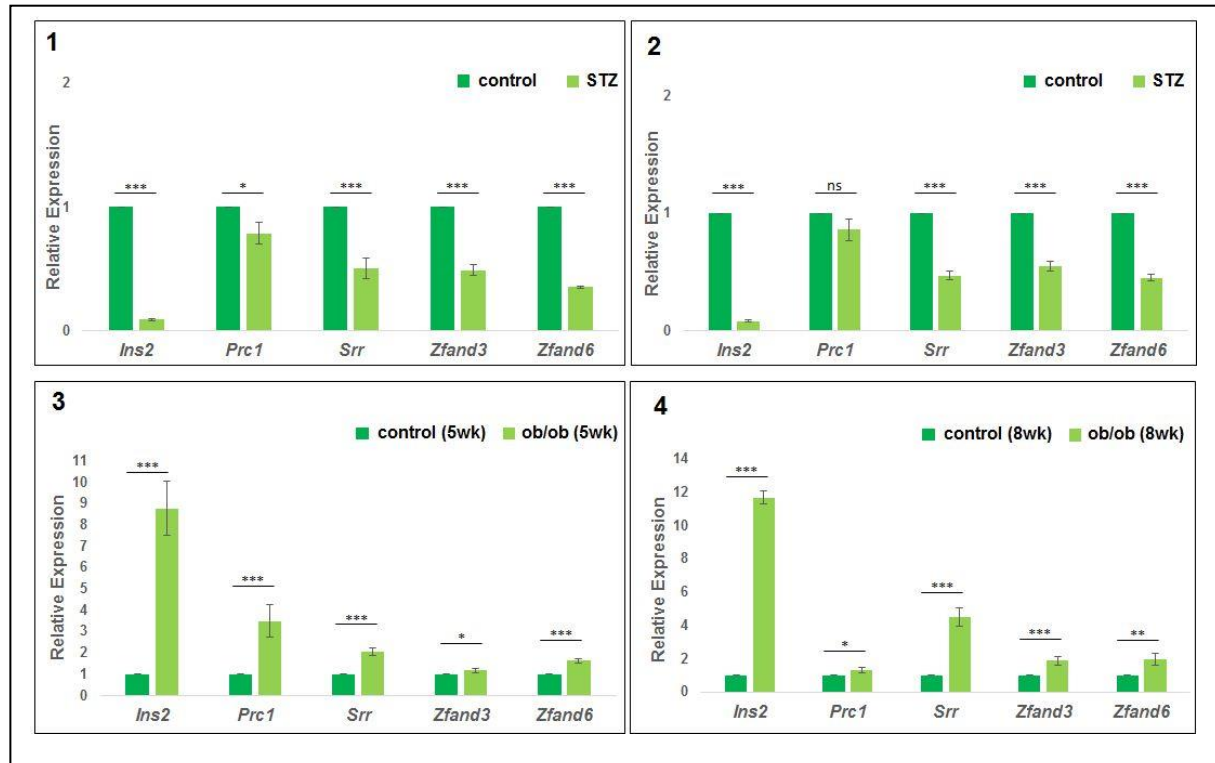
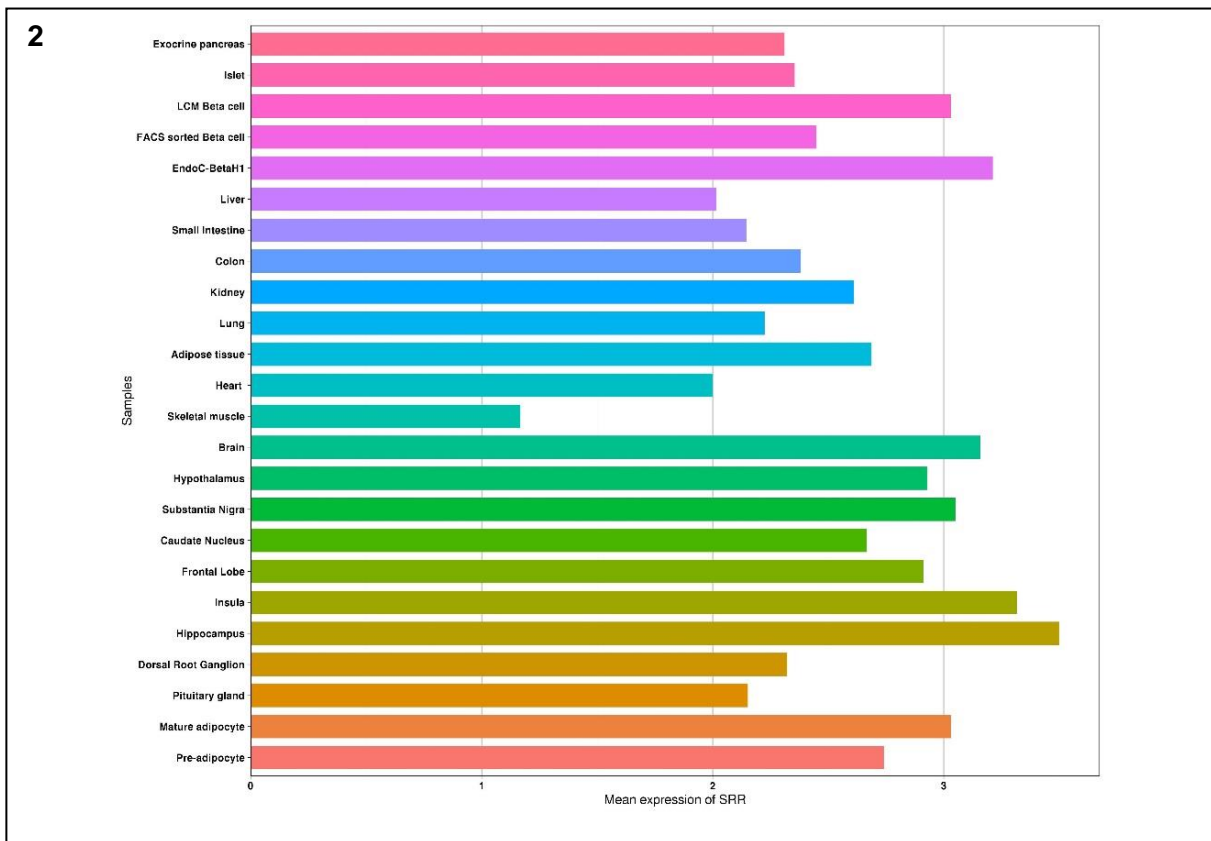
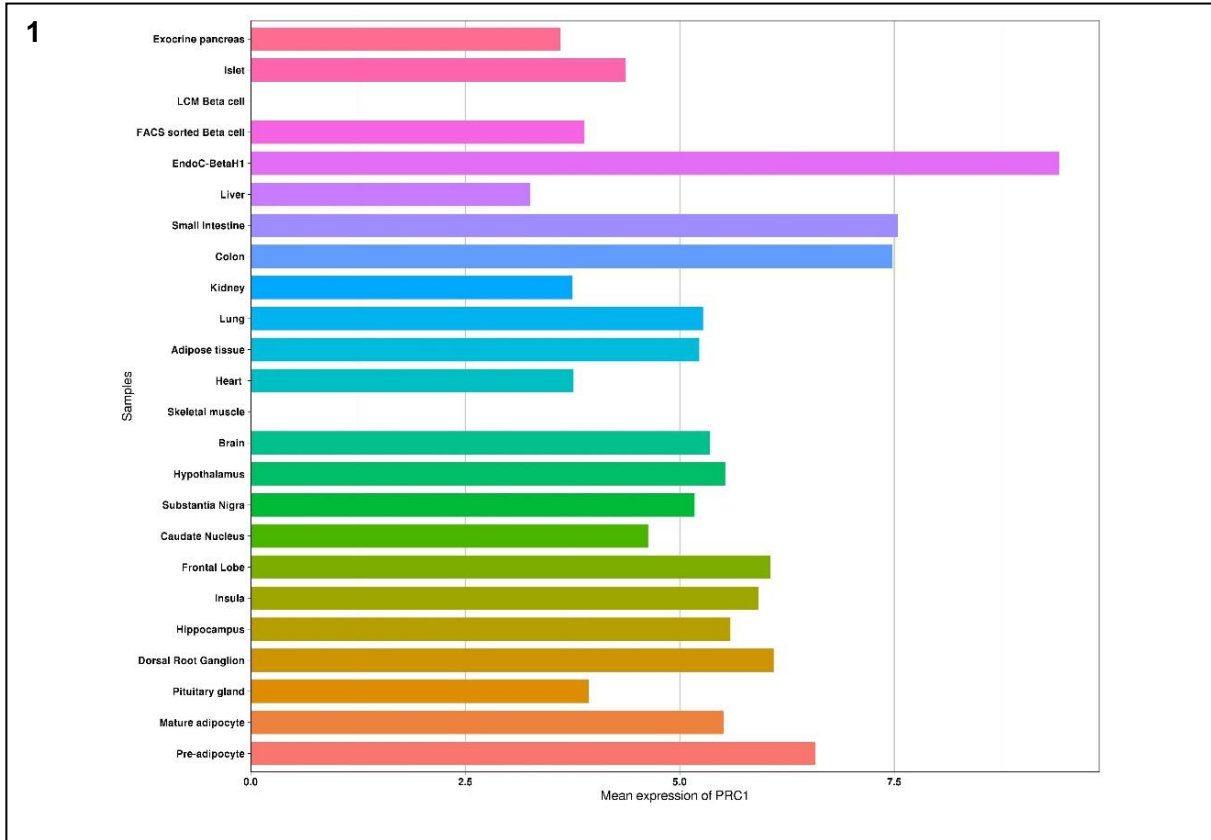


Figure Q. *PRC1* (1), *SRR* (2), *ZFAND6* (3) and *ZFAND3* (4) are ubiquitously expressed in our panel of human tissues.



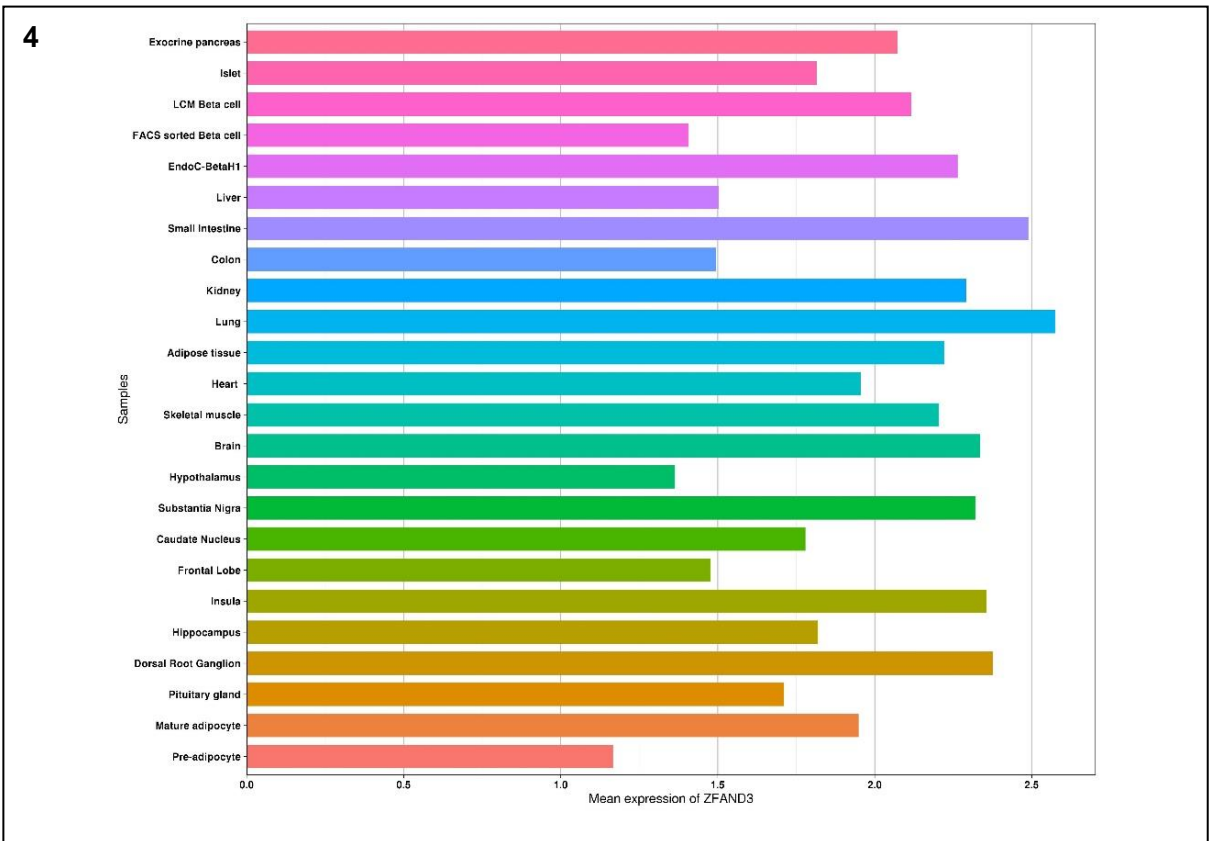
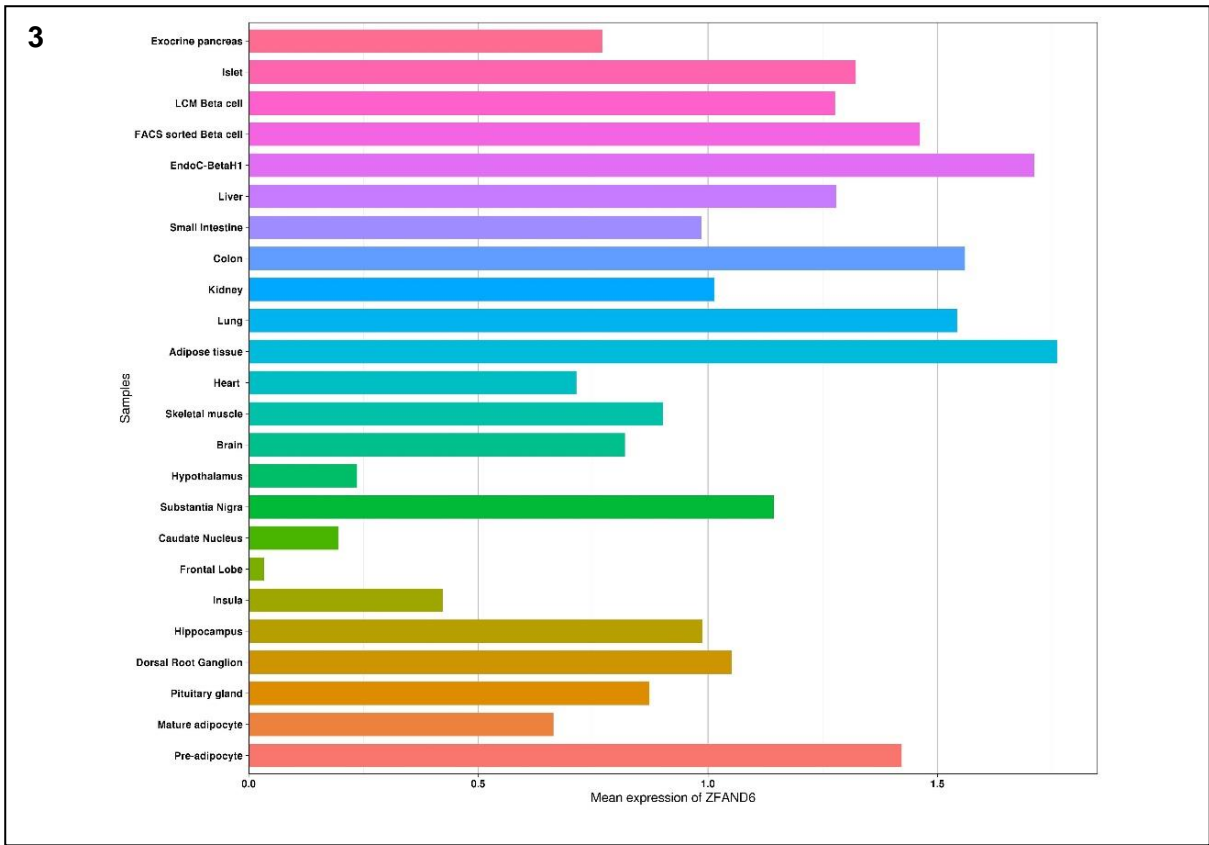


Table A. Probe design and selection for the expression study. (cf infra Annexe 2)

Table B. List of deregulated genes emphasized by the decreased expression of PRC1 in EndoC- β H1 cells, within the network related to apoptosis.

Gene	Log2 Fold Change	Standard Error	P-Value
<i>AAMDC</i>	0.52	0.23	0.026521
<i>AATK</i>	0.45	0.23	0.048149
<i>ABCA1</i>	-0.73	0.26	0.004842
<i>ABCG1</i>	-0.42	0.21	0.047317
<i>ACVR1C</i>	-0.69	0.24	0.003253
<i>ADM</i>	0.68	0.25	0.005929
<i>AES</i>	0.44	0.21	0.03579
<i>AGAP2</i>	0.57	0.25	0.020592
<i>AGER</i>	0.70	0.23	0.002415
<i>AKT3</i>	-0.46	0.19	0.017728
<i>ANO6</i>	-0.46	0.20	0.019754
<i>ANTXR1</i>	-0.62	0.25	0.013917
<i>ANXA2</i>	0.69	0.25	0.006579
<i>APH1B</i>	-0.45	0.20	0.023689
<i>AQP3</i>	0.81	0.22	0.000178
<i>ARAF</i>	0.44	0.21	0.034539
<i>ARC</i>	0.68	0.27	0.010949
<i>ARHGDI A</i>	0.74	0.22	0.000681
<i>ARHGDI B</i>	0.72	0.27	0.007243
<i>ARSB</i>	-0.59	0.21	0.004996
<i>ASCL1</i>	-0.69	0.25	0.005143
<i>ASIC1</i>	-0.55	0.21	0.008409
<i>ASTN1</i>	-0.53	0.26	0.041322
<i>ATAD3A</i>	0.67	0.25	0.00736
<i>ATP1A2</i>	-0.66	0.26	0.010295
<i>ATP2B4</i>	-0.65	0.20	0.001412
<i>AURKA</i>	0.40	0.20	0.04257
<i>AURKB</i>	0.63	0.22	0.004344
<i>BAD</i>	0.65	0.24	0.007457

<i>BCL2L12</i>	0.53	0.25	0.031085
<i>BIRC5</i>	0.55	0.20	0.004569
<i>BMP5</i>	-0.48	0.22	0.025444
<i>BOK</i>	0.47	0.23	0.044972
<i>BRMS1</i>	0.57	0.22	0.009569
<i>CAPRIN1</i>	-0.39	0.20	0.049352
<i>CASR</i>	-0.45	0.22	0.04326
<i>CAV1</i>	0.55	0.26	0.038241
<i>CCDC47</i>	-0.40	0.20	0.044883
<i>CCNG1</i>	-0.44	0.21	0.041519
<i>CDC20</i>	0.55	0.21	0.008527
<i>CDC25B</i>	0.49	0.21	0.022689
<i>CDK3</i>	0.60	0.23	0.0087
<i>CDKN2D</i>	0.66	0.21	0.001588
<i>CDKN3</i>	0.44	0.20	0.030734
<i>CERS6</i>	-0.51	0.21	0.014281
<i>CHTF18</i>	0.93	0.23	7.5E-05
<i>COX8A</i>	0.49	0.22	0.027924
<i>CRABP2</i>	0.54	0.27	0.047503
<i>CTGF</i>	0.82	0.26	0.001622
<i>DDAH2</i>	0.93	0.23	5.88E-05
<i>DKK3</i>	-0.59	0.21	0.005361
<i>DLL1</i>	0.69	0.23	0.002325
<i>DOT1L</i>	0.43	0.21	0.037789
<i>DPM3</i>	0.67	0.26	0.011948
<i>DPP4</i>	0.49	0.20	0.013016
<i>DUSP6</i>	1.05	0.26	4.82E-05
<i>DVL1</i>	0.53	0.24	0.026796

<i>E4F1</i>	0.52	0.21	0.014491
<i>EEF1D</i>	0.58	0.24	0.013565
<i>EMD</i>	0.43	0.21	0.042982
<i>EPHA4</i>	-0.57	0.20	0.004588
<i>ERF</i>	0.47	0.21	0.027617
<i>ETS1</i>	-0.50	0.20	0.013281
<i>ETV5</i>	1.02	0.22	2.47E-06
<i>FABP1</i>	0.42	0.20	0.039304
<i>FAIM2</i>	-0.80	0.26	0.002387
<i>FAU</i>	0.51	0.24	0.03122
<i>FBLIM1</i>	0.60	0.21	0.005009
<i>FBXO32</i>	-0.54	0.24	0.02366
<i>FDXR</i>	0.46	0.23	0.048941
<i>FKBP8</i>	0.51	0.23	0.027115
<i>FN1</i>	-0.82	0.22	0.000224
<i>GADD45B</i>	0.54	0.25	0.027072
<i>GADD45GIP1</i>	0.59	0.25	0.018306
<i>GAL</i>	2.05	0.27	3.14E-14
<i>GJC1</i>	-0.48	0.22	0.028607
<i>GJD2</i>	-0.49	0.22	0.029174
<i>GLI1</i>	0.49	0.20	0.012469
<i>GLI3</i>	0.54	0.27	0.041923
<i>GLIS2</i>	0.53	0.20	0.007872
<i>GLTSCR2</i>	0.53	0.24	0.025619
<i>GMDS</i>	0.41	0.21	0.048503
<i>GREM1</i>	-0.40	0.21	0.049667
<i>H2AFX</i>	0.92	0.25	0.00023
<i>HES1</i>	0.57	0.27	0.032923
<i>HEY1</i>	0.71	0.23	0.001658
<i>HIC1</i>	0.55	0.23	0.019566
<i>HIP1</i>	-0.61	0.24	0.01004

<i>HIP1R</i>	0.43	0.21	0.041477
<i>HIPK1</i>	-0.79	0.22	0.000272
<i>HIST1H1C</i>	0.50	0.24	0.035005
<i>HLA-G</i>	-0.54	0.26	0.039708
<i>HMGA2</i>	0.87	0.25	0.000585
<i>HMGCR</i>	-0.46	0.21	0.026645
<i>HMGN5</i>	0.57	0.25	0.020766
<i>HRAS</i>	0.58	0.24	0.014624
<i>HSPA1A</i>	0.57	0.24	0.016413
<i>HSPA1B</i>	0.56	0.24	0.019072
<i>IAPP</i>	0.67	0.25	0.006894
<i>IER3</i>	0.84	0.22	0.000131
<i>IGF2</i>	0.59	0.20	0.002566
<i>IGFBP3</i>	0.95	0.24	5.24E-05
<i>IGFBP5</i>	-0.52	0.25	0.038864
<i>IL6R</i>	-0.58	0.21	0.005117
<i>INPP5E</i>	0.53	0.24	0.02983
<i>IRF3</i>	0.58	0.24	0.014547
<i>IRF7</i>	0.69	0.26	0.008565
<i>ITGB1</i>	-0.47	0.24	0.045799
<i>JMY</i>	-0.47	0.20	0.017757
<i>JUNB</i>	0.83	0.22	0.000179
<i>KCNJ11</i>	0.45	0.20	0.025037
<i>KRT18</i>	0.73	0.21	0.000496
<i>KRT8</i>	0.73	0.23	0.001301
<i>LAG3</i>	0.54	0.27	0.047092
<i>LEPR</i>	-0.49	0.24	0.039331
<i>LHX4</i>	-0.60	0.22	0.007397
<i>LMNA</i>	0.47	0.20	0.021663
<i>LRP6</i>	-0.42	0.22	0.049416

<i>LYPLA1</i>	-0.41	0.21	0.046869
<i>LYPLA2</i>	0.53	0.23	0.023191
<i>MAP1LC3A</i>	0.48	0.23	0.03904
<i>MAP1S</i>	0.56	0.22	0.012016
<i>MAP3K10</i>	0.49	0.22	0.0239
<i>MAP4K1</i>	0.55	0.27	0.040423
<i>MAPK11</i>	0.53	0.21	0.013492
<i>MAPK12</i>	0.49	0.23	0.031358
<i>MAPK7</i>	0.46	0.21	0.026399
<i>MAPT</i>	-0.50	0.22	0.026513
<i>MC1R</i>	0.62	0.23	0.007596
<i>MET</i>	-0.56	0.21	0.008706
<i>MICAL1</i>	0.51	0.22	0.020053
<i>MIF</i>	0.73	0.26	0.00422
<i>MME</i>	-0.46	0.20	0.020296
<i>MMP2</i>	-0.48	0.22	0.032016
<i>MPG</i>	0.82	0.24	0.000518
<i>MRPL41</i>	0.57	0.27	0.030625
<i>MSH6</i>	-0.49	0.19	0.011544
<i>MYBL2</i>	0.63	0.21	0.00238
<i>MYC</i>	0.97	0.27	0.000287
<i>NAA38</i>	0.62	0.24	0.010331
<i>NDRG1</i>	-0.41	0.20	0.040641
<i>NDUFA13</i>	0.62	0.22	0.004797
<i>NFKBID</i>	0.62	0.23	0.006925
<i>NINJ1</i>	0.51	0.23	0.027097
<i>NME3</i>	0.79	0.26	0.002277
<i>NME4</i>	0.45	0.20	0.026162
<i>NQO1</i>	0.56	0.22	0.008878
<i>NR0B2</i>	0.91	0.22	3.14E-05
<i>NR1H2</i>	0.61	0.24	0.009835
<i>NRGN</i>	0.65	0.23	0.00515

<i>NUDT1</i>	0.66	0.25	0.008246
<i>NUF2</i>	0.59	0.20	0.002504
<i>OSGIN1</i>	0.65	0.25	0.008131
<i>PAFAH1B3</i>	0.48	0.22	0.030455
<i>PAM16</i>	0.44	0.22	0.040561
<i>PCSK2</i>	-0.41	0.19	0.033134
<i>PDE5A</i>	-0.40	0.20	0.043578
<i>PDLIM7</i>	0.58	0.22	0.008612
<i>PHLDA1</i>	0.63	0.24	0.009764
<i>PIDD1</i>	0.63	0.26	0.01402
<i>PIM3</i>	0.75	0.23	0.001312
<i>PLCE1</i>	-0.42	0.21	0.042433
<i>PLK1</i>	0.50	0.19	0.00978
<i>PLK3</i>	0.65	0.22	0.003874
<i>POMC</i>	0.59	0.25	0.01925
<i>POU3F1</i>	0.55	0.27	0.043455
<i>PPARA</i>	-0.43	0.20	0.035315
<i>PQBP1</i>	0.52	0.21	0.013244
<i>PRKCB</i>	2.19	0.27	6.11E-16
<i>PRR13</i>	0.49	0.21	0.01766
<i>PRR7</i>	0.53	0.27	0.047617
<i>PSEN1</i>	-0.39	0.19	0.044557
<i>PTPRZ1</i>	-0.50	0.22	0.025283
<i>PTTG1</i>	0.56	0.20	0.006187
<i>RAC3</i>	0.60	0.25	0.015065
<i>RAD9A</i>	0.69	0.24	0.003309
<i>RB1</i>	-0.49	0.21	0.019312
<i>RBCK1</i>	0.54	0.23	0.018173
<i>RBPJ</i>	-0.60	0.19	0.001993

<i>RHOC</i>	0.53	0.21	0.012576
<i>ROR1</i>	-0.67	0.24	0.005216
<i>RPRM</i>	0.52	0.26	0.047254
<i>RPS19</i>	0.49	0.23	0.034511
<i>RPS6KA5</i>	-0.48	0.22	0.030225
<i>RTN4R</i>	0.61	0.27	0.021813
<i>RUVBL2</i>	0.48	0.23	0.036673
<i>S100A11</i>	0.66	0.26	0.010635
<i>S100A6</i>	0.55	0.24	0.024644
<i>S1PR3</i>	-0.63	0.26	0.016902
<i>SAT1</i>	0.63	0.20	0.001506
<i>SATB1</i>	-0.48	0.21	0.026124
<i>SCN3B</i>	-0.43	0.19	0.02628
<i>SDF2L1</i>	0.73	0.25	0.00364
<i>SIRT6</i>	0.59	0.24	0.012135
<i>SLC18A3</i>	0.64	0.26	0.012553
<i>SLC2A1</i>	-0.39	0.19	0.041783
<i>SLC39A10</i>	-0.46	0.20	0.01861
<i>SLC39A6</i>	-0.44	0.22	0.048108
<i>SLC6A6</i>	-0.45	0.20	0.02347
<i>SMAD5</i>	-0.57	0.21	0.005689
<i>SOX5</i>	-0.90	0.22	3.79E-05
<i>SPOCK1</i>	-0.45	0.21	0.038062
<i>SST</i>	1.30	0.21	3.35E-10
<i>SSTR2</i>	-0.62	0.19	0.001131
<i>ST3GAL1</i>	-0.52	0.26	0.044856
<i>ST6GAL1</i>	-0.67	0.19	0.000472
<i>STC1</i>	0.62	0.26	0.017674
<i>STUB1</i>	0.49	0.22	0.024207

<i>SULF1</i>	-0.76	0.21	0.000259
<i>TACC3</i>	0.67	0.22	0.002058
<i>TCF4</i>	-0.54	0.20	0.008119
<i>TEX11</i>	-0.50	0.20	0.013485
<i>TFDP2</i>	-0.40	0.19	0.042089
<i>TFPT</i>	0.49	0.23	0.034336
<i>THBD</i>	-0.58	0.25	0.021691
<i>TIAM1</i>	-0.43	0.20	0.03475
<i>TIMP3</i>	-0.62	0.22	0.004322
<i>TK1</i>	0.59	0.23	0.010718
<i>TMBIM6</i>	-0.41	0.19	0.031823
<i>TMEFF2</i>	-0.64	0.23	0.005074
<i>TNFAIP2</i>	0.52	0.24	0.031759
<i>TNFAIP8L1</i>	0.57	0.23	0.013299
<i>TNFRSF11B</i>	0.71	0.25	0.004933
<i>TNFRSF12A</i>	0.68	0.22	0.001925
<i>TNFRSF6B</i>	0.66	0.27	0.012419
<i>TNNI3</i>	0.57	0.27	0.032266
<i>TP53I3</i>	0.47	0.21	0.025102
<i>TREX2</i>	0.53	0.25	0.033846
<i>TRIM32</i>	-0.50	0.20	0.012077
<i>UGT8</i>	-0.95	0.19	1.11E-06
<i>VCAN</i>	0.61	0.27	0.022184
<i>VCL</i>	-0.52	0.19	0.006984
<i>WNT5A</i>	-0.61	0.20	0.002646
<i>ZBED6</i>	-0.53	0.25	0.035941
<i>ZBTB17</i>	0.48	0.22	0.030132
<i>ZFP36</i>	0.81	0.21	0.000108

Annexe 2. Design et sélection des sondes du panel de gènes sélectionnés pour l'étude d'expression

Gene	Accession	Target sequence	Tm_ Tm_ PN (CP;RP)		Group	
			CP	RP		
<i>ABCC8</i>	NM_000352.3	ACCTCCGTGGTCTACTATCACA	81	82	309041; 209041	Monogenic diabetes gene
		ACATCGAGACTTCCAACCTCCC				
		CAAGCTGCTAATTGCCCTGCTG				
		GTGTATTGGACCCTGGCCTTCA				
		TCACCAAGACCA				
<i>ADAMTS9</i>	NM_182920.1	AGTGAAATTATTAGAGACCCTGA	80	83	350001; 250001	T2D gene
		GCGAATACGAAATCGTGTCTCC				
		CATCCGAGTGAACGCTCTCGGA				
		GAACCCTTTCCACGAACGTCC				
		ACTTCAAAGA				
<i>ADCY5</i>	NM_183357.2	CCCCTCCATATTCATGCTCAGC	83	80	350002; 250002	T2D gene
		TTCTACCTGACCTGTTCCCTGCT				
		GCTGACCTTGGTGGTGGTTTGTG				
		TCTGTGATCTACTCCTGCGTAAA				
		GCTCTTCCC				
<i>ALPI</i>	NM_001631.3	CAGCAAGGCTCAGGACAGCAAA	85	85	386252; 286252	Marker of gut
		GCCTACACGTCCATCCTGTACG				
		GCAATGGCCCGGGCTACGTGTT				
		CAACTCAGGCGTGCACAGAC				
		GTGAATGAGAGC				
<i>ANK1</i>	NM_020477.2	CAGGGTACTTTTTCCCAACCTCA	80	79	374572; 274572	T2D gene
		TCTGTCAGAAATCCATGTGGGC				
		TTCCTGGAAAGAAAAAAAAAAAA				
		AAGAAAAGTAGGCATGAAATCA				
		GTTTAACACC				
<i>ANKRD55</i>	NM_024669.2	GCACAGCAGCAGAAGAGAGTGA	85	77	351314; 251314	T2D gene
		ACATTCTGCCAACCCACCAGT				
		GATGAAAATTAAGTGGGCCA				
		CTCGCTGCAGAAATGTAGATGA				
		ATATGTATTTTC				
<i>AP3S2</i>	NM_005829.4	GGTGCTAGGGCTCGTGAGCGC	85	85	355827; 255827	T2D gene
		CGGGGCCAAGTTTCCGAGTGCC				

		GCTCTCAGCAGCGCACCAACCG				
		GAAGTGATCGTGTTGTGGCGGA				
		AGGAGGAGCTTTC				
<i>AQP2</i>	NM_000486.5	GTCTCACAGGTAGTATATGGTG	80	82	365408;	Marker of kidney
		GAGCCAACACTTGAACTCAGAC			265408	
		CTTTTTACACAAAATCCCATGAT				
		TTTTCCACTGAGACAAATCCTAG				
		GCTCCTGGGA				
<i>ARAP1</i>	NM_001040118.2	GGCCACAGTGAAGGCCCTTATC	83	83	370135;	T2D gene
		AGCCACCTGTACTGTGTTTCAGT			270135	
		GCTTCTCAGACACGAACCAGAT				
		GAACGTGCACAACCTGGCAATT				
		GTGTTTGGGCCC				
<i>ARL15</i>	NM_019087.2	AATGCCATCTTGAATGTAAAAGA	84	81	300047552;	T2D gene
		ACTTGGAGGGGCTGATAACATC			200047552	
		CGGAAATACTGGAGCCGCTACT				
		ACCAAGGATCTCAAGGGTAAT				
		ATTTGTATTAG				
<i>BCAR1</i>	NM_001170717.1	CTGGCCCCGGCACCCTGTACG	85	86	374085;	T2D gene
		ATGTGCCCCGTGAACGGGTGCT			274085	
		TCCTCCTGAGGTGGCTGATGGT				
		GGCGTGGTGCACAGTGGTGTGT				
		ATGCGGTGCCTCC				
<i>BCL11A</i>	NM_022893.3	TACACATGTACAACCTGCAAACA	79	83	335334;	T2D gene
		GCCATTCACCAGTGCATGGTTT			235334	
		CTCTTGCAACACGCACAGAACA				
		CTCATGGATTAAGAATCTACTTA				
		GAAAGCGAAC				
<i>BLK</i>	NM_001715.2	AGCTTCTTGCTCCAATCAACAAG	78	81	304841;	Monogenic
		GCCGGCTCCTTTCTTATCAGAG			204841	diabetes gene
		AGAGTGAAACCAACAAAGGTGC				
		CTTCTCCCTGTCTGTGAAGGAT				
		GTCACCACCCA				
<i>C1orf43</i>	NM_015449.2	ATTCGACTCTCCAGGGTTCAGG	84	84	300000629;	Housekeeping
		ATATCAAGTATGAGCCCCAGCT			200000629	gene
		CCTTGCAGATGATGATGCTAGA				
		CTACTACAACCTGGAAACCCAGG				
		GAAATCAAAGTT				

<i>C2CD4A</i>	NM_207322.2	GCATTTTGTTTAAGACCCCGGAT81 AAGAAAATGAGGGCAAAGAGG TGAAGTGA CTGTCCAAGATCA ACAGTGAATTATTAGTTGGAACG CCAGCCTGAT	80	310209; 210209	T2D gene
<i>C2CD4B</i>	NM_001007595.2	AGGATGCGGCTCCTCGAGAAAC 86 TCTGTTCCCTCGGCCGAGGCAG CTCCGCGCCGAAGCCCGCCTTC GCCAAAGTGCTCACGCCGAATC GCATCCCCGAAT	86	335228; 235228	T2D gene
<i>CAMK1D</i>	NM_020397.2	AAAGAGACCCTCGGAACCGGG 79 GCCTTTTCCGAAGTGTTTTAGC TGAAGAGAAGGCAACTGGCAAG CTCTTTGCTGTGAAGTGTATCCC TAAGAAGGCGC	81	305079; 205079	T2D gene
<i>CCND2</i>	NM_001759.3	TGTGAGGAACAGAAGTGCGAAG 85 AAGAGGTCTTCCCTCTGGCCAT GAATTACCTGGACCGTTTCTTG GCTGGGGTCCCGACTCCGAAGT CCCATCTGCAAC	86	340263; 240263	T2D gene
<i>CDC123</i>	NM_006023.2	TTGGTGAAGTCACAGATTC ACT 83 GCTGTTACCTGGGAAGAACTG ATATCTGAGAACA ACTTAAACGG CGATTTTAGTGAAGTTGACGCTC AAGAGCAGGA	81	300039699; 200039699	T2D gene
<i>CDH16</i>	NM_004062.2	GCCACGTGAACACATAATCCCC 82 GTGGTGGTCAGCCACAATGCCC AGATGTGGCAGCTCCTGGTT CG AGTGATCGTGTGTCGCTGCAAC GTGGAGGGGCAG	81	308452; 208452	Marker of kidney
<i>CDKAL1</i>	NM_017774.2	GGTCACTCTGTGAGACTGCTGG 82 GTCAGAAAAGGATAATGGAAG GCGGCTTGGGGGAGCACGATT GGATTTGCCGAAGATTAGGAAG AATCCACTGATAG	82	306459; 206459	T2D gene
<i>CDKN2A</i>	NM_000077.3	AAGCGCACATTCATGTGGGCAT 82 TTCTTGCGAGCCTCGCAGCCTC CGGAAGCTGTGACTTCATGAC AAGCATTTTGTGAACTAGGGAA GCTCAGGGGGGT	81	302810; 202810	T2D gene

<i>CDKN2B</i>	NM_004936.3	CACTTGGGTGACGGCAGTCGAT GCGTTCACCTCCAATGTCTGCTG AGGAGTTATGGTGAACCCACAA CTTAGGCCCTAGCGGCAGAAAG GAAAACCTGAAG	82	81	301731; 201731	T2D gene
<i>CEL</i>	NM_001807.3	GGTTCGTGGAAGGCGTCAATAA GAAGCTCGGCCTCCTGGGTGAC TCTGTGGACATCTTCAAGGGCA TCCCCTTCGCAGCTCCCACCAA GGCCCTGGAAAA	85	84	348673; 248673	Monogenic diabetes gene
<i>CHCHD2P9</i>	ENST0000046172 6.1	CTTCTATGGGATCAAACAGTTTC TGGAGTGTGCCAGAACCAGG GCGACATCAAGCTCTGTGAGGA TTTCAGTAAGGTGCTGAAACAG TGCCGACTTGCA	86	84	300093539; 200093539	T2D gene
<i>CIDEA</i>	NM_022094.2	GACAAGGATGGAATACGCCATG AAGTCCCTTAGCCTTCTCTACCC CAAGTCCCTCTCCAGGCATGTG TCAGTGCGTACCTCTGTGGTGA CCCAGCAGCTG	84	85	343264; 243264	Marker of adipose tissue
<i>CILP2</i>	NM_153221.2	CCGCTCCCAGCTCAGAAGCCGT CTCTGACTTCTCGTGCGTATTTT GACCCTGATTTCAATCTTCTACC CTTGGGAGTTCTGGCGTTTGGC ACAAAGTCCC	83	79	300060271; 200060271	T2D gene
<i>COBL1</i>	NM_014900.3	AGTTTTTTTCAACGCAGTAAGAA AAAGCGAGACCAAACCTGCAAGT GCCCCTGCAACCCCTCTAGTAA ATAAGCACCGCCCAACTTTTACA AGGTCCAATA	80	82	313525; 213525	T2D gene
<i>DGKB</i>	NM_004080.1	TCCACTTCTTGTGCTCCTGGGC TTAGAAAATAACGTGAAGGATG ATGGACAGCACGTGTGGCGACT GAAGCACTTTAACAAACCTGCC TATTGCAACCTT	78	79	302687; 202687	T2D gene

<i>DNER</i>	NM_139072.3	CCTCTACATCATCATTGGAGCC CTCTGCGTGGCCTTCATCCTTAT GCTGATCATCCTGATCGTGGGG ATTTGCCGCATCAGCCGCATTG AATACCAGGGT	82	83	350100; 250100	T2D gene
<i>DUSP9</i>	NM_001395.2	CCCATCTCCGACCACTGGAGCC AGAACCTGTCGCGGTTCTTTCC GGAGGCCATTGAGTTCATTGAT GAGGCCTTGTCACAGAACTGCG GGGTGCTCGTCC	85	84	347657; 247657	T2D gene
<i>FABP4</i>	NM_001442.2	GGTGAATGCGTCATGAAAGGC GTCACTCCACGAGAGTTTATG AGAGAGCATAAGCCAAGGGACG TTGACCTGGACTGAAGTTCGCA TTGAACTCTACA	83	83	311558; 211558	Marker of adipose tissue
<i>FAF1</i>	NM_007051.2	GCTTTTCAAGAGGCCTTCTATGT GAAAGCCCGAGATAGAAAGCTT CTTGCTATCTACCTCCACCATGA TGAAAGTGTGTTAACCAACGTG TTCTGCTCAC	81	80	314945; 214945	T2D gene
<i>FITM2</i>	NM_001080472.1	CTTGTCCCAGAAGGTGTTTGGC ACCTTGTTTGGTTTGCTGAGCTG GTACGGGACATACGGGTTTTGG TATCCGAAAGCCTTTTCCCAG GACTTCCTCCC	79	82	300022375; 200022375	T2D gene
<i>FOXP3</i>	NM_014009.3	GGGCCATCCTGGAGGCTCCAG AGAAGCAGCGGACACTCAATGA GATCTACCACTGGTTCACACGC ATGTTTGCCTTCTTCAGAAACCA TCCTGCCACCTG	81	79	310104; 210104	Monogenic diabetes gene
<i>FTO</i>	NM_001080432.2	AAAGTGAGGATGACTCTCATCT CGAAGGCAGGGATCCTGATATT TGGCATGTTGGTTTTAAGATCTC ATGGGACATAGAGACACCTGGT TTGGCGATACC	84	80	344638; 244638	T2D gene
<i>GATA4</i>	NM_002052.3	GACTTCTTTCCCAAGATGTCCTT GTCCCCTGCGTTCCCCTACTGTG GCCTAGACCGTGGGTTTTGCAT TGTGTTTCTAGCACCGAGGATC TGAGAACAAGC	83	81	311568; 211568	Monogenic diabetes gene

<i>GATA6</i>	NM_005257.3	GACAGTGGCGACTGCGCTGACA GAACGTGATTCTCGTGCCTTTAT TTTGAAAGAGATGTTTTCCCAA GAGGCTTGCTGAAAGAGTGAGA GAAGATGGAA	80	83	311617; 211617	Monogenic diabetes gene
<i>GCC1</i>	NM_024523.5	TACAGCAGGAAATGAGAAAGAC AGCTCTTGACAGAGGATCAACTC CGTCAGCAATCTCAGGTAGAAG AACAGAGGGTGGCAGCCCTGG AGAATCAAATATC	82	81	300572; 200572	T2D gene
<i>GCG</i>	NM_002054.2	TGGA CTCCAGGCGTGCCCAAGA TTTTGTGCAGTGGTTGATGAATA CCAAGAGGAACAGGAATAACAT TGCCAAACGTCACGATGAATTT GAGAGACATGC	84	83	311569; 211569	Marker of pancreatic islet
<i>GCK</i>	NM_000162.3	CCACCTTTCTCGCTGGAATCAAT TTCCCAGAAGGGAGTTGCTCAC TCAGGACTTTGATGCATTTCCAC ACTGTCAGAGCTGTTGGCCTCG CCTGGGCCCA	82	83	311750; 211750	T2D gene & Monogenic diabetes gene
<i>GCKR</i>	NM_001486.3	TGGGTGCTGAATACAGTGAGTA CAGGTGCTCATGTGCTTCTTGG TAAGATCCTACAAAACCACATGT TGGACCTTCGATTAGCAACTC CAAGCTCTTCT	84	82	349899; 249899	T2D gene
<i>GIPR</i>	NM_000164.2	CCCTGTCTCTGCCCACTGCT GCTAGCCCTGCTCATCTTGAGT TTGTT CAGGCGGCTACATTGCA CTAGAAACTATATCCACATCAAC CTGTT CACGTC	82	79	302954; 202954	T2D gene
<i>GLIS3</i>	NM_001042413.1	CCCGGGACATCCATGTCCAGCA ATAGTGTCTCTAACTATTACCA TCCTACCTTTTTGGCACGGAAA GTAGCCACTCTCCTTACCCTAGT CCTCGGCACT	82	83	300021627; 200021627	T2D gene & Monogenic diabetes gene

<i>GPSM1</i>	NM_001145638.1	GGCCACGGCGAGCCCCAGGAG CCGGGGGACGACTTCTTCAACA TGCTCATCAAGTACCAGTCCTC CAGGATCGATGACCAGCGCTGC CCGCCACCTGACG	84	84	374380; 274380	T2D gene
<i>GRB14</i>	NM_004490.2	ACAGCTGGACCCTTTTTGAGCA CCTGCCTCACATAGGTGTAGAA AGAACAATAGAAGACCACGAAC TGGTGATTGAAGTGCTATCCAA CTGGGGGATAGA	83	82	302690; 202690	T2D gene
<i>GRK5</i>	NM_005308.2	GTTCTCCACGGGCTCTGTGTCC ATCCCATGGCAAACGAGATGA TAGAAACAGAATGCTTTAAGGA GCTGAACGTGTTTGGACCTAAT GGTACCCTCCCG	79	78	303130; 203130	T2D gene
<i>HHEX</i>	NM_002729.4	GCACTATCACTTAGTACCTGTTT GACCAAGGTGTTAAGGGGATAG TACCTCCAATTCAAGCAGAGA AACTGACCTGACTAAAGTTAATC GCAGATGAAC	82	83	311692; 211692	T2D gene
<i>HLA-B</i>	NM_005514.6	CCCTGAGATGGGAGCCGTCTTC CCAGTCCACCGTCCCCATCGTG GGCATTGTTGCTGGCCTGGCTG TCCTAGCAGTTGTGGTCATCGG AGCTGTGGTCGC	86	86	329226; 229226	T2D gene
<i>HMG20A</i>	NM_018200.2	TATACATCTCCATTTTCTGACCT CTGGACTAACTGGTTGCTCAGC AAGGTTCTGAAGGAGAGTTTCT TGCATTGGACAGGCCAGTCTT CTCCCATCATT	81	80	348437; 248437	T2D gene
<i>HMGA2</i>	NM_003484.1	GAGGAGGAATTCTTTCCCGCC TAACATTTCAAGGGACACAATTC ACTCCAAGTCTCTTCCCTTCCA AGCCGCTTCCGAAGTGCTCCCG GTGCCCCGAA	81	85	370307; 270307	T2D gene
<i>HNF1A</i>	NM_000545.4	GGGGGTCGTGGAGAGCTAGGA GCAAAGCCTGTTCATGGCAGAT GTAGGAGGGACTGTCGCTGCTT CGTGGGATACAGTCTTCTTACTT GGAAGTGAAGGG	82	82	310561; 210561	T2D gene & Monogenic diabetes gene

<i>HNF1B</i>	NM_000458.1	ACGTCCTGCTGGCACCTCAGAC AATCCACTCTCAGGAGCGCAGC CCGAAGCCCAGTTTCCCTTCTAT GCAGTATTGCCACAATGCCTCT CCCACGATGTC	82	79	300034; 200034	T2D gene & Monogenic diabetes gene
<i>HNF4A</i>	NM_178850.1	CCTTGCAGAGCATCACCTGGCA GATGATCGAGCAGATCCAGTTC ATCAAGCTCTTCGGCATGGCCA AGATTGACAACCTGTTGCAGGA GATGCTGCTGGG	83	83	360741; 260741	T2D gene & Monogenic diabetes gene
<i>IAPP</i>	NM_000415.1	ATTCTCTCATCTACCAACGTGGG ATCCAATACATATGGCAAGAGG AATGCAGTAGAGGTTTTAAAGA GAGAGCCACTGAATTACTTGCC CCTTTAGAGGA	83	81	311536; 211536	Marker of pancreatic islet
<i>IDE</i>	NM_004969.3	AAACTGATCGCACAGAAGAGTG GTATGGAACCCAGTACAAACAA GAAGCTATACCGGATGAAGTCA TCAAGAAATGGCAAATGCTGA CCTGAATGGGAA	83	83	300039130; 200039130	T2D gene
<i>IER3IP1</i>	NM_016097.3	GGGAACAGACCAGGGAATTGGT GGATTTGGAGAAGAGCCGGGAA TTAAATCACAGCTAATGAACCTT ATTGATCTGTAAGAACCGTGAT GAGAGTGCCA	84	81	343083; 243083	Monogenic diabetes gene
<i>IGF2</i>	NM_001127598.1	ACACACACTCATGCGCAGCACA TACATGAACACAGCTCACAGCA CACAAACACGCAGCACACACGT TGCACACGCAAGCACCCACCTG CACACACACATG	87	88	322178; 222178	T2D gene
<i>IGF2BP2</i>	NM_001007225.1	GAACAAAAGCGAAACACACAAA CCAGCCTCAACTTACACTTGGTT ACTCAAAGAACAAGAGTCAAT GGTACTTGTCTAGCGTTTTGG AAGAGGAAAAC	84	81	366890; 266890	T2D gene

<i>INS</i>	NM_000207.2	GGGTCCCTGCAGAAGCGTGGC ATTGTGGAACAATGCTGTACCA GCATCTGCTCCCTCTACCAGCT GGAGAACTACTGCAACTAGACG CAGCCCGCAGGCA	85	86	350253; 250253	T2D gene & Monogenic diabetes gene & Marker of pancreatic islet
<i>INSM1</i>	NM_002196.2	AAGCCTCCCCTTGCGGGGAG AAGCTTTTTTCTTGCTAGTATT CGCTGTGTTTCATGGTCTAGAAAT GCGGTCTGGTCTCGCCTCGCCT ACCAATCTCTG	79	83	311571; 211571	Marker of pancreatic islet
<i>IRS1</i>	NM_005544.2	CCCTGGGCAGCGGTGAGAGCA GCTCCACCCGCCGCTCAAGTGA GGATTTAAGCGCCTATGCCAGC ATCAGTTTCCAGAAGCAGCCAG AGGACCGTCAGTA	83	83	300093750; 200093750	T2D gene
<i>ISL1</i>	NM_002202.2	CTTACAGGCTAACCCAGTGGAA GTACAAAGTTACCAGCCACCTT GGAAAGTACTGAGCGACTTCGC CTTGCAGAGTGACATAGATCAG CCTGCTTTTCAG	79	83	308799; 208799	Marker of pancreatic islet
<i>JAZF1</i>	NM_175061.3	CCTGGACCACAGAGAGTGCCAT CAGCTCCGAAGCCATCCTCAGC TCCATGTGCATGAATGGAGGGG AAGAGAAGCCTTTTGCCTGCCC AGTTCCTGGATG	82	82	310734; 210734	T2D gene
<i>KCNJ11</i>	NM_000525.3	CTCATCCAGGGTGTTACAAGGC ACTTGTCACTATGCTATTTCTGG CCTCAGCAGGAACCTGTA CTGG GTTATTTTTGTCCCTGCTCCTCC CAACCCAATT	81	81	349841; 249841	T2D gene & Monogenic diabetes gene
<i>KCNK16</i>	NM_001135105.1	CTGGTCATTCTCATCTTCCCACC CATGGTCTTCAGCCATGTGGAG GGCTGGAGCTTCAGCGAGGGC TTCTACTTTGCTTTCATCACTCT CAGCACCATTG	83	80	300029232; 200029232	T2D gene
<i>KCNQ1</i>	NM_181798.1	CAGACGTGGGTCGGGAAGACC ATCGCCTCCTGCTTCTCTGTCTT TGCCATCTCCTTCTTTGCGCTCC CAGCGGGGATTCTTGGCTCGGG GTTTGCCCTGA	83	83	311680; 211680	T2D gene

<i>KLFI1</i>	NM_001177716.1	TCATCACCTCTAGCCAAAACCTGT	83	83	349892;	Monogenic
		GTCCCTCAGGTAGACTTTTCCC			249892	diabetes gene
		GAAGGAGGAACTATGTTTGCAG				
		CTTCCCAGGTTGCCGGAAGACC				
		TACTTCAAAAAG				
<i>KLFI4</i>	NM_138693.2	CAGGCCGTTGTCCCTGCTTTCT	80	86	349984;	T2D gene
		CTCTGCCCATCCTTCTTCCCAG			249984	
		AGTCATTACACCAAGGCACAGA				
		CTGGTTCCTCTGCTCTGAGGGT				
		GGGTCCAGGCA				
<i>KLHDC5</i>	NM_020782.1	CCACCGCTCTTTTAAGGAGGCA	78	79	300533;	T2D gene
		TTATGAATGAGTGCAGCATTCT			200533	
		GTCCTCTGTGCCAGGATTTGGT				
		CTTAGAATCCATGTCAGATTGGT				
		GCTTCCAGAC				
<i>LAMA1</i>	NM_005559.2	CAGTTGCACCAAATGCCACCC	81	82	311620;	T2D gene
		TTGAACTCAAGGCTGCTGAAGA			211620	
		TTTATTGTCACAAATTCAGGAAA				
		ATTACCAGAAGCCGCTGGAAGA				
		ATTGGAGGTAT				
<i>LEP</i>	NM_000230.2	GTAGTTCTTGTCTGATTGGCTCA	80	81	316749;	T2D gene
		CCCAAGCAAGGCCAAAATTACC			216749	
		AAAAATCTTGGGGGGTTTTTACT				
		CCAGTGGTGAAGAAAACCTCCT				
		TAGCAGGTGG				
<i>LGALS4</i>	NM_006149.3	AGAAGATCACCCACAACCCATT	82	84	344872;	Marker of gut
		TGGTCCCGGACAGTTCTTTGAT			244872	
		CTGTCCATTCGCTGTGGCTTGG				
		ATCGCTTCAAGGTTTACGCCAAT				
		GGCCAGCACCT				
<i>LGR5</i>	NM_003667.2	CTTATGCTTACCAGTGCTGTGCA	79	79	344720;	T2D gene
		TTTGGAGTGTGTGAGAATGCCT			244720	
		ATAAGATTTCTAATCAATGGAAT				
		AAAGGTGACAACAGCAGTATGG				
		ACGACCTTCA				

<i>LIPF</i>	NM_001198828.1	AGAAGCAGCTACACTATGTTGG CCATTCCCAGGGCACCACCATT GGTTTTATTGCCTTTTCCACCAA TCCCAGCCTGGCTAAAAGAATC AAAACCTTCTA	84	79	387771; 287771	Marker of gut
<i>LPP</i>	NM_005578.2	GCTGTATGACATGGAAAATCCA CCTGCTGACGAATACTTTGGCC GCTGTGCTCGCTGTGGAGAAAA CGTAGTTGGGAAGGTACAGGA TGCACTGCCATG	81	82	308346; 208346	T2D gene
<i>MACF1</i>	NM_012090.5	CATGGATGAAAAGGAGCAGCTT ATACAGTCCAAGAGTTCCGTTG CCAGTCTCGTTGGGAGATCAAA AACCATCGTTCAGCTAAAACCA CGCAGTCCAGAC	83	83	300043617; 200043617	T2D gene
<i>MAEA</i>	NM_001017405.2	CCCTGCCCATGGCCCACTGTGC CAACTCCCGCCTGGTCTGCAAG ATTTCTGGCGACGTGATGAACG AGAACAATCCGCCCATGATGCT GCCCAACGGCTA	83	83	300089574; 200089574	T2D gene
<i>MAFA</i>	NM_201589.2	AGCTGCCCAGCAGCCCGCTGG CCATCGAGTACGTCAACGACTT CGACCTGATGAAGTTCGAGGTG AAGAAGGAGCCTCCCGAGGCC GAGCGCTTCTGCCA	85	86	311743; 211743	Marker of pancreatic islet
<i>MC4R</i>	NM_005912.1	TGGAGGGTGCTACGAGCAACTT TTTGTCTCTCCTGAGGTGTTTGT GACTCTGGGTGTCATCAGCTTG TTGAGAATATCTTAGTGATTGT GGCAATAGCC	80	78	303291; 203291	T2D gene
<i>MNX1</i>	NM_005515.3	CCTGGGCGCTTCCCTTTTAAGC AAGGGCGCCTCACCTGCTCTTC AAGAAACAGCGAGAGGGAGAC CCAGGGGGCTGAAACTTGAAC CTGGTTCTTTTAA	80	82	310646; 210646	Monogenic diabetes gene
<i>MOB2</i>	NM_053005.3	CCACATCAACCTGCAGTATAGC ACCATCTCGGAGTTCTGCACAG GAGAGACGTGTCAGACGATGGC CGTGTGCAACACACAGTACTAC TGGTATGACGAG	84	84	340815; 240815	T2D gene

<i>MPHOSPH9</i>	NM_022782.3	AGCCTGGGAGAAGAATAAATCA GTTAGCTACGAACAGTGTAAAGC CGGTTTCAGTCACTCCACAGGG GAATGATTTTGAATATACAGCAA AAATTCGGACC	83	80	300049787; 200049787	T2D gene
<i>MTNR1B</i>	NM_005959.3	ATCCCTGAGGGGCTATTTGTCA CTAGCTACTTACTGGCTTATTC AACAGCTGCCTGAATGCCATTG TCTATGGGCTCTTGAACCAAAA CTTCCGCAGGG	78	79	302238; 202238	T2D gene
<i>NEUROD1</i>	NM_002500.2	GTGCCAGCTCAATGCCATATTT CATGATTAGAGGCACGCCAGTT TCACCATTTCCGGGAAACGAAC CCACTGTGCTTACAGTACTGT CGTGTTTACAA	81	79	311578; 211578	Monogenic diabetes gene & Marker of pancreatic islet
<i>NEUROG3</i>	NM_020999.2	CGCGCGAAGTGGGCATTGCAAA GTGCGCTCATTTTAGGCCTCCT CTCTGCCACCACCCATAATCT CATTCAAAGAATACTAGAATGGT AGCACTACCCG	83	82	311658; 211658	Monogenic diabetes gene
<i>NKX2-2</i>	NM_002509.3	TAATTATTATTATGGAGTCGAGT TGACTCTCGGCTCCACTAGGGA GGCGCCGGGAGGTTGCCTGCG TCTCCTTGGAGTGGCAGATTCC ACCCACCCAGCT	82	83	383978; 283978	Monogenic diabetes gene
<i>NKX6-1</i>	NM_006168.2	CTGGCCTGTACCCCTCATCAAG GATCCATTTTGTGGACAAAGAC GGGAAGAGAAAACACACGAGAC CCACTTTTTCCGGACAGCAGAT CTTCGCCCTGG	84	83	311629; 211629	Marker of pancreatic islet
<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3	AAGAGTCACCAAATTTTGAGAGT TATACTTGCTTGTGTGCTCCTGG CTGGCAAGGTCAGCGGTGTACC ATTGACATTGACGAGTGTATCTC CAAGCCCTG	79	83	347789; 247789	T2D gene

<i>PAM</i>	NM_000919.2	TCATATATACCAGGCTTGCTCTT TGCAGTGAATGGGAAGCCTCAT TTTGGGGACCAAGAACCTGTAC AAGGATTTGTGATGAACTTTTCC AATGGGGAAA	79	82	335097; 235097	T2D gene
<i>PAX4</i>	NM_006193.2	TGTCCAGCCCTCTTTGCCTGGG AAATCCAACGCCAGCTTTGTGC TGAAGGGCTTTGCACCCAGGAC AAGACTCCCAGTGTCTCCTCCA TCAACCGAGTCC	83	84	300039793; 200039793	T2D gene & Monogenic diabetes gene
<i>PAX6</i>	NM_000280.3	GAACATCCTTTACCCAAGAGCA AATTGAGGCCCTGGAGAAAGAG TTTGAGAGAACCCATTATCCAGA TGTGTTTGCCCGAGAAAGACTA GCAGCCAAAAT	84	83	366937; 266937	Marker of pancreatic islet
<i>PCBD1</i>	NM_000281.2	GGGCTGTGGGGTGAATGAGC TGGAAGGCCGTGATGCCATCTT CAAGCAGTTTCATTTCAAAGACT TCAACAGGGCCTTTGGGTTCAT GACAAGAGTGGC	83	78	300015261; 200015261	Monogenic diabetes gene
<i>PDX1</i>	NM_000209.3	TGACCTCTTTCTTTCTCCTCCTC CTCCTTCTACCTCCCCTTCTCAT CCCTCCTCTTCTTCTCTTAGC TGCACACTTCACTACTGCACATC TTATAACT	78	79	311526; 211526	T2D gene & Monogenic diabetes gene & Marker of pancreatic islet
<i>PEPD</i>	NM_000285.3	ACGATCCAGAATGGGGATATGT GCCTGTTCGACATGGGCGGTGA GTATTACTGCTTCGCTTCCGACA TCACCTGCTCCTTTCCCGCCAA CGGCAAGTTCA	83	82	300015263; 200015263	T2D gene
<i>PLIN1</i>	NM_001145311.1	CATCTCCACCCGCCTCCGCAGT GCCAGAAACAGCATCAGCGTTC CCATCGCGAGCACTTCAGACAA GGTCCTGGGGGCCGCTTTGGC CGGGTGCGAGCTT	82	84	362927; 262927	Marker of adipose tissue
<i>POU5F1</i>	NM_002701.4	AAGTTCTTCATTCATAAGGAAG GAATTGGGAACACAAAGGGTGG GGGCAGGGGAGTTTGGGGCAA CTGGTTGGAGGGAAGGTGAAGT TCAATGATGCTC	78	82	308193; 208193	T2D gene

<i>PPARG</i>	NM_015869.3	GAGCAAAGAGGTGGCCATCCG CATCTTTCAGGGCTGCCAGTTT CGCTCCGTGGAGGCTGTGCAG GAGATCACAGAGTATGCCAAAA GCATTCCTGGTTTT	81	81	300811; 200811	T2D gene
<i>PRC1</i>	NM_199413.1	ACAGAAAGTCTGCTCCAGCTCC ACGATGCTGAGATTGTGCGGTT AAAAAACTACTATGAAGTTCACA AGGAACTCTTTGAAGGTGTCCA GAAGTGGGAAG	84	82	336825; 236825	T2D gene
<i>PROX1</i>	NM_002763.3	TCTCCTTGTCGCTCATAAAGTCC GAGTGCGGCGATCTTCAAGATA TGTCTGAAATATCACCTTATTCTG GGAAGTGAATGCAGGAAGGAT TGTCACCCAA	79	82	311583; 211583	T2D gene
<i>PSMB2</i>	NM_002794.4	AGCAATATTGTCCAGATGAAGG ACGATCATGACAAGATGTTTAAG ATGAGTGAAAAGATATTACTCCT GTGTGTTGGAGAGGCTGGAGAC ACTGTACAGT	79	85	300093536; 200093536	Housekeeping gene
<i>PSMB4</i>	NM_002796.2	GGACACAGCTATAGTCCTAGAG CTATTCATTCATGGCTGACCAG GGCCATGTACAGCCGGCGCTC GAAGATGAACCCTTTGTGGAAC ACCATGGTCATCG	87	86	300093534; 200093534	Housekeeping gene
<i>PSMD6</i>	NM_001271780.1	ATAGGTCATTAACCCTTGGCTAT ATGGCAGAAGCGTTTGGTGTTG GTGTGGAATTCATTGATCAGGA ACTGTCCAGGTTTATTGCTGCC GGGAGACTACA	79	81	365106; 265106	T2D gene
<i>PTF1A</i>	NM_178161.2	CAACAGCAAATCTTCCTTCAACA ACATAGAAAACGAACCACCATTT GAGTTTGTGTCCTGAGAAGTCC CAGACTCGGCTGAAGATCTGAT TATGTCTCTG	78	82	311732; 211732	Monogenic diabetes gene

<i>PTPRD</i>	NM_001040712.2	TTTTAGTTAAACAAAGGGGGTCA	80	84	341816;	T2D gene
		GACAGACATTGCATCATCCAGA			241816	
		CATGCCTTGTTGGACATGTAGA				
		ATCCGATGGAGCACTGCACACC				
		AGAATGATTGG				
<i>R3HDML</i>	NM_178491.2	CCAGGTACCGCCGGAAGCGCC	84	84	325372;	T2D gene
		ACATCTCTGTGAGAGACATGAA			225372	
		TGCCTTACTGGATTATCACAACC				
		ACATCCGGGCCAGTGTGTACCC				
		ACCTGCCGCCAA				
<i>RASGRP1</i>	NM_005739.3	ACGATCTCATTGACAGCTGCATT	78	82	335283;	T2D gene
		CAATCTTTTGATGCAGATGGAAA			235283	
		CCTGTGTCGAAGTAACCAACTG				
		TTGCAAGTCATGCTGACCATGC				
		ACCGAATTGT				
<i>RBM43</i>	NM_198557.2	CAGCAATATAGTCATAAGGGCT	81	78	355924;	T2D gene
		GCTTTCTCTTGCTGAGCAGTGA			255924	
		CCATTGCCATGAATGAGGCTAG				
		CTTTACACACCGTATCTCATGAA				
		TCCTTATAGTC				
<i>RBMS1</i>	NM_016839.2	ATCTGTCACTAGGCAGCACCGG	82	82	309308;	T2D gene
		AACATACATGCCTGCAACGTCA			209308	
		GCTATGCAAGGAGCCTACTTGC				
		CACAGTATGCACATATGCAGAC				
		GACAGCGGTTCC				
<i>RFX6</i>	NM_173560.2	AGCAGTGCATATTACCACTCCG	80	82	336282;	Monogenic
		TTTATTCTGGAAAGGGCTTGACA			236282	diabetes gene &
		AGTTTTTCTGGAAGCAAGCTAA				Marker of
		AGAATGAGGGTGGCTTCACTCG				pancreatic islet
		TAAATATTCGC				
<i>RND3</i>	NM_005168.3	GGAACAAATCACAGAGAGCCAC	82	80	308797;	T2D gene
		AAAGCGGATTTACACATGCCT			208797	
		AGCAGACCAGAACTCTCGGCAG				
		TTGCTACGGACTTACGAAAGGA				
		CAAAGCGAAGAG				
<i>RREB1</i>	NM_001003698.2	TTCGAACACATCGAGGACTGCT	79	80	310505;	T2D gene
		GCGTCACAACGCGCTTGTCCAC			210505	
		AAACAACCTCCAGGGATGCAA				
		TGGGCAGACCTTTCATACAGAA				
		CAACCCTTCAAT				

<i>SFTP2</i>	NM_001098668.2	CCATCTCTCCAGCTAGCAAAATT ACTACCAGAGCCGTTACTACAC ACAAAGGCTATTGACCGAGCAC ATACCATGTGCCACACACCTTG ACAAAATCTTT	83	83	390536; 290536	Marker of lung
<i>SFTP3</i>	NM_000542.3	CACACACAGGATCTCTCCGAGC AGCAATCCCCATTCTCTCCCC TATTGCTGGCTCTGCAGGGCTC TGATCAAGCGGATCCAAGCCAT GATTCCCAAGG	83	86	344205; 244205	Marker of lung
<i>SFTPC</i>	NM_003018.2	TTCCCTGCTGCCAGTGACACCT GAAACGCCTTCTTATCGTGGTG GTGGTGGTGGTCCATCGTCCG TGGTGATTGTGGGAGCCCTGCT CATGGGTCTCCA	81	81	301927; 201927	Marker of lung
<i>SGCG</i>	NM_000231.2	ACACTGAGTGTTGAGTTGCCGT GTGGAGTTAATGTATGACGCTC CACTGTGGATATCTAATGCCCT GTTGAGAGTAGCCTTGCTCAGT ACTAAAATGCCC	82	84	345859; 245859	T2D gene
<i>SLC12A1</i>	NM_000338.2	CCAAGTTCGACTGAATGAACTC TTACAGGAGCACTCCAGAGCTG CTAATCTCATTGTCCTGAGCCTT CCCGTGGCAAGAAAGGGATCCA TATCGGATTTG	83	81	300015293; 200015293	Marker of kidney
<i>SLC16A11</i>	NM_153357.1	CGGCCTGAGTCTGTTCCACACGC CGGGCCTTCTCAATCTTTGCTCT AGGCACAGCCCTGGTTGGGGG CGGGTACTTCGTTCCCTTACGTG CACTTGGCTCCC	82	83	365403; 265403	T2D gene
<i>SLC16A13</i>	NM_201566.2	GGTGCTCTCAGCGTTCTTCCAG TCGGCGCTTGTGTTTGGGGTGC TCCGCTCCTTTGGGGTCTTCTTC GTGGAGTTTGTGGCGGCGTTTG AGGAGCAGGCA	84	82	365405; 265405	T2D gene

<i>SLC19A2</i>	NM_006996.1	CCTGTGGGAGAAAGTGATGCCT TCTCGCTATGCTGCTATCTATAA TGGTGGCGTGGAGGCCGTTTCA ACCTTACTGGGTGCTGTTGCTG TGTTTGCAGTT	80	80	300323; 200323	Monogenic diabetes gene
<i>SLC22A2</i>	NM_003058.2	CTAACATCTGGCTTGAGCTCCC GCTGATGGTTTTCGGCGTGCTT GGCTTGGTTGCTGGAGGTCTGG TGCTGTTGCTTCCAGAACTAAA GGGAAAGCTTT	82	84	320257; 220257	Marker of kidney
<i>SLC2A2</i>	NM_000340.1	CAATTATGGAAATATAGTTCTGA TGGGTCCCAAAGCTTAGCAGG GTGCTAACGTATCTCTAGGCTG TTTTCTCCACCAACTGGAGCACT GATCAATCCT	81	82	311532; 211532	Monogenic diabetes gene
<i>SLC30A8</i>	NM_173851.2	CAGATGCAACCAATTCATTCAGT CCACGAGCATGATGTGAGCACT GCTTTGTGCTAGACATTGGGCT TAGCATTGAACTATAAAGAGGA ATCAGACGCA	80	83	349995; 249995	T2D gene & Marker of pancreatic islet
<i>SPRY2</i>	NM_005842.2	GCCGTTTTAACTGATATGCTTGT TAGAACTCAGCTAATGGAGCTC AAAGTATGAGATACAGA ACTTG GTGACCCATGTATTGCATAAGC TAAAGCAACAC	77	84	368417; 268417	T2D gene
<i>SRR</i>	NM_021947.1	ACAATTGCCCTGGAAGTGCTGA ACCAGGTTCTTTGGTGGATGC ACTGGTGGTACCTGTAGGTGGA GGAGGAATGCTTGCTGGAATAG CAATTACAGTTA	82	81	301964; 201964	T2D gene
<i>SSR1</i>	NM_003144.3	ACATTGCCTGGGTCTCAGTAAG CCGCTTAAGTGACTGCTCTCATT TTCGCTGTAAAGCACCATACTGT AATAACATCCCATGAAGCATGG GGCGGGGAAG	79	81	308324; 208324	T2D gene
<i>SST</i>	NM_001048.3	AGCTGCTGTCTGAACCCAACCA GACGGAGAATGATGCCCTGGAA CCTGAAGATCTGTCCCAGGCTG CTGAGCAGGATGAAATGAGGCT TGAGCTGCAGAG	82	82	301249; 201249	Marker of pancreatic islet

<i>ST6GAL1</i>	NM_003032.2	ATGATGACGCTGTGTGACCAGG	81	82	361087;	T2D gene
		TGGATATTTATGAGTTCCTCCCA			261087	
		TCCAAGCGCAAGACTGACGTGT				
		GCTACTACTACCAGAAGTTCTTC				
		GATAGTGCCT				
<i>TBC1D4</i>	NM_014832.2	GCAGTTTCTGGCTTTACAGTACC	81	83	344936;	T2D gene
		GACTCAGACACAGATTGCCTAA			244936	
		TAAACAACAGCCTCCTGACATAT				
		CCTATAAGGAACTTTTGAAGCA				
		GCTCACTGCT				
<i>TCF19</i>	NM_001077511.1	TTGCAAGTCGGCTTAACCAATTT	79	79	300022149;	T2D gene
		TGCATTGAGTCCTAGGCTGCTT			200022149	
		GCACTCTGAATTTGGGCTATTCA				
		GGTAGTGTGCTCAAAGTTGAAA				
		CCGCATACAG				
<i>TCF7L2</i>	NM_001146274.1	ATATGGTCCCACCACATCATAC	86	86	362160;	T2D gene
		GCTACACACGACGGGCATTCCG			262160	
		CATCCGGCCATAGTCACACCAA				
		CAGTCAAACAGGAATCGTCCCA				
		GAGTGATGTCCGG				
<i>THADA</i>	NM_001083953.1	CCAGAATCTTCTGATGGATTATT	81	78	329955;	T2D gene
		GACGGTGGAGCAGGTAAAAGAA			229955	
		ATAGGAGATTACTTTAAACAACA				
		CCTTTTGCAGTCCAGGCACAGA				
		GGAGCATTTG				
<i>TLE1</i>	NM_005077.3	CCGACTCACATGACAGCCCATT	82	79	311859;	T2D gene
		CTTTCTTTCTGGGTGATCTGGG			211859	
		GATCACGCCTTGCCCAAGTGTG				
		AGATTACCTTTCTGTTCTTGCA				
		GTTACCTCAC				
<i>TLE4</i>	NM_007005.3	AAAACAAGGACAGCAGAGGAGG	81	79	309013;	T2D gene
		GTTTGCAGAGACCTCCCTCTGA			209013	
		AAAACACAAAGAATGGACTCTCT				
		CCTGGGATGAGGACTTGCTTTC				
		TTTACCTCCGG				

<i>TMEM154</i>	NM_152680.2	GCGCAGCCCTAGTCTTCGCCCT GGTGATCGCGCTCGTTCCCGTC GGCCGGGGTAATTATGAGGAAT TAGAAAACCTCAGGAGATACAAC TGTGGAATCTGA	85	81	373634; 273634	T2D gene
<i>TMEM163</i>	NM_030923.4	TGGGGGTGATATTCCTTCTGTC ATCCATATGTATAGTGGTCAAAG CCATCCATGACCTCTCAACTAG GCTGCTCCCAGAAGTGGACGAT TTCCTGTTGAG	79	83	388351; 288351	T2D gene
<i>TP53INP1</i>	NM_033285.3	CCAAGAGCTTTCGCCCTTCCCA GTGGATAAAAGAACACAGTGAA AGACAGCCTCTTAACAGAAATA GCCTTCGTCGCCAAAATCTTAC CAGGGATTGCCA	83	80	348825; 248825	T2D gene
<i>TRMT10A</i>	NM_001134665.1	CCCACAGACAAAGCCTGTGAAA GTGCTTCTCATGACAATCAGTCT GTCAGGATGGAGGAAGGTGGAT CGGACAGTGATTCCAGTGAGGA GGAATATAGCA	84	83	383028; 283028	Monogenic diabetes gene
<i>TSPAN8</i>	NM_004616.2	CTGGCTATGTGGTATCTTGATCC TAGCATTAGCAATATGGGTACG AGTAAGCAATGACTCTCAAGCA ATTTTTGGTTCTGAAGATGTAGG CTCTAGCTCC	79	79	317600; 217600	T2D gene
<i>UBE2E2</i>	NM_152653.3	GTGAAAGTGTTTCAGCAAGAACC AGAAAGAGAACAAGTTCAGCCC AAGAAAAAGGAGGGAAAAATAT CCAGCAAACCGCTGCTAAATT GTCAACTAGTGC	84	83	368035; 268035	T2D gene
<i>VCP</i>	NM_007126.3	AGATGGATCTCATTGACCTAGA GGATGAGACCATTGATGCCGAG GTCATGAACTCTCTAGCAGTTAC TATGGATGACTTCCGGTGGGCC TTGAGCCAGAG	85	87	300093533; 200093533	Housekeeping gene
<i>VPS26A</i>	NM_004896.3	TGGCACTTTGATAAAATGGTCA GGAACCAACTTTACTGGCAAAA GGGTCCATGTACCACCATGTGC TGGAGCATCTGTTCTACATGTG GATATCTATGAA	84	81	300039091; 200039091	T2D gene

<i>VPS29</i>	NM_016226.4	AGTGGTCACCTATGTGTATCAG CTAATTGGAGATGATGTGAAAG TAGAACGAATCGAATACAAAAA CCTTAAAGCCAGGCCTGTCTTG ATGATTTTTGG	81	76	300093535; 200093535	Housekeeping gene
<i>WFS1</i>	NM_006005.3	GTCAGCAACCTCACCATCGACT TCTTCGCCTTCTTCATCCCGCTG GTCATCTTCTACCTGTCCTTCAT CTCCATGGTGATCTGCACCCTC AAGGTGTTCC	80	81	326714; 226714	T2D gene & Monogenic diabetes gene
<i>ZBED3</i>	NM_032367.2	GGGCTGGGAACCCGAACCTGG TGACTTTGAAAGGATAGAGCTT CATTCCATACCAAAGACTTATCA CACCATGTGCCTATACACCCAG CAGCCCAAGGTG	83	83	349968; 249968	T2D gene
<i>ZFAND3</i>	NM_021943.2	ACAGCCAGACGATGATTCCGCT CCAAGTACAAGTAACAGCCAAT CAGATTTGTTTTCCGAAGAGAC CACCAGTGACAACAACAATACC TCGATAACCACG	84	83	343067; 243067	T2D gene
<i>ZFAND6</i>	NM_001242919.1	AAGTGCCTATGCTTTGTTCCACT GGCTGTGGATTTTATGGAAACC CTCGTACAAATGGCATGTGTTT AGTATGCTATAAAGAACATCTTC AAAGACAGAA	79	78	363380; 263380	T2D gene
<i>ZMIZ1</i>	NM_020338.3	CCACGGTCAACATGGGGCAGTA TTACAAGCCAGAACAGTTTAATG GACAAAATAACACGTTCTCGGG	84	83	300048334; 200048334	T2D gene

AAGCAGCTACAGTAACTACAGC

CAAGGGAATGT

CP, sonde de capture; **RP**, sonde reportrice ; **PN (CP;RP)**, identifiant NanoString pour le couple de sondes; **Tm**, melting temperature

Annexe 3. Heatmaps représentant l'expression des gènes de susceptibilité au diabète dans notre panel d'étude

