

THESE DE DOCTORAT DELIVREE PAR L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNOLOGIES DE LILLE 1

Spécialité:

GENETIQUE MOLECULAIRE

Présentée par:

Amar ABDERRAHMANI

pour obtenir le titre de Docteur de l'Université de Lille1

Sujet de la thèse:

**LE DIABETE DE TYPE MODY : ROLE DES FACTEURS NUCLEAIRES
HEPATIQUES HNF1 α ET HNF3 β .**

Soutenue le 28 octobre 1999

Devant le jury composé de:

**Pr. A. VERBERT
Dr. B. LAINE
Pr. G. REACH
Dr. F. FONTAINE
Pr. P. FROGUEL**

**Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur**



Je remercie Messieurs les membres du jury de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et le Professeur André Verbert de présider à cette soutenance.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Pr Philippe Froguel pour m'avoir accueilli dans son équipe. Merci au Dr Bernard Bailleul pour m'avoir donné les premières armes et appris à poser les bonnes questions.

Je remercie Habib, Jean- Claude, Fred, Mohamed, Bruno, Martine, Valérie, et l'incorrigible Stephan,... pour leur convivialité à tous les instants. Un merci tout particulier au Dr Francis Vasseur pour son immense qualité humaine et scientifique, merci « garchon » pour tin aide et tin si précieuse compagnie durant toutes ces années. Un grand merci à tous les autres membres de l'équipe qui ont su me témoigner leur sympathie. Toute ma reconnaissance revient aussi au Dr Vincent Poitout et Dr Christian Vaisse, merci pour vos précieux conseils et l'acharnement exemplaire au travail.

Un grand merci à tous les membres de l'équipe du CNRS UPRESA 8090 qui ont su me témoigner leur sympathie. Je remercie toute l'équipe du secrétariat chargée du recrutement des familles qui a permis au laboratoire d'être ce qu'il est aujourd'hui.

Je remercie enfin, toutes les familles diabétiques Françaises qui ont participé à l'étude. Sans elles, une partie de ce travail n'aurait été possible. Une pensée particulière pour ma famille qui a été le moteur de cette thèse.

Table des matières.

<i>Préambule:</i> _____	13
INTRODUCTION GENERALE _____	15
<i>I-Le diabète?</i> _____	15
1. <i>Nouvelle classification du diabète.</i> _____	15
II. <i>Le diabète de type 1.</i> _____	18
III. <i>Le diabète de type 2.</i> _____	18
1. <i>Régulation normale de la glycémie.</i> _____	20
2. <i>Sécrétion et mécanismes d'action de l'insuline.</i> _____	21
2.1. <i>Sécrétion de l'insuline.</i> _____	21
2.2. <i>Mécanismes d'action de l'insuline.</i> _____	25
3. <i>Physiopathologie du diabète de type 2.</i> _____	26
4. <i>La composante génétique.</i> _____	30
5. <i>La génétique inverse: la stratégie de recherche de gènes morbides.</i> _____	31
6. <i>L'approche « gènes candidats »:</i> _____	32
IV. <i>Le diabète de type MODY: Une forme monogénique du diabète de type 2.</i> _____	35
1. <i>MODY1.</i> _____	36
2. <i>MODY2.</i> _____	38
3. <i>MODY4.</i> _____	38
4. <i>MODY3 et MODY5.</i> _____	39
V. <i>Implication du facteur nucléaire hépatique HNF1α dans l'homéostasie glucidique: Description d'un gène majeur du diabète.</i> _____	41
1. <i>Portrait du gène HNF1α.</i> _____	41
1.1. <i>Le gène HNF1α est un membre de la famille HNF1.</i> _____	41
1.2. <i>Plusieurs isoformes résultent de l'épissage alternatif d'un seul transcrit.</i> _____	43
1.3. <i>Cartographie de la protéine HNF1A.</i> _____	44
1.3.1. <i>Le domaine amino-terminal.</i> _____	44
1.3.2. <i>Le domaine de fixation à l'ADN.</i> _____	45
1.4. <i>Le co-facteur de Dimerisation DCoH (Cofactor of Dimerisation of HNF1) : Partenaire de dimérisation du facteur HNF1α.</i> _____	51
1.5. <i>La séquence de reconnaissance HNF1α est un palindrome dégénéré:</i> _____	53
2. <i>Le réseau de régulation des HNFs.</i> _____	54
3. <i>HNF1α et certains membres du réseau des HNFs sont exprimés dans les cellules pancréatiques.</i> _____	56

4. L'invalidation complète du gène <i>HNF1α</i> entraîne chez la souris un phénotype diabétique.	57
5. L'expression stable d'une forme dominante négative d'<i>HNF1α</i> altère le mécanisme de sécrétion à l'insuline dans les cellules β-pancréatiques	59
VI. Position du problème.	60
1. Le mécanisme moléculaire, par lequel les différentes mutations du <i>MODY3</i> sont transmises est mal connu.	60
2. L'hyperglycémie chronique pourrait avoir un effet délétère sur l'activité et/ou l'expression du gène <i>HNF1α</i>.	61
2.1. La quantité de protéine <i>HNF1α</i> est diminuée dans les extraits nucléaires des hépatocytes de rats diabétiques.	61
2.2. Etablissement d'un modèle ex-vivo de « glucotoxicité »: Le modèle des cellules HIT-T15 cultivées pendant de nombreux passages à de fortes concentrations de glucose.	61
2.3. L'hyperglycémie chronique diminue l'activité des facteurs de transcription <i>STF-1</i> et <i>RIPE3b1</i>, dans les cellules β-pancréatiques en culture.	62
2.4. L'expression du gène <i>HNF1α</i> pourrait être affectée dans les cellules β-pancréatiques par l'hyperglycémie chronique.	63
3. <i>HNF3β</i>: un gène potentiel au <i>MODY</i>.	63
VII. Objectifs:	65
 MATERIELS ET METHODES	 66
1. Les techniques courantes de la biologie moléculaire.	67
1. Techniques d'électrophorèse.	67
1.1. Electrophorèse en gel d'agarose.	67
1. 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.	67
2. Marquage des sondes d'oligonucléotides double brin au ³²P.	67
3. Collection de l'ADN.	68
4. Amplification des fragments d'intérêts par PCR (Polymerase Chain Reaction).	69
5. Digestion enzymatique de l'ADN.	70
6. Techniques de séquençage de l'ADN.	70
6.1. Séquençage des constructions plasmidiques.	71
6.2. Séquençage des amplicons.	71
7. Génotypage par PCR-RFLPs.	72
8. Localisation d'un gène en utilisant le panel d'hybrides par radiation G3.	72
9. Génotypage à l'aide de marqueurs polymorphes microsatellites.	73
10. Mutagenèse dirigée par PCR.	75
10.1. Construction des mutants <i>HNF1α</i>.	75

<i>10.2. Construction des mutants de la région promotrice du gène HNF1α.</i>	77
<i>II. Culture cellulaire.</i>	77
<i>1. Culture des lignées cellulaires.</i>	77
<i>III. Etude de l'expression de gènes.</i>	78
<i>1. Transfections transitoires.</i>	78
<i>1.1. Transfection dans les cellules C33.</i>	78
<i>1.2. Transfection dans les cellules HepG2 et INS1.</i>	79
<i>1.3. Transfection dans les cellules HIT-T15.</i>	80
<i>2. Préparation des extraits protéiques nucléaires.</i>	81
<i>2.1. Préparation des extraits nucléaires de cellules transfectées.</i>	81
<i>2.2. Préparation des extraits nucléaires des cellules en culture HIT-T15.</i>	82
<i>3. Analyse de la protéine HNF1α par Western Blot.</i>	83
<i>4. Retard sur gel.</i>	83
RESULTATS	85
<i>I. Analyse des effets des mutations du MODY3 sur les propriétés fonctionnelles de la protéine HNF1A (publication n°1).</i>	143
<i>1. Construction des mutants HNF1α.</i>	143
<i>2. Toutes les mutations diminuent l'activité transcriptionnelle de la protéine, dans les conditions de co-transfection transitoire.</i>	144
<i>3. Les protéines mutées sont exprimées à différents niveaux.</i>	145
<i>4. Certains mutants ne se fixent pas à l'ADN.</i>	147
<i>5. Certains mutants peuvent affecter l'activité de la protéine sauvage.</i>	147
<i>II. Etudes fonctionnelles de variants du promoteur du gène HNF1α, associés au MODY3 (publication n°3).</i>	148
<i>1. Des variations nucléotidiques sont identifiées dans la région promotrice du gène HNF1α chez des individus MODY.</i>	148
<i>2. Etudes fonctionnelles des variants du promoteur proximal.</i>	148
<i>III. Effets de l'hyperglycémie chronique sur l'activité et le niveau d'expression protéique HNF1α dans les cellules HIT-T15 dites « glucotoxiques ».</i>	149
<i>1. Le niveau d'expression de la protéine ne varie pas entre les extraits de cellules cultivées avec 11.1mmol/l et 0.8mmol/l de glucose (figure 5A).</i>	149
<i>2. La capacité de fixation à l'ADN ne diffère pas entre les extraits de cellules cultivées avec 11,1mmol/l et 0,8mmol/l de glucose (figure 5B et 5C).</i>	149
<i>3. L'activité du vecteur $\beta(28)$,LUC ne varie pas entre les cellules HIT-T15 cultivées avec 11.1 mmol/l et 0.8mmol/l de glucose (figure 6).</i>	150

IV. Recherche de variations génétiques dans la région codante du gène HNF3β associées au phénotype du MODY (publication n°2).	154
1. Des variations nucléotidiques identifiées dans le gène HNF3β ne sont pas associées au diabète de type MODY.	154
2. Pas d'évidence de liaison entre les marqueurs polymorphes et le phénotype diabétique de type MODY dans les familles.	154
 DISCUSSION	 156
I. La réduction de l'activité de la protéine HNF1, par différents mécanismes, expliquerait la transmission dominante du phénotype MODY3.	157
II. Le niveau d'expression du gène HNF1α serait important pour le maintien de la fonction β-pancréatique.	161
III. Les gènes qui régulent l'expression ou l'activité du gène HNF1α: Des gènes du MODY?.	164
 CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	 167
Bibliographie:	170

LISTE DES ABREVIATIONS.

ADA:	adénosine déaminase
ADN:	acide désoxyribonucléique
ADNc:	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP:	adénosine diphosphate
AMPc:	adénosine monophosphate cyclique
APM:	affected pedigree member
APOCII:	apolipoprotein C-II
ARNm:	acide ribonucléique messenger
ARNt:	acide ribonucléique de transfert
ATP:	adénosine triphosphate
BMI:	body mass index
CCK:	cholécystokinine
CCKBR:	cholecystokinine-B receptor
CCM:	chemical cleavage of mismatch
CDX-3:	Caudal-Type Homeobox 3
CEPH:	Centre d'Etudes du Polymorphisme Humain
cM:	centimorgan
CpG:	5'-cytosine-phosphate-guanine-3'
DGGE:	denaturing gradient gel electrophoresis
DID:	diabète insulino-dépendant
DNID:	diabète non insulino-dépendant

EDTA:	éthylène diamino tétra-acétate
FABP2:	fatty acid binding protein 2
FISH:	fluorescence in situ hybridization
GCG:	glucagon
GCGR:	récepteur au glucagon
GCK:	glucokinase
GCKR:	glucokinase regulatory protein
GIRK1:	human G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channel
GK:	Goto Kakisaki
GLP-1:	glucagon-like peptide-1
GLP1R:	glucagon-like peptide-1 receptor
GLUT:	transporteur de glucose
G6P:	glucose-6-phosphate
GSY:	glycogène synthase
HGPO:	hyperglycémie provoquée par voie orale
HGPIV:	hyperglycémie provoquée par voie intra-veineuse
HK:	hexokinase
HKI:	hexokinase I
HKII:	hexokinase II
HLA:	human leucocyte antigen
HNFs:	hepatocyte nuclear factors
HRC:	histidine-rich calcium-binding protein
IBD:	identical by descent

IBS:	identical by state
IFG:	impaired fasting glycemia
IG:	intolérance au glucose (ou intolérant au glucose)
IPF1:	Insulin promoter factor
IRS-1:	insulin-receptor substrate-1
Isl-1:	LIM/homeodomain gene Islet-1
kb:	kilobase
KI6.2:	K ⁺ inwardly rectifier Channel 6.2
K _m :	constante de Michaelis-Menten
LDL:	low density lipoprotein
LDLR:	low density lipoprotein receptor
m-GDH:	mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase
MODY:	maturity-onset diabetes of the young
Mpb:	méga paires de bases
NADH:	nicotinamide adénine dinucléotide
PAH:	phenylalaline hydroxylase
pb:	paire de bases
PC-1,-2 et -3:	protein convertase 1, 2 ou 3
PCR:	polymerase chain reaction
PEPCK:	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PFKL:	phosphofructokinase liver
PK:	pyruvate kinase
PKL:	pyruvate kinase liver

PKM:	pyruvate kinase muscle
PP1:	protein phosphatase 1
RAD:	ras associated with diabetes
RFLP:	restriction fragment length polymorphism
SSCP:	single strand conformation polymorphism
STRP:	short tandem repeat polymorphism
Vmax:	vitesse maximale de réaction
VNTR:	variable number of tandem repeat
YAC:	yeast artificial chromosome

La nomenclature internationale de base est adoptée pour les abréviations des nucléotides:

A (adénine), T (thymine), G (guanine), C (cytosine).

Les abréviations des acides aminés suivent le codage à 1 lettre ou à 3 lettres.

Préambule:

Chez les mammifères, des quelques cent mille gènes qu'on leur prête, une partie seulement est exprimée dans un tissu et à un stade donné du développement. Certains, indispensables aux fonctions communes à toutes les cellules de l'organisme, impliquant notamment de multiples voies énergétiques ou métaboliques, sont exprimés de façon uniforme. D'autres, associés à des fonctions spécialisées, ont des territoires d'expression restreints, voire absents en dehors de stimuli particuliers. L'expression de ces gènes doit donc être régulée afin de permettre l'adaptation en fonction de l'environnement. Un premier niveau de régulation a lieu au niveau de la chromatine. En effet, de cette dernière, une partie peut se trouver sous un état « condensé », conduisant à « l'extinction » de gènes, un phénomène qui s'avère durable et héritable lors de la division cellulaire. A l'inverse, la chromatine « décondensée » est dite « active », car l'accès des facteurs protéiques à l'ADN, avec laquelle ils interagissent est facilité. Cette phase est importante puisqu'elle constitue le prélude obligatoire à la transcription. La chromatine renferme ainsi une "information conformationnelle" qui est le reflet de son état d'activation ou un vestige de la différenciation cellulaire. L'étape d'interaction de facteurs protéiques avec l'ADN est cruciale, puisque si dans le flux dogmatique de l'information génétique, la protéine va refléter le trait phénotypique, la conversion en ARN n'en reste pas moins le processus indispensable et initial. Cette étape va mettre en scène un jeu de mécanismes régulateurs dans lesquels interviendront un grand nombre de facteurs. Ces facteurs protéiques de la transcription vont ainsi constituer des éléments cruciaux pour le fonctionnement de cette machinerie. Des anomalies de l'expression ou de l'activité de ces facteurs feraient donc état de bouleversement physiologique grave. Plusieurs syndromes humains ont été associés à des mutations identifiées dans différents gènes codant des facteurs de transcription. Citons parmi eux, le

diabète du sujet jeune (MODY). Ce diabète sévère, d'origine monogénique, compte à ce jour 5 sous-types, du MODY1 au MODY5. Quatre d'entre eux résultent d'anomalies identifiées dans les gènes codant des facteurs de transcription, dont trois sont des membres de la classe des facteurs de transcription hépatiques de type HNFs (Hepatocyte Nuclear Factor).

INTRODUCTION GENERALE

I-Le diabète?

Le terme de "diabète sucré" englobe en fait de nombreuses entités cliniques dont l'hyperglycémie chronique est la facette communément rencontrée, mais mettant en jeu des mécanismes étiologiques vraisemblablement distincts et qui commencent à être identifiés. La diabétologie clinique a fait un pas considérable, il y a une quinzaine d'années, lorsque est apparue une classification nosologique des diabètes (WHO (OMS), 1980). Selon les nouvelles normes (1997) définies récemment par l'OMS et l'ADA (American Diabetes Association), est considéré comme diabétique, tout individu ayant une glycémie à jeûn, supérieure à 1,26 g/l (ou 7 mmol/l) et une glycémie supérieure ou égale à 2 g/l (11 mmol/l) à la deuxième heure suite à une HyperGlycémie Provoquée par voie Orale (HGPO) (Tableau I). La glycémie doit être mesurée par la technique de la glucose oxydase, sur plasma de sang veineux, et doit au moins être contrôlée à deux reprises en dehors de toute condition de stress (maladie intercurrente, traumatisme, geste chirurgical...).

1. Nouvelle classification du diabète.

La nouvelle classification nosologique des états diabétiques a l'avantage contrairement à l'ancienne classification, de lever l'ambiguïté sur l'état d'intolérance au glucose et d'amener à considérer les sujets ayant une glycémie à jeûn comprise entre 1,10 et 1,26 g/l comme présentant une hyperglycémie modérée à jeûn. Les anciennes appellations de Diabète Non Insulino-Dépendant (DNID ou type 2) et Diabète Insulino-dépendant (DID ou type 1), ayant une connotation thérapeutique, disparaissent au profit de nouvelles appellations plus proches

de la physiopathologie: **Diabète de type 1** (auto-immun ou idiopathique) et **diabète de type 2** (par trouble prédominant de l'insulino-sécrétion ou anomalie essentielle de l'effet insulinique) (Tableau II). Ces deux formes touchent plus volontiers des sujets de plus de 40 ans et en général en surpoids. Sur le plan clinique, les sujets sont dépourvus de potentiel cétogène et répondent favorablement et durablement aux mesures diététiques et (ou) aux traitements, par anti-diabétique oraux, ou par injection d'insuline.

	ADA-OMS		
	Glycémie à jeûn (8 heures de jeûne)	glycémie au "hasard" et signes cliniques	glycémie 2ème heure de HGPO
Diabète	> 1,26 g/l	> 2 g/l	> 2 g/l
Anomalies de la glyco-	> 1,10 et < 1,26 g/l	—	> 1,40 et < 2 g/l
Normal	< 1,10 g/l	—	< 1,40 g/l

Tableau I: Nouveaux Critères diagnostiques de diabète définis en 1997.

<p>I-Diabète de type 1 A: Auto immun B: Idiopathique.</p> <p>II-Diabète de type 2 A: Insulinorésistance prédominante B: Anomalie de l'insulinosécrétion prédominante</p> <p>III-Autres types spécifiques de diabète A: Anomalies génétiques impliquant l'insulinosécrétion 1-MODY1 (HNF-4a) 2-MODY2 (glucokinase) 3-MODY3 (HNF-1a) 4-MODY4 (IPF-1) 4'-Diabète mitochondrial 5-Autres B: Anomalies génétiques impliquant l'action de l'insuline 1-type A d'insulino-résistance 2-Leprechaunisme 3-Syndrome de Rabson-Mendenhall 4-Diabète lipoatrophique 5-Autres C: Pathologies du pancréas exocrine D: Endocrinopathies E: Diabète induit par des médicaments ou des toxiques F: Infections 1-Rubéole congénitale 2-cytomégalovirus 3-Autres G: Formes inhabituelles de diabètes immunologiques H: Autres syndromes génétiques parfois associés à un diabète</p> <p>IV-diabète gestationnel</p>

Tableau II: Nouvelle classification du diabète proposée par l'ADA-OMS.

II. Le diabète de type 1.

Il se caractérise par l'effondrement de la sécrétion de l'insuline chez les sujets qui en sont atteints. La destruction des cellules β du pancréas endocrine, dont l'origine est auto-immune, est responsable de l'insulinopénie. Environ 15% des diabétiques sont de type 1, et ainsi plus de 200 000 Français sont traités quotidiennement par l'insuline (2/3 au moins sont des diabétiques insulino-dépendants et 1/3 sont des diabétiques insulino-nécessitant). Le Diabète de type 1 survient dans 80% des cas chez des patients de moins de 40 ans, d'où sa terminologie ancienne de diabète juvénile. La région du complexe majeur d'histocompatibilité HLA sur le chromosome 6 (et en particulier les gènes HLA DR et DQ) (Todd et al, 1987) et les régions flanquantes du gène de l'insuline (Julier et al, 1991) jouent un grand rôle dans le déterminisme génétique de cette affection. De plus, récemment il a été suggéré que l'antigène de l'acide glutamique décarboxylase (Glutamic Acid Decarboxylase, GAD) était le premier à déclencher la réaction auto-immune (Kaufman et al, 1993).

III. Le diabète de type 2.

Le diabète de type 2 représente la forme la plus commune de diabète dans l'ensemble des pays et concerne environ 120 millions de personnes à travers le monde. Cette pathologie chronique pose un problème majeur de santé public avec « une épidémie apparente de diabète touchant les adultes du monde entier » qui a conduit, en 1989, à la 42^{ème} résolution de l'assemblée générale de l'Organisation Mondiale de Santé (OMS) et au plan européen à la déclaration de Saint Vincent. Après avoir concerné essentiellement les pays industrialisés, le diabète touche aujourd'hui également les minorités défavorisées de ces pays, ainsi que les pays en voie de développement. Le diabète de type 2 semble évoluer de manière préoccupante, puisque les prévisions de l'OMS font état de 200 millions de personnes

affectées par la maladie en l'an 2000. La France compterait 1 à 2 millions de personnes atteintes et ce chiffre croit chaque année de 7%. Malheureusement, cette affection demeure une entité clinique à la "physiopathologie mystérieuse". Les études épidémiologiques revêtent alors d'une importance particulière, dans la mesure où elles permettent d'évaluer la prévalence et l'incidence de la maladie dans différentes populations, et de mettre en évidence les facteurs innés (**génétique**) et acquis (**environnement**), impliqués dans l'explosion de la maladie. L'étude de certaines populations à haut risque de diabète, présente alors un réel intérêt.

Par définition, le diabétique non insulino-dépendant est un diabétique qui n'a pas besoin d'insuline pour assurer sa survie. Un individu dont le diabète débute comme s'il était insulino-dépendant, peut cependant devenir diabétique non insulino-dépendant et plus fréquemment, un patient chez qui on a porté le diagnostic de diabète de type 2, peut évoluer vers un diabète de type 1.

Ce type de diabète touche une large population hétérogène dont la prévalence présente une grande variabilité. Les prévalences les plus fortes se trouvent chez les indiens Pimas de l'Arizona et de Pondichery avec près de 50%. Des taux élevés aux alentours de 20%, sont observés dans certaines populations insulinaires, du pacifique sud ou de l'océan indien (île Maurice). En Europe, la prévalence du diabète de type 2 est relativement basse, en moyenne de l'ordre de 1-2%, 1,4% en France et 1,2% en Grande Bretagne par exemple. Toutefois, des taux élevés peuvent être rencontrés en Finlande ou en Italie du sud.

La prévalence du diabète augmente avec l'âge. Au delà de 60 ans, le risque de développer un diabète de type 2 est égal à environ trente fois celui des sujets âgés de 20 à 30 ans. L'âge est un facteur de risque dont il faut tenir compte dans les enquêtes de prévalence. Cette maladie peut être plus rare dans certaines populations uniquement parce que leur espérance de vie est limitée. Aux Etats-Unis, la prévalence est plus élevée dans la population

noire et plus encore dans les minorités d'origine hispanique. Sur l'ensemble des pays, le diabète de type 2 représente environ 90% des cas de diabète.

1. Régulation normale de la glycémie.

Après une nuit de jeûne, les tissus non insulino-dépendants comme le cerveau (~50%) et les tissus splanchniques (~25%) consomment la majeure partie du glucose disponible dans le plasma sanguin. Les tissus insulino-dépendants, principalement le muscle squelettique, utilisent le glucose restant (DeFronzo et al, 1988). Le taux basal de consommation de glucose par ces tissus est ~2 mg/kg.min, c'est à dire exactement le taux de production hépatique de glucose et de son flux vers le plasma sanguin. Après une ingestion de glucose, cet équilibre délicat entre la consommation tissulaire de glucose et sa production hépatique est perturbée, et le maintien de l'homéostasie normale de glucose repose dès lors sur trois processus qui agissent de manière coordonnée et étroitement intégrée: l'insulino-sécrétion, l'utilisation tissulaire de glucose (tissus périphériques et splanchniques) et la suppression de production hépatique de glucose (DeFronzo et al, 1988).

En effet, à l'état post-absorptif, le foie est le seul organe producteur et relargueur de glucose dans le plasma sanguin via deux voies métaboliques: 1) la glycogénolyse libère le glucose stocké sous forme de glycogène, en période non absorptive et compte pour 75% de cette production; 2) la néoglucogénèse, qui permet la synthèse de glucose à partir de précurseurs d'origine musculaire, tels que le lactate et les acides aminés gluco-formateurs (principalement la glutamine chez l'homme) produit les 25% restants. Le foie produit le glucose à un taux équivalent à son utilisation périphérique basale. Le cerveau en majorité et les tissus splanchniques sont les utilisateurs principaux de glucose. Le restant est partagé entre les tissus insulino-dépendants (le muscle principalement). Le muscle trouve alors le complément de son apport énergétique dans l'oxydation des acides gras issus du tissu adipeux. Ainsi, lors des périodes de jeûne, la chute progressive normale des niveaux plasmatiques en insuline va déclencher la glycogénolyse et la néoglucogénèse ainsi que l'utilisation du glucose essentiellement par les tissus non insulino-dépendants (le cerveau ne devant en aucun cas être

en état de privation de glucose). Le glucagon joue alors un rôle majeur en stimulant à la fois glycogénolyse et néoglucogénèse hépatiques (Pilkis et al, 1992).

La régulation de l'homéostasie glucidique en réponse à un apport glucidique s'effectue grâce à deux mécanismes: 1) le foie diminue sa production de glucose (d'environ 50%) et fixe 25~35% de la charge de glucose. Il y a donc un flux net du glucose vers le foie qui reforme ses stocks en glycogène pour la période de jeûne suivante. 2) les tissus périphériques voient leur systèmes d'utilisation du glucose s'activer, et fixent plus de la moitié du glucose ingéré. Ce flux de glucose se fait essentiellement vers les muscles qui l'utilisent surtout dans des processus anaboliques (synthèse de glycogène, synthèse de lipides), et secondairement pour l'oxyder. Libérée en réponse une élévation de glucose plasmatique, l'insuline hormone anabolisante, joue un rôle central dans l'intégration de l'ensemble de ces processus. Elle supprime la production hépatique de glucose, et surtout elle active l'utilisation du glucose par les tissus périphériques insulino-dépendant (muscles, tissu adipeux) et sa conversion en glycogène (Felig et al, 1995).

2. Sécrétion et mécanismes d'action de l'insuline.

2.1. Sécrétion de l'insuline.

Le couplage entre stimulation et sécrétion comporte une séquence de phénomènes métaboliques (production de messagers intracellulaires comme signal sécrétoire), ioniques (augmentation intracellulaire du calcium ionisé, sortie de potassium) et mécaniques (extrusion des grains sécrétoires et libération d'insuline). Cet ensemble complexe assure pour l'îlot normal une sécrétion basale pulsatile et des ripostes insulino-sécrétoires rapides (figure 1).

La réponse insulino-sécrétoire au glucose présente une cinétique biphasique avec une première phase rapide et transitoire (pic précoce insulinique) et une seconde phase plus lente et plus durable. La relation entre débit sécrétoire et concentration glucidique est sigmoïde, avec un seuil de stimulation proche d'une concentration en glucose de 5 mmol/l, une riposte

semi-maximale à environ 10 mmol/l et une riposte maximale à environ 20 mmol/l (Malaisse WJ et al, 1990). D'autres sécrétagogues, indépendamment de la voie glycolytique, interviennent dans la stimulation de la sécrétion d'insuline : arginine, agonistes β adrénergiques, peptides intestinaux à effet insulino-trope, glucagon (Rosselin G, 1990).

Les canaux potassiques ATP-dépendants et ceux couplés à une protéine G jouent un rôle important pour maintenir le potentiel de repos de la membrane et pour contrôler l'excitabilité cellulaire. Ces canaux potassiques appartiennent à une nouvelle famille (*inward rectifier potassium channel*) et permettent les flux potassiques (influx ou efflux) par un mécanisme ne dépendant pas du voltage membranaire (Kubo Y et al, 1993; Ashford MLJ et al, 1994). Le métabolisme oxydatif du glucose (mais également des acides gras) dans la cellule β - pancréatique, en augmentant le rapport ATP/ADP cytosolique, va permettre la fermeture des canaux potassiques ATP-dépendants. La diminution de l'efflux de potassium provoque la dépolarisation de la cellule et l'activation de canaux calciques potentiel-dépendants (Mislser S et al, 1992). L'augmentation de la concentration intracellulaire du calcium libre ionisé va permettre la libération de l'insuline à partir des granules sécrétoires matures, réalisant ainsi la première phase de sécrétion d'insuline. Un système oscillatoire lié au cycle fermeture/ouverture de canaux potassiques calcium- dépendants se met secondairement en place, correspondant à la deuxième phase de l'insulino-sécrétion.

L'insuline est synthétisée via un précurseur monocaténaire, la proinsuline, qui subit un double clivage enzymatique par deux endopeptidases, les prohormones convertase 2 et 3 (PC2 et PC3). Au site d'exocytose, l'insuline est libérée en quantité équimolaire à celle du peptide C (un faible pourcentage du produit de sécrétion est libéré sous forme de proinsuline) (Figure 1).

La glucokinase, en contrôlant la première étape du métabolisme oxydatif du glucose jouerait un rôle de "glucose sensor" ou "glucorécepteur" et régulerait ainsi la sécrétion de l'insuline en

réponse au glucose. Une protéine régulatrice de la GCK (Glucokinase-Regulatory-Protein) a été identifiée dans le foie et l'îlot (Van Schaftingen E et al, 1989). Cette protéine de 62 kDa forme un complexe inhibiteur avec l'enzyme en présence de fructose-6-phosphate. Elle permet ainsi le contrôle de l'activité de la GCK par deux effecteurs ayant une action antagoniste : le fructose-6-phosphate qui agit comme inhibiteur et le fructose-1-phosphate qui a une action activatrice (Van Schaftingen E et al, 1993). Les autres enzymes limitant le flux glycolytique dans la cellule β - pancréatique sont la phosphofructo-1-kinase et la pyruvate kinase (Randle PJ et al, 1993). La navette glycérol-3-phosphate/dihydroxyacétone-phosphate, qui fonctionne avec l'enzyme glycérol-3-phosphate déshydrogénase (GDH) à NADH (cytosolique) ou à FADH₂ (mitochondriale), permet une entrée d'ions hydrogène dans la mitochondrie pour la formation d'ATP par la chaîne respiratoire. Elle joue ainsi un rôle clé, en favorisant le métabolisme oxydatif du glucose dans la cellule β pancréatique.

Une potentialisation de la sécrétion d'insuline induite après l'ingestion de glucose par des facteurs intestinaux a été décrite. Cet effet a été attribué à plusieurs peptides insulino-tropes : sécrétine, cholécystokinine, gastrine, VIP (vasoactive intestinal peptide), entéroglucagon, GIP (gastric inhibitory peptide ou glucose-dependent insulino-tropic polypeptide), GLP-1 (glucagon-like peptide 1). Ces peptides, par la stimulation de récepteurs couplés à une protéine G_s activant l'adénylate cyclase, déclenchent une production d'AMPc qui activera une protéine kinase A à l'origine de la phosphorylation de plusieurs éléments des signaux intermédiaires dans l'insulino-sécrétion (Thorens B et al, 1993).

L'hydrolyse des phosphoinositides membranaires par la phospholipase C apparaît aussi être un système modulateur pour la réponse insulinosécrétoire à une variété de sécrétagogues autres que le glucose (acétylcholine, vasopressine, cholécystokinine). Les métabolites formés, l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) et le diacylglycérol (DAG) agiraient par l'intermédiaire de deux mécanismes : une augmentation de la concentration cytoplasmique de calcium et

activation de la calmoduline par l'IP3 et l'activation d'une protéine kinase C- α par le DAG et le calcium (Leahy JL et al, 1992).

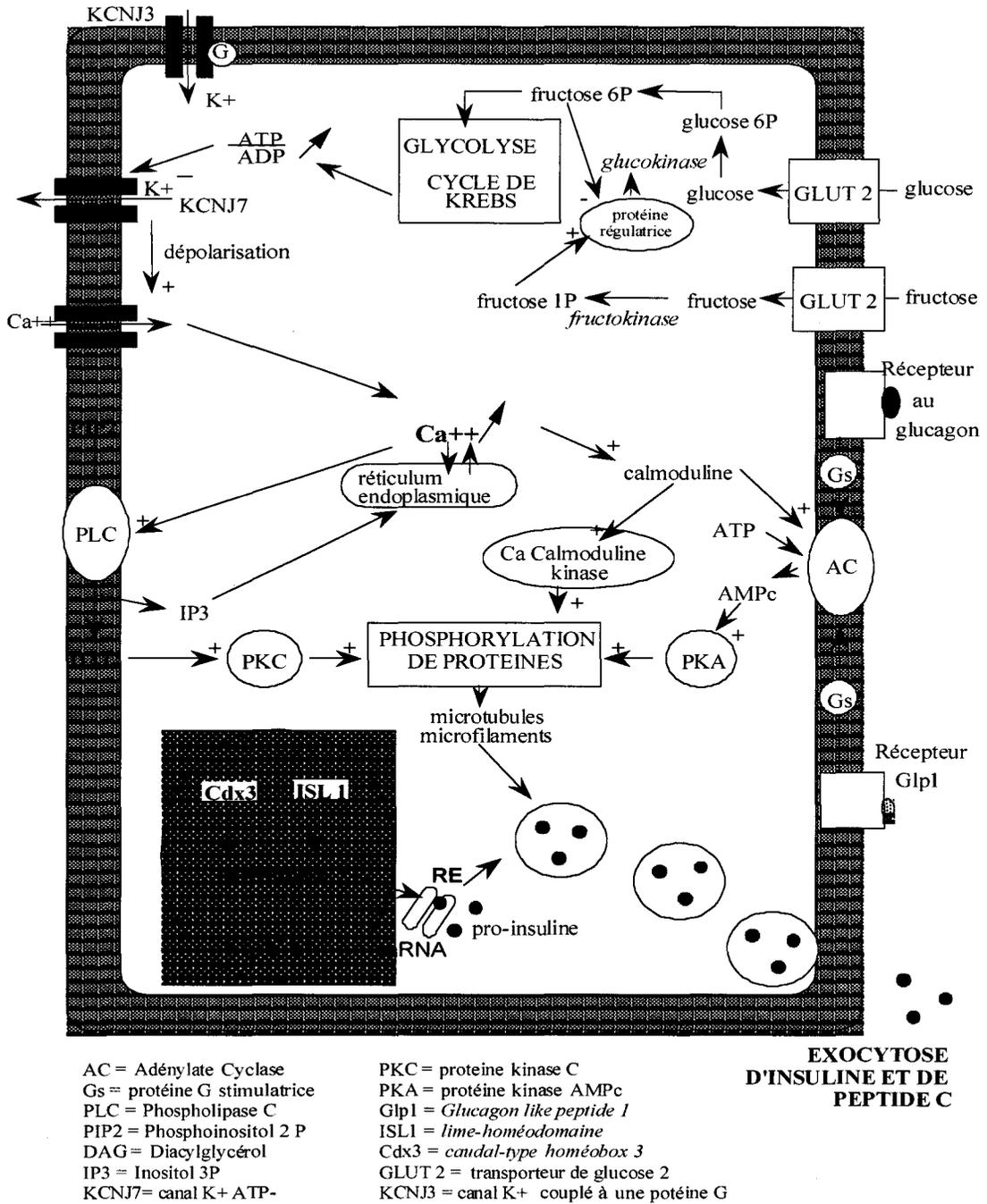


Figure 1 : Mécanismes de sécrétion de l'insuline dans la cellule β pancréatique.

2.2. Mécanismes d'action de l'insuline.

L'insuline exerce ses nombreux effets physiologiques en se fixant à un récepteur spécifique qui est exprimé dans tous les types cellulaires. Le récepteur de l'insuline (IRE) est une glycoprotéine membranaire composée de deux sous-unités α et de deux sous-unités β reliées entre elles par des ponts disulfures. Les sous-unités α sont extracellulaires et contiennent le site de liaison de l'insuline, tandis que les sous-unités β traversent la membrane cellulaire et portent un domaine tyrosine kinase dans leur région intracellulaire. La liaison de l'insuline aux sous-unités α provoque des changements conformationnels qui vont induire l'activation des sous-unités β par autophosphorylation. Ces dernières ainsi activées sont capables de phosphoryler des substrats cellulaires et ainsi de transmettre l'effet de l'hormone en stimulant le métabolisme, la croissance et la différenciation. Le premier substrat identifié qui est directement phosphorylé par la kinase du récepteur à l'insuline est l'Insulin Receptor Substrate 1 (IRS1). En se complexant avec la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K) et autres protéines intra-cellulaires ayant un domaine SH2, IRS1 jouerait ainsi un rôle crucial dans la transmission du signal insulinique (Backer JM et al, 1993). Ces événements initiaux liés à l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline représentent le premier niveau d'action de l'insuline. Le deuxième niveau consiste en une cascade de réactions de phosphorylation/déphosphorylation de sérines, centrées autour d'une enzyme appelée MAP kinase (mitogen-activated protein/microtubule-associated protein). Le troisième niveau est représenté par les effecteurs biologiques terminaux de la cascade insulinique. Il comprend la translocation des transporteurs de glucose GLUT4 à la surface cellulaire du muscle/tissu adipeux (favorisant ainsi le transport intra-cellulaire du glucose après stimulation insulinique), des enzymes permettant la synthèse du glycogène et des lipides, et des protéines impliquées dans l'action de l'insuline sur l'expression des gènes et la croissance cellulaire (Kahn CR et al, 1994) (Figure 2). La stimulation de la glycogène synthase (GS) par l'activation de la Ras-

MAP kinase est cependant controversé (Yamamoto HR et al, 1995).

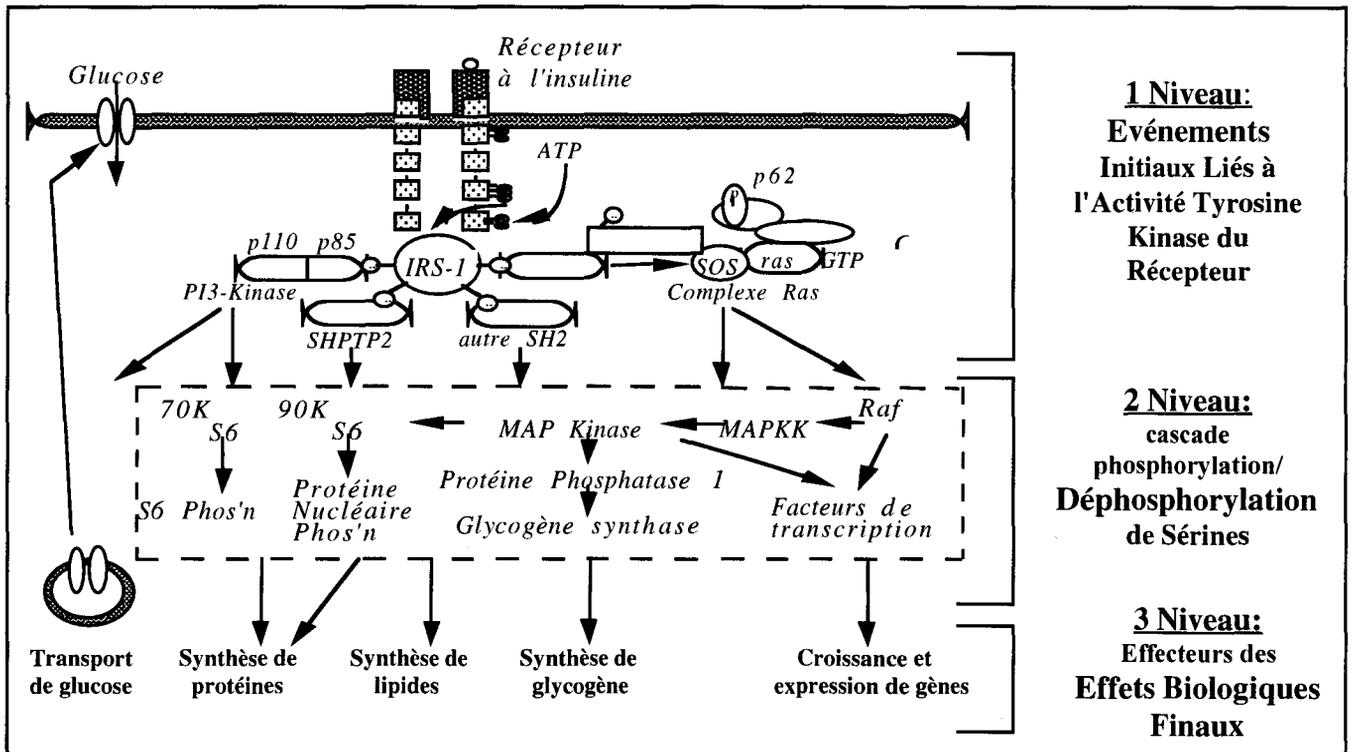


Figure 2 : Mécanismes d'action de l'insuline (Kahn CR, Diabetes, 1994)

3. Physiopathologie du diabète de type 2.

Il est désormais reconnu que l'hyperglycémie des sujets diabétiques est la conséquence de l'association de deux anomalies interdépendantes:

A- Une diminution de la sensibilité des tissus périphériques (muscle, tissu adipeux, foie) aux effets de l'insuline (insulino-résistance). Dans la période postabsorptive, la production hépatique de glucose est normale ou augmentée chez les diabétiques, malgré la présence d'une hyperinsulinémie à jeûn, tandis que l'utilisation du glucose par les tissus périphériques est diminuée. En réponse à la sécrétion endogène ou à l'administration exogène d'insuline, la

production hépatique de glucose n'est pas supprimée normalement et la captation de glucose par le muscle est diminuée. C'est essentiellement une augmentation de la néoglucogénèse qui est à l'origine de l'augmentation de la production hépatique de glucose. Dans le muscle, les deux voies métaboliques intracellulaires du glucose sont altérées, synthèse de glycogène et oxydation du glucose (DeFronzo et al, 1992). La résistance cellulaire à l'action de l'insuline peut être due à de nombreux mécanismes et peut se situer schématiquement aux trois différents niveaux d'action de l'insuline. Elle peut intéresser l'étape des événements initiaux liés à l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline, l'étape intermédiaire de la cascade de phosphorylation/déphosphorylation centrée autour de la MAP kinase ou l'étape des effecteurs des effets biologiques finaux (Figure 2) (Kahn et al, 1994).

B- Une anomalie de la réponse insulinosécrétoire au glucose qui comprend:

a) des anomalies de la pulsatilité de l'insulinosécrétion avec disparition des oscillations rapides et une réduction des oscillations lentes. La disparition de la pulsatilité de l'insulinosécrétion est responsable d'une moindre efficacité de l'insuline (Polonsky et al, 1988);

b) des anomalies de la cinétique de l'insulinosécrétion caractérisée par l'abolition ou la diminution marquée du pic insulinique précoce au cours d'une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale ou après administration intraveineuse de glucose, et par l'augmentation progressive, retardée et inappropriée de l'insulinémie;

c) des anomalies quantitatives de l'insulinosécrétion. L'insulinémie des sujets DNID peut être basse mais sans jamais d'insulinopénie absolue. Elle peut également être normale ou franchement élevée, notamment chez l'obèse diabétique, mais il existe toujours une insulinopénie relative.

d) des anomalies qualitatives de l'insulinosécrétion qui consistent en une libération en excès de pro-hormones: pro-insuline intacte, pro-insuline clivée en 32-33. Le pourcentage de

molécules-précurseurs peut représenter 50% du total chez les patients DNID (Davies et al, 1993).

Les îlots de Langerhans des patients DNID sont en quantité suffisante pour théoriquement assurer une sécrétion normale (60 à 80% du nombre d'îlots des sujets normaux). Anatomiquement, ces îlots contiennent des dépôts de glycogène et de substance amyloïde fibrillaire dans laquelle un peptide de 37 acides aminés (islet amyloid polypeptide-IAPP ou amyline), cosécrété en même temps que l'insuline a été identifié. Ce polypeptide, quoique plus abondant chez les diabétiques, est présent aussi dans les îlots de sujets non diabétiques et le rôle qu'il peut jouer dans la pathogénie du DNID n'est toujours pas clair (Clark et al, 1987). En fait, cette anomalie insulino-sécrétoire semble surtout correspondre à un défaut de reconnaissance du glucose par les cellules bêta-pancréatiques, qui serait primitive mais peut être secondaire à l'hyperglycémie elle-même (on parle alors de gluco-toxicité). La réponse insulino-sécrétoire aux autres sécrétagogues (arginine et isoprotérénol) est, en présence d'une hyperglycémie, longtemps préservée en valeur absolue.

S'il est clair que les deux déficits - de la sécrétion et de l'action de l'insuline - sont nécessaires au développement d'une hyperglycémie chronique franche, il est difficile de reconnaître lequel de ces deux déficits est apparu le premier dans l'histoire naturelle de la maladie. Les études métaboliques de sujets non diabétiques, mais à haut risque de le devenir, ont montré des résultats discordants: certaines études montrent un déficit primaire de l'insulinosécrétion (O'Rahilly et al, 1986; Pimenta et al, 1992), d'autres montrent l'existence d'une insulino-résistance avant l'apparition du diabète (Martin et al, 1992; Schalin-Jäntti et al, 1992; Lillioja et al, 1993). Cependant, quelque soit l'anomalie qui initie les perturbations du métabolisme glucidique, celle-ci sera suivie finalement par l'apparition de l'autre déficit (Figure 3).

Le diabète de type 2 est à donc à la fois une maladie du pancréas endocrine et des principaux

organes cibles de l'insuline, le foie, le muscle et le tissu adipeux (DeFronzo et al, 1988; DeFronzo et al, 1992).

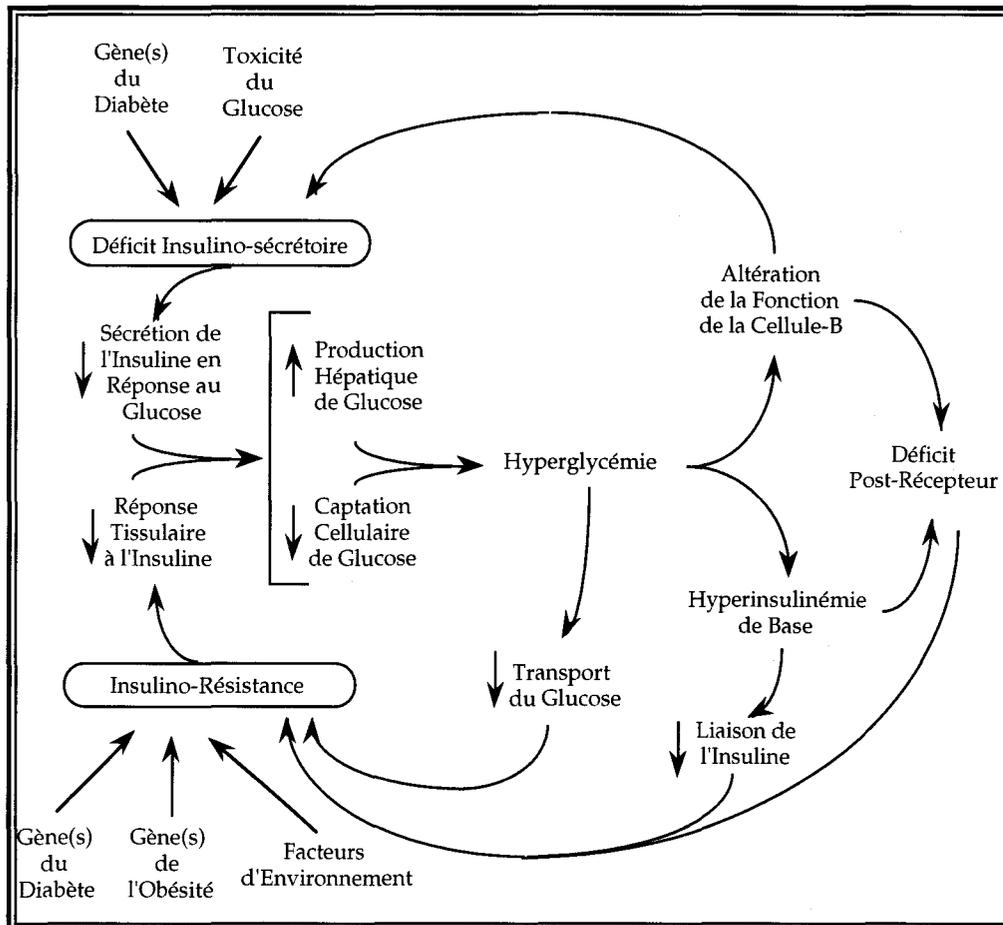


Figure 3. Pathogénèse du diabète de type 2.

Il est maintenant admis que l'hyperglycémie chronique joue un rôle délétère dans l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. Chez l'homme, la phase précoce de la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose disparaît dès que la glycémie des diabétiques de type 2 devient supérieure à 120 mg/dl. Elle est restaurée lorsque leur glycémie est normalisée par un contrôle métabolique strict (Leahy et al, 1996). Ces effets toxiques ont également été reproduits dans différents modèles *in vivo* de diabète. L'hyperglycémie affecte les cellules β -pancréatiques et

leurs capacités insulino-sécrétrices en réponse au glucose. L'hyperglycémie représente donc à la fois le résultat et l'un des phénomènes qui accentuent les troubles de l'insulino-sécrétion et de la sensibilité à l'insuline. C'est un phénomène auto-aggravant ou auto-perpétuant (figure 3). Pour rompre le cercle vicieux que représente la gluco-toxicité, des régimes profondément hypocaloriques parfois proches d'une diète hyperprotidique (sous surveillance rigoureuse), ou une insulinothérapie intensive transitoire à la pompe sont parfois proposés par le diabétologue.

4. La composante génétique.

Des formes communes de diabète de type 2 groupe de pathologies hétérogènes correspondent à des formes polygéniques et multifactorielles de la maladie. En effet, on peut considérer que celles-ci sont la résultante de l'expression de plusieurs anomalies génétiques sous l'influence de facteurs environnementaux. Les différentes formes de diabète de type 2 peuvent être schématiquement représentées avec, à une extrémité, des formes où les facteurs génétiques sont prédominants (telles que les formes monogéniques de diabète de type 2) et, à l'opposé, des formes fortement liées aux facteurs environnementaux.

Il est généralement admis que le diabète de type 2 est une maladie métabolique à fort caractère héréditaire. L'existence de regroupements familiaux, et surtout le taux élevé de concordance (50 à 80%) pour le diabète de type 2 rencontré chez les jumeaux monozygotes, contrairement à celui des jumeaux dizygotes (2 à 10%), appuie en faveur de l'importance du rôle de l'hérédité dans le diabète (Barnett et al, 1981; Newman et al, 1987). D'autres observations comme l'effet de "mélange ethnique" (« population admixture ») sont en faveur d'une base génétique du diabète de type 2. Pour exemple, on a pu remarquer que chez la population originaire de Nauru (Nauréens de souche), la prévalence du diabète de type 2 après

l'âge de 60 ans est de 83%, alors que chez les migrants (habitants allochtones de Nauru, originaires d'autres ethnies), cette prévalence n'est que de 17% . Sachant que ces deux population vivent en commun dans le même environnement, seul le patrimoine génétique divergent entre les deux populations peut expliquer cette différence. Cette observation privilégie ainsi une part importante des gènes pour expliquer la variabilité de la tolérance au glucose.

D'autres arguments prouvent également que la variabilité de la tolérance au glucose est contrôlée génétiquement. A cet égard, il existe une entité particulière de diabète de type 2 survenant chez le sujet jeune (Maturity Onset Diabetes of the Young ou MODY) à caractère monogénique autosomal dominant (Tattersall et al, 1975), où des mutations d'au moins cinq gènes différents sont responsables de l'hyperglycémie familiale (Revue générale, voir Froguel P, 1997).

Certaines souches animales développant spontanément le diabète de type 2, présentent divers aspects physiologiques et métaboliques communs au diabète de type 2 chez l'humain. Chez ces souches animales, le diabète se transmet génétiquement. Ainsi, le modèle GK ("Goto-Kakisaki") obtenu par sélections et croisements successifs de rats les plus intolérants au sein de la souche Wistar, présente un diabète des plus proches à celui humain, dont la composante héréditaire a été récemment disséquée grâce à des études systématiques du génome. Ces études ont permis la localisation de plusieurs loci contrôlant le développement de l'hyperglycémie ou de traits phénotypiques associés à la tolérance au glucose (Galli et al, 1995; Gauguier D et al, 1995).

5. La génétique inverse: la stratégie de recherche de gènes morbides.

La stratégie de la génétique inverse grâce aux progrès récents des techniques de génétique moléculaire et des cartes du génome humain a rendu possible l'étude des déterminants

génétiqes. L'approche dite "au hasard" (« random approach »), complémentaire à l'étude des gènes et régions candidates, consiste à explorer de façon systématique le génome de familles de diabétiques de type 2 à l'aide de marqueurs polymorphes anonymes, régulièrement répartis sur le génome et dont la localisation chromosomique exacte est connue. Les loci reconnus par ces polymorphismes pourraient être situés à proximité d'un gène inconnu associé au DNID, et par un déséquilibre de liaison dû à cette proximité, leur servir de marqueur (Feingold et al, 1991). La liste des maladies monogéniques et/ou hétérogènes localisées grâce à cette approche s'allonge d'années en années: la chorée de Huntington (Gusella et al, 1983), la mucoviscidose (Wainwright et al, 1985), la polypose familiale (Bodmer et al, 1987), le cancer du sein (Hall et al, 1990), la myopathie des ceintures (Beckmann et al, 1991), la néphronophthise (Antignac et al, 1993), le syndrome CADASIL (Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukœncephalopathy) (Tournier-Lasserre et al, 1993).

6. L'approche « gènes candidats »:

A côté de l'approche au hasard, des approches plus ciblées peuvent être entreprises dans la recherche des déterminants génétiques d'une maladie, et qui permettent parfois de « court-circuiter » l'ensemble des étapes d'un clonage positionnel classique. La plus communément utilisée est celle des gènes dits "candidats". En se basant sur des données pertinentes des études biochimiques, physiologiques, et métaboliques, on peut à priori définir des voies biologiques susceptibles d'être potentiellement défectueuses dans une pathologie donnée. Au sein de ces voies biologiques, certaines protéines jouent des rôles clés, leurs gènes correspondant sont alors qualifiés de "gènes candidats". Par exemple, dans les syndromes monogéniques humains associés à des malformations de l'oreille, les gènes contrôlant les étapes du développement embryonnaire de l'oreille et sa maturation sont les candidats

potentiels à un défaut héréditaire de ce type.

L'approche "gène candidat" ne peut être conduite que lorsque le gène en question est cloné, cartographié sur le génome humain et qu'un polymorphisme est caractérisé dans/ou à proximité du gène (généralement moins de 1 mégabase). Pour d'autres gènes, on ne connaît que la localisation physique par les techniques d'hybridation par marquage fluorescent (FISH), ou alors la localisation du gène n'est que déduite par homologie aux cartes génétiques d'autres espèces. L'évaluation de liaison génétique de ce type de gène avec les maladies héréditaires est rendue possible grâce aux cartes intégrées, cartes chromosomiques faisant la correspondance entre la carte physique des gènes et la carte des marqueurs microsatellites anonymes. On parle alors de l'approche dite "régions candidate au hasard" (ou random candidate gene approach), les marqueurs explorés étant des polymorphismes anonymes. L'approche gène candidat qui permet de tester un gène unique, tout en se basant sur une hypothèse de départ, présente aussi bien des avantages que des inconvénients. Son caractère ciblé peut être fructueux dans le cas des maladies où une voie biologique est privilégiée dans l'étiologie. Le gène de l'angiotensinogène en est l'illustration. Codant pour le précurseur de l'angiotensine, polypeptide à rôle clé dans la régulation de la tension artérielle, la voie gouvernée par le produit de ce gène a été privilégiée dès le départ comme candidate à un défaut dans l'hypertension artérielle humaine. L'approche gène candidat de ce gène a permis de l'incriminer dans le développement de cette maladie (Jeunemaître X et al, 1991). Étant donné la proximité génétique du marqueur étudié au gène candidat, s'il ne s'agit pas d'un marqueur intragénique, on peut clairement détecter une liaison génétique ou l'exclure. De plus, l'approche gène candidat peut être conduite en étude familiale (méthode des sib-pair) et/ou par étude d'association, à l'inverse de l'approche systématique du génome qui est aujourd'hui impossible d'entreprendre en étude d'association. En outre, on peut même détecter des effets géniques non majeurs dans une pathologie avec l'approche gène candidat, en

utilisant les études d'association, ce qui n'est pas à la portée de l'approche systématique du génome. Cependant, l'approche "gène candidat" a également ses limites. On ne peut l'appliquer que sur les gènes connus, à condition qu'il soit cloné avec un polymorphisme caractérisé dans ou près du gène. Compte tenu qu'actuellement, 20% de la totalité des gènes humains est cloné, on comprend clairement les limites de la portée que peut avoir cette approche dans les maladies multifactorielles. Par ailleurs, avec des études familiales, l'approche gène candidat ne permet d'évaluer que le rôle d'une région relativement restreinte du génome. De plus, l'approche gène candidat devient plus difficile à mesure où la physiopathologie de la maladie étudiée devient complexe, et implique un réseau très complexe protéines en interaction.

Ainsi, l'exploration des ces gènes candidats peut s'effectuer par des études familiales du type « sib-pairs », sur un grand nombre de paires de germains affectés, à l'aide d'un microsatellite caractérisé au locus du gène en question. Mais il est aussi possible de cribler d'emblée les régions codantes et régulatrices d'un "gène candidat" afin de rechercher des mutations délétères, dans un groupe de patients diabétiques non apparentés. Ceci entre dans le cadre d'un criblage moléculaire direct de certains gènes rendus "candidats" par l'analyse des données génétiques, biochimiques ou physiologiques disponibles. Plusieurs techniques de criblage moléculaire direct telles que le séquençage direct d'ADN, les techniques de criblage basées sur la conformation d'ADN criblé (SSCP ou DGGE), ou les techniques de détection des hétéroduplexes d'ADN se prêtent à cette approche, qui peut s'avérer très fructueuse. En effet, dans le diabète de type 2 à début tardif, le rôle du glucagon dans l'homéostasie glucidique a stimulé le criblage du récepteur au glucagon; son étude moléculaire directe a permis d'identifier une mutation génique associée au diabète dans 5% des formes communes DNID (Hager J et al, 1995). L'utilisation de cette approche directe n'empêche pas d'effectuer à posteriori des études familiales dans la recherche d'une co-ségrégation, non avec des

polymorphismes anonymes, mais avec le variant génique lui même (exemple du gène du récepteur au glucagon), afin de valider sa liaison avec la maladie.

En complément, l'apport des études des modèles animaux peut également contribuer à une démarche de génétique inverse dans les maladies humaines. Chez des modèles animaux des maladies humaines, on peut relativement plus facilement localiser les gènes de susceptibilité. Les régions chromosomiques synténiques aux régions de liaison génétique chez l'animal, peuvent être étudiées et intégrées à la recherche des déterminants de la maladie en question chez l'homme. On peut ainsi les qualifier de "régions candidates". C'est ce qu'on désigne par le terme de "cartographie comparative". Divers animaux de laboratoire reproduisant des maladies humaines peuvent se prêter à cette approche d'autant plus que des cartes de synténie génétique commencent à être progressivement établies pour plusieurs espèces en comparaison au génome humain. Cependant, l'héritage génétique relativement homogène de ces modèles animaux, produits par plusieurs croisements sélectifs, peut ne pas être extrapolé facilement aux populations humaines, extrêmement hétérogènes génétiquement.

_IV. Le diabète de type MODY: Une forme monogénique du diabète de type 2.

Une forme de diabète de type 2 à progression lente, souvent asymptomatique, se développant chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune a été décrite au début des années soixante par Fajans et ses collaborateurs (Fajans SS et al, 1990). Cette forme de diabète, appelée Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) ou diabète non insulino-dépendant du sujet jeune, est la forme monogénique du diabète de type 2 la plus fréquente (Froguel et al, 1993). Ce diabète à début précoce se définit sur trois critères:

a-Le diabète débute en général avant l'âge de 25 ans.

b-II se définit dans une famille comprenant au moins 3 générations de diabète, ayant si possible des cousins montrant le même phénotype de diabète précoce.

c-Le mode de transmission est autosomique dominant à forte pénétrance (>90%) (Tattersall

RB et al, 1975).

Bien que la sensibilité à l'insuline chez ces patients semble normale, le phénotype est principalement caractérisé par un défaut primaire dans la sécrétion à l'insuline et une hyperglycémie chronique non auto-immune qui, dans les formes les plus sévères, s'aggrave avec le temps et entraîne l'apparition de complications dégénératives tout comme le diabète de type 2 à début plus tardif. A la fin des années 80, plusieurs groupes avaient décidé de rechercher les mutations des gènes du MODY, qu'ils considéraient comme un paradigme possible du diabète commun. En d'autres termes, l'abord génétique du MODY, plus facile que celui du diabète de type 2 commun, permettait de mettre en évidence des protéines ayant un rôle majeur dans l'homéostasie glucidique. En fait, il est maintenant établi que le MODY, tel qu'il a été décrit à l'origine, n'est pas une maladie unique, mais regroupe plusieurs entités pathologiques d'étiologies différentes bien que cliniquement assez proches. Dans cette forme monogénique, la mutation d'un seul gène est suffisante pour entraîner une hyperglycémie. Les facteurs environnementaux interviennent alors pour en moduler l'expression clinique. A ce jour, cinq formes du MODY ont été déterminées suite à l'identification de mutations localisées dans cinq gènes différents et il est possible que d'autres gènes du MODY restent à identifier.

1. MODY1.

C'est dans les extraits nucléaires de foie qu'a été identifiée une protéine, capable d'interagir dans les éléments régulateurs en cis du gène de la transthyrétine. Cette protéine définissait ainsi une nouvelle famille de facteurs de transcription hépatiques, dont elle devenait le premier membre : HNF4 α . L'ADNc cloné et la purification de la protéine classaient la famille HNF4 parmi les récepteurs nucléaires orphelins, qui se composent d'un domaine de fixation à l'ADN en doigt à zinc et d'un domaine de dimérisation avec d'autres récepteurs hormonaux.

La partie carboxy-terminale, riche en résidus proline, constituait le domaine potentiel d'activation.

La famille américaine RW comprenant 360 membres connus était constituée de 72 membres affectés distribués sur 5 générations suivies depuis 1958 (Fajans SS et al, 1990). Ces membres présentaient des degrés variés d'hyperglycémie. Des études de liaison effectuées dans cette famille avaient alors mis en évidence un gène de susceptibilité putatif localisé dans une région du chromosome en 20q (Bell GI et al, 1991). Dans la plupart des branches de cette famille, le diabète co-ségrégeait avec des polymorphismes localisés à proximité du gène de l'adénosine déaminase. Des études identifiaient par la suite une mutation non-sens Q268X (CAG/TAG) dans le gène codant le facteur HNF4 α qui co-ségrégeait avec le phénotype du MODY dans cette famille (Yamagata et al, 1996). Ces travaux devaient ainsi aboutir sur l'identification d'une forme exceptionnelle du MODY: Le MODY de type1 (MODY1). Cependant, même si parmi les sujets porteurs de la mutation, certains ne développaient pas encore le diabète. Ces individus présentaient des troubles de l'insulino-sécrétion en réponse à une infusion prolongée de glucose et une réduction de l'amplitude des oscillations d'insulino-sécrétion, comparés aux individus non diabétiques et non porteurs de la mutation. Une seconde mutation non-sens R154X, une substitution C/T dans le codon 154 était identifiée dans une autre famille composée sur 3 générations par Lindler et ses collaborateurs. Des études cliniques montraient pour 6 membres affectés dans cette famille, un diabète sévère nécessitant un traitement par l'insuline ou des agents hypoglycémisants. Le fait qu'aucune anomalie hépatique ou rénale (Lindler et al, 1997) n'était détectée, suggérait que seul persistait un défaut de la fonction β -pancréatique. Dans une famille japonaise de diabète précoce, 3 individus sur 5 étaient porteurs d'une nouvelle mutation R127X, localisée dans une région importante pour la dimérisation et la fixation à l'ADN (Furuta et al, 1997).

2. MODY2.

La glucokinase est un enzyme clé de contrôle et d'intégration du métabolisme du glucose. Il a été défini comme le « sensor » pancréatique du glucose (Matchinsky et al, 1990). A cause de sa fonction, il était spéculé qu'une putative mutation dans le gène, en réduisant son activité enzymatique, pouvait affaiblir la capacité d'insulino-sécrétion des cellules β . Permutt et ses collaborateurs clonèrent le gène humain et définirent deux marqueurs polymorphes « CA repeat » en tandem à proximité du gène (Tanizawa et al, 1992; Tanizawa et al, 1993). En utilisant ces marqueurs, plusieurs résultats révélèrent une liaison avec des familles MODY dans diverses populations (Froguel et al, 1992). Le séquençage du gène confirmait la présence de mutations (Froguel et al, 1993). Plus de cinquante mutations différentes ont jusqu'à ce jour été répertoriées pour la plupart disséminées dans les exons 5, 6, 7 et 8, qui codent le site de fixation du glucose substrat de l'enzyme. Les études fonctionnelles des mutations montrèrent une réduction du V_{max} et/ou une augmentation de l'affinité pour le glucose (Gidh-jain M et al, 1993).

3. MODY4.

Le facteur de transcription IPF-1 (insulin Promoter Factor-1), un des activateurs majeurs de l'expression du gène de l'insuline et de la somatostatine (Ohlsson et al, 1993; Miller et al, 1994) est primordial pour le développement du pancréas. L'invalidation de ce gène entraîne une agénésie pancréatique chez la souris transgénique (Jonson et al, 1994). Chez l'homme, le gène a été localisé par « fluorescence in situ hybridation » (FISH) sur le chromosome 13q12.1 (Fiedorek et al, 1995). Une délétion homozygote dans le codon 63 (Pro63fsdelC) a été identifiée dans le gène codant IPF1 chez une fillette qui développait une agénésie pancréatique et présentait des antécédents familiaux de diabète. Dans cette famille, le diabète suivait un mode de transmission de type autosomique dominant sur 6 générations, et un age

d'apparition du diabète en moyenne vers 35 ans. La mutation Pro63fsdelC à l'état hétérozygote co-ségrégait avec le diabète dans la famille. Les études génétiques de liaison excluant les loci MODY1, MODY2 et MODY3, les auteurs désignaient IPF-1 comme un nouveau gène de pré-disposition du MODY, MODY4 (Stoffers et al, 1997). L'expression du mutant dans les cellules COS-1, génère une protéine tronquée dans le domaine C-terminale (domaine de fixation à l'ADN) de 16 kD. L'utilisation d'anticorps spécifiques des domaines carboxy et amino-terminales révéla l'expression de deux protéines. L'une qui consistait uniquement du domaine amino-terminale était séquestrée dans le cytoplasme, l'autre ne disposait que du domaine carboxy-terminale et était dépourvue du domaine de transactivation. L'isoforme carboxy-terminale était incapable de transactiver et inhibait le potentiel de transactivation de la protéine sauvage IPF-1 (Stoffers et al, 1998).

4. MODY3 et MODY5.

Douze familles françaises de type MODY dont le diabète n'était génétiquement pas associé aux loci MODY2 et MODY1 avaient orienté les investigations vers l'identification d'un troisième locus MODY encore inconnu. Une recherche systématique du génome par l'approche au hasard avait donc été entreprise en utilisant au total 250 marqueurs polymorphes microsatellites. Les analyses génétiques devaient exclure 78% de la carte génétique jusqu'à ce qu'un marqueur D12S76 localisé sur le chromosome 12q montrait une liaison avec le phénotype MODY (Vaxillaire et al, 1995). L'homogénéité des échantillons testée, révélait 50% des familles associées à ce locus. La région de susceptibilité se confirmait aussi dans les familles de différentes populations (Fajans et al, 1995). Ce locus dévoilait par la suite des mutations identifiées dans le gène codant le facteur HNF1 α (Yamagata et al, 1996). De nombreuses mutations hétérozygotes ont été identifiées co-ségrégant avec le phénotype du diabète dans de nombreuses familles de populations

variées. Ces données suggéraient désormais que des anomalies fonctionnelles de la protéine pourraient être à l'origine du diabète. Quelques mutations hétérozygotes identifiées dans la région promotrice ont également été retrouvées. Une mutation localisée dans une séquence consensus de reconnaissance HNF4 dans le promoteur du gène HNF1 α a été décrite par Gragnoli et ses collaborateurs (Gragnoli et al, 1997). Cette mutation était associée avec le phénotype MODY dans une famille italienne. Une putative altération de l'activité au niveau de ce site, impliquant une réduction de l'expression du gène, serait suffisante pour induire le phénotype du MODY.

L'implication des facteurs HNF4 α et HNF1 α dans le MODY suggérait l'importance du circuit des HNFs dans la fonction normale des cellules β -pancréatiques. Ainsi, 57 patients japonais non appariés de type MODY, faisaient l'objet d'une recherche de mutations par séquençage direct dans les régions codantes du gène HNF1 β appartenant à la famille HNF1. Aucune variation génétique pour les gènes HNF1 α , HNF4 α et glucokinase n'avait été identifiée dans ces probands, suggérant l'existence d'un autre gène du MODY. Horikawa et ses collaborateurs identifièrent un individu portant une mutation nonsense dans le codon 177 (une substitution CAG/TAG) R177X, avec une transmission de diabète bilinéaire (Horikawa et al, 1997). Cette mutation n'était détectée dans aucuns des individus contrôles. Le gène HNF1 β est fortement exprimé dans le rein, dans lequel il aurait un rôle prépondérant (Lazzaro et al, 1992). Le fait que la famille du proband présente une néphropathie, présume d'un effet probable de l'expression du gène muté dans le dysfonctionnement rénal. Une étude fonctionnelle de la mutation, par transfection transitoire, consistait à utiliser un vecteur rapporteur comprenant un gène rapporteur luciférase dont l'expression est sous le contrôle du promoteur du gène de l'albumine. Ce promoteur est induit par l'expression d'HNF1 β . Dans les cellules HeLa, le potentiel transactivateur est réduit par rapport à celui de la forme sauvage (Horikawa et al, 1997). Ces résultats suggèrent qu'une perte d'activité HNF1 β pourrait être à

l'origine du MODY chez les individus porteurs de la mutation. C'est à ce jour, la seule famille décrite MODY de type 5.

V. Implication du facteur nucléaire hépatique HNF1 α dans l'homéostasie glucidique:

Description d'un gène majeur du diabète.

1. Portrait du gène HNF1 α

1.1. Le gène HNF1 α est un membre de la famille HNF1.

La famille HNF1 est constituée par deux membres connus jusqu'à ce jour, pour être les seuls capables de reconnaître la même séquence d'ADN spécifique cible HNF1 α : Il s'agit du gène HNF1 α appelé aussi APF, LFB1, HNF1 ou HP1 (Frain et al, 1989; Chouard et al, 1990; Baumhueter et al, 1990) et du gène HNF1 β également nommé HNF1 β , vAPF ou LFB3 identifié dans la lignée cellulaire dédifférenciée d'hépatome et dans la lignée de carcinome embryonnaire F9 après stimulation de la différenciation (Cereghini et al 1987, Cereghini et al 1988, Cereghini et al 1990). Le gène HNF1 α est localisé sur le chromosome humain en 12q24.3 et chez la souris en 5F (Bach et al 1990) alors que le gène HNF1 β est localisé sur le chromosome 17q11.2-q21.1 et 11 β 4-D chez la souris (Bach et al 1991).

La structure génomique d'HNF1 α et d'HNF1 β a été déterminé chez les rongeurs, l'homme (Bach et al 1992, Bach et al 1993) et chez le xénope (Zapp et al 1993). L'organisation exon-intron pour ces deux gènes est fortement conservée entre ces tétrapodes. Ces deux gènes codent des ARN pré-messagers aboutissant à la formation de trois isoformes (dont un majeur et deux mineurs) (Rey-Campos et al 1991, Bach et al 1993). Toutes les protéines isoformes découlant des gènes HNF1 α et HNF1 β interagissent *in vitro* entre elles sans spécificité apparente, pour former soit des complexes homo-dimères ou hétéro-dimères. Ces observations effectuées *in vitro* (De Simone et al 1991, Mendel et al 1991), *ex vivo* (Mendel et

al 1991, Denecke et al 1993) ou *in vivo* (Rey Campos et al 1991; Blumenfeld et al, 1991) montrent ainsi une distribution des formes homo ou hétéro-dimères reflétant la stœchiométrie des différents isoformes. Les gènes HNF1 α et HNF1 β peuvent ainsi coder 21 facteurs de transcription variant sur la nature du complexe formé, tous capables de se fixer sur la même séquence cible.

Les profils d'expression d'HNF1 α et d'HNF1 β ont été bien caractérisés chez les rongeurs, le xénope (Burtkowski et al 1993) et le saumon (Deryckere et al 1995). Les deux gènes sont exprimés à des périodes précoces au cours du développement, et l'expression d'HNF1 β précède toujours celle d'HNF1 α . Chez la souris, l'ARN messager HNF1 β est détectable dans l'endoderme viscéral à partir du jour 6.5 (post coïtum) alors que l'activité de fixation à l'ADN ne peut être détectée à des niveaux constants dans ce même tissu à partir du jour 9, elle décroît ensuite jusque la naissance (Ott et al, 1991; Cereghini et al 1992). L'ARNm HNF1 α n'est détectable que plus tard, au jour 8.5, et son expression augmente jusque la naissance (Blumenfeld et al, 1991; Ott et al 1991). Le gène HNF1 α est exprimé dans l'intestin primitif, le foie et le rein embryonnaire. L'ARNm HNF1 α apparaît au jour 10 dans le bourgeon précurseur du foie. Les deux gènes sont exprimés dans le foie adulte et embryonnaire. Au jour 10.5, HNF1 β est exprimé dans le métanéphros de la souris alors qu' HNF1 α n'est détectable que le jour suivant (Blumenfeld et al, 1991; Ott et al, 1991). A la période adulte, le foie est l'organe où l'expression d'HNF1 est la plus forte. Il a été estimé 22.000 molécules HNF1 α présentes par noyaux diploïdes dans le foie de rat alors que la molécule HNF1 β bien que présente est en quantité 10 à 20 fois moins importante qu'HNF1 α . Dans le rein, même si les niveaux d'expression HNF1 α et HNF1 β sont similaires, on retrouve l'expression d'HNF1 β dans un plus large spectre de types cellulaires constituant cet organe (Lazzaro et al 1992). Concernant les autres organes, le pancréas (De Simone et al 1991), le thymus (Rengeisen et al 1993), la rate (Deryckere et al 1995), l'épithélium utérin (Cereghini et al 1992) et l'oviducte

de poulet expriment faiblement HNF1 α et HNF1 β . Dans le poumon, l'expression d'HNF1 α n'est pas détectable (alors que l'expression HNF1 β est détectée) (Mendel et al 1991). Dans l'œsophage (De Simone et al 1991), la glande thyroïde (Frain et al 1989), et l'ovaire (Lazzaro et al 1992), seule l'expression d'HNF1 α est détectée. Dans la plupart des tissus, sauf dans le rein, les isoformes HNF1 α -C et HNF1 β -C ne représentent qu'une petite quantité des formes totales HNF1 α et HNF1 β (Bach et al 1993). L' isoforme HNF1 α -B est 3 à 20 fois moins exprimé que l' isoforme HNF1 α -C, alors que le ratio HNF1 α -A sur HNF1 α -B ne varie presque pas (Ringeisen et al 1993).

1.2. Plusieurs isoformes résultent de l'épissage alternatif d'un seul transcrit.

Une sonde dérivée du messenger codant HNF1 α a permis d'isoler les ADNc de messagers hnf1 ayant subi des épissages variables et codant des polypeptides différents (Rey-Campos et al, 1991; Bach et al, 1993). Trois formes d'HNF1 α ont ainsi été identifiées : HNF1A, HNF1B et HNF1C. Chez le rat et la souris, le gène est constitué de neuf exons séparés par huit introns, tous compris dans la phase ouverte de lecture (Bach et al, 1992; Bach et al, 1993). La forme HNF1A est la forme majoritairement exprimée par rapport aux isoformes courtes HNF1B et HNF1C (Ringeisen et al, 1993; Cereghini et al, 1992). Cependant, dans le rein fœtal et adulte, le taux de transcrit codant HNF1C représente 86-87% de celui codant HNF1A (Bach et al, 1993).

1.3. Cartographie de la protéine HNF1A.

C'est sans doute parce que les premiers ADNc codant HNF1 ont été clonés chez le rat (Frain et al, 1989), que la cartographie fonctionnelle de la protéine a été principalement menée sur le facteur HNF1 de cet animal. Conformément aux prédictions statistiques faites sur la seule

base de la séquence codante du facteur, plusieurs résultats expérimentaux confirment que les régions amino et carboxy-terminales constituent des domaines protéiques structurés.

1. 3. 1. Le domaine amino- terminal.

La protéine HNF1A complètement traduite *in vitro* ou extraite s'avère instable et l'ensemble de la région carboxy-terminale est rapidement dégradé à température ambiante (Frain et al, 1989). En revanche, la partie amino-terminale seule, obtenue à partir d'extraits de bactéries recombinantes, de lysats de réticulocytes ou de tissus, est stable à trente degrés Celcius. Une des singularités d' HNF1A réside dans sa mobilité électrophorétique anormalement réduite en gel dénaturant (Frain et al 1989). Ce comportement également visible pour la protéine recombinante ou traduite *in vitro* ne saurait se justifier par l'importante O-glycosylation dont HNF1 fait l'objet (Lazaro et al, 1989). Des mutants progressivement tronqués dans leur partie carboxy-terminale traduits *in vitro* conservent cette singularité (Frain et al, 1989). Il semble que cette mobilité réduite en conditions dénaturantes résulte de la persistance de structures coudées (impliquant probablement des prolines) dans le domaine amino-terminal, et plus particulièrement, dans les deux cents premiers acides aminés du facteur (Frain et al, 1989). La région amino-terminale d'HNF1A est donc un domaine structuré et stable.

Ce domaine amino-terminal (284 acides aminés) comprenant le domaine de fixation à l'ADN, peut seul ou fusionné à d'autres polypeptides, se fixer aussi bien que la protéine sauvage sur la séquence cible spécifique. La délétion des extrémités amino ou carboxy-terminales de ce domaine aboutit à la perte de la fonction (Nicosia et al 1990). Ce fragment constitue le plus petit fragment d'HNF1A qui est à la fois nécessaire et suffisant pour la fixation spécifique à l'ADN. la structure des différentes parties de ce domaine a été étudiée. Ce domaine amino-terminal d'HNF1 non seulement dimérise en solution (Tomei et al 1992) mais peut également former des hétéro-dimères avec la protéine entière HNF1A (Nicosia et al 1992). Le segment comprenant les 31 premiers résidus acides aminés est strictement nécessaire pour la

dimérisation d'HNF1A (Chouard T et al, 1990). Ce petit fragment, seul, peut former des homo-dimères, ou des hétéro-dimères avec la protéine entière HNF1A.

1. 3. 2. Le domaine de fixation à l'ADN.

Comme la protéine complète, le domaine amino-terminal produit isolément *in vitro* (Tomei et al 1992), ou *ex vivo* (Nicosia et al, 1990), est capable de se fixer sur la séquence cible reconnue par HNF1 α . Les troncatures carboxy-terminales conservant les deux cent quatre vingt un premiers résidus d'acides aminés ont cette même propriété (Frain et al, 1989). En outre, si un segment provenant d'une protéine étrangère est fusionné au domaine amino-terminal, la protéine chimérique reconnaît le site sur l'ADN toujours de la même façon (Denecke et al, 1993). Enfin si ce domaine, isolé ou inclus dans HNF1, est altéré dans une de ses extrémités, il perd son affinité de fixation à l'ADN (Nicosia et al, 1990). Ce domaine amino-terminal est donc le domaine nécessaire à la fixation à l'ADN.

En plus de pouvoir former des complexes hétéro-dimères avec la protéine complète, ce domaine isolé est aussi capable de former des homo-dimères en solution (Nicosia et al, 1992). Ce domaine suffit aussi à l'hétéro-dimérisation avec d'autres membres de la famille HNF1 (Nicosia et al, 1990; Chouard et al, 1990) provenant d'espèces distantes (Denecke et al, 1993), comme entre les HNF1 α du rat et du xénope.

La dissection des domaines fonctionnels d'HNF1A, par mutagenèse, a permis de localiser les 281 premiers résidus d'acides aminés qui constituent le domaine de fixation à l'ADN (Chouard et al, 1990). Ce domaine dispose de trois régions ou segments indispensables contiguës, appelés segments A, B et C (Nicosia et al, 1990). Le segment B (résidus 100 à 184 acides aminés) et le segment C (résidus 198 à 281 acides aminés) présentent respectivement des homologies avec la boîte POU-A et l'homéodomaine POU des protéines POU (Herr et al, 1988). Le segment C traduit isolément dans *E.coli* et purifié, est une molécule monomérique

en solution (Tomei et al, 1992). Ce polypeptide est capable de se fixer à un oligonucléotide contenant un demi-palindrome reconnu par HNF1 α , une répétition en tandem de ce demi-site, ou encore une répétition inversée séparée par un nucléotide (configuration retrouvée dans le site sauvage). Toutefois, il semble que la fixation de ce segment isolé ne se produise pas sur les mêmes bases que celle observée avec le domaine amino-terminal complet. L'empreinte à la Dnase I laissée par C est aussi large que celle observée avec le domaine amino-terminal, mais est décalée du site. Dans tous les cas, la fixation d'un second monomère de C à l'oligonucléotide se fait indépendamment du premier, sans aucune coopérativité de fixation visible (Tomei et al, 1992). La constante de dissociation du segment C avec le site sur l'ADN, difficilement mesurée, est estimée très largement à environ deux nanomoles par litres (Tomei et al, 1992). cependant, l'affinité de ce polypeptide pour un fragment d'ADN sans aucun site ou demi site spécifiquement reconnu par HNF1 ne serait que dix fois inférieur. La constante de dissociation pour l'ADN " non spécifique " (l'oligonucléotide utilisé pour cette mesure ne contient aucune occurrence du motif " TAAT ") est alors estimé à vingt nanomoles par litre (Tomei et al, 1992). ce segment a donc une affinité importante pour l'ADN, mais peu spécifique du site que reconnaît HNF1. En résumé, ce segment C se fixe de façon à l'ADN non spécifique et non coopérative.

Cependant la formation d'un polypeptide de fusion « BC » comprenant les segments B et C réduit l'affinité pour les séquences d'ADN non spécifique. La constante de dissociation est alors supérieure à 100 nanomoles par litres. La fixation de ce polypeptide « BC » sur un oligonucléotide comprenant deux demi-sites reconnus par le segment C placés en tandem, ou un seul de ces demi-sites, se fait aussi peu d'affinité (Tomei et al, 1992). Le segment B restreint considérablement l'affinité du segment C pour l'ADN " non spécifique ", et l'augmente légèrement pour le site reconnu par HNF1 (la spécificité atteint alors un facteur cinq cents). En outre, B oriente l'interaction, en privilégiant le site palindromique sur lequel la

fixation devient coopérative, au détriment de la répétition en tandem de demi sites qui n'est plus reconnue spécifiquement.

Le segment A recouvrant les résidus d'acides aminés 1 à 32, en formant une structure en hélice alpha, est nécessaire et suffisant pour favoriser la dimérisation des protéines en solution. Lorsque ce segment est supprimé, le domaine amino-terminal perd toute aptitude à former des dimères, et son affinité pour le site de reconnaissance. Un peptide de synthèse composé uniquement du segment A est non seulement capable de former des homo-dimères en solution (De Francesco et al 1991) mais aussi capable de former de hétéro-dimères avec la protéine complète HNF1A.

Un polypeptide de fusion « AC » comprenant les segments A et C, forme des homodimères en solution (Tomei et al 1992) et se fixe sur l'ADN sous forme de dimère. L'affinité de « AC » pour un oligonucléotide comprenant le site reconnu par HNF1, ou une répétition en tandem du demi-site est la même que celle du segment C isolé. Le segment A ne semble donc pas modifier l'interaction de C avec l'ADN. L'important gain entropique apporté par A ne se traduirait pas par une affinité fortement accrue pour le site reconnu par HNF1-alpha. En outre, la constante de dissociation entre « AC » et un ADN « non spécifique » est d'environ cinquante nanomoles par litre. Ainsi l'action combinée des trois segments A, B et C fait que le domaine amino-terminal de HNF1:

a- forme des dimères en solution,

b- se fixe donc à l'ADN de façon coopérative,

c- a une forte affinité pour son site,

d- Le reconnaît très spécifiquement (cinq mille fois mieux).

1. 3. 2. 1. Le segment C est un homéodomaine atypique. _

La comparaison de la séquence du segment C, avec l'ensemble des séquences peptidiques connues, révèle une importante ressemblance entre cette partie d'HNF1 α et les homéodomains (Frain et al, 1989; Baumhueter et al, 1990). Toutefois plusieurs caractéristiques font de ce segment un membre atypique de cette classe de domaine de fixation à l'ADN. En effet, la deuxième hélice- α du motif est plus longue et une boucle séparant cette hélice de la troisième (i.e. de l'hélice de reconnaissance) remplace le court coude trouvé à cette jonction dans tous les autres membres de la classe. En outre, le neuvième résidu de l'hélice de reconnaissance est une alanine dans ce segment de HNF1, alors qu'à cette position on ne rencontre essentiellement que des glutamines et plus rarement les acides aminés cystéine (au sein des homéodomains de la famille POU), sérine, histidine ou lysine. Enfin, les résidus E⁵⁵ et A⁵⁷ sont singulièrement différents des résidus arginine et lysine systématiquement trouvées à ces positions (Chouard et al, 1990). La détermination de la structure tridimensionnelle de l'homéodomaine de HNF1 isolé accomplie par cristallisation et diffraction aux rayons X (Ceska et al, 1993), ou par résonance magnétique nucléaire (Leiting et al, 1993), a confirmé les observations faites à partir de la seule séquence du facteur.

Une série de délétions internes au segment C montre qu'il peut être rendu plus conforme aux autres homéodomains connus sans dommage pour la fixation à l'ADN. En effet, si la seconde hélice et la longue boucle qui la suit sont écourtées et ramenées aux dimensions trouvées dans les homéodomains classiques, HNF1 garde son aptitude à fixer spécifiquement son site (Nicosia et al, 1990). C'est donc bien par ce qui le rapproche structurellement des autres homéodomains que le segment C remplit sa fonction au sein du domaine amino-terminal.

1. 3. 2. 2. Le segment B/homéodomains POU: Homologies.

Les deux homéodomains du dimère d'HNF1 occupant le centre du palindrome, les contacts établis entre le facteur et les extrémités du site sont nécessairement dus à une autre portion du domaine amino-terminal. Sachant que la fusion « BC » établit ces mêmes contacts, ceux-ci résultent probablement d'une interaction directe entre le segment B de l'ADN. La disposition des homéodomains sur le site reconnu par HNF1 implique une torsion de l'ADN permettant l'inter-digitation des chaînes latérales des hélices en contact (Chouard et al, 1993). L'interaction directe du segment B avec l'ADN apporte sans le bras de levier nécessaire à ce coude. Ainsi le domaine amino-terminal d'HNF1 α dispose d'un homéodomaine, et d'un second segment interagissant spécifiquement avec le site reconnu. Cette situation rappelle celle, retrouvée dans les facteurs de la famille POU. En effet, ceux-ci reconnaissent leur site par le biais d'un homéodomaine, POU_{hd}, caractéristique de cette famille, et d'un second domaine POU, du type hélice-tour-hélice. Tous les homéodomains POU_{hd} ont une cystéine en position neuf de l'hélice de reconnaissance, là même où HNF1 α a une alanine atypique. En outre, tous les homéodomains ayant ce résidu sont dans la famille POU_{hd}. Enfin les homéodomains POU sont toujours rencontrés associés à un homéodomaine POU_{hd}, et réciproquement.

L'homologie fonctionnelle entre le segment B et les domaines POU, pour la fixation spécifique du facteur à son site, est donc frappante. Plusieurs tronçons dans B sont d'ailleurs probablement hélicaux. Ces hélices sont amphiphyles, et plutôt basiques sur une de leurs faces. Cette seule caractéristique, doublée des deux identités de résidus, conduit à une faible similarité entre l'extrémité carboxy-terminale de B et la première hélice, amino-terminale des domaines POU. La très faible similarité confirme que cette ressemblance ne résulte que de la propension de ces tronçons à former de telles hélices. On peut donc raisonnablement conclure

que la faible similitude de séquence observée entre le segment B et les domaines POU est fortuite, ou, au mieux, ne reflète qu'une propension à former une hélice α amphiphyle dont une face est basique. En revanche, l'homologie fonctionnelle entre domaines B et POU est aujourd'hui fortement consolidée (Tomei et al, 1992).

1. 3. 2. La partie carboxy-terminale:

La partie carboxy-terminale est nécessaire à l'activation transcriptionnelle *in vitro* et *ex vivo* (Lichsteiner et al, 1989; Lazzaro et al, 1992; Nicosia et al, 1990). Lorsqu'un domaine de fixation à l'ADN hétérologue est fusionné à la partie carboxy-terminale de l'ADN, le complexe chimérique est capable d'activité transcriptionnelle *in vitro* (Nicosia et al, 1990) et *ex vivo* (Raney et al, 1991). Des délétions progressives de cette partie conduit à une réduction graduelle de l'activité *in vitro* (Nicosia et al, 1990) et *ex vivo* (Raney et al, 1991). L'expression de ces mutants tronqués dans la partie carboxy-terminale révélait de courts segments péptidiques plus importants que d'autres pour l'activité (Raney et al, 1991). Lorsque ces mutants sont fusionnés au domaine de fixation à l'ADN d'HNF1 α , deux segments internes (S392-A547 et S548-Q628) sont partiellement suffisant pour induire une activité *ex vivo* (Raney et al, 1991). Ces portions activatrices définissaient respectivement des domaines riches en glutamine et en sérine/thréonine (Raney et al, 1991).

1.4. Le co-facteur de Dimerisation DCoH (Cofactor of Dimerisation of HNF1) : Partenaire de dimérisation du facteur HNF1 α .

La recherche de partenaires moléculaires d'HNF1 α dans un crible par double-hybride, a conduit à l'isolement du facteur DCoH (Dimerisation Cofactor of HNF1), protéine déjà décrite par ailleurs. En effet, deux voies totalement indépendantes ont déjà conduit au clonage du gène codant DCoH. Dans l'ordre chronologique, la première, a consisté à micro-séquencer

une protéine co-purifiée avec HNF1 α (Mendel et al, 1991) et à isoler le gène codant le polypeptide correspondant. L'autre visait à isoler le gène codant un enzyme du métabolisme de la tétrahydrobioptérine: La 4 α -hydroxy tétrahydrobioptérine déshydratase (Citron et al, 1992; Hauer et al, 1993). Cette même protéine porte apparemment les deux fonctions: Fixation spécifique de HNF1 et activité enzymatique.

Les territoires d'expression de DCoH incluent ceux d'HNF1. Chez le rat, on retrouve DCoH en grande quantité dans le foie et le rein, dans une moindre mesure dans l'estomac et l'intestin (Mendel et al, 1991).

La co-purification de DCoH et HNF1, à partir des extraits de foie de rat (Mendel et al, 1991) a permis de déterminer la stœchiométrie du complexe. Il s'agit d'un hétéro-tétramère, incluant un dimère HNF1 et deux molécules de DCoH. Les dimères formés entre membres de la famille HNF1 sont capables d'échanger des monomères d'un dimère à l'autre. Les homodimères d'HNF1 α et HNF1 β mis dans la même solution, sont capables d'échanger leurs monomères respectifs pour former des hétérodimères. De même, *in vitro*, un mélange quelconque d'homodimères ou d'hétérodimères de membres de la famille aboutit, par échanges successifs, à une population de dimères dont la compétition est statistiquement régie par la concentration respective des différents monomères. Cependant, au sein d'un hétérotétramère, HNF1 α ne peut échanger ses monomères avec d'autres dimères formés *in vitro*. En chauffant fortement la solution, il est possible de séparer DCoH au dimère HNF1, et de rétablir une aptitude à échanger ses monomères. Si, après ce traitement, le dimère d'HNF1 est recruté par de nouvelles molécules de DCoH traduites *in vitro* dans la même solution, de nouveaux hétéro-tétramères seront formés, qui ne pourront plus échanger leurs monomères (Nicosia et al, 1992). DCoH pourrait donc stabiliser les dimères d'HNF1 α . La dissociation de deux monomères d'HNF1 par traitement aux détergents ou aux agents réducteurs devient impossible (Nicosia et al, 1992). Dans ce cas, l'hétérotétramère ne résulterait pas de la

fixation indépendante de molécules de DCoH à chacun des monomères d'HNF1 α , mais bien d'une interaction intime entre un dimère d'HNF1 α et un dimère de DCoH. Au contraire, d'autres auteurs postulent que l'interaction de DCoH ne semble pas avoir de conséquences sur la fixation d'HNF1 à l'ADN (Mendel et al, 1991). Ni l'affinité apparente, observée en retardement sur gel, ni la spécificité ne semblent altérées. Il semble en revanche que la demi vie de la protéine soit prolongée du fait de la formation d'hétérotétramère (Nicosia et al, 1992). DCoH ne se comporte pas comme un segment activateur *ex vivo*. La protéine fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de GAL4, n'active pas la transcription depuis les promoteurs auxquels elle est associée (Mendel et al, 1991). Il semble toutefois, que dans des expériences de co-transfection, l'effet global soit d'augmenter l'activation transcriptionnelle due à HNF1 α . Lorsqu'un seul site est reconnu dans le promoteur du gène traceur, l'effet de DCoH est très modeste : Une augmentation de 30% de l'activité (Mendel et al, 1991). Si les quantités de vecteur d'expression d'HNF1 sont réduites (Ce qui fait supposer qu' HNF1 deviendrait limitant), l'effet de DCoH est beaucoup plus marqué: Le niveau d'activation serait multiplié par deux cents (Mendel et al, 1991). Toutefois, en dehors de ce groupe, aucuns autres n'ont pu reproduire de tels effets.

L'interaction se fait à partir du domaine de dimérisation d'HNF1. La délétion du segment A d'HNF1, responsable de la dimérisation conduit à la perte de l'interaction avec DCoH *in vitro* (Mendel et al, 1991). La structure tridimensionnelle de ce segment est inconnue. Cependant, plusieurs données sur la structure secondaire de ce domaine de dimérisation sont disponibles (De Francesco et al, 1991 ; Pastore et al, 1991). Le dimère du segment A adopterait la forme d'un faisceau de quatre hélice- α , qui interagissent par une face hydrophobe portant le palindrome LLxxLL, caractéristique des structures en faisceau (De Francesco et al, 1991; Pastore et al, 1991).

1.5. La séquence de reconnaissance HNF1 α est un palindrome dégénéré:

La protéine HNF1A est capable d'interagir avec des séquences définies dans des régions promotrices de nombreux gènes spécifiques du foie. Ces séquences sont fortement conservées du xénope à l'homme (Mendel et al, 1991). Si une moitié de chacun de ces sites semble convergée, l'autre est plus divergente. En prenant la plus conservée des deux moitiés comme référence et en réorientant éventuellement les sites pour que cette référence soit systématiquement lue sur le même brin, une loi statistique peut être déduite de cette compilation. L'ensemble des mutants du site décrits et testés, glanés au détour de multiples rapports, confirme la valeur prédictive de la loi déduite des allèles sauvage de l'élément reconnu par HNF1 (Chouard et al, 1993). Le cœur du site est toujours riche en paire de base AT, point commun avec la plupart des motifs reconnus par les homéodomains. L'étude des contacts entre les facteurs et son site passe par la détermination des points d'interférence suite à la méthylation des purines au DMS, et accessoirement, à la méthylation en N6 des adénines par le système bactérien DAM. Menée sur six sites naturels, cette cartographie révèle de nombreux contacts situés dans le grand sillon de l'ADN, tout le long du site. Les données concernant le petit sillon sont plus limitées, et sans doute moins fiables compte tenu de la méthode utilisée (Chouard et al, 1993). La surface de contact entre le dimère et le grand sillon de l'ADN s'étend donc tout le long du site, jusqu'aux extrémités, y compris du côté le plus dégénéré du motif pseudo-palindromique (Sourdive, Thèse 1993).

2. Le réseau de régulation des HNFs.

Les premiers arguments qui définissaient une régulation de l'expression du gène HNF1 α par HNF4, découlaient des travaux de complémentation génétique réalisée dans les hépatocytes

dédifférenciés (Kuo et al, 1992). La présence de séquences cibles de fixation HNF4 et HNF3 dans le promoteur du gène HNF1 α et les études fonctionnelles, venaient renforcer l'implication des facteurs HNF3, mais surtout HNF4, comme régulateurs positifs du promoteur du gène HNF1 α . Dans les hépatomes différenciés humains HepG2, transitoirement transfectés, alors que la délétion d'une base dans la séquence cible HNF4, était suffisante pour réduire de manière drastique l'activité (93-95%) (Kuo et al, 1992), la délétion du site de fixation HNF3 ne diminuait que de 30% l'activité du promoteur HNF1 α (Kuo et al, 1992). Le site de fixation HNF4 est donc crucial pour l'expression du gène HNF1 α .

Plusieurs études spéculèrent sur une possible autorégulation d'HNF1 α sur son propre promoteur. Cette hypothèse tenait sur l'observation que l'introduction croissante de vecteurs sur-exprimant HNF1 α dans les cellules Hela et HepG2 transitoirement transfectées, diminuait l'activité de son promoteur (Piaggio et al, 1994). Cette hypothèse se confortait par les résultats de Kritis et ses collaborateurs, qui en outre, de retrouver le même effet de l'expression d' HNF1 sur son promoteur dans les cellules HepG2, observait une diminution de l'activité des promoteurs ApoCIII et ApoAI régulée par HNF4, lorsqu'une quantité croissante du vecteur HNF1 était introduite dans les cellules Hela ou HepG2. Les auteurs suggéraient l'existence d'un mécanisme d'autorégulation indirecte de l'expression du gène HNF1 α , au cœur duquel HNF4 serait impliqué (Kritis et al, 1993). L'établissement de cellules HepG2 sur-exprimant HNF1 α , après transfection stable, apportait des arguments supplémentaires sur cette régulation négative (Kristaki et al, 1997). En effet, dans ces cellules, l'expression stable d' HNF1 α exogène réprimait, non seulement la transcription de sa version endogène, mais aussi l'activité de promoteurs dont l'activité était normalement contrôlée par HNF4 (Kristaki et al, 1997). Les auteurs déterminèrent en double hybride une interaction directe de la région d'HNF1 α (comprenant les résidus 280-440) et le domaine AF2, le

domaine d'activation d'HNF4. La régulation négative en boucle de l'expression du gène HNF1 α ferait donc intervenir une interaction HNF1 α /HNF4. Les travaux réalisés à partir des cellules souches embryonnaires ES (Embryonic Stem cells) invalidées par recombinaison homologue pour l'expression des gènes HNF3 α et HNF3 β , ont apporté un certain nombre d'arguments en faveur de l'existence d'une hiérarchie transcriptionnelle entre certains membres des HNFs. Dans les cellules ES invalidées dans les deux allèles pour HNF3 β (HNF3 β -/-), par RT-PCR, une forte réduction de la transcription du gène HNF4 α et de ces gènes cibles, dont HNF1 α était observée. Tandis que l'expression du gène HNF3 α n'était visiblement pas détectable. L'expression d'HNF3 β s'avérait donc primordiale pour la transcription du gène HNF3 α . A l'inverse, l'extinction du gène HNF3 α (HNF3 α -/-) augmentait l'expression du gène HNF1 α , tandis que le niveau d'expression d' HNF3 β et d'HNF4 α restait inchangé (Duncan et al, 1998). Dans cette hiérarchie, HNF3 α aurait une fonction de répresseur sur l'expression du gène HNF1 α . A des stades précoces du développement fœtal, l'expression d' HNF3 β apparaît avant celle des facteurs HNF3 α et HNF4 α (Duncan et al, 1998). Ces observations orienteraient en toute logique HNF3 β au sommet de la cascade de régulation. Toutefois, la présence d'une séquence compatible avec la séquence de fixation du facteur HNF6 dans le promoteur du gène HNF3 β , accorde un rôle régulateur probable d' HNF6 au niveau de ce site (Lemaigre et al, 1996). Toutes ces données semblent désormais appuyer l'existence d'un réseau de régulation entre certains membres des HNFs (Duncan et al, 1998), ou chaque élément occupe une place clé, incontournable, pour la physiologie, le métabolisme et la différenciation cellulaire.

3. HNF1 α et certains membres du réseau des HNFs sont exprimés dans les cellules pancréatiques.

C'est sans doute parce que ces facteurs de transcription de type HNFs ont à l'origine été identifiés dans les cellules hépatiques, que les champs d'investigations se sont principalement focalisés sur leur rôle dans ces cellules. Certains travaux ont cependant recherché l'expression des HNFs dans d'autres tissus, notamment dans le pancréas. Les îlots de Langerhans du pancréas sont constitués de quatre types de cellules, désignées α , β , γ et pp, respectivement sécrétrices du glucagon, d'insuline, de somatostatine et de polypeptide pancréatique (PP). Dans les îlots de rat et dans les insulinomes, les transcrits codant HNF1 α , HNF4 α ainsi que les membres de la famille HNF3 et HNF6 ont été détectés par RT-PCR (Vaisse et al, 1997). Dans le pancréas endocrine et exocrine, fœtal et adulte, l'expression des formes HNF1 et HNF4 a été observée (Miquerol et al, 1994). Par hybridation in situ, l'expression des transcrits HNF6 et HNF3 β a aussi été détectée dans les cellules endocrines et exocrines du pancréas murin (Rausa et al, 1998).

Au cours du développement de la souris, le gène HNF3 β est transcrit dans le bourgeon pancréatique dorsale au jour 10 post-coïtum (Ahlgren U et al, 1996). Dans les tissus pancréatiques adultes et dans les cellules exocrines, un niveau d'ARNm codant HNF3 β a été détecté (Cockell et al, 1995). La présence de la protéine HNF3 β a été mise en évidence par immunohistochimie dans les noyaux des cellules β des îlots de Langherans (Wu et al, 1997). Dans ces dernières, une forte expression du gène a été observée (Philippe, 1995). Des délétions de la région régulatrice du gène PDX-1, facteur clé de la régulation de l'expression du gène de l'insuline et de la somatostatine chez le rongeur, identifiaient un élément de réponse au facteur HNF3 β (Wu et al, 1997). Les études de retard sur gel, effectuées à partir des extraits protéiques de différentes lignées d'insulinome (HIT-T15 et β -TC3), et d'îlots humains, montraient qu' HNF3 β est capable d'interagir sur cet élément. Dans les cellules α , sécrétrices du glucagon, trois protéines isoformes issues de trois transcrits différents ont été identifiées: HNF3 β 1, HNF3 β 2 et HNF3 β 3 (Philippe, 1995). Ces protéines isoformes diffèrent

dans leur capacité transactivatrice et modulerait l'expression du gène du glucagon (Philippe, 1995).

Dans la lignée d'insulinome de hamster HIT-T15, HNF1 α est capable de transactiver l'expression du gène codant l'insuline de type I (Emmens et al, 1992).

4. L'inactivation complète du gène HNF1 α entraîne chez la souris un phénotype diabétique.

L'inactivation par recombinaison homologue du gène HNF1 α n'affecte pas le développement embryonnaire des souris hétérozygotes (HNF1 $^{-/+}$) ou homozygotes HNF1 $^{-/-}$. Alors que la croissance des souris hétérozygotes est comparable à celle des souris de type sauvage, celle des souris invalidées homozygotes se réduit dès la première semaine. Un pourcent seulement des souris homozygotes atteignent 3 mois de vie et cinquante pourcent survivent jusqu'au jour 26 (Pontoglio et al, 1996).

Les souris homozygotes développent dès la deuxième semaine, une hépatomégalie accompagnée par une stéatose, une sévère hyperphénylalaninémie, une désorganisation de l'épithélium glandulaire gastrique chez certains cas. Aucuns signes pathologiques visibles macroscopiques et histologiques au niveau de l'intestin, du pancréas ou du rein n'étaient décelés. Les traits typiques du syndrome rénal humain de Fanconi sont également observés chez ces souris: polyurie, glucosurie massive, aminoacidurie, phosphaturie et déminéralisation de la moëlle. La moitié des souris homozygotes a une diurèse journalière de plus de 40% de leur poids corporels, avec des concentrations de glucose très élevés dans les urines. Le phénotype rénal de ces souris s'expliquerait par un dysfonctionnement des processus de réabsorption du glucose et autres petites molécules de l'urine primaire au niveau des tubules proximales du rein (Pontoglio et al 1996).

Le niveau d'expression des gènes cibles hépatiques d' HNF1 a été étudié chez ces souris invalidées homozygotes. Alors que le taux des ARN codant l'albumine, l'alpha-1 anti-

trypsine ou le β -fibrinogène est réduit de 2 à 5 fois, l'expression du gène codant la phénylalanine hydroxylase (PAH) est complètement éteinte. A l'exception de la PAH, la réduction du niveau transcriptionnel des gènes cibles de HNF1 α ne semble pas affecter la fonction codée par ces gènes. L'hépatomégalie observée chez les souris homozygotes ne saurait être attribuée à l'hyperphénylalaninémie sévère causée par l'extinction du gène codant la PAH, mais résulterait plus volontiers de l'altération d'autres fonctions hépatiques. La réabsorption du glucose et d'autres petites molécules de l'urine primaire n'est plus assurée. Les mécanismes de transport au niveau du rein sont affectés, suggérant que les souris homozygotes ont une réduction (deux fois) du nombre de co-transporteurs Na⁺ / glucose. Les gènes cibles d HNF1 au niveau du rein restent cependant à être identifiés. Même si le taux d'ARN de HNF1 β est retrouvé deux fois plus élevé dans le foie des souris mutantes, l'activité finale de fixation à l'ADN n'excède pas 10%/15% de l'activité hépatique d'HNF1 α trouvée chez les souris de type sauvage. Bien que les homo-dimères HNF1 β se fixent sur la même séquence cible, ils ne complètent pas l'absence d' HNF1 α . Ceci pourrait s'expliquer par le faible niveau activateur d'HNF1 β .

La concentration du glucose sanguin est de 20% et 65% plus élevée chez les souris invalidées (-/-) après respectivement deux et six semaines de vie, comparée à celle des souris hétérozygotes ou de type sauvage. Une diminution du contenu en insuline et de la masse des cellules β -pancréatiques étaient observées dans les souris homozygotes. La réduction de la masse des cellules β étant proportionnelle à la diminution de la taille des animaux, elle ne saurait justifier l'état diabétique de ces souris. En outre, les auteurs n'observaient aucune variation du taux d'ARN codant l'insuline chez les souris invalidées hétérozygotes ou homozygotes comparées aux souris sauvages. Le facteur majeur responsable du développement du diabète chez les souris (-/-) serait une réduction sévère de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose et à l'arginine, démontrée à la fois dans le pancréas perfusé et

dans les îlots périfusés (Pontoglio et al, 1998).

5. L'expression stable d'une forme dominante négative d'HNF1 α altère le mécanisme de sécrétion à l'insuline dans les cellules β -pancréatiques

L'implication d'HNF1 α dans les cellules β -pancréatiques, au moins dans le mécanisme de l'insulino-sécrétion semble désormais évidente. Afin d'explorer le mécanisme moléculaire par lequel l'inactivation d'HNF1 α affecte le mécanisme de l'insulino-sécrétion, des cellules β -pancréatiques de rat INS1 sur-exprimant la forme HNF1 α de type sauvage ou la forme dominante négative (résultant d'une substitution de 83 acides aminés dans le domaine de fixation à l'ADN) ont été générées en utilisant le système d'expression inductible à la doxycycline (Wang et al, 1998). L'inactivation de la version HNF1 α endogène par la sur-expression du mutant dominant négatif aboutissait alors à une diminution du mécanisme de sécrétion à l'insuline résultant d'un défaut de l'oxydation mitochondriale et de la dépolarisation membranaire. La perte de l'activité d' HNF1 α engendrait aussi une diminution de la transcription de gènes impliqués dans le transport et le métabolisme du glucose: GLUT2 et la L-type Pyruvate Kinase. HNF1 α est capable de transactiver l'expression du gène de l'insuline de type I dans les cellules β de hamster HIT-T15 (Emens et al, 1992). Alors qu'aucune altération de l'expression du gène de l'insuline n'était observée dans les souris invalidées homozygotes, la sur-expression de la forme dominante négative réduit la transcription du gène de l'insuline de type I dans les cellules INS1. Cependant, la sur-expression excessive induite (plus de 100 fois comparé à l'expression endogène de HNF1 α) du dominant négatif pourrait exagérer certains effets observés et justifier par ailleurs les différences avec le modèle des souris mutantes.

VI. Position du problème.

1. Le mécanisme moléculaire, par lequel les différentes mutations du MODY3 sont transmises est mal connu.

On dénombre jusqu'à ce jour plus de 60 mutations différentes dans le gène (faux sens et non sens) associées avec le phénotype MODY3, recouvrant tous les domaines fonctionnels de la protéine (Vaxillaire et al, 1997). MODY3 représente désormais la forme du MODY la plus courante. Ces observations suggèrent un effet probable de toutes ces mutations dans la fonction de la protéine et actuellement La mutation A(-283)C a été identifiée dans le site consensus au facteur HNF4 α du promoteur du gène HNF1 α . (Gragoli et al, 1997). Cette mutation, associée au MODY3, suggère que des mutations localisées dans les régions régulatrices du gène pourraient aussi induire la pathologie, via une possible altération de l'activité de ces régions. La recherche systématique de mutations dans les régions régulatrices du gène HNF1 α . ont permis d'identifier d'autres mutations associées au MODY3 (Godart et al, manuscrit soumis).

Pour toutes ces mutations, la base moléculaire de la transmission autosomique dominante reste encore mal comprise.

2. L'hyperglycémie chronique pourrait avoir un effet délétère sur l'activité et/ou l'expression du gène HNF1 α .

2.1. La quantité de protéine HNF1 α est diminuée dans les extraits nucléaires des hépatocytes de rats diabétiques.

HNF1 α est un facteur de transcription dont l'activité est modulée par des fluctuations de la pression osmotique colloïdale dans les conditions de culture de cellules d'hépatomes (Pietrangelo A et al, 1994). Des travaux ont montré dans les cellules hépatiques de rats rendus diabétiques avec la streptozotocine une chute de l'expression transcriptionnelle de l'albumine

liée à une diminution de la quantité de la protéine HNF1 α dans le noyau (Barrera-Hernandez et al, 1996). Les auteurs n'observaient aussi aucune variation du taux d'ARNm HNF1 α dans ces cellules. Lorsque la glycémie de ces rats diabétiques est normalisée (sans modifier le taux d'insuline circulante en les traitant avec le vanadate ou la phlorizine), l'expression du gène de l'albumine est alors restaurée à des taux normaux (rats euglycémiques) et ceci en rapport avec une augmentation de la quantité de la protéine HNF1A (Barrera-Hernandez et al, 1996b). L'hyperglycémie chronique semblerait réduire de manière réversible l'activité du facteur HNF1 α via un mécanisme post-transcriptionnel.

2.2. Etablissement d'un modèle ex-vivo de « glucotoxicité »: Le modèle des cellules HIT-T15 cultivées pendant de nombreux passages à de fortes concentrations de glucose.

L'impossibilité de disposer des biopsies de pancréas humain et les nombreuses difficultés techniques rencontrées dans les modèles *in vivo* ont limité l'étude du dysfonctionnement des cellules β par l'hyperglycémie. Le mécanisme moléculaire par lequel l'hyperglycémie chronique affecte les cellules β -pancréatiques demeure ainsi mal compris. Bien qu'elles ne reproduisent pas l'ensemble des propriétés des cellules *in vivo*, les lignées en culture, *ex vivo*, offrent un système expérimental plus maniable. Des cellules β -pancréatiques de hamster (HIT-T15) (Santerre R et al, 1981) ont ainsi été cultivées pendant de nombreux passages à de fortes concentrations de glucose (11,1mmol/l) (Robertson RP et al, 1992). Ces cellules présentent une déficience de la capacité d'insulino-sécrétion et une réduction drastique de la transcription du gène de l'insuline, comparées aux cellules cultivées au même nombre de passages mais à une concentration plus physiologique (0,8 mmol/l, pour ces cellules) où toutes les fonctions sont préservées. Aucune mutation dans le gène codant l'insuline n'a été détectée dans les cellules cultivées à 11,1mmol/l de glucose (Robertson RP et al, 1992). Le niveau d'expression transcriptionnel du transporteur de glucose GLUT-2 et de

la glucokinase ou de son activité, de même que le temps de doublement et le profil RFLPs ne différaient pas entre les cellules cultivées à 11,1 et 0,8 mmol/l de glucose. Ces résultats montrant aucune modification génétique détectable, indiquent désormais que les cellules cultivées à 11,1 et 0,8 mmol/l de glucose sont encore issues de la même population.

2.3. L'hyperglycémie chronique diminue l'activité des facteurs de transcription STF-1 et RIPE3b1, dans les cellules β -pancréatiques en culture.

Une réduction de l'expression du gène de l'insuline a été observée dans les cellules HIT- T15 cultivées à 11,1 mmol/l de glucose. Cette diminution est alors associée avec la réduction de l'activité de deux facteurs de transcription directement impliqués dans la régulation de l'expression du gène de l'insuline: l'activateur RIPE3b1 et la Somatostatin Transcription Factor-1 (STF-1 nommé aussi IDX-1, IPF-1, PDX-1 et GSF) (Olson et al, 1995; Sharma et al, 1995). L'effet négatif de l'hyperglycémie chronique sur l'expression du gène de l'insuline a été observé dans d'autres modèles. En effet, une réduction des ARNm de l'insuline et de STF-1 était aussi observée dans les îlots restant des rats rendus hyperglycémiques par pancréatectomie à 90% (Zangen et al, 1997). En outre, des résultats montraient une réduction de l'expression du gène de l'insuline et de l'activité du facteur RIPE3b1 dans les cellules β murines β TC-6 cultivées également à de fortes concentrations en glucose. Les îlots humains exposés à de fortes concentrations en glucose montraient également à la fois une réduction du contenu en insuline et de la capacité insulino-sécrétoire en réponse au glucose (Eizirik et al, 1992). Des travaux ultérieurs ont montré que l'expression du gène de l'insuline et de STF-1 pouvait partiellement être réversée lorsque les cellules étaient replacées à 0,8mmol/l de glucose. L'introduction de la somatostatine dans le milieu de culture inhibait l'insulino-sécrétion en réponse au glucose, mais ne modifiait pas le défaut de l'expression du gène de l'insuline (Moran A et al, 1997). Ces observations militaient en

faveur de l'effet de la glucotoxicité et favorisaient les auteurs à écarter l'hypothèse de « l'épuisement cellulaire » lié aux multiples repiquages, comme l'origine unique du défaut de l'expression du gène de l'insuline dans ces cellules.

2.4. L'expression du gène HNF1 α pourrait être affectée dans les cellules β -pancréatiques par l'hyperglycémie chronique.

Compte tenu du rôle délétère de l'hyperglycémie chronique sur la fonction des cellules β -pancréatiques et de l'implication d' HNF1 α dans le mécanisme de sécrétion de l'insuline (Wang et al, 1998, pontoglio et al, 1998), on pourrait supposer que l'expression du gène HNF1 α ou l'activité de sa protéine soit également affecter par l'exposition chronique à de fortes concentrations en glucose dans les cellules β -pancréatiques

3. HNF3 β : un gène potentiel au MODY.

En résumé, deux approches sont donc employées pour rechercher les gènes de susceptibilité. L'analyse de liaison en ciblant des gènes candidats, sélectionnés par rapport à leurs fonctions dans les mécanismes de sécrétion de l'insuline et/ ou de l'action de l'insuline. L'analyse de liaison en utilisant des marqueurs polymorphes anonymes (des polymorphismes répétés en tandem CA), permet de faire une cartographie d'exclusion du génome. Ces deux stratégies ont donc permis d'identifier et d'exclure un certain nombre de gènes et de loci dans de nombreuses populations. Les loci des 5 MODY étaient systématiquement analysés et/ou les gènes séquencés. Des travaux avaient donc aboutit sur l'identification de familles françaises de type MODY dont le diabète ne co-ségrégait avec aucuns des loci MODY connus (Chèvre et al, 1998). On compte à ce jour au moins 21 familles ne présentant aucunes variations génétiques pour les cinq gènes du MODY connus (glucokinase, HNF1 α , HNF1 β ,

HNF4 et PDX-1). Au moins, un autre gène serait donc responsable du MODY dans ces cas familiaux restants.

Les facteurs HNF4 α et HNF3 β sont des régulateurs positifs de la transcription du gène HNF1 α (Kuo et al, 1992). Des mutations dans le gène HNF4 α sont associées au MODY1. La mutation A(-283)C identifiée dans le site consensus de fixation au facteur HNF4 α et associée au MODY3, suggère que la réduction de l'expression du gène HNF1 α peut suffire à induire le phénotype MODY3. Dans ce cas, le phénotype du MODY1, pourrait s'expliquer en partie par une réduction de la transcription du gène HNF1 α . Lorsque le site consensus de fixation au facteur HNF3 est muté, l'activité du promoteur du gène HNF1 α est réduite de 30% (Kuo et al, 1992). D'autre part, une mutation T(-218)C a été identifiée dans la séquence consensus de fixation aux facteurs HNF3/NFY. Cette mutation est associée au MODY3 (Godart et al, manuscrit soumis). Par ailleurs, plusieurs marqueurs polymorphes localisés à proximité des gènes HNF3 α et HNF3 γ , n'indiquaient pas de liaisons évidentes avec le diabète dans ces familles (JC Chèvre, communication personnelle). On pourrait alors soupçonner que des mutations délétères dans les régions codantes ou régulatrices du gène HNF3 β puissent être à l'origine d'un phénotype MODY dans ces 21 familles.

VII. Objectifs:

Cette thèse va s'orienter sur 3 grands axes :

1) Etudes fonctionnelles, des mutations localisées dans le gène codant HNF1 α , associées au MODY3.

Nous avons sélectionné 10 mutations réparties dans les différents domaines fonctionnels du gène. Tous les mutants seront analysés par transfection transitoire, pour leurs effets sur les différentes propriétés de la protéine : Transactivation, capacité de fixation à l'ADN, stabilité de la protéine. L'activité des régions régulatrices du gène HNF1 α mutées sera mesurée par comparaison avec celle de la région sauvage.

2)- Effets de l'hyperglycémie chronique sur l'expression du gène HNF1 α et l'activité de sa protéine, dans les cellules β -pancréatiques HIT-T15.

3) Recherche de mutations dans les exons et les jonctions introns/exons du gène HNF3 β .

MATERIELS ET METHODES

I. Les techniques courantes de la biologie moléculaire.

1. Techniques d'électrophorèse.

1.1. Electrophorèse en gel d'agarose.

Le gel d'agarose est utilisé pour la séparation des fragments d'ADN. Sa concentration varie de 0,6% à 2,5% en fonction de la taille des fragments à séparer ou à purifier. La migration a lieu dans du tampon TBE (Tris-HCl 0,9M (pH 7,8), Acide borique 0,9M, Na₂EDTA.2H₂O 2,5mM). L'ADN est mélangé v/v avec une solution de bleu de bromophénol (BBO) à 0,05%, avant d'être déposé. La migration est effectuée à 100V pendant 30 minutes. L'ADN est visualisé sur rampe UV grâce au bromure d'éthidium contenu dans le gel d'agarose (8 à 10 µg/ ml).

1. 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide.

La concentration des gels varie de 3,5 à 12% (rapport bis-acrylamide/acrylamide 1/29) selon la taille des fragments d'ADN à séparer. La migration a lieu en tampon TBE 1X. Les gels de séquence pour les migrations sur 36 cm et 48 cm, sont des gels préparés de 50 ml Long Ranger™ 5%/ Urée 6M (Bioproducts), constitués par de l'urée 18 gr, eau distillée 26 ml, Long Ranger 50% 5 ml, TBE 10X 5ml, persulfate d'ammonium 10% 0,25 ml et du TEMED 35 µl. La migration a lieu dans du tampon TBE 1X.

2. Marquage des sondes d'oligonucléotides double brin au ³²P.

Les oligonucléotides simple brins complémentaires correspondant aux éléments de fixation à l'ADN des facteurs HNF1α et E2TR sont respectivement : 5'-CTTTAGTTAATATTTGACGACAGTTT-3' et 5'-CTAGACAACCGATTTCGGTTGT 3'.

Les oligonucléotides simple brins sont appariés à la concentration de 0,1 mg/ml dans du tampon TE (Tris-HCl 10mM pH 7,8, EDTA 1mM) NaCl 0,1M, en amenant le mélange réactionnel à ébullition puis en le laissant refroidir doucement à température ambiante.

Les réactions de marquage ont été effectuées comme suit :

a- La réaction est effectuée dans un volume de 10 µl avec : 2 µl d'oligonucléotide double brin (200ng), 1 µl de tampon kinase 10X, 1 µl de DTT 50 mM, 1 µl de spermidine 20mM, 2 µl d'ATP [γ - 32 P] (370 MBq/ml), 2 µl d'eau et 1µl de polynucléotide kinase T4.

b- Le mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 30 minutes, puis à 70°C pendant 5 minutes.

c- L'extrémité des oligonucléotides double-brins utilisés en retard sur gel sont rendus francs par traitement par l'enzyme de klenow dans un volume de 20 µl obtenu à partir des 10 µl de milieu de marquage précédents à qui ont été ajouté : 1 ml de tampon klenow 10X, 4 µl de désoxyribonucléotides 5 mM, 2 unités de klenow et 4 µl d'eau. Le mélange est incubé dans la glace pendant 30 minutes.

d- Les fragments d'ADN marqués en 5' sont purifiés en gel de polyacrylamide à 8%, TBE 1X. Leur élution se fait dans du TE 1X à 37°C pendant une nuit.

3. Collection de l'ADN.

Les échantillons d'ADN des individus diabétiques et contrôles ont été préparés à partir de leucocytes, selon la méthode d'extraction délivrée par le kit d'extraction Puregène (Puregène). La collection d'ADN de familles de type MODY a été réalisée au laboratoire d'études génétiques des maladies multifactorielles du Pr Philippe Froguel, sur le programme de recrutement : « 200 familles pour vaincre le diabète », qui a débuté depuis 1992, en collaboration avec le CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Paris).

Le criblage par séquençage direct du gène HNF3 β , a été entrepris sur 21 individus non appariés, provenant de 21 familles françaises (d'origines caucasiennes) diabétiques de type MODY. Ces probands présentent les caractéristiques suivantes : rapport homme/ femme 12/9; âge moyen 47 ± 10 ans; BMI (indice de masse corporel) $25,2 \pm 4,7$ kg/m² ; âge du diagnostic 28 ± 9 ans, durée de l'hyperglycémie 18 ± 9 ans ; glucose à jeun $9,4 \pm 3,3$ mmol/l ; Insuline à jeun $10,8 \pm 14,01$ pmol/l. Le diabète de ces familles n'était associé avec aucun des loci MODY connus (Chèvre et al, 1998 ; JC Chèvre, communication personnelle) Le génotypage, grâce aux marqueurs microsatellites, est réalisé lorsque les familles sont suffisamment informatives. Le génotypage de la région du gène HNF3 β , a été réalisé sur un total de 220 individus de 15 familles (parmi les 21 familles).

4. Amplification des fragments d'intérêts par PCR (Polymerase Chain Reaction).

Toutes les réactions de PCR ont été réalisées en utilisant l'appareil GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystem). Dans un volume final de 50 μ l, chaque réaction comprenait 1 μ l du mélange des amorces sens et antisens à 5 pmoles chacune, des didésoxynucléotides (dNTP) à 2,5 mM 4 μ l, tampon 10X (Applied biosystem) 5 μ l, taq polymérase 5u/ μ l (Applied biosystem) 0,2 μ l, 100 ng d'ADN matrice et de l'eau QSP volume final. Une étape de dénaturation à 96°C pendant 3 minutes, ou 12 minutes lorsque l'ampli taq Gold polymérase était utilisée, précédée 35 cycles de 3 étapes : Une étape de dénaturation à 96°C pendant 30 secondes, une étape d'hybridation au T_m pendant 45 secondes suivie d'une étape d'élongation à 72°C pendant 45 secondes. La réaction est enfin terminée par une étape d'élongation à 72°C pendant 7 minutes.

Les 3 exons et les jonctions exon/ intron, du gène HNF3 β ont été amplifiés par PCR (Polymerase Chain Reaction^o). Tous les oligonucléotides sens et antisens utilisés comme

amorces sont respectivement flanqués à leurs extrémités 5' par les séquences universelles - 21M13 (5'-TGTAAAACGACGGCCAGT-3') et le reverse M13 (5'-CAGGAAACAGCTATGACC-3'). Le fragment amplifié de 408 paires de bases (pb) à partir des amorces (sens 5'- GAAACACGCCGGCCTGAATATCAG-3' et antisens 5'-GCAGATCCCTATGAAAGCCGGATT- 3'), recouvrait entièrement l'exon 1 non traduit et 100 bp de séquences introniques en 5' de l'exon. L'exon 2 et les flancs introniques (38 pb et 208 pb en 5' et 3') étaient amplifiés en un fragment de 400 bp à partir des amorces spécifiques (sens 5'-GGGTGATTGCTGGTCGTTTGTGTG-3' et antisens 5'-GAGGCGCCGCAAGTCAATATTTG-3'). L'exon 3 a été amplifié en 4 fragments chevauchant (F3.1, F3.2, F3.3 et F3.4), (voir Table 2, publication n°2). L'amplification de tous ces fragments nécessitait l'ajout, pour chaque volume réactionnel de 5% de DMSO (DiMethylsulfoxyde), de 3 unités d'amplitaq gold polymerase et de 4 µl de MgCl₂ 25mM (2 µl MgCl₂ 25mM pour les fragments recouvrant l'exon 2 et F3.1). La température d'hybridation T_m, pour tous les couples d'amorces est portée à 60°C.

5. Digestion enzymatique de l'ADN.

Toutes les réactions enzymatiques sont effectuées à 37°C pendant 3-5 heures, selon les conditions spécifiées par le fabricant de l'enzyme.

L'ADN plasmidique est digéré avec 1-5 unités d'enzymes/ µg d'ADN.

Les produits amplifiés par PCR sont digérés dans un volume final de 50 µl comprenant, 10 µl de produits de PCR, 5 µl de tampon 10X, 1-2 unités d'enzymes et eau QSP volume final.

6. Techniques de séquençage de l'ADN.

Toutes les réactions de séquence, rapportées dans ces travaux, ont été réalisées en utilisant le kit de réaction de séquence ABI PRISM™ dRhodamine Terminator Cycle

Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem, Foster city, USA) et sont effectuées sur GeneAmp PCR system 9700 (Applied biosystem). Les produits de la réaction sont ensuite purifiés sur une colonne de chromatographie de gel filtration (biogel p10, taille de fractionnement [1500- 20 000 Da]) (Biorad) et séchés au speed vac pendant 15 minutes. Le culot est repris dans 3 μ l de tampon de dépôt 1X (tampon 6X (Applied Biosystem) dilué au 1/6 avec du formamide froid). 1,5 μ l du produit est finalement déposé sur séquenceur automatique ABI PRISM 377 (Applied Biosystem). Les données sont analysées avec les logiciels « Sequencing Analysis » et « Sequence Navigator ».

6.1. Séquençage des constructions plasmidiques.

La réaction est effectuée dans un volume final de 20 μ l comprenant 300-800 ng de préparation plasmidique, 3,2 pmoles d'amorces spécifiques (0,8 pmoles/ μ l), 8 μ l de kit de séquence dRhodamine Terminator, eau QSP volume final. La réaction démarre par une dénaturation à 96°C pendant 1 minute suivie par 25 cycles d'une étape de dénaturation à 96°C (15 secondes), d'une étape d'hybridation à 50°C (5 secondes) et d'une étape d'élongation à 60°C (4 minutes). Les échantillons sont déposés sur un gel de 48 cm, puis migrés à 2400V (1200 scans/ heure, 51 °C), pendant 10 heures.

6.2. Séquençage des amplicons.

Les fragments amplifiés par PCR, sont purifiés sur une colonne de chromatographie de gel filtration Biorad (Biogel p60, taille de fractionnement [3000- 60 000 Da]). La réaction de séquence est réalisée dans un volume final de 20 μ l comprenant 15 ng de produits purifiés, 3,2 pmoles d'amorces spécifiques ou les amorces M13, 4 μ l de MIX du kit dRhodamine Terminator, 2 μ l de tampon de dilution (Tris 400 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8) et de l'eau QSP volume final. La réaction suit les mêmes cycles et température que paragraphe I.3, sauf que le

temps d'élongation est fixé à 2 minutes 30. Les échantillons sont déposés sur un gel de 36 cm, puis sont migrés à 3000V pendant 3 heures (2400 scans/ heures, 51°C).

7. Génotypage par PCR-RFLPs.

Les génotypes des familles diabétiques et des sujets contrôles, pour les différents variants HNF3 β , ont été effectués par PCR-RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Les fragments comportant les transitions C/T et G/A respectivement localisées à la position +130 de l'exon 1 non traduit, et au codon 367 de l'exon 3 étaient amplifiés par PCR en utilisant les couples d'amorces respectifs (sens 5'-CGCCCCGCGCTTCTCCCGgtGC-3', et antisens 5'-GAAACACGCCGGCCTGAATATCAG-3') et (sens 5'-CACAGCCACCACCACCctCA-3' et antisens 5'-CTTGCTCTCTCTCACTTGTCTCGAT-3'). Pour ces fragments, deux nucléotides des amorces sens en (5') étaient substitués par deux autres nucléotides (en minuscule et en gras), afin de créer les nouveaux sites de restriction Ban I et Dde I respectivement en présence des variants T (+137) et A (codon 367). Le polymorphisme de transition A/G localisé en position -21 dans la région 5'UTR et la transversion G/C en position +31 dans l'intron 1 abolissaient respectivement les sites de restriction Alw26I et Eco47III. Dans l'exon 3, la transition C/T au codon 67 abolissait le site NaeI, tandis que le variant A/G au codon 249 créait un nouveau site ApaI.

8. Localisation d'un gène en utilisant le panel d'hybrides par radiation G3.

La technique de cartographie par hybrides de radiation permet d'aligner des marqueurs le long d'un chromosome et d'estimer la distance physique entre eux. Cette technique peut ainsi déterminer la position d'un gène dans un locus.

Des cellules diploïdes humaines (donatrices) sont irradiées jusqu'à cassure de l'ADN, puis fusionnées aux cellules non endommagées de hamster (réceptrices) ne portant pas la résistance à la Thymidine Kinase (TK-). Les cellules sont cultivées dans un milieu sélectif HAT ou seules survivent les cellules hybrides humaines- hamster (cellules qui ont récupérées la résistance TK apportée par les cellules humaines). Les cellules hybrides résultantes, sont alors groupées en un panel de clones, ou chacun de ces clones ont finalement un nombre inconnu et variable de fragments d'ADN humains induit par irradiation, présents soit sous forme de mini-chromosomes, ou recombinée dans le chromosome de hamster. Le panel G3 de forte résolution, dispose ainsi de 86 différents clones d'hybrides obtenus avec la dose d'irradiation de 10 000 rads.

Les marqueurs sont amplifiés par PCR dans l'ADN pour chacun de ces clones, dans au moins deux réactions indépendantes. Un profil du panel est établi en fonction de la présence ou de l'absence des marqueurs donnés pour chaque clone. Les valeurs 1 et 0 sont alors respectivement attribuées à la présence et à l'absence des marqueurs. Les données sont alors transmises dans une base de données, au site public <http://www-shgc.stanford.edu/cgi-bin/smap>, qui calcule un score relatif de proximité de ces marqueurs, exprimé en LOD.

La localisation du gène humain HNF3 β a été réalisée en utilisant le panel d'hybrides G3. Le couple d'amorces spécifiques (sens 5'- CACAGCCACCACCCTCA- 3' et antisens 5'- CTTGCTCTCTCACTTGTCCTCGAT-3'), utilisé comme marqueur intra-génique, amplifiait spécifiquement chez l'homme, un fragment de 320 pb de l'exon 3. Les produits étaient vérifiaient sur gel d'agarose à 2%.

9. Génotypage à l'aide de marqueurs polymorphes microsatellites.

Trois marqueurs polymorphes (CA)_n répétés en tandem (D20S912, D20S871 et D20S195) (séquences disponibles sur le site <http://www.genethon.fr>), localisés à proximité du

gène HNF3 β ont été sélectionnés pour leur fort degré d'hétérozygotie (voir le tableau des caractéristiques). Chaque marqueur est en fait constitué d'un couple d'amorces dont une amorce est fixée à son extrémité 5' par une fluoroscéine de type phosphoramidites [6-FAM] et [TET]. Toutes les réactions de PCR, pour les 3 marqueurs, étaient effectuées avec du MgCl₂ 2,5 mM et 40 ng d'ADN. Du DMSO 5% est ajouté dans la réaction, pour l'amplification avec le marqueur D20S871. Les amplifications pour chaque marqueur sont spécifiées dans le tableau 3 ci-après. Les produits sont ensuite mélangés puis co-précipités par 3 volumes d'éthanol absolu froid à -20°C et finalement séchés rapidement au speed vac. Le culot est resuspendu dans 3 μ l de tampon de dépôt (formamide / bleu (Applied biosystem)/ standard de taille TAMRA (Applied biosystem). Un volume de 0,5 μ l est déposé sur gel Long Ranger™ 5% / Urée 6M (Bioproducts) sur séquenceur automatique ABI PRISM™ 377. L'analyse des génotypes se fait à l'aide des logiciels spécifiques Genescan® 3.0 et Genotyper® 2.0 (Applied biosystem). Les analyses statistiques basées sur le calcul du LOD score étaient basés sur celles décrites par Vaxillaire et ses collaborateurs (1995).

Marqueurs	D20S912	D20S871	D20S195
% hétérozygotie	80	88	81
Marquage	TET	TET	6-FAM
Fragments bp	267-283	156-188	237-261
Paramètres de PCR	1-96°C 5 min 2-94°C 30 sec 3-56°C 30 sec 35 cycles à 2 5- 72°C 10 min	1-96°C 12 min 2-94°C 30 sec 3-53°C 30 sec 4-72°C 30 sec 35 cycles à 2 5- 72°C 10 min	1-96°C 12 min 2-94°C 15 sec 3-55°C 15 sec 4-72°C 30 sec 30 cycles à 2 5- 72°C 10 min

Tableau 3: Caractéristiques des marqueurs D20S912 D20S871 et D20S195.

10. Mutagenèse dirigée par PCR.

10.1. Construction des mutants HNF1 α .

Les mutations faux sens ont été introduites dans l'ADNc humain HNF1 α , par mutagenèse dirigée, en utilisant l'ADN polymérase thermostable et de très grande fidélité *pfu*, selon les recommandations préconisées par le fournisseur (QuickChangeTM, Stratagene, La Jolla, CA). Les mutants ont été générés par PCR (voir figure 5, représentant le principe de cette technique).

La constructions des deux mutants générant les protéines tronquées ont été réalisées en utilisant les couples d'amorces suivants : sens 5'-CGTAAGCTTGCGGTAGAGGA-3' et antisens 5'- AAGTCTAGACTCACTGGAGGCCTGTGTCTGAGGT-3'. Ces amorces étaient modifiées pour créer les sites de restriction HindIII en 5' et XbaI en 3, respectivement en position -20 et +1630 (à partir de la base +1 (A) de l'ATG de l'ADNc humain HNF1 α). La mutation T547E548fsdelTG et le codon stop en phase de lecture se trouve dans l'amorce antisens. La mutation P291fsinsC étaient générées à partir des amorces internes sens en position +749 (5'- TCCCCATCACAGGCAC-3') et antisens en position +858 (5'- CTGGGGGGGGGGCCCGCTG-3'). Tous les fragments étaient clonés HindIII/ XbaI en amont du promoteur CMV (CytoMegaloVirus) dans le vecteur d'expression eucaryote pCDNA3.

Toutes les constructions étaient vérifiées par séquençage.

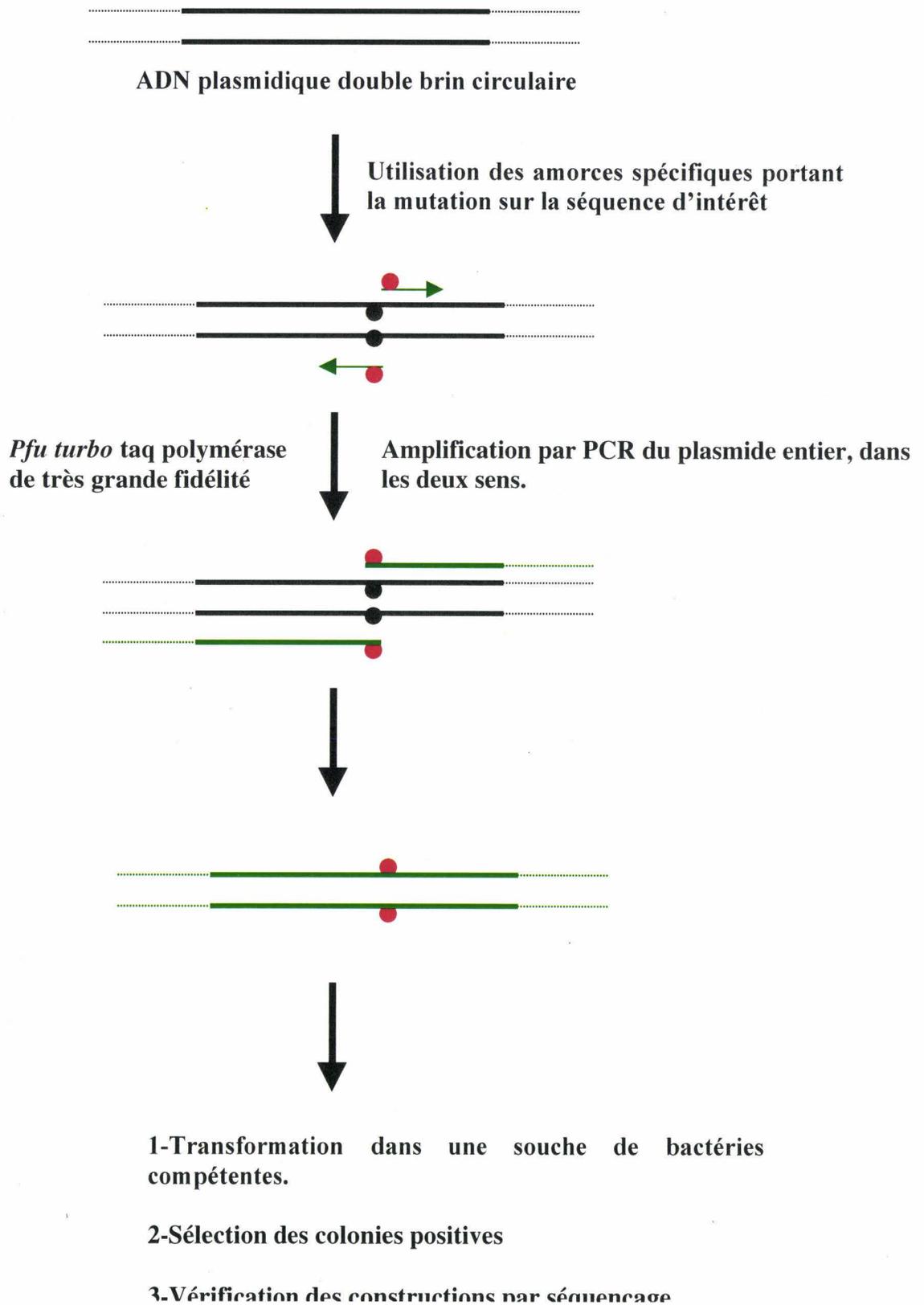


Figure 5 : Principe de mutagenèse par PCR selon le kit « QuickChange™ » :

10.2. Construction des mutants de la région promotrice du gène HNF1 α .

Les constructions plasmidiques étaient réalisées par les procédures de clonage courantes. Les amorces sens (5'-CCTCAGATCTGCCCACTCCC-3') et antisens (5'-TAGCCAAGCTTTGTGGGCACC-3') étaient utilisés comme amorces, pour amplifier directement par PCR un fragment de 235 paires de bases du promoteur minimum du gène HNF1 α . Les fragments mutés (-283 A>C et -218 T>C) et sauvages étaient générés à partir de l'ADN d'un patient hétérozygote. Les fragments étaient clonés dans le vecteur d'expression eucaryote pGL3 basique (Promega) à l'origine dépourvu de promoteur minimum, en 5' et en 3,' à partir des sites de restriction BglIII et HindIII respectivement dans les oligonucléotides sens et antisens.

II. Culture cellulaire.

1. Culture des lignées cellulaires.

Toutes les lignées cellulaires citées ci-après, sont incubées à l'étuve, à 37°C, 5%CO₂ et 90% humidité. Le milieu de toutes les cellules est systématiquement remplacé toutes les 48 heures et contient du sérum de veau fœtal décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes, et les antibiotiques suivants : pénicilline 100U /ml et streptomycine 100mg/ml.:

Les différentes lignées utilisées sont les suivantes :

- Les cellules C33 :** Kératinocytes humains transformés dérivant d'un carcinome cervical (Yee et al, 1985).
- Les cellules HepG2 :** Hépatocytes humains transformées dérivant d'hépatoblastomes (Knowles et al, 1980)

Les cellules HIT-T15 : Insulinomes dérivant de cellules β -pancréatiques de hamster transformées par le virus simien SV40 (Santerre et al, 1981)

Les cellules INS-1 : Cellules β -pancréatiques de rat isolées à partir d'insulinome induit par rayon X (Asfari et al, 1992).

Les cellules HIT-T15. cultivées à partir du passage 70 jusqu'au passage 110 soit dans 0,8 mmol/l ou 11,1 mmol/l de glucose proviennent du laboratoire de Karl Olson (Département de physiologie, Université de l'état du Michigan, East Lansing, MI). Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Sigma-ALDRICH), complémentées avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Life technologies), par du tampon HEPES 10mM, L-Glutamine 2mM et du bicarbonate de sodium 2g/l. Les passages se déroulent une fois par semaine en utilisant de la trypsine-EDTA 1X, lorsque les cellules atteignent 70-80% de confluence.

Les cellules INS1 sont cultivées dans du RPMI 1640 (Life technologies) complémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Boehringer Mannheim), pyruvate de sodium 1mM, L-Glutamine 2mM, tampon HEPES 10mM et du β -mercaptoéthanol 50 μ M.

Les cellules HepG2 et C33 sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium), complémenté par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Life technologies), pyruvate de sodium 1mM et de la L-Glutamine 2mM.

III. Etude de l'expression de gènes.

1. Transfections transitoires.

1. 1. Transfection dans les cellules C33.

Les cellules C33 ont été transfectées en utilisant la procédure classique de co-précipitation au phosphate de calcium. Chaque transfection est réalisée avec un total de 5 µg d'ADN total, comprenant 1 µg du plasmide rapporteur p(β28)₃CAT, une quantité variée du vecteur d'expression HNF1α et 1 µg du pRSV-β-galactosidase pour normaliser l'efficacité de la transfection. Une quantité variant de 10ng à 1µg du vecteur d'expression HNF1α muté ou sauvage était testé. La quantité de plasmides transfectés était maintenue constante en ajoutant du plasmide pGEM3. 40 à 48 heures après la transfection, les cellules sont lysées et les extraits cellulaires totaux sont préparés. Les activités CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) et β-galactosidase sont mesurées suivant le protocole décrit par Gorman et ses collaborateurs (1982). Les activités CAT étaient quantifiées par PhosphorImager et les signaux étaient analysés avec le logiciel ImageQuant software après autoradiographie.

1.2. Transfection dans les cellules HepG2 et INS1.

Les cellules INS1 et les cellules HepG2 sont respectivement cultivées à une densité de 10⁶ cellules/ puits et à 5.10⁵ cellules/ puits, dans une plaque de 6 puits, 48 heures avant la transfection. Ces deux types cellulaires sont transfectés en utilisant le complexe polycationique Exgen 500 (Euromedex) dans les mêmes conditions préconisées par le fournisseur. Une quantité de 1µg d'ADN total, comprenant 750 ng ou 1 µg du vecteur rapporteur luciférase (comportant le promoteur minimum HNF1α) et 50ng avec le vecteur rapporteur de normalisation pRL-CMV est utilisée. L'ADN et la solution d'Exgen 500 (en rapport respectif 1 :4) sont préalablement dilués dans du tampon NaCl 150 mM dans un volume final de 50 µl. Le mélange ADN-Exgen 500 (100 µl) est incubé à température ambiante pendant 10 minutes, avant d'être versé dans 1ml de milieu de culture avec ou sans sérum. Les cellules sont incubées avec le mélange pendant 5 heures, à l'étuve à 37°C. Ce

milieu est ensuite remplacé par le milieu de culture normal. 48 heures après la transfection, les cellules sont lysées avec du tampon de lyse (Promega). Les activités luciférase sont mesurées suivant les conditions préconisées par le kit de détection « Dual luciferase » (Promega) (firefly et renilla).

1.3. Transfection dans les cellules HIT-T15.

Les vecteurs rapporteurs INSCAT et INSLUC nous ont été gracieusement délivrés par R. Paul Robertson (Pacific Northwest Research Institute, Seattle). Dans ces vecteurs, les gènes rapporteurs CAT et luciférase sont sous la dépendance des mêmes séquences régulatrices humaines de l'insuline (-326 à +30). Le vecteur p(β 28)₃LUC contenant les mêmes éléments de régulation HNF1 α que le vecteur p(β 28)₃CAT, nous a été gracieusement offert par G. Grabtree, (CA). Les cellules HIT-T15 cultivées soit avec 11,1mmol/l ou 0,8 mmol/l de glucose, sont placées à une densité de 10⁶ cellules/ puits dans une plaque 6 puits, 48 heures avant la transfection. Les cellules sont transfectées, en utilisant le procédé de liposome DOTAP (rapport ADN /DOTAP est de 1 :4), avec une quantité totale de 1,5 μ g d'ADN total. Les cellules étaient co-transfectées avec 0,5 μ g de RSV LUC et 50 ng du pRL-CMV pour la normalisation de l'efficacité de la transfection, quand respectivement 1 μ g de chacun des vecteurs rapporteurs INSCAT ou p(β 28)₃CAT et INSLUC ou p(β 28)₃LUC étaient utilisés. Toutes les transfections étaient réalisées à la concentration de 11,1 mmol/l de glucose. L'ADN et la solution de DOTAP sont initialement dilués dans du tampon comprenant (HEPES 20mM et du NaCl 0,15M pH 7,4). Les solutions sont soigneusement mélangées et homogénéisées à la pipette avant d'être incubées pendant 15 minutes à température ambiante. Les cellules sont préalablement rincées deux fois avec du milieu de culture sans sérum avant d'être incubées avec le mélange dans 1 ml de milieu de culture sans

sérum pendant 5 heures à 37°C. Le milieu est ensuite remplacé par 4 ml de milieu avec sérum. La lyse des cellules s'effectue 30 à 48 heures après la transfection. Les protéines totales sont dosées par la méthode de détection selon Bradford (Biorad). L'expression CAT est détectée par le système ELISA (CAT ELISA, Boehringer Mannheim) suivant le protocole du kit. Les activités luciférases, étaient réalisées suivant le protocole recommandé du kit de détection « dual luciferase » lorsque le vecteur pRL-CMV était utilisé, sinon suivaient les procédures courantes de détection.

2. Préparation des extraits protéiques nucléaires.

Toutes les procédures d'extraction sont réalisées entre 0 et +4°C. Toutes les solutions utilisées dans cette préparation sont gardées à +4°C et contiennent les inhibiteurs de protéases suivants : PMSF 0,5 mM, bestatine 5 µg/ml, aprotinine 5µg/ml, pepstatine 5µg/ml et leupeptine 5µg/ml. Le dosage des protéines est effectué à 595 nm selon la méthode Bradford : 100 µl d'échantillons à doser dans 2 ml de réactifs « protéin assay Biorad » (Biorad) dilué au 1/5 avec du tampon Tris-Hcl 0,1 M pH 8.

2. 1. Préparation des extraits nucléaires de cellules transfectées.

Les extraits de protéines nucléaires ont été obtenus à partir des cellules C33 transfectées suivant le protocole modifié d'après celui initialement décrit par Gorski et ses collaborateurs (1986). 48 heures après la transfection, les cellules ($4-10 \cdot 10^7$) sont lavées deux fois avec du PBS, puis centrifugées à 6000 tours/ minutes (tr/mn) pendant 10 minutes à +4°C. Le culot cellulaire est resuspendu dans 500 µl de tampon HNB (sucrose 0,5M, Tris-Hcl 15mM pH 7,5, KCl 60mM, EDTA 0,25mM pH 8, EGTA 0,125 mM, spermidine 0,5mM, spermine 0,15 mM, DTT 1mM). Dans le mélange est ajoutée 250 µl de la solution

NP40 1% (diluée avec du tampon HNB). Les noyaux sont ensuite culotés, en centrifugeant la solution à 6000 tr/mn pendant 3 minutes à +4°C. Avec précaution, le culot est resuspendu dans 100µl de tampon NEB1 (HEPES 20 mM pH 7,9, glycérol 25%, MgCl₂ 1,5mM, EDTA 0,25mM pH 8, EGTA 1mM, DTT 1mM, NaCl 0,14M). Dans ce mélange, est rajouté 30 µl de NaCl 0,7M complémenté avec du tampon NEB1. Après 30 minutes d'une agitation lente et homogène à +4°C, le mélange est centrifugé pendant 20 minutes à 10 000g à +4°C. Le surnageant est alors récupéré et conservé en aliquots à -80°C. La concentration en protéine est mesuré par le système de dosage de protéine par la technique de Bradford.

2.2. Préparation des extraits nucléaires des cellules en culture HIT-T15.

Les cellules sont cultivées dans une flasque T150 jusqu'à ce qu'elles atteignent 80% de confluence. Elles sont ensuite lavées avec 10 ml de tampon TBS (PBS) (Constitution). Les cellules détachées de la surface de la boîte, sont transférées dans un tube conique falcon de 15 ml, puis ensuite centrifugées à 2000 tours/ minutes (tr/mn) à + 4°C.pendant 10 minutes. Le culot est alors repris dans un volume de 1 ml de tampon TBS, par des reflux répétés à la pipette. Le mélange est alors transféré dans un tube eppendorf de 1,5 ml, puis centrifugée dans les mêmes conditions. Le culot est resuspendu dans 800 µl de tampon A (HEPES 10mM, KCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, EGTA 0,1 mM, DTT 1mM, et les inhibiteurs de protéases). Le mélange est incubé dans la glace pendant 15 minutes, puis vigoureusement agité quelques secondes au vortex après l'ajout de 50 µl Nonidet NP-40 (Sigma-Aldrich). Le mélange est centrifugé à 10 000g pendant 30 secondes à +4°C. Le culot de noyaux est resuspendu dans 100 µl de tampon B froid (HEPES 20 mM, NaCl 20 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1mM, DTT 1mM, et les inhibiteurs de protéases). Le mélange est ensuite vigoureusement homogénéisé à

+4°C puis centrifugé à 10000g à +4°C. Le surnageant est aliquoté et conservé -80°C . Les protéines sont ensuite dosées selon la méthode Bradford.

3. Analyse de la protéine HNF1 α par Western Blot.

Le protocole modifié qui suit provient de celui décrit par Hainault et ses collaborateurs (1991). 20 μ g d'extraits nucléaires sont déposés dans un gel non dénaturant de polyacrylamide de 7 ou 10% (gel préparé Biorad, life science research, CA), puis migrés pendant 1,5 heures à 80 volts. Le gel est ensuite transféré sur une membrane de nitrocellulose (Schleicher) toute la nuit à +4°C. La détection de protéines dans la membrane s'effectue par le rouge de Ponceau. Après rinçage à l'eau, la membrane est alors incubée pendant trente minutes avec du tampon PBST (PBS, 0,1% tween 20) contenant 5% de lait en poudre écrémé et non filtré. Après deux lavages successifs pendant 10 minutes avec du PBST, la membrane est incubée pendant une heure avec les anticorps polyclonaux primaires de lapin reconnaissant le domaine Nt de la protéine HNF1 α (rHNt-283). Les anticorps sont dilués au 1/1000 dans du PBST complétement par 10% de sérum de veau foetal. La membrane est ensuite lavée deux fois avec du PBST pendant 10 minutes et incubée pendant une heure cette fois avec les anticorps secondaires polyclonaux HRP dirigé contre ceux de lapin dilués au 1/8000 dans du PBST complétement avec 10% de sérum de veau foetal. La membrane est finalement lavée trois fois avec du PBS. La révélation par chimioluminescence a été réalisée en suivant strictement le protocole de détection préconisé par le kit de détection ECL (Amersham).

4. Retard sur gel.

Cette technique a été utilisée pour caractériser les protéines se fixant sur les séquences désoxyribonucléiques. Pour chaque extrait, un volume contenant 10 μ g de protéines nucléaires sont incubées (dans la glace) pendant 20 minutes dans du tampon NEB1

complémenté avec (NaCl 0,21M, MgCl₂ 5mM, spermidine 5mM) avec 1,5 µg de poly (dI)(dC) et 1 µg d'ADN de sperme de saumon (après sonication) pour la compétition non spécifique. Après l'ajout de 0,75 ng de l'oligosonde double brin marquée au [γ -³²P], le mélange est incubé dans la glace pendant 5 minutes. Le mélange est rapidement centrifugé après l'incubation et les complexes ADN-protéines sont séparés de la sonde libre par électrophorèse en gel de polyacrylamide à 6%, TBE 0,25X, pendant 2 heures à 5 V/cm sous 150V. Après fixation, dans 10% acide acétique/ 10% éthanol, le gel est séché sous vide à 80°C pendant 12-36 heures et ensuite exposé par autoradiographie.

RESULTATS

Publication 1

**Anatomy of a homeoprotein revealed by the
analysis of human MODY3 mutations**

Martine Vaxillaire, **Amar Abderrahmani**, Philippe Boutin, Bernard Bailleul,
Philippe Froguel, Moshe Yaniv and Marco Pontoglio.

accepté dans *the Journal of Biological Chemistry*.

Anatomy of a homeoprotein revealed by the analysis of human MODY3 mutations

Martine Vaxillaire^{¶§‡}, Amar Abderrahmani[§], Philippe Boutin[§], Bernard Bailleul[§],
Philippe Froguel[§], Moshe Yaniv^{¶*} and Marco Pontoglio[¶]

[¶] Unité des Virus Oncogènes, URA 1644 du Centre National de la Recherche Scientifique, Département des Biotechnologies, Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

[§] Institut de Biologie de Lille, UPRESA 8090 du Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille, France

[‡]Present address: Institut de Biologie de Lille, UPRESA 8090 du Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille, France.

*Corresponding author: Tel.: 33 1 45 68 85 12; Fax: 33 1 40 61 30 33; E.mail: yaniv@pasteur.fr

Running title: MODY3 mutations affect transcriptional activity of HNF1 α

SUMMARY

Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha (HNF1 α) is an atypical dimeric homeodomain-containing protein that is expressed in liver, intestine, stomach, kidney and pancreas. Mutations in the HNF1 α gene are associated with an autosomal dominant form of non-insulin-dependent diabetes mellitus called Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY3). More than 80 different mutations have been so far identified, many of which involve highly conserved amino acid residues among vertebrates HNF1 α . In the present work, we investigated the molecular mechanisms by which MODY3 mutations could affect HNF1 α function. For this purpose, we analysed the properties of ten mutants resulting in amino acid substitutions or protein truncation. Some mutants have a reduced protein stability whereas others are either defective in the DNA binding or impaired in their intrinsic transactivation potential. Three mutants, characterized by a complete loss of transactivation, behave as dominant negatives when transfected with the wild-type protein. These data define a clear causative relationship between MODY3 mutations and functional defects in HNF1 α transactivation. In addition, our analysis sheds new light on the structure of a homeoprotein playing a key role in pancreatic β cell function.

INTRODUCTION

Hepatocyte nuclear factor 1 (HNF1 α or LF-B1) was initially characterized as a transcriptional regulator of a large set of hepatic genes including albumin, β fibrinogen and α -1 antitrypsin (1-3). It is highly conserved among vertebrates, *e.g.* there is a 94% amino acid identity between rat and human proteins (4). HNF1 α is an atypical homeoprotein that binds as a dimer to palindromic cis-acting DNA elements related to the GTTAAT_nATTAAC consensus sequence. HNF1 α and its close homologue HNF1 β (vHNF1 or LF-B3) constitute a unique subfamily of homeoproteins. The two proteins share strong homologies in the dimerization and DNA binding domains, and can form heterodimers that bind to the same DNA sequences (5,6). All the residues essential for DNA recognition are located in the 281 N-terminal amino acids of these proteins. The dimerization domain was mapped to the first 33 N-terminal amino acids (2,7). This region can be bound by DCoH (Dimerization Cofactor of HNF1), a small protein of 11 kDa which reduces the exchange rate of HNF1 molecules in both homodimer and heterodimer configurations (8). DCoH was shown to be identical to 4 α -carbinolamine dehydratase, an enzyme that accelerates the regeneration of tetrahydrobiopterin (9,10). HNF1 α contacts its cognate sites via an extra-large homeodomain (81 amino acids), consisting of four alpha helices with a loop of 16 amino acids, instead of the usual 3, between the helices 2 and 3 (11-13). A conserved sequence of 85 amino acids located between the dimerization domain and the homeodomain, previously defined as the B domain, is necessary for high specificity DNA recognition (7,14). It was suggested to share a weak homology with the POU-A box ; however this homology does not comprise the POU domain recognition helix and it is not spaced correctly relative to the homeodomain. This region is highly conserved in both HNF1 α and HNF1 β of different species, and we will refer to it as the HNF domain. Finally, the C-terminal transactivation domain extends from amino acid residue 282 to 631 including two proline rich (29%) and a serine rich (26%) regions. While initially assumed to be liver specific, further studies have shown that HNF1 α is not restricted to hepatocytes, but is expressed in epithelial cells of the intestine, stomach, kidney proximal tubules and pancreas (15,16). The expression of HNF1 α in the pancreas raised the possibility that it may be involved in the transcriptional regulation of pancreatic genes.

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is a subtype of Non-Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM) inherited as an autosomal dominant genetic disease(17). Affected individuals are characterized by a primary insulin secretion defect, that generally becomes clinically apparent before 25 years of age, without insulin resistance (18,19). MODY is a genetically heterogeneous disease that can be accounted for by at least 3 major loci called *MODY1*, *MODY2* and *MODY3*. They were initially mapped by linkage

analysis to chromosomes 20q (20), 7p (21) and 12q (22), respectively. Positional cloning and search for candidate genes have shown that they correspond to HNF4 α (23), glucokinase (24) and HNF1 α (25) respectively. HNF4 α belongs to the steroid/thyroid hormone receptor superfamily of transcription factors and was shown to be a transcriptional regulator of HNF1 α in hepatoma cell lines (26). Glucokinase is a key enzyme of the pancreatic glycolytic pathway, known to be a glucose sensor for regulating insulin secretion in response to glucose (27). The molecular basis of the β cell insulin secretion defect in MODY1 and MODY3 is not known. The clinical course of MODY3 subjects is characterized by a more severe diabetes than MODY2, requiring oral hypoglycemic agents or insulin treatment (18,19). MODY3 represents the most common cause of early-onset NIDDM. In fact, it has been estimated to account for 30% of all MODY cases in France (22). Furthermore, the prevalence of the disease may be substantially higher than previously thought, given the wide range of the age of onset and the possible mis-diagnosis of patients as IDDM or NIDDM. Recent genetic studies of MODY3 kindreds have revealed a large spectrum of mutations in the HNF1 α gene. So far, more than 80 different mutations (missense, nonsense or frameshift) have been identified in the HNF1 α sequence in association with the MODY3 phenotype (28-33). These mutations are localized along the different functional domains of the protein and involve highly conserved amino acid residues, suggesting that MODY3 is accounted for by impaired HNF1 α function. However, the exact nature of the molecular defects and the mechanisms that explain the dominant transmission of the mutations are unknown. These mutations could generate proteins that might interfere with the function of the protein encoded by the wild-type allele from the other homologous chromosome. To investigate this issue, we analysed the transcriptional activity of a number of representative MODY3 mutations. This was done by transient transfection of native and/or mutant human HNF1 α with a target reporter gene. Our results revealed that most of the mutations strongly affected protein stability. Some of them were defective in their DNA binding capacity or in transactivation potential. Finally, several but not all of the mutants behaved as dominant negative effectors on the wild-type protein.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plasmids and Site directed mutagenesis. In vitro mutagenesis was carried out on full length human HNF1 α expression vector (34) from double-stranded 5,981 kb plasmid DNA using high-fidelity thermostable *Pfu* DNA polymerase (QuikChangeTM, Stratagene, La jolla, CA). The full length and truncated mutants in the RSV-driven human HNF1 α expression plasmid were generated by PCR elongation using two oligonucleotides primers each complementary to opposite strands of the vector. The oligonucleotides used for mutagenesis were:

5' - CGAAGATGGTCAAGTCCTGCCTGCAGCAGCACAATATTCCACAGCGGGAGG-3' (mutant Y122C) ; 5' - GCAGCAGCACAATATTCCACAGCAGGAGGTGGTCGATACCAC-3' (mutant R131Q) ; 5' - GGCCTCAACCAGTTCCACCTGTCCCAACACC-3' (mutant S142F) ; 5' - TCCCATGAAGACGCAGAAAGCAGGCCGCCCTGTATACCTGGTACGTC-3' (mutant R159Q) ; 5' - CCTGGTAIGTCCGCAAGCAGTGAGAGGTGGCGCAGCAGTTC-3' (mutant R171ter) ; 5' - GGAGGAACCGTTTCCAGTGGGGCCAGCATCCCAGCAAATATTGTTCC-3' (mutant K205Q) ; 5' - GGTTTGCCAACCGGCCAAAGAAGAAGCTTTCCGGCAC-3' (mutant R272H) ; 5' - CAGGCACAGAGTGTGCTGGTGATCAACAGCATGGGCAG-3' (mutant P447L). The mutated nucleotides are underlined. In order to check the identity of each mutant plasmid by enzymatic digestion, we introduced in the vicinity of the point mutation some conservative nucleotide changes, when that was possible, to create or eliminate a restriction endonuclease site. We checked that nucleotide changes did not generate rarely used codons.

For the construction of the two frameshift/deletion mutants, sense (5'-CGT AAGCTTGCGGTAGAGGA-3') and antisense (5'-AAGTCTAGACTCACTGGAG GCCTGTGTCTGAGGT-3') oligonucleotides modified to create a HindIII restriction site at position -20 and a XbaI site at position +1630 respectively, based on position +1 for the ATG of human HNF1 α cDNA, were used as primer set for the amplification of a TG deleted fragment at codons 547-548 and a fragment containing one C insertion at codon 289. The TG deletion and the in frame stop codon are in the antisense primer. A second set of oligonucleotides with the C insertion at position +739 (sense: 5'-TCCC-CATCACAGGCAC-3') and position +858 (antisense: 5'-CTGGGGGGGGGGCCCG-CTG-3') were used as internal primers with the first set to yield the P291fsinsC mutated fragment. The HindIII-XbaI digested fragments were inserted downstream the Cytomegalovirus promoter in a pCDNA3 expression vector. Each of the ten mutant plasmids was verified by DNA sequencing of proximal promoter and full length HNF1 α coding sequence to confirm the introduction of the desired mutations and to exclude other sequence changes.

Cell line, transient transfection, and CAT assay. The C33 human epithelial cervical carcinoma cells (35), which lack endogenous HNF1 α expression, were cultured and transfected as previously described (34).

For each transfection, a total of 5 μ g of DNA was used including 1 μ g of the p β 283 reporter plasmid (36), varying amounts of HNF1 α expression vectors, and 1 μ g of pRSV- β -galactosidase construct for normalization of transfection efficiencies. Amounts from 10 ng to 1 μ g of wild-type or mutant HNF1 α expression vectors were tested and the total quantity of plasmids was maintained constant by adding suitable amounts of a pGEM3 plasmid. 40 to 48 h after transfection, the cells were harvested and total cell extracts were prepared. CAT and β -galactosidase activities were measured as previously described (37). Each experiment was repeated at least three to five times with at least two different plasmid preparations.

Electrophoretic mobility shift assays with nuclear extracts from transfected cells.

C33 cells (2.5×10^6 cells) were seeded into 10 cm Petri dishes and transfected with similar amount (2.5 μ g) of native or mutant HNF1 α plasmids. For EMSA analysis, a CMV enhancer-driven E2TR expression plasmid (38) was co-transfected with HNF1 α plasmid in similar amount (2.5 μ g) as an internal marker for transfection efficiency as well as reproductibility of nuclear extract preparation. Nuclear extracts from the transfected cells were prepared from two 10cm Petri dishes essentially as previously described (39) (34) The protein concentration was measured by Bradford assay. Single-stranded oligonucleotide (5'-CTTTAGTTAATATTTGACAGTTT-3'), corresponding to the HNF1 α DNA-binding element of the rat β -fibrinogen promoter, was end-labeled by using [γ - 32 P]dATP and T4 polynucleotide kinase, then annealed with an excess (1.5 fold) of cold complementary oligonucleotide. For detection of E2TR DNA-binding activity, the oligonucleotides were as follows: 36Y1 (5'-CTAGACAACCGATTTTCGGTTGT-3'), 36Y2 (5'-CTAGACAACCGAAATTCGGTTGT-3'); 36Y1 was end-labeled as described above. Binding reactions were performed as previously described (34)

Western blot analysis. C33 nuclear extracts were prepared from transfected cells as described above. Twenty micrograms of protein extract were resolved by 7% or 10%-SDS-PAGE and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After control of equal loading by Ponceau staining, the membranes were incubated in PBS containing 10% dried milk for 30 min, and subsequently washed twice for 10 min in PBST (PBS supplemented with 0.1% Tween 20) and once for 10 min in PBS. The membranes were then incubated with a 1:1000 dilution of polyclonal rabbit anti-HNF1 antibody, rHNFt-283 as previously described (40).

Metabolic labeling of transiently transfected cells and Immunoprecipitation. C33 cells were transfected as described above with 10 µg of native or mutant (Y122C and R159Q) HNF1α plasmids. To analyze protein stability, 40 to 48 h after transfection, the cells were pulse-labeled for 15 min with ³⁵S containing amino acids (cysteine and methionine, Tran³⁵S-label, ICN) and chased for various lengths of time in the presence of excess nonradioactive cysteine and methionine added to the DMEM plus 3% dialysed fetal calf serum culture medium. The cells were washed twice with ice-cold PBS, then all subsequent steps were performed at 4°C. The cells were lysed in HNB buffer + 1% Nonidet NP40 as described above for nuclear extract preparation. The nuclei were resuspended in 30 µl of cold RB buffer (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM HEPES pH 7.5, 2 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM β-mercaptoethanol, 0.2 mM PMSF, 2 µg/ml bastatin, 2 µg/ml aprotinin, 2 µg/ml pepstatin), then treated with 3 µl of DnaseI (10 U/µl) in order to reduce the viscosity by incubating for 5 min on ice with the enzyme in presence of 4.5 mM MgCl₂. Then the digestion of DNA was stopped by adding 6 µl of 166 mM EDTA and the nuclear extracts were resuspended in 120 µl of RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% NP40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris (pH8.0)) and subjected to immunoprecipitation with saturating amounts (2.5 µl) of rHNT-283 antibody according to standard procedures (41).

Immunodetection in transfected cells. C33 cells were grown and transfected onto 18 mm glass coverslips as described above. To assess the cellular localization of each mutant and wild-type HNF1α protein, we performed indirect immunofluorescence on the fixed cells. The cells on the coverslip were fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde at room temperature, rinsed in PBS, then permeabilized with 1% Triton X-100, rinsed again in PBS, and incubated with the primary anti-HNF1α antibody, rHNT-283, in the same conditions as those described for the immunoblot analysis. The coverslips were then incubated with a fluorescein coupled anti-rabbit antibody (Amersham) in PBST + 10% FCS, and rinsed twice in PBST, then in PBS, and mounted in anti-fade medium for viewing on a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope.

RESULTS

Construction of HNF1 α mutants. Based on previous structural and functional studies of HNF1 α and HNF1 β , predictions could be made about the activity of some of the MODY3 mutations. It has been shown that deletions of the activation domain generate proteins that can still dimerize, bind DNA and behave as dominant negative mutants on the activity of the normal protein (34, 42). However, the properties of point mutations were difficult to predict since no single amino acid substitutions have been previously analysed. For this reason, we chose to evaluate the properties of ten mutants in different domains of HNF1 α (Figure 1). Seven of them were point mutations resulting in amino acid substitution (Y122C, R131Q, S142F, R159Q, K205Q, R272H, P447L) ; one was nonsense mutation (R171ter) and two were frameshift mutations (P291fsinsC/ter, T547E548fsdelTG/ter) resulting in protein truncation. These mutations are responsible for the MODY3 phenotype in different families. The seven missense mutants and the N-terminal truncated protein (R171ter) were introduced into the human HNF1 α cDNA sequence, and cloned into an expression vector under the control of the Rous sarcoma virus long terminal repeat (RSV LTR). The two C-terminal frameshift mutations of the same cDNA were introduced in a pCDNA3 expression vector under the control of a Cytomegalovirus promoter. The constructs were sequenced in their promoter and coding portions to ensure that additional mutations were not introduced during the mutagenesis step.

Subcellular localization of HNF1 α mutants

To investigate whether HNF1 α mutations affected nuclear translocation, we transfected the different mutants in C33 cells and monitored the subcellular localization by indirect immunofluorescence. Almost all of the mutant proteins tested gave a nuclear signal with antibodies prepared against the N-terminal half of HNF1 α , showing that they accumulate in the nucleus (Fig 2). For some of them (Y122C, S142F, R272H and P291fsinsC(ter)), in a certain percentage of transfected cells, a faint signal was also detected in the cytoplasm. R171ter was on the contrary the only mutant that was abundantly localized both in the cytoplasm and in the nucleus. These results suggest that the nuclear import is normally operating for most the mutants tested.

HNF1 α mutants are expressed at different levels.

In order to evaluate a possible defect in protein stability we first evaluated the expression levels of the mutant proteins in the transfected cells by Western blot analysis. As shown in Figure 3A, protein levels of mutants Y122C, R159Q, K205Q and P447L were reduced compared to the wild type. Conversely, mutants R131Q, S142F and R272H retained a relatively normal expression level. In agreement with previous studies, HNF1 α protein

migrates as a slightly diffuse band with an apparent molecular weight ranging roughly between 92 to 98 kD (40). Strikingly, P447L was the only mutant that reproducibly appeared as a sharper band. A specific HNF1 α fragment was detected with an N-terminal anti HNF1 α antibody for the mutant R171ter as a weak band migrating with an apparent molecular weight below 30 kD. Finally, mutants P291fsinsC and T547E548fsdelTG were overproduced relative to the wild-type protein.

To test if the reduced protein levels obtained for Y122C and R159Q resulted from decreased stability of these mutant proteins, we performed pulse-chase experiments in transfected C33 cells followed by immunoprecipitation of mutant proteins. Upon very short labeling times (15 min), and before the chase, the protein level of both mutants was only partially reduced as compared to the wild-type protein, indicating that the dramatically reduced protein levels observed at steady state could not be explained by a possible defective protein synthesis. Indeed, after the chase, the decline of both mutant proteins was much more pronounced when compared with that of the wild-type protein (Figure 4 and results not shown). From these data, we have estimated that the wild-type HNF1 α half-life in C33 cells is about 12 hrs whereas for the mutant proteins is only of 2.5 hours.

Several HNF1 α mutants are defective in DNA binding. Next, we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) to assess the specific DNA binding activity of the different mutants. As shown in Figure 3B, a specific DNA binding activity was detected for mutants Y122C, R131Q, R159Q, K205Q, R272H and P447L. The first five proteins showed the same mobility than that obtained with the wild-type HNF1 α protein. Conversely, mutant P447L showed a slightly different migration pattern characterized by a band which migrated reproducibly slightly faster than the wild-type HNF1 α band. The two C-terminal deletion mutants clearly showed a strong increase in the DNA binding activity that reflected their increased expression level. These proteins showed a faster mobility of the retarded complexes as previously reported for C-terminal truncation mutants and were able to heterodimerize with a cotransfected full-length wild-type protein (data not shown) and (43). As expected, no binding activity was detected for mutant R171ter. Surprisingly, S142F lacked any DNA binding activity. In order to monitor the transfection efficiency and the quality of nuclear extract preparation, we included in the transfection the Papillomavirus-encoded E2TR protein expression vector (38). Figure 3C shows that E2TR DNA binding activity was equally detected in each transfection. Comparison of the intensity of the retarded bands relative to the level of expressed proteins demonstrated that the two C-terminal truncated mutants bound DNA at least as well as normal HNF1 α . On the contrary, mutant R272H had reduced DNA binding activity when compared with the steady state proteins levels. Finally, Y122C, R159Q, K205Q and P447L had very low binding activities compatible with their low level of

expression, whereas R131Q showed only a small decrease in DNA binding and expression level.

The transactivation potential of HNF1 α mutants. To assess the transactivation potential of the HNF1 α mutants as compared to that of the native protein, we transfected increasing amounts of the HNF1 α expression vector together with a CAT reporter gene under the control of the chimeric β 28 promoter containing three HNF1 α binding sites upstream of the rat β -fibrinogen TATA box sequence (construct p β 28₃ (36)). Transfections were performed in the human epithelial C33 cells which lack any endogenous HNF1 expression. In agreement with previous studies, HNF1 α activated this reporter plasmid up to 50-70 fold. No appreciable effect (less than 2 fold) was observed by further addition of DCoH encoding plasmid (data not shown). The capacity of increasing amounts of mutant HNF1 α expression vectors to activate the reporter was compared to the wild-type protein in the same experiment. Figure 5 shows the different patterns of transactivation we obtained for the ten mutants analyzed. The profiles shown are representative of 3-5 experiments and reveal either a markedly decreased activity, particularly at low input of transfected HNF1 α encoding plasmid, or no transcriptional activity. The ten mutants can be grouped as follows :

Class I : transactivation defect brought about by reduced mutant proteins stability coupled with a possible decrease in DNA binding. Y122C activated transcription of the CAT reporter gene at significantly lower levels than those obtained with the wild-type HNF1 α . This was particularly true in the lower range of transfected plasmid (10-200 ng). Activation levels similar to those of the wild-type protein (65 to 70-fold) were obtained when 1 μ g of mutant DNA was transfected. However, while the transactivation by the wild-type protein approached a plateau at 200 ng of plasmid in most experiments, a five-fold excess of mutant protein encoding plasmid was required to reach this level of activity. Comparable profiles were obtained for mutants R131Q, R159Q, K205Q and R272H. For mutants Y122C, R159Q and K205Q, the impaired transactivation potential can be correlated with decreased mutant protein accumulation. In contrast, mutant R272H showed a decreased intrinsic transactivation brought about by a decrease in specific DNA binding whereas the protein stability was only marginally affected.

Class II : very low or no activity. S142F mutant displayed no transcriptional activity below 200 ng of plasmid transfected and very weak activation levels when 1 μ g of plasmid was transfected compared to the wild-type activation level (11 ± 3.5 fold vs 65 ± 19.7 fold, mean \pm standard error of the mean, n=4). A similar profile was obtained for R171ter mutant, as could be expected. Surprisingly, P447L, a point mutation in the transactivation domain, had almost no transactivation function, even when 1 μ g of DNA was transfected. As discussed below, mutants P291fsinsC(ter) and T547E548fsdelTG(ter) also belong to this class.

The residual transcriptional activity of the different mutants can be compared by considering the transactivation efficiency obtained in the linear range of the dose-response curve, namely when 50 ng of plasmid were transfected. As shown in Figure 5, mutants S142F, R171ter, P447L, P291fsinsC(ter) and T547E548fsdelTG(ter) exhibited very weak activation capacities. On the other hand, only two mutants showed a transactivation capacity higher than 20% of that of the wild-type protein. These mutants were Y122C and R131Q with a transactivation capacity of ($22\% \pm 2\%$) and ($52\% \pm 6\%$) respectively. Three others, K205Q, R272H and R159Q exhibited around 10% of the wild-type activity.

Several mutant proteins can affect the activity of the wild-type protein. We next examined which of the mutations may have generated dominant negative effectors. To this end, we cotransfected a low constant amount (50 ng) of the wild-type encoding plasmid with increasing amounts of mutant expression vector (50 ng to 1 μ g). Class I mutants, i.e. Y122C, R131Q, R159Q, K205Q and R272H, did not interfere with the wild-type HNF1 α activity but rather increased slightly the reporter activity (see Figure 6A for an example). The mutants grouped in class II could be further subdivided into two subgroups. In the first, that we called IIa, increasing amounts of plasmid mutants, including S142F and R171ter, only marginally changed the activity of the cotransfected wild-type protein (Figure 6B, and results not shown). On the contrary, mutants belonging to subgroup IIb decreased the activity of the coexpressed normal protein almost to baseline. These included P447L and the two C-terminal frameshift mutants P291fsinsC(ter) and T547E548fsdelTG(ter) (see Figure 6C for an example).

DISCUSSION

The transcriptional activation by MODY3 mutants. MODY3 mutations in HNF1 α are probably one of the largest set of known mutations affecting a homeoprotein. In fact, more than 80 different mutations have been so far identified in the human HNF1 α gene. Most of the mutations affect amino acid residues that have been conserved during evolution in all HNF1 α and HNF1 β genes. Missense mutations concern all the functional domains of HNF1, however the highest mutation density occurs in the HNF and homeodomains (Table 1). This suggests that protein domains that are involved in DNA binding are more sensitive to single amino acid changes than the transactivation domain. The present work aimed to investigate how MODY3 mutations could affect HNF1 α function. Ten mutants located in different functional domains of HNF1 α have been monitored for nuclear localization, protein stability, DNA binding and transcriptional activation.

Our results demonstrate that all the expression vectors coding for MODY3 mutant proteins present a defective HNF1 α transcriptional function in transient transfection studies. In this respect, we have shown that some mutants have a reduced protein stability whereas others are either defective in the DNA binding or impaired in their intrinsic transactivation potential. Three mutants, characterized by a complete loss of transactivation, have also acquired a dominant negative potential on the wild-type protein in the transactivation assay.

Involvement of the HNF domain and homeobox domain in DNA binding. Among the different point mutants in the HNF domain, S142F mutant is the only one that totally failed to activate transcription, presumably because it failed to bind DNA. The HNF domain was shown to enhance sequence specific DNA binding and to mediate the formation of DNA-stabilized protein dimers (14). In fact, the HNF domain seems to impose an oriented 2-fold symmetry on the dimer molecule, thus defining a reciprocal orientation of the two homeodomains in the bound dimer. In this way, the HNF region might increase the binding site specificity by permitting the recognition of only those DNA sequences containing properly oriented half-sites. In addition, the HNF domain could interact with the natural cognate DNA sequence, for example with the strictly conserved GT residues immediately 5' to the TAAT recognition sequence. Indeed, UV crosslinking experiments suggest that the HNF domain may be in close proximity to the target DNA (T. Chouard, unpublished observations). From this, we speculate that the amino acid change in the S142F mutant could have disturbed a cooperative interaction between the HNF domain and the homeodomain of HNF1 α . The present data further reinforce the role of the 85 amino acids containing HNF domain in high affinity specific DNA binding. Since the homology of this domain with the POU specific domain is not significant, we suggest that it be considered as a new conserved

motif outside the homeodomain. It will be interesting to discover new atypical homeogenes containing this HNF motif and to search for its possible occurrence in less developed organisms.

Mutant R272H activates only weakly, compared to its expression level. It seems that R272 lies at a critical position, in helix 3 of the homeodomain, which is part of the WFXNXR motif found to be strictly conserved among all known homeodomain sequences. In conclusion, both the homeodomain and the HNF domain contribute to the strength of DNA binding by HNF1 α and are crucial *in vivo*. Such an interdependence could influence the selection of target sites by homeobox proteins.

Negative dominance of some mutant proteins. It is worth noting that the three mutants that have lost the transactivation potential but that still were able to bind efficiently DNA and dimerize had a strong dominant negative effect in the co-transfection/transactivation assay. The dominant negative effect, in these cases, is very likely due to the formation of a heterodimeric inactive complex. Particularly interesting is the case of the mutant T547E548fsdelTG that results in a C terminal deletion of the last 85 amino acid residues. Previous studies have shown that progressive unidirectional deletions of the C-terminal domain resulted in a gradual decrease in the transactivation potential of the protein. In fact, deletion mutants of the last 62 and 114 amino acid residues retained a specific activity of 75% and 55% relative to the intact protein, respectively (43). However, the mutant T547E548fsdelTG is characterized by a much more drastic effect, the mutation not only abolished transactivation, but also gave rise to a dominant negative protein. The C-terminal domain of this mutant contains four unrelated additional amino acids introduced by the frameshift, which may cause the protein to adopt an inactive conformation. Alternatively, HNF1 α residual activity may be more sensitive to the position of protein truncation than previously thought.

A surprising result came from mutant P447L which fails to activate transcription, acts as a dominant negative effector and shows a particular migration pattern in both EMSA and Western blot analysis. It seems that the amino acid substitution from proline to leucine leads to an important conformational change of the protein. Proline has a major effect upon protein structure since the nitrogen atom of the amino group is incorporated into a ring. The peptidyl-prolyl amide bond can exist in either *cis* or *trans* stereochemical configurations, so that a proline residue disrupts the usual organization of the backbone of a polypeptide chain by introducing a constraint in the direction of the chain. It is interesting to note that another proline residue changed into leucine at position 519 in the transactivation domain of HNF1 α has been reported as a mutation responsible for MODY3 (28). Somewhat similar transdominant negative effects have been reported for some mutants in the ligand-dependent transactivation domain, AF2, of various steroid hormone receptors. A point mutant in AF2



progesterone receptor region, PRBE911A, has been shown to inhibit transactivation by a cotransfected wild-type receptor without influencing hormone- and DNA-binding affinities (44). A carboxyl-terminal deleted form of glucocorticoid receptor, called Gr β , has also been claimed to exhibit a dominant negative effect (45). It is possible that the P447L mutant, via the heterodimerization with the wild-type protein, gives rise to a complex that is unable to activate transcription. The aberrant conformation of such a complex could prevent protein contacts essential for transcriptional activation. All these observations suggest that the function of the transactivation domain of HNF1 α could rely on its dimeric structure.

HNF1 α mutations and MODY3 phenotype. The first two classes of mutants (I and IIa) showed decreased or no transactivation respectively whereas class IIb mutants showed strongly decreased transactivation and behaved as dominant negative mutants. These different behaviors should predict important consequences on the clinical course of the pancreatic dysfunction of individuals carrying distinct types of mutations. MODY3 patients heterozygous for mutations in HNF1 α belonging to the last class of mutants (IIb) should have a more pronounced reduction of HNF1 α activity compared to patients carrying mutations of class I or IIa. This should be particularly true for carriers of the two C-terminal truncated proteins that accumulated to levels much higher than that of the wild-type protein and readily inhibited the activity of the wild-type protein. However, the analysis of the clinical data did not show any clear correlation between the severity of the phenotype of MODY3 patients and the nature of their mutations (M. V. unpublished observations). Such an apparent paradox is further complicated by the observation that MODY3 is inherited as a dominant trait in humans, whereas in mice, the same type of pancreatic dysfunction, is inherited as a recessive trait. In fact, a null mutation in the murine HNF1 α gene (46) gives rise to a severe insulin secretion defect only in homozygous animals whereas the heterozygous mice are normoglycemic and have a normal glucose tolerance (47). We should bear in mind that the affected mice are nullizygous, since the mutation consists of a deletion that prevents the synthesis of any trace of HNF1 α protein. How can we explain these discrepancies? The lack of any correlation between the clinical data and the dominant negative nature of the mutations would suggest that a unique mechanism is at the basis of the MODY3 phenotype.

One possibility is that all MODY3 mutant proteins behave in reality as dominant negative effectors in MODY3 patients. In this case, however, we have to assume that transient transfection experiments can not reproduce the exact conditions occurring in the pancreatic β -cells. We have to postulate that even in the presence of minimal amount of transfecting plasmid, a saturating intranuclear level of normal HNF1 α protein will be produced in the successfully transfected cells. Mutant proteins, that are either unstable or unable to bind DNA will not prevent the wild-type protein from binding to the test promoter. Only mutants that

generate stable proteins that bind DNA without activating transcription will behave as dominant negative in *ex-vivo* assays if this hypothesis is correct.

Alternatively, one could suggest that the negative dominance is not the mechanism at the basis of the dominant inheritance of MODY3. In this case we should postulate that HNF1 α protein levels are in excess in mice but not in humans. If this is true, in a MODY3 patient, when the increased demand for β -cell function occurs with age, the decrease HNF1 α activity might become insufficient and thus elicit the onset of diabetes. If this reasoning is correct, all the MODY3 mutations studied might in fact be merely loss of function mutations resulting in haploinsufficiency. Such an hypothesis is compatible with the identification of promoter mutations that decrease HNF1 α mRNA synthesis and with a truncation mutation at the 7th codon (33).

The discrepancy in the inheritance of the traits between mouse and human is reminiscent of what has been observed for HNF4 α /MODY1, HoxD13 (48) or Brn-3.1/Pou4f3(49). In these cases, the traits are transmitted in a dominant fashion in humans whereas they are in a recessive manner in mice. The analysis of the HNF4 α (Q268X) mutation showed a loss of function effect (50) while HNF4 α heterozygous mice showed no signs of diabetes and exhibited normal glucose tolerance. Conversely, the analysis of HoxD13 and Brn-3.1/Pou revealed a dominant negative effect of the mutated proteins.

Further experiments that can distinguish between the two alternative explanations, loss of function resulting in haploinsufficiency or formation of a dominant negative protein, should await the reconstruction of knock-in mice with different type of MODY3 mutations. In this case, one will be able to follow the level of HNF1 α activity and hopefully the transcription of target genes with age.

All together, our data define a clear causative association between MODY3 mutations and functional defects in HNF1 α dependent transactivation. This work also sheds new light on the role played by specific amino acid residues in the function of a homeoprotein that is involved in the maintenance of normal pancreatic β cell function.

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to Tanguy Chouard for the rHNt-283 antibody. We thank Antonia Doyen for advice on cell culture and technical assistance, Armelle Lengronne for her help in transfection experiments and Françoise Thierry for the gift of E2TR encoding plasmid and. We wish also to thank all the other members of the Virus Oncogenes Unit and are very grateful to Jonathan Weitzman for critically reading the manuscript.

FIGURE AND TABLE LEGENDS

Figure 1: Schematic representation of the HNF1 α functional domains.

The position of the ten MODY3/HNF1 α mutations analysed is indicated at the bottom of the scheme. "ter" stands for a stop codon and "fs" stands for a frameshift mutation, both resulting in protein truncation. The filled arrows show missense mutations and empty arrows show truncation mutations.

Figure 2: Subcellular localization. Subcellular localization of HNF1 α mutants was monitored by indirect immunofluorescence on fixed transiently transfected C33 cells. Polyclonal anti-HNF1 α immunoreactive proteins were detected with FITC (fluorescein isothiocyanate) labeled goat anti-rabbit immunoglobulin secondary reagent, as seen in panel A. The blue nuclear fluorescence from the DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) complexed with DNA is displayed in panel B. A superposition of FITC (green) and DAPI (electronically converted to red) stainings is shown in panel C. Phase-contrast images of the immunostained cells are shown in panel D.

Figure 3: Protein expression and DNA binding of the different mutants.

A- Western Blot analysis and immunodetection of HNF1 α wild-type and mutant proteins in nuclear extracts from transfected C33 cells. Equal quantity of nuclear proteins was analysed as detailed in materials and methods. B- Gel shift analysis of HNF1 α mutants with the β fibrinogen HNF1 binding site (see materials and methods for details). C- Gel shift analysis with a E2 DNA binding site for normalization of transfection efficiency and quality of nuclear extract preparation. Note that two retarded bands are usually seen with this papillomavirus derived E2TR transcriptional regulator. Left and right panels derive from two independent experiments using RSV LTR and CMV expression vectors, respectively. The data shown represent a typical experiment that was reproduced several times.

Figure 4: Stability of Y122C mutant compared to wild-type HNF1 α protein.

C33 cells were labeled with [³⁵S] methionine and cysteine for 15 min (time 0) and pulse-chased for various lengths of time (45, 90 and 180 min) in the presence of excess non radioactive methionine and cysteine. Samples were immunoprecipitated under normal stringency conditions using polyclonal anti-HNF1 α antibody, rHNt283, and subjected to SDS-PAGE. Nuclear extracts prepared from untransfected C33 cells were immunoprecipitated in the same conditions than for those prepared from cells transiently transfected with wild-type or mutant HNF1 α encoding plasmid and used as negative control (Mock).

Figure 5: Transcriptional activation by HNF1 α mutants.

The transactivation profiles obtained for each of the ten mutants analysed are shown as a mean \pm SE from 3 to 5 independent experiments. Expression vectors for the wild-type or mutant proteins were cotransfected with the reporter construct p(β 28)₃ CAT containing three HNF1 binding sites upstream of the β -fibrinogen minimal promoter. RSV- β GAL was included as a reference plasmid. The β -galactosidase normalized CAT activity is expressed as fold activation (vertical axis). Transactivations with expression vector encoding for WT (diamonds) or mutant (squares) are plotted against the amount (ng) of the vector transfected into C33 cells (horizontal axis).

Figure 6: Effect of mutant proteins on wild-type protein activity. The three different profiles of interference with wild-type activity are illustrated for mutants Y122C (class I), S142F (class IIa) and P447L (class IIb). Expression vectors were cotransfected with the reporter construct p(β 28)₃ containing three HNF1 binding sites. The β -galactosidase normalized CAT activity is expressed as fold activation (vertical axis). Transactivations with expression vector encoding for WT (diamonds) or mutant (squares) are plotted against the amount (ng) of the vector transfected into C33 cells (horizontal axis). Transactivations with constant amount (50 ng) of wild-type and increasing amount of mutant vector are indicated with triangular symbols. The arrows indicate the value for equimolar amount of wild-type and mutant plasmids when cotransfected. The profiles shown are representative of 3-5 experiments. Mutants R131Q, R159Q, K205Q and R272H behaved similarly to Y122C (panel A), mutant R171(ter) similarly to S142F (panel B) , and mutants P291fsinsC(ter) and T547E548fsdelTG(ter) similarly to P447L (panel C).

REFERENCES

1. Baumhueter, S., Mendel, D. B., Conley, P. B., Kuo, C. J., Turk, C., Graves, M. K., Edwards, C. A., Courtois, G., and Crabtree, G. R. (1990) *Genes Dev.* **4**, 372-9
2. Chouard, T., Blumenfeld, M., Bach, I., Vandekerckhove, J., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1990) *Nucleic Acids Res.* **18**, 5853-63
3. Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stampfli, S., Frank, R., and Cortese, R. (1989) *Cell* **59**, 145-57
4. Bach, I., Mattei, M. G., Cereghini, S., and Yaniv, M. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 3553-9
5. De Simone, V., De Magistris, L., Lazzaro, D., Gerstner, J., Monaci, P., Nicosia, A., and Cortese, R. (1991) *EMBO J.* **10**, 1435-43
6. Rey-Campos, J., Chouard, T., Yaniv, M., and Cereghini, S. (1991) *EMBO J.* **10**, 1445-57
7. Nicosia, A., Monaci, P., Tomei, L., De Francesco, R., Nuzzo, M., Stunnenberg, H., and Cortese, R. (1990) *Cell* **61**, 1225-36
8. Mendel, D. B., Khavari, P. A., Conley, P. B., Graves, M. K., Hansen, L. P., Admon, A., and Crabtree, G. R. (1991) *Science* **254**, 1762-7
9. Citron, B. A., Davis, M. D., Milstien, S., Gutierrez, J., Mendel, D. B., Crabtree, G. R., and Kaufman, S. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11891-4
10. Thony, B., Neuheiser, F., Hauer, C. R., and Heizmann, C. W. (1993) *Advances in Experimental Medicine & Biology* **338**, 103-6
11. Ceska, T. A., Lamers, M., Monaci, P., Nicosia, A., Cortese, R., and Suck, D. (1993) *EMBO J* **12**, 1805-10
12. Leiting, B., De Francesco, R., Tomei, L., Cortese, R., Otting, G., and Wuthrich, K. (1993) *EMBO J.* **12**, 1797-803
13. Schott, O., Billeter, M., Leiting, B., Wider, G., and Wuthrich, K. (1997) *J. Mol. Biol.* **267**, 673-83
14. Tomei, L., Cortese, R., and De Francesco, R. (1992) *EMBO J.* **11**, 4119-29
15. Blumenfeld, M., Maury, M., Chouard, T., Yaniv, M., and Condamine, H. (1991) *Development* **113**, 589-99
16. Emens, L. A., Landers, D. W., and Moss, L. G. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 7300-4
17. Froguel, P., Vaxillaire, M., and Velho, G. (1997) *Diabetes Reviews* **5**, 123-30
18. Byrne, M. M., Sturis, J., Menzel, S., Yamagata, K., Fajans, S. S., Dronsfield, M. J., Bain, S. C., Hattersley, A. T., Velho, G., Froguel, P., Bell, G. I., and Polonsky, K. S. (1996) *Diabetes* **45**, 1503-10

19. Velho, G., Vaxillaire, M., Boccio, V., Charpentier, G., and Froguel, P. (1996) *Diabetes Care* **19**, 915-9
20. Bell, G. I., Xiang, K. S., Newman, M. V., Wu, S. H., Wright, L. G., Fajans, S. S., Spielman, R. S., and Cox, N. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 1484-8
21. Froguel, P., Vaxillaire, M., Sun, F., Velho, G., Zouali, H., Butel, M. O., Lesage, S., Vionnet, N., Clement, K., Fougerousse, F., and et al. (1992) *Nature* **356**, 162-4
22. Vaxillaire, M., Boccio, V., Philippi, A., Vigouroux, C., Terwilliger, J., Passa, P., Beckmann, J. S., Velho, G., Lathrop, G. M., and Froguel, P. (1995) *Nature Genetics* **9**, 418-23
23. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G. I. (1996) *Nature* **384**, 458-60
24. Froguel, P., Zouali, H., Vionnet, N., Velho, G., Vaxillaire, M., Sun, F., Lesage, S., Stoffel, M., Takeda, J., Passa, P., Permutt, M. A., Beckmann, J. S., Bell, G. I., and Cohen, D. (1993) *N. Engl. J. Med.* **328**, 697-702
25. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X., Cox, N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S., Bell, G. I., and et al. (1996) *Nature* **384**, 455-8
26. Kuo, C. J., Conley, P. B., Chen, L., Sladek, F. M., Darnell, J. E., Jr., and Crabtree, G. R. (1992) *Nature* **355**, 457-61
27. Matschinsky, F., Liang, Y., Kesavan, P., Wang, L., Froguel, P., Velho, G., Cohen, D., Permutt, M. A., Tanizawa, Y., Jetton, T. L., and et al. (1993) *J. Clin. Invest.* **92**, 2092-8
28. Frayling, T. M., Bulamn, M. P., Ellard, S., Appleton, M., Dronsfield, M. J., Mackie, A. D., Baird, J. D., Kaisaki, P. J., Yamagata, K., Bell, G. I., Bain, S. C., and Hattersley, A. T. (1997) *Diabetes* **46**, 720-5
29. Glucksmann, M. A., Lehto, M., Tayber, O., Scotti, S., Berkemeier, L., Pulido, J. C., Wu, Y., Nir, W. J., Fang, L., Markel, P., Munnely, K. D., Goranson, J., Orho, M., Young, B. M., Whitacre, J. L., McMenimen, C., Wantman, M., Tuomi, T., Warram, J., Forsblom, C. M., Carlsson, M., Rosenzweig, J., Kennedy, G., Duyk, G. M., Krolewski, A. S., Groop, L. C., and Thomas, J. D. (1997) *Diabetes* **46**, 1081-6
30. Hansen, T., Eiberg, H., Rouard, M., Vaxillaire, M., Moller, A. M., Rasmussen, S. K., Fridberg, M., Urhammer, S. A., Holst, J. J., Almind, K., Echwald, S. M., Hansen, L., Bell, G. I., and Pedersen, O. (1997) *Diabetes* **46**, 726-30
31. Iwasaki, N., Oda, N., Ogata, M., Hara, M., Hinokio, Y., Oda, Y., Yamagata, K., Kanematsu, S., Ohgawara, H., Omori, Y., and Bell, G. I. (1997) *Diabetes* **46**, 1504-8

32. Kaisaki, P. J., Menzel, S., Lindner, T., Oda, N., Rjasanowski, I., Sahm, J., Meincke, G., Schulze, J., Schmechel, H., Petzold, C., Ledermann, H. M., Sachse, G., Boriraj, V. V., Menzel, R., Kerner, W., Turner, R. C., Yamagata, K., and Bell, G. I. (1997) *Diabetes* **46**, 528-35
33. Vaxillaire, M., Rouard, M., Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Boriraj, V. V., Chevre, J. C., Boccio, V., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Dussoix, P., Philippe, J., Timsit, J., Charpentier, G., Velho, G., Bell, G. I., and Froguel, P. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 583-6
34. Bach, I., and Yaniv, M. (1993) *EMBO J.* **12**, 4229-42
35. Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R., and Howley, P. M. (1985) *Am. J. Pathol.* **119**, 361-6
36. Courtois, G., Morgan, J. G., Campbell, L. A., Fourel, G., and Crabtree, G. R. (1987) *Science* **238**, 688-92
37. Gorman, C. M., Merlino, G. T., Willingham, M. C., Pastan, I., and Howard, B. H. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 6777-81
38. Demeret, C., Yaniv, M., and Thierry, F. (1994) *J. Virol.* **68**, 7075-82
39. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M., and Schaffner, W. (1989) *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419
40. Chouard, T., Jeannequin, O., Rey-Campos, J., Yaniv, M., and Traincard, F. (1997) *Biochimie* **79**, 707-15
41. Harlow, E., and Lane, D. (1988) *Antibodies: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour Laboratory Press
42. Nicosia, A., Tafi, R., and Monaci, P. (1992) *Nucleic Acids Res.* **20**, 5321-8
43. Sourdive, D. J., Chouard, T., and Yaniv, M. (1993) *C R Acad. Sci. Sciences de la Vie* **316**, 385-94
44. Gong, W., Chavez, S., and Beato, M. (1997) *Mol. Endocrinol.* **11**, 1476-85
45. Oakley, R. H., Sar, M., and Cidlowski, J. A. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 9550-9
46. Pontoglio, M., Barra, J., Hadchouel, M., Doyen, A., Kress, C., Bach, J. P., Babinet, C., and Yaniv, M. (1996) *Cell* **84**, 575-85
47. Pontoglio, M., Sreenan, S., Roe, M., Pugh, W., Ostrega, D., Doyen, A., Pick, A. J., Baldwin, A., Velho, G., Froguel, P., Levisetti, M., Bonner-Weir, S., Bell, G. I., Yaniv, M., and Polonsky, K. S. (1998) *J. Clin. Invest.* **101**, 2215-22
48. Johnson, K. R., Sweet, H. O., Donahue, L. R., Ward-Bailey, P., Bronson, R. T., and Davisson, M. T. (1998) *Hum. Mol. Genet.* **7**, 1033-8
49. Vahava, O., Morell, R., Lynch, E. D., Weiss, S., Kagan, M. E., Ahituv, N., Morrow, J. E., Lee, M. K., Skvorak, A. B., Morton, C. C., Blumenfeld, A., Frydman, M., Friedman, T. B., King, M. C., and Avraham, K. B. (1998) *Science* **279**, 1950-4
50. Stoffel, M., and Duncan, S. A. (1997) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **94**, 13209-14

TABLE 1

Domain	Length	Mutations	Density/100
Dimerization	33	4	12
HNF domain	85	14	16.5
Homeodomain	84	13	15.5
Transactivation	350	20	5.7
Total		51	

Table 1: Density of MODY3/HNF1 α mutations in the different functional domains of the protein. A total of 51 single amino acid substitutions were considered. For each domain, the mutation density is expressed as the number of amino acid changes for 100 amino acid residues.

TABLE 2

Class	Effect	Mutation	Expression Level	Specific Activity
Wild-type			+++	+++
Class I	Decreased Transactivation	Y122C	+	++
		R131Q	++	++
		R159Q	+	++
		K205Q	+	++
		R272H	++	+
Class IIa	Loss of Transactivation	S142F	++	-
		R171(ter)	+	-
Class IIb	Loss of Transactivation and dominant negative effect	P447L	++	-
		P291(ter)	++++	-
		T547(ter)	++++	-

Table 2: Biological properties of the HNF1 α mutants. Class distribution, Transcriptional activation, expression level and estimated specific activity for the ten MODY3/HNF1 α mutants. The expression levels were estimated from the western blot shown in figure 3 and the specific activity represents the fold of transactivation with limiting plasmid concentration divided by the protein expression level.

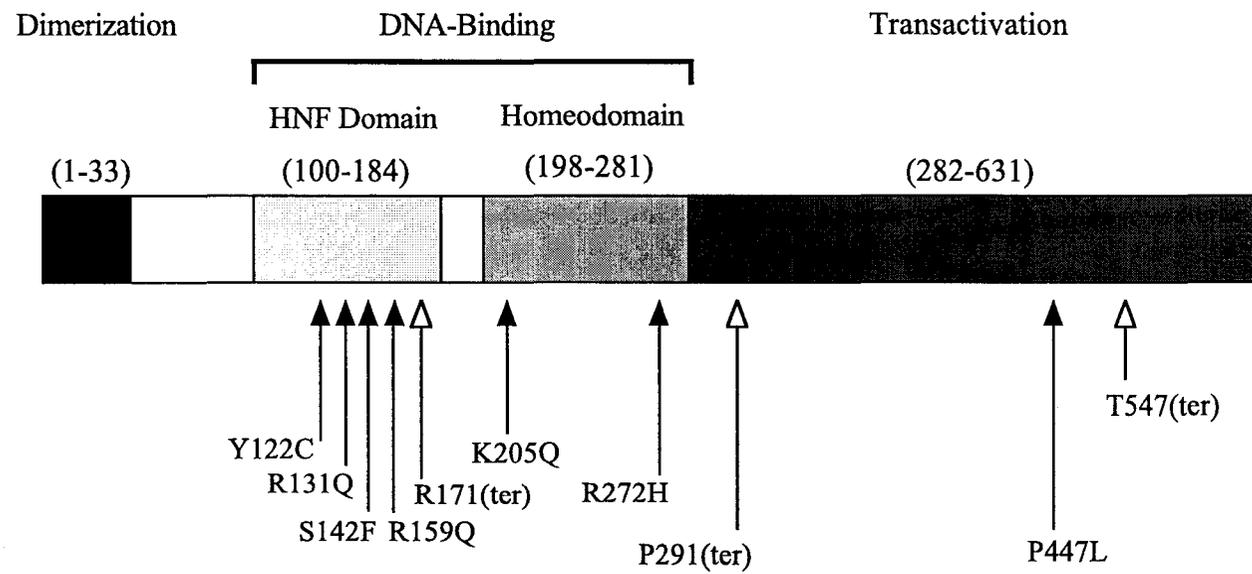


Figure 1
(M. Vaxillaire et al.)

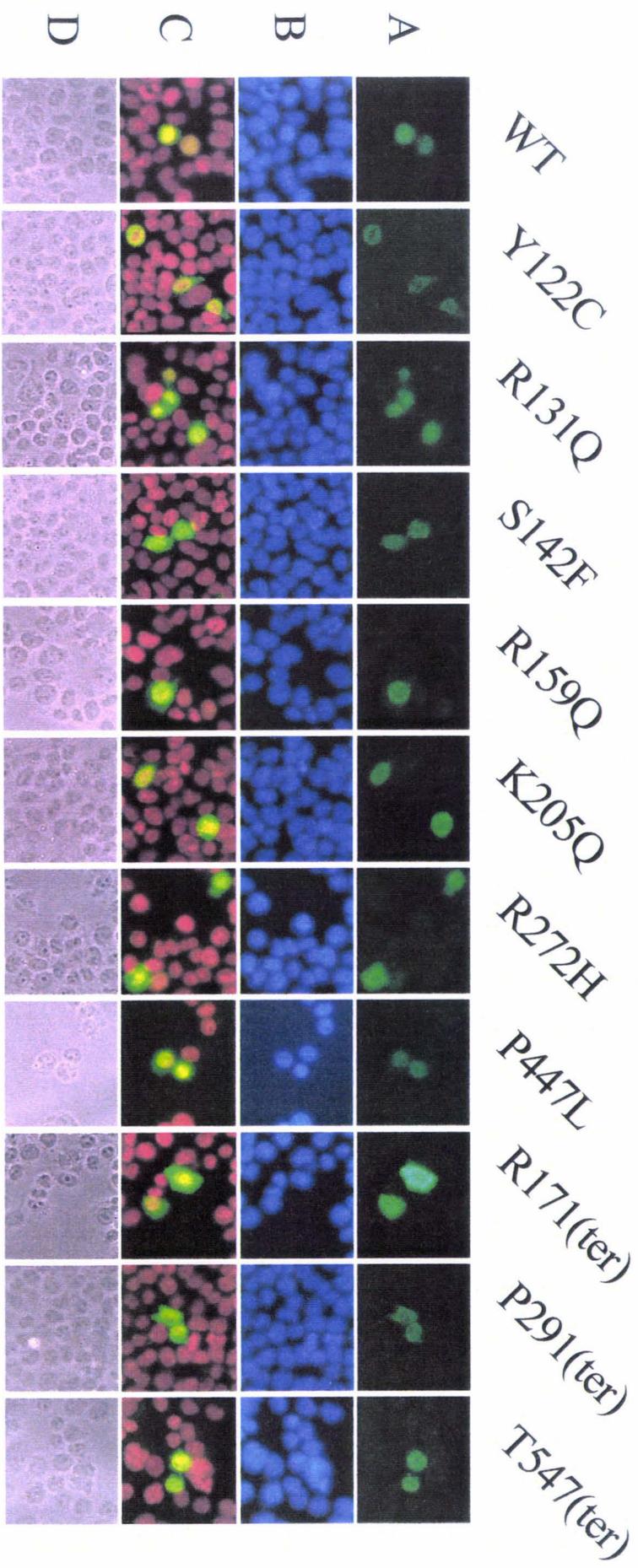


Figure 2 (M. Vaxillaire et al)

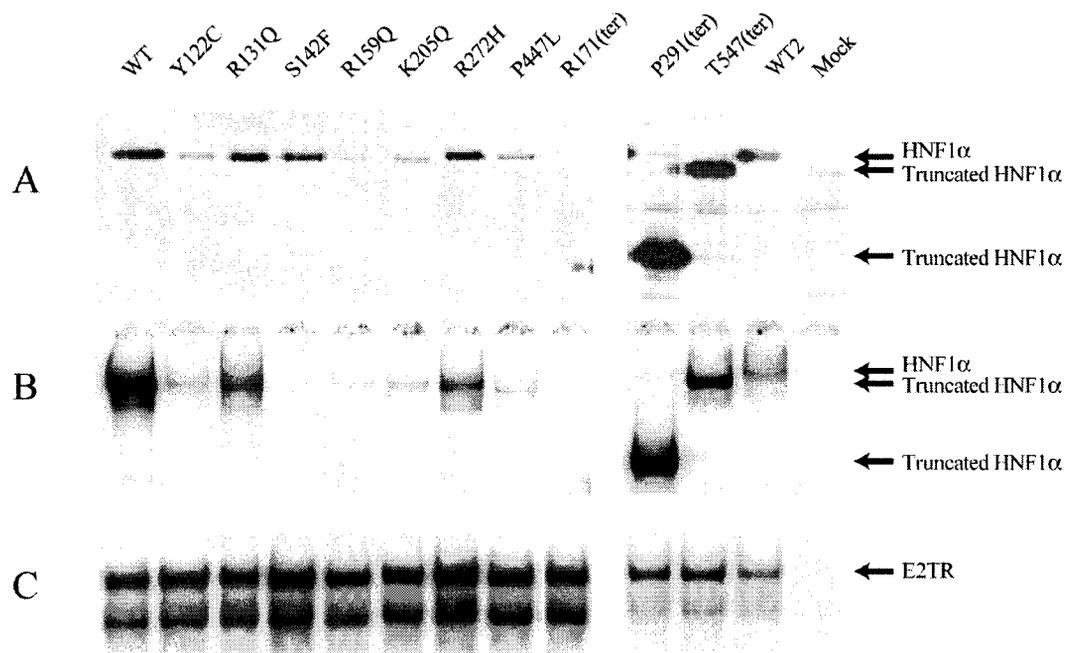


Figure 3 (M. Vaxillaire et al)

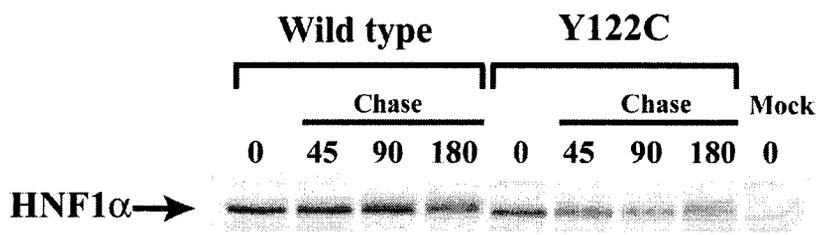


Figure 4. (M. Vaxillaire et al)

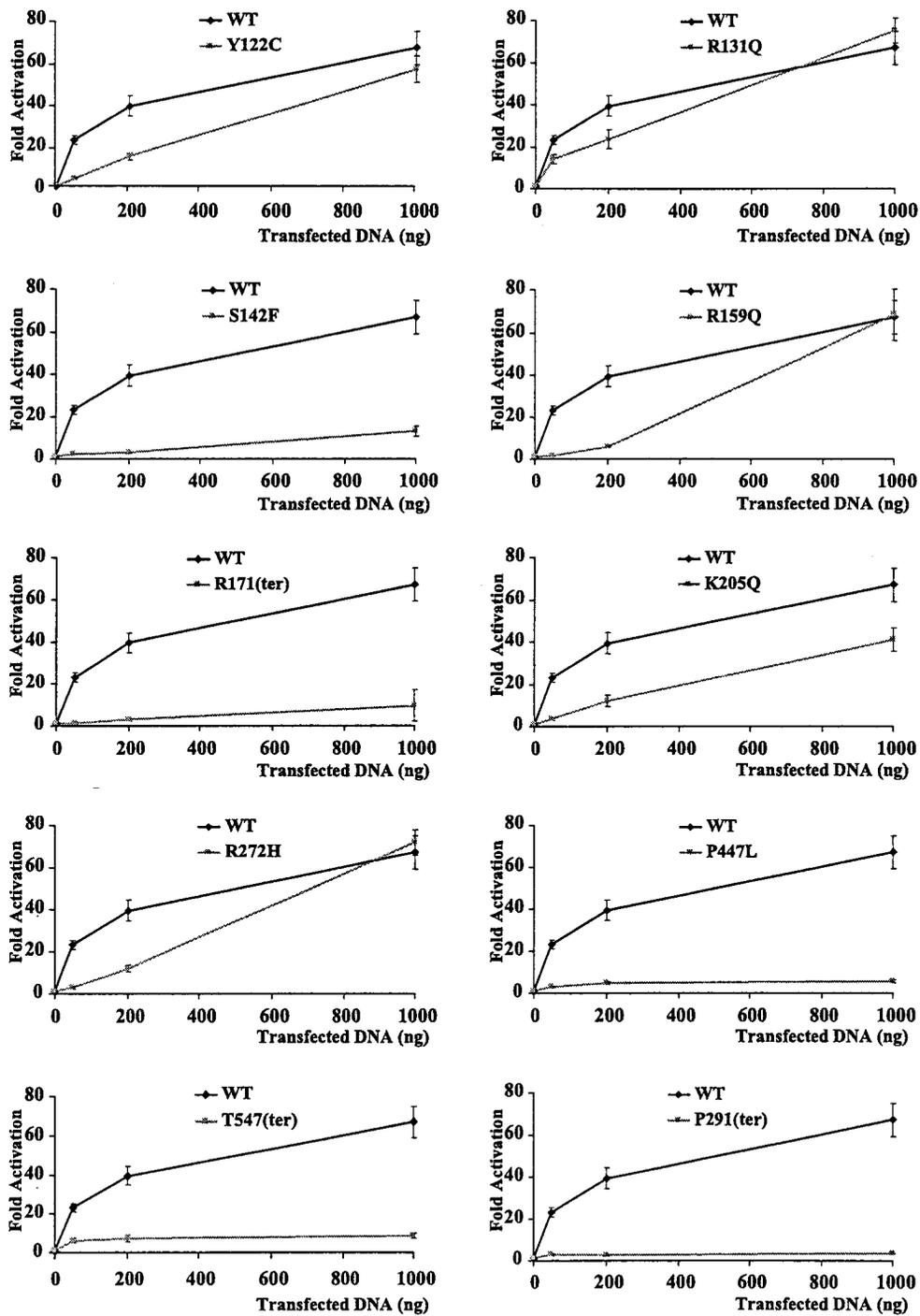


Figure 5. (M. Vaxillaire et al.)

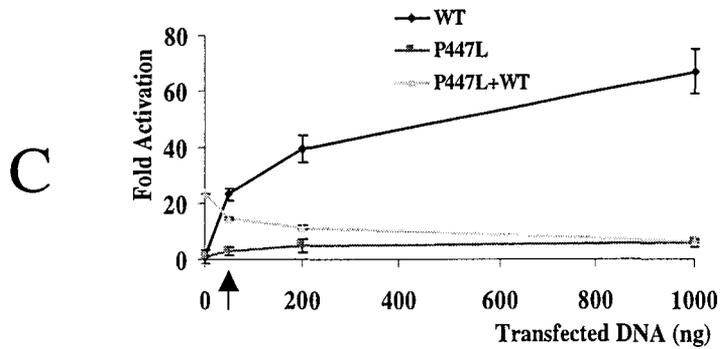
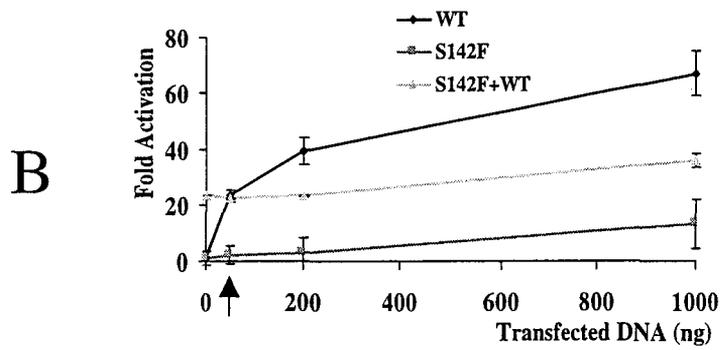
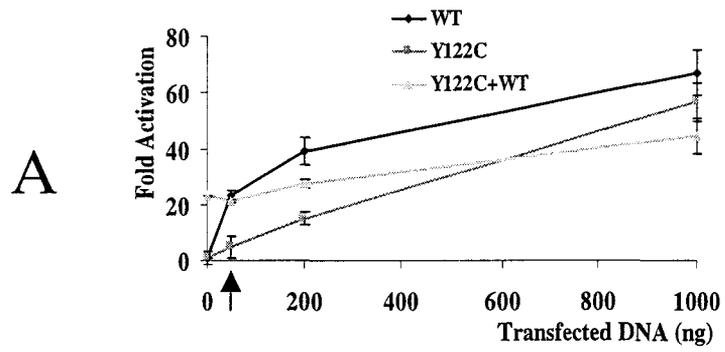


Figure 6. (M. Vaxillaire et al.)

Publication 2

**Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-3 β gene
(*HNF3B*) does not contribute to MODY in French
Caucasians.**

Amar Abderrahmani, Jean-Claude Chèvre, Shuichi Otabe, Mohamed Chikri, El Habib
Hani, Martine Vaxillaire, Yoshinori Hinokio, Yukio Horikawa, Graeme I. Bell, and Philippe
Froguel.

A brief genetic report Accepted dans Diabetes.

Genetic variation in the hepatocyte nuclear factor-3 β gene (*HNF3B*) does not contribute to MODY in French Caucasians.

Amar Abderrahmani, Jean-Claude Chèvre, Shuichi Otabe, Mohamed Chikri, El Habib Hani, Martine Vaxillaire, Yoshinori Hinokio, Yukio Horikawa, Graeme I. Bell, and Philippe Froguel.

From the CNRS UPRESA 8090, Institut de Biologie de Lille (A.A., J-C.C, S.O., M.C., E.H.H., M.V., P.F.), Lille, France, and the Howard Hughes Medical Institute, and Departments of Biochemistry and Molecular Biology, Medicine, and Human Genetics (Y.Hi., Y.Ho., G.I.B.), The University of Chicago, Chicago, Illinois

Corresponding author: P. Froguel CNRS UPRES-A 8090, Institut de Biologie de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, BP 245, 59019 Lille Cedex, France. e-mail: froguel@pasteur-lille.fr

Keywords: MODY, transcription factor, polymorphism

Running Title: HNF-3 β and MODY in France

Abbreviations used in this paper: HNF, hepatocyte nuclear factor; IPF-1, insulin promoter factor-1; MODY, maturity-onset diabetes of the young.

Maturity-Onset Diabetes of the Young (MODY) is a group of metabolic disorders characterized by early-onset diabetes mellitus, autosomal dominant inheritance and a primary defect in glucose-stimulated insulin secretion (1). The hepatocyte nuclear factors (HNFs) are a structurally diverse group of transcription factors that were originally identified in the context of liver-specific regulation of gene expression (Reviewed in 2). Mutations in genes encoding three members of this group, hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF-4 α), HNF-1 α and HNF-1 β , have shown to be the causes of three of the five forms of MODY, MODY1, MODY3 and MODY5 (3-5). HNF-4 α is an upstream regulator of HNF-1 α gene expression (6) and HNF-1 α and -1 β can activate gene expression as homodimers as well as heterodimers and together comprise transcriptionally active complex (7). The genetic and molecular biological studies of HNF function indicate that an intact HNF network is required for normal function of pancreatic β -cells and consequently for normal regulation of glucose metabolism. Thus, it was suggested that transcription factors involved in this complex network are candidates for genetic defects in diabetes (8). The HNF-3 β gene (*HNF3B*) located on human chromosome 20p11 encodes a member of HNF-3/Forkhead winged helix family, and is expressed in pancreatic α - and β -cells (9). HNF-3 β regulates the expression of the insulin promoter factor-1 gene (*IPF1*), mutations of which are the cause a fourth described form of MODY, MODY4 (10,11). It is also a positive regulator of expression of the HNF-4 α and HNF-1 α genes and their downstream targets (8). Finally, a mutation in a HNF-3 responsive element in the promoter of the HNF-1 α gene has recently been identified in a MODY patient (Godard, F. et al, submitted manuscript). All these data suggest that *HNF3B* is a plausible candidate for heritable defects in MODY.

This prompted us to screen the coding region of *HNF3B* for mutations in 21 MODY probands of French ancestry (clinical characteristics are described in Table 1). Eleven of these were selected from families with a clinical diagnosis of MODY (1). The other ten were from MODY-like families. All of the five known MODY genes were excluded in as being the cause of diabetes in these families either by direct sequencing and/or linkage analyses (12 and J-C. Chèvre, unpublished data).

Direct sequencing of both strands of the coding region of *HNF3B* (Table 2) in this group of subjects revealed six sequence variants compared to the reference *HNF3B* sequence (GenBank accession no. AF147787) (Table 3). Two transitions, an A-to-G at position -213 (c.-213A/G) and a C-to-T at position -63 (c.-63C/T) were found in the promoter and 5'-untranslated region of exon 1, respectively (the first nucleotide of the ATG codon is denoted as +1). In addition, we identified a G-to-C transversion located at position +32 relative to the splice-donor of intron 1 (IVS1+32G/C) and three transitions in exon 3, resulting in non-coding mutations : GCC-to-GCT (Ala97Ala; c.291C/T), GGA-to-GGG (Gly279Gly; c.837A/G) and CAG-to-CAA (Gln396Gln; c.1188G/A).

We also screened 115 normoglycemic control subjects for the presence of each of these sequence variants. The allele frequencies were not significantly different between the MODY probands and control subjects (Table 3). Each polymorphism was in Hardy-Weinberg equilibrium in the MODY and control groups. The IVS1+32G/C variant was only identified in a single proband for whom family segregation analyses were not possible and was not found in 115 controls. However, the location of this variant distal from the splice-donor and acceptor sites in intron suggests that it likely just a rare variant rather than a pathogenic mutation causing MODY.

Familial segregation studies were performed for the c.-213A/G and the c.-63C/T polymorphisms. They did not co-segregate with the diabetes in the 2 MODY families in which they were found suggesting that a putative functional effect of these variants, or a nearby variant, on HNF-3 β function/expression is unlikely to be the cause of MODY in these families.

In parallel, using the G3 Stanford Radiation Hybrids panel, we mapped *HNF3B* to chromosome 20p, at 30 cRays (~850 kbp) from the marker SHGC-36334, the latter located at the interval 48.1-50.7 cM from the pter of chromosome 20 (GeneMap-99, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap/>). The logarithm of odds for this location was 10.25. The closest polymorphic microsatellite marker was D20S184 at 48.1 cM. We tested three markers D20S912, D20S871 and D20S195 which were closely linked to D20S184 (2, 0 and

2.1 cM from D20S184, respectively) but had higher heterozygosity for linkage with diabetes in 15 pedigrees (6/21 families were not suitable for linkage analysis because of their small size). Clinical characteristics of those 15 kindreds are described in Table 1. It was possible to exclude linkage (i.e. $LOD < -2$) of the *HNF3B* region with MODY in 11 families; the lod scores in the remaining four families were inconclusive (i.e. $-2 < LOD < -3$, data not shown).

In conclusion, we have described six variants in *HNF3B* and demonstrate through a combination of direct screening for mutations and linkage analysis that genetic variation of *HNF3B* is unlikely to be a major cause of MODY in France. However, considering the genetic heterogeneity of the MODY and the existence of rare families with mutations in the IPF-1 and HNF-1 β genes (5,11), there may be rare families with diabetes due to mutations in *HNF3B*. In addition, there have been reports of linkage of the *HNF3B* region of chromosome 20 with classical type 2 diabetes (13,14); perhaps genetic variation in *HNF3B* is associated with this form of diabetes rather than MODY.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the diabetic subjects and their families who participated in this study. This work was supported by the Institut Pasteur, Centre National de la Recherche Scientifique, the BIOMED II program Grant N° BMH4-CT950662, the Howard Hughes Medical Institute, the Blum-Kovler Foundation and grants from the U.S. Public Health Service (DK-20595 and DK-44840).

REFERENCES

1. Fajans, SS. : Maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetes Metab. Rev.* 5: 579-606, 1989.
2. Cereghini S. : Liver-enriched transcription factors and hepatocyte differentiation. *FASEB J* 10: 267-82, 1996.
3. Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI. : Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1a gene in maturity-onset diabetes of the young. *Nature* 384: 455-8, 1996.
4. Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI.: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4a gene in maturity-onset diabetes of the young. *Nature* 384: 458-60, 1996.
5. Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI.: Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 4: 384-385, 1997.
6. Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE, Crabtree GR.: A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355, 457-461, 1992.
7. Rey-Campos J, Chouard T, Yaniv M and Cerighini S.: vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J* 6, 1445-1457, 1991.
8. Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M.: Regulation of a transcription factor network required for differentiation and metabolism. *Science* 281, 692-695, 1998.
9. Philippe J.: Hepatocyte-nuclear factor 3 beta gene transcripts generate protein isoforms with different transactivation properties on the glucagon gene. *Mol Endocrinol* 3, 368-374, 1995.

10. Wu KL, Gannon M, Peshavaria M, Offield MF, Henderson E, Ray M, Marks A, Gamer LW, Wright CV, Stein R.: Hepatocyte nuclear factor 3beta is involved in pancreatic beta-cell-specific transcription of the pdx-1 gene. *Mol Cell Biol* 10, 6002-6013, 1997.
11. Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF.: Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 2, 138-139, 1997.
12. Chevre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanche H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanne-Chantelot C, Velho G, Froguel P.: Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 41, 1017-1023, 1998 .
13. Zouali H, Hani EH, Philippi A, Vionnet N, Beckmann JS, Demenais F, Froguel P. : A susceptibility locus for early-onset non-insulin dependent (type 2) diabetes mellitus maps to chromosome 20q, proximal to the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Hum Mol Genet* 6: 1401-8, 1997.
14. Ghosh S, Watanabe RM, Hauser ER, Valle T, Magnuson VL, Erdos MR, Langefeld CD, Balow J Jr, Ally DS, Kohtamaki K, Chines P, Birznieks G, Kaleta HS, Musick A, Te C, Tannenbaum J, Eldridge W, Shapiro S, Martin C, Witt A, So A, Chang J, Shurtleff B, Porter R, Boehnke M. et al. Type 2 diabetes: evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 2198-203, 1999.
15. World Health Organisation Study Group on Diabetes Mellitus Report. Technical Report Series WHO No.727. Geneva (1985).
16. Lathrop GM, Lalouel J-M, Julier C, Ott J. Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 :3443-3446 (1984).
17. Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, et al. A gene for Maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet* 9, 418-423.

Table 1: Clinical characteristics of the MODY probands and families investigated in this study

	probands	15 families
individuals (n)	21	220
glucose tolerance status: MFH-IGT/diabetes (n and %)	0/21 (0%/100%)	45/43 (51%/49%)
Men/women	9/12	114/106
Age (years)	45±10	35±19
BMI (Kg/m ²)	25.2±4.7	23.4±5.1
Age at diagnosis (years):		
All subjects	28±9	34±19
Minimal age in the kindreds	13	17±9
Duration of hyperglycaemia	18±9	11±10
Fasting Glucose (mmol/l)	9.4±3.3	7.4±2.5
Fasting insulin (pmol/l)	77±100	67±101
2h Glucose (mmol/l) (number of patients, n)	ND	8.3±3.7 (n=48)
2h Insulin (pmol/l) (number of patients, n)	ND	197±196 (n=36)
Treatment: Diet/OHA/Insulin, N (%)	2/9/6 (12%/53%/35%)	15/19/10 (34%/43%/23%)

Subjects who were non-overtly diabetic underwent oral glucose tolerance testing (OGTT) and a diagnosis of diabetes or impaired glucose tolerance (IGT) was done according to the World Health Organization criteria for diabetes (15). Subjects who presented with fasting plasma glucose level between 6.1 and 7.7 mmol/l on two separate measurements were considered diagnosed as having mild fasting hyperglycemia (MFH). Data are expressed as means ± standard deviation (SD). MFH: mild fasting hyperglycaemia; IGT: impaired glucose tolerance; OHA: oral hypoglycaemic agents; ND: not determined.

Table 2. Sequences of primers used for amplification of *HNF3B*

DNA Amplicon *	Forward primer (5'--->3')	Reverse primer (5'--->3')
Exon 1	GAAACACGCCGGCCTGAATATCAG	GCAGATCCCTATGAAAGCCGGATT
Exon 2	GGGTGATTGCTGGTCGTTTGTGTTGTG	GAGGCGCCGCAAGTCAATATTTG
Exon 3.1	GAATGAAACAGACTCGGAGTCCGG	ATCTCGCTCAGCGTCAGCATCTTG
Exon 3.2	AAGACCTACAGGCGCAGCTACACG	CCTCCTTCAGCGCCAGCTGCTTCT
Exon 3.3	TTCTGGACCCTGCACCCTGACT	AGGCCTTGAGGTCCATTTTGTG
Exon 3.4	GGAACACCACTACGCCTTCAACCA	CTTGCTCTCTCACTTGTCTCGAT

*Because of its large size, exon 3 was divided into four overlapping segments (designated exon-3.1, -3.2, -3.3 and -3.4) for mutation screening. Genomic DNA was amplified using a Gene-Amp PCR system 9700 Thermocyclers (Perkin-Elmer, Foster City, CA) using 6 specific primers sets shown above extended by the universal -21 M13-forward (5'tgtaaacgacggccagt3') and M13-reverse (5'caggaaacagctatgacc3') sequences at their 5' ends. PCR reactions were performed using Amplitaq Gold (Perkin-Elmer) and cycling conditions included an initial denaturation at 96°C for 12 min, followed by 35 cycles at 96°C for 30s, 30s at 60°C and 72°C elongation for 45s, and a final extension for 10 min at 72°C. Post-PCR purification and direct DNA sequencing on both strands was performed as previously described (12). MgCl₂ was used in PCR amplification at a final concentration of 1.5 mM for all fragments except Exon-2 and 3.1 where the MgCl₂ was 1mmol/l.

Table 3. Polymorphisms/variants in *HNF3B* in French subjects with MODY

Location	Position	Nucleotide variation	Designation*	Non diabetics (N = 115)	MODY (N = 21)
Promoter	-213	A-to-G	c.-213A/G	A: 0.92; G: 0.08	A: 0.95; G: 0.05
Exon 1	-63	C-to-T	c.-63C/T	C: 0.93; T: 0.07	C: 0.95; T: 0.05
Intron 1	+32	G-to-C	IVS1+32G/C	G:1.00; C:0.00	G: 0.95; C: 0.05
Exon 3	Codon 97	GCC-to-GCT	c.291C/T	C: 0.93; T: 0.07	C: 0.90; T: 0.10
	Codon 279	GGA-to-GGG	c.837A/G	A: 0.96; G: 0.04	A: 0.95; G: 0.05
	Codon 396	CAG-to-CAA	c.1188G/A	G:0.75; A:0.25	G: 0.70; A: 0.30

*Nucleotide numbering – the A of the ATG in the initiator Met codon of the cDNA sequence is denoted nucleotide +1 and the lower case c for cDNA in front of the nucleotide number indicates that the reference sequence is the cDNA sequence. The polymorphism in the promoter region is located 4 bp upstream of the transcriptional start site.

For allelic frequency study, all polymorphisms were screened in 115 control subjects by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism assays (PCR-RFLPs). Nested forward primers with two mismatches at the third and fourth nucleotides from the 3' end (5'-cgccccgcgcttctcccgtgc-3') and (5'-cacagccaccaccacctca-3') were used for the screening of the c.-63C/T and c.1188G/A variants. The corresponding reverse primers were derived from the genomic reference sequence (oligonucleotides 5'-gaaacacgcccgcctgaatatcag-3' and 5'-cttgctctctcactgtcctcgat-3', respectively). The mismatches introduced either Ban I or Dde I polymorphic restriction sites, depending on the presence or absence of C-to-T and G-to-A transitions, respectively. The c.-213A/G, IVS1+32G/C, and c.291C/T polymorphisms disrupted Alw26I, Eco47III, and Nae I sites, and c.837A/G created an Apa I sites, respectively. The digested products were separated on a 2% standard agarose gel. The specificity of this screening protocol was checked by direct sequencing of both DNA strands of the PCR products of random samples (data not shown). Comparisons of allele frequencies between probands and controls groups were performed using contingency table chi-square

tests with the JMP software (SAS Institute Inc. Cary, NC). *HNF3B* was mapped using the Stanford G3 Radiation Hybrids panel. PCR was performed using 5'-cacagccaccaccacctca-3' and 5'-cttgctctcacttgctcctcgat-3' as forward and reverse primers, respectively. The amplicon tested is located in exon 3 and matches only the human *HNF3B* sequence. Amplifications were checked and analyzed on 2% agarose gel with ethidium bromide staining. Analyses were done by submitting the data at <http://www-shgc.stanford.edu/cgi-bin/smap> website for a two-point statistical analyses with markers in the version 2.0 Stanford Human Genome Center G3. We typed 15/21 families with the fluorescent-labeled polymorphic markers D20S912, D20S871 and D20S195. The samples were loaded on an ABI377 sequencer (Perkin-Elmer) and analyzed using the Genescan-2.1 and Genotyper-2.0 softwares. The Lod-score calculations were done using the LINKAGE-Package (16), and the genetic model described in reference 17.

Publication 3

Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1 α promoter region in MODY patients.

Godart François, Bellanné-Chantelot Christine, Clauin Séverine, Gagnoli Claudia, **Abderrahmani Amar**, Blanché Hélène, Boutin Philippe, Chèvre Jean Claude, Thomas Gilles, Froguel Philippe, Bailleul Bernard.

accepté à *Human Mutation*.

Identification of seven novel nucleotide variants in the hepatocyte nuclear factor-1 α promoter region in MODY patients.

Abbreviated title; Mutations in HNF-1 α promoter in MODY patients.

Godart François, ++Bellanné-Chantelot Christine, ++Clauin Séverine, *Gragnoli Claudia, Abderrahmani Amar, ++Blanché Hélène, Boutin Philippe, Chèvre Jean Claude, ++Thomas Gilles, Froguel Philippe, Bailleul Bernard.

Corresponding author:

Bailleul Bernard, e-mail: b.bailleul@xenope.pasteur-lille.fr

CNRS UPRESA 8090, IBL, Institut Pasteur de Lille, F59019 Lille. ++Fondation Jean Dausset-CEPH, 27 rue Juliette Dodu, F75010 Paris, * Howard Hughes Medical Institute and departments of biochemistry and Molecular Biology of Medicine, Chicago, Illinois.

KEYWORDS: MODY3, HNF-1 α , promoter variants, functional studies.

ABSTRACT

Maturity onset diabetes of the young (MODY) is an heterogeneous subtype of type-2 diabetes mellitus. To date, five MODY genes have been identified. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1 α (HNF-1 α) gene are associated with MODY3. In the present work, we implemented the HNF-1 α promoter region in the screening of MODY-suspected patients and identified seven variants not detected in control subjects. The family was available for the -119delG variant and segregation between MODY and variant is observed. Most of these variants are located in highly conserved regions and may alter HNF-1 α expression through binding alteration of nuclear factors or other mechanisms. We demonstrate by functional studies that the transcriptional activity of the -283A>C and -218T>C variant promoters were 30 and 70 % of the wild type activity, respectively. These data suggest that HNF-1 α promoter variants could be diabetogenic mutations and emphasize that the accurate HNF-1 α expression is important for the maintenance of normal pancreatic β cell function.

INTRODUCTION

The most frequent form of monogenic diabetes is the maturity onset diabetes of the young (MODY) characterized by autosomal dominant inheritance, early age of onset and defect in glucose-stimulated insulin secretion. To date, five genes have been implicated in MODY. Among them are four transcription factors: hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF-4 α , MODY1) (Yamagata et al., 1996a), hepatocyte nuclear factor 1 α (HNF-1 α , MODY3) (Yamagata et al., 1996b), hepatocyte nuclear factor 1 β (HNF-1 β , MODY5) (Horikawa et al., 1997) and insulin promoter factor 1 (IPF-1, MODY4) (Stoffers et al., 1998). The fifth MODY gene is the glucokinase gene (GCK, MODY2) (Froguel et al., 1993).

The HNF-1 α gene, which is a member of homeodomain-containing protein family (Bach et al., 1993), encodes a transcription factor of 628 amino acids and is highly conserved in vertebrates. Many studies have shown a role for HNF-1 α in the regulation of the expression of liver genes such as albumin, β -fibrinogen, α -1 antitrypsin, PEPCK and L-PK (Baumhueter et al., 1990; Chouard et al., 1990; Frain et al., 1989). This transcription factor is also expressed in epithelial cells of intestine, stomach, proximal tubules of the kidney and pancreas (Miquerol et al., 1994). Recently, the role of HNF-1 α in the regulation of pancreatic β -cell function was investigated (Wang et al., 1998). The data show that HNF-1 α function is essential for maintaining insulin storage and glucose mediated release.

Genetic studies have revealed a large spectrum of mutations in diabetic families principally affecting the DNA-binding and transactivation domains of the HNF-1 α protein (Chevre et al., 1998; Frayling et al., 1997; Glucksmann et al., 1997; Hansen et al., 1997; Kaisaki et al., 1997; Vaxillaire et al., 1997) and have suggested that MODY3 results from impaired HNF-1 α function. A dominant-negative mechanism has been clearly demonstrated for the P291fsinsC mutation, occurring in a mutational hot spot identified in HNF-1 α (Yamagata et al., 1998). Moreover, few mutations have also been identified in the dimerization domain (Glucksmann, et al., 1997) and more recently in the promoter region (Gagnoli et al., 1997). For these mutations, the mechanism leading to an autosomal dominant disorder is unclear. Here, we report the identification of seven novel promoter and 5' untranslated region (5'-UTR) variants identified in MODY patients, and demonstrate through functional studies a reduced transcriptional activity of HNF-1 α promoter for two variants. Our results suggest that an haplo-insufficient expression of HNF-1 α could lead to a β -cell dysfunction and diabetes.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Subjects classified as MODY according to their clinical and biological profile were referred to the medical genetic unit in the Fondation Jean Dausset for diagnostic purpose. All gave their informed consent. A control population composed of 51 unrelated non-diabetic subjects was also tested.

Identification of mutations

The amplification of each exon and exon-intron boundaries was performed for GCK and HNF-1 α genes (OMIN 142410). PCR products were screened by a PCR-SSCP method as previously described (Blanche et al., 1994; Boutin et al., 1997); the proximal promoter region (GenBank Acc U73499) was analysed using sequence specific primers described by Kaisaki (Kaisaki, et al., 1997) and leading to a 385 bp amplicon. PCR products presenting a variation of the electrophoretic pattern were sequenced on an ABI sequencer using the AmpliTaq DyeDeoxy Terminator cycle sequencing kit (PE-ABI).

Plasmid constructions

Plasmid constructions were done by standard cloning procedures. Briefly, sense (5' CCTCAGATCTGCCCACTCCC3') and antisense (5' TAGCCAAGCTTTGTGGGCACC3') oligonucleotides were used to amplify a 235 bp fragment of the HNF-1 α minimum promoter from the DNA of patients heterozygous for the -283 A>C and -218 T>C substitutions. These fragments were directionally inserted into the pGL3-Basic vector (Promega) lacking the minimum promoter, using the BglIII and HindIII restriction sites in the sense and the antisense oligonucleotides, respectively. The wild type and mutant plasmids were selected and confirmed by sequencing.

Cell line, transient transfection and Luciferase assay

The hepatic HepG2 cell line was grown in Dulbecco Modified Eagle Medium (Life Technologies, Inc) supplemented with 10% of fetal calf serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100mg/ml), sodium pyruvate (1mM) and L-Glutamine (2mM). The β -pancreatic INS-1 cell line was grown in RPMI 1640 (Life Technologies, Inc), supplemented with 10% of fetal calf serum, penicillin (100U/ml), streptomycin (100mg/ml), sodium pyruvate (1mM), L-Glutamine (2mM), HEPES buffer (0.01M) and β -mercaptoethanol (50mM). Cotransfection of 750 ng or 1 μ g of the plasmids previously constructed with 50 ng of the pRL-CMV normalisation vector (Promega, Life Science, France) was done using Exgen 500 (Euromedex, France). Dual-luciferase assays (firefly and renilla) were performed as described by manufactory (Promega, Life Science, France).

Transfection experiments were performed in triplicate in three independent transfection (n=9).

RESULTS

Nucleotide variants in the promoter region of the HNF-1 α gene are observed in MODY patients

Subjects referred to us for MODY diagnostic purposes were explored for GCK and HNF-1 α coding sequence variations. As no mutation was detected by PCR-SSCP and was confirmed on both genes by sequencing, the molecular study was implemented with the analysis of the HNF-1 α promoter region. Seven novel nucleotide variants (Table 1) have been identified and characterized by sequencing in patients suspected as MODY for their familial history of diabetes and their early age at diagnosis (Table 2). The nuclear segregation has been made only for the F92 family for which the -119delG variant cosegregates with diabetes (Figure 1). The other variants have been found in isolated subjects for whom only a familial history of diabetes is known. None of these variants was detected in more than 250 other MODY-suspected patients and in 51 unrelated non-diabetic subjects. A -119,-118insG variant has been detected in the control studies.

The seven variants found in MODY-suspected patients and the previously described -283A>C variant in the Italy 1 family (Gragoli, et al., 1997) are shown in Table 1. We observed that the seven novel variants are localized downstream from the transcriptional start site (position -225). The variants upstream from -118 lie in a sequence conserved between human, rat and mouse. The -97T>G transversion is localized in a 13 pyrimidine and purine sequence identical in rat, mouse and human. Interestingly, two variants occur at the same position corresponding to a polyG tract, centered around position -119 (delG and G>A). As previously suggested for the -283A>C variant (Gragoli, et al., 1997), these variants may disrupt the binding site for transcription factors. Search for potential transcription factor binding sites in the vicinity of these sequence variants with the matrix search program MatInspector using the TRANSFAC 3.4 matrices reveals that some variants could affect nuclear factor binding (See table 1 and figure 2). The variants lie in binding sites of either ubiquitous factors like NF-Y, AP1 and Myc/Max or tissue specific factors like HNF-3 and HNF-4 α . The -283A>C and the -218T>C change a crucial nucleotide described in the HNF-4 α and the NF-Y consensus sequence respectively (Mantovani, 1998; Tian et al., 1991). The -207,-206ins27, -187C>T and -62C>T variants could modify the nucleotide context of the HNF-3, AP1 and Myc/Max binding sites

respectively (figure 2). The -207,-206ins27 corresponds to a 27 base pair insertion which duplicates the CCAAT box found at position -222 and may disrupt the context of the HNF-3 binding site.

Functional studies of promoter variants.

To investigate whether HNF-1 α allelic variants could cause differences at the transcriptional level, we performed transient transfections using a luciferase reporter construct to measure proximal promoter activity (position -363 to -147) of wild type and variant promoters in hepG2 and INS1 cells. The functional studies have been performed with two variants localized upstream or close to the transcription start site; the -283A>C in the HNF-4 α binding site as previously described (Tian and Schibler, 1991) and the -218T>C in a NF-Y putative binding site (Mantovani, 1998), corresponding to a tissue-specific and an ubiquitous nuclear factor, respectively. The transcriptional activity of the -283A>C and -218T>C mutant constructs were 30 and 70 % of the wild type construct respectively (n=9, P<0.05) when both HepG2 and INS-1 cells were used in the transfection experiments (Figure 3). These cell lines express both HNF4 α and NF-Y nuclear factors constitutively. Both variants modify the HNF-4 α or NF-Y binding sequence at a nucleotide which is highly conserved in various functional binding sites (Figure 2).

DISCUSSION

In this study, we identified promoter variants in diabetic families with criteria for MODY (table 2). These putative pathogenic mutations, absent in control subjects, are the sole modification found in HNF-1 α and GCK genes in these families. The variants are all localized downstream from the transcription initiation (location -255; the A of the HNF-1 α initiator ATG codon is denoted nucleotide +1) and will be present in 5'UTR of the transcript. These 5'-UTR variants may participate to transcriptional initiation. Indeed, whereas the function of the 5'-UTR has been demonstrated in viral and eukaryotic genes as centering predominantly on translational control (Dix et al., 1992; Geballe et al., 1986; Rao et al., 1988), transcriptional activity of this region has also been described (Amrolia et al., 1995; Mansour et al., 1986; Wilhide et al., 1997). The minimum HNF-1 α promoter including part of the 5'-UTR is highly conserved between human, rat and mouse suggesting a functional role of this sequence in HNF-1 α expression. Most of the variants lie in a sequence conserved over 12 nucleotides and some are in a potential binding site for nuclear factors (table 1). These factors are expressed in pancreatic β cells like HNF-3, HNF-4 α as tissue-

specific factors and Myc/Max, NF-Y and AP1 as ubiquitous factors. The -283A>C and -218T>C variant functional studies strongly support the idea that a single base pair change in the HNF-1 α minimum promoter may alter the basal transcriptional level of the HNF-1 α gene in pancreatic β cells and hepatocytes. As the variants change a crucial base of the HNF-4 α and NF-Y binding sites, impaired HNF-4 α and NF-Y interaction in the variant promoter is the more likely explanation, whereas others altered nuclear factor interactions could not be excluded. The HNF-4 α transcription factor, recently identified as the MODY1 gene, is involved in HNF-1 α expression in both β -cell and hepatocyte. NF-Y is a CCAAT-specific transcription factor assumed to be involved in the regulation of a variety of eukaryotic genes (Mantovani, 1998). Modified transcriptional activity of mutant promoters has been previously described for others genes like the lipoprotein lipase and the apolipoprotein E (Bullido et al., 1998; Yang et al., 1995). These genes are associated with risk for hyperlipidemia and Alzheimer's dementia respectively, and in these cases, a functional analysis revealed a residual 15% and 60% transcriptional activity of the variants promoter compare to wild type, respectively. The mutation in the lipoprotein lipase promoter seems to alter binding of the ubiquitous transcription factor Oct-1 (Yang et al., 1995). Furthermore, it has been shown that hemophilia B Leyden is caused by mutations in the HNF-4 α binding site of the coagulation factor IX promoter (Reijnen et al., 1992). The present data suggest that in the patients with -283A>C or -218T>C variants, the reduced HNF-1 α transcription level is responsible for the MODY3 phenotype.

Concerning the other variants that we have identified, they could either affect the transcription level, modify the mRNA stability or the translation efficiency of the HNF-1 α transcript. It is noteworthy that three variants were found in a G stretch at position -126,-119; two of them are found in diabetic families and one in a control subject. The cosegregation observed between -119delG and the MODY phenotype in the family F92 strongly suggests that this variant has a functional consequence as a pathogenic mutation, but there is no obvious nuclear binding site which might be affected by a delG in a stretch of seven G and might be unaffected by the -119,-118insG variant found in a control subject. However, we may hypothesize that the 5'-UTR participates to translational or stability properties of the HNF-1 α mRNA and that different variants will not yield to identical HNF-1 α expression alterations because these regulations act on mRNA secondary structure. Further investigations have to be performed to demonstrate the hypothesis, functional studies of such variants

could not be explored with reporter constructs and require more complex constructs.

A dominant negative mechanism of HNF-1 α mutations in DNA-binding or transactivation domains results in a strong reduced HNF-1 α activity through alteration of the wild type activity. Functional studies of various MODY3 mutant proteins reveal that some mutants lead to a decrease or a loss of transactivation activity without exerting a dominant-negative effect on the wild type protein (Vaxillaire M. personal communication). It is therefore likely that MODY3 is due to mutations in HNF-1 α coding sequence leading to a reduced amount of functional HNF-1 α by haplo-insufficiency. In the same manner, the existence of HNF-1 α variants in promoter and 5'-UTR in MODY3 patients, resulting in weak alterations of HNF-1 α expression by a gene dosage mechanism, is sufficient to alter pancreatic β -cell glucose-mediated insulin release. Consequently, MODY3 is developed by a reduced HNF-1 α activity through different mechanisms. Interestingly, given the fact that HNF-4 α (MODY1) is a transactivator of HNF-1 α gene (MODY3), we can hypothesize that MODY1 is, at least in part, a consequence of an impaired HNF-1 α transcription. Two HNF-1 α promoter variants have been recently described in patients with late onset type II diabetes (Cox et al., 1998). They could correspond to mild MODY phenotype. Taken together, these works shed new light on the importance of an accurate HNF-1 α expression for the maintenance of normal pancreatic β cell function.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was mainly supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) et l'Institut National de la Santé et de la recherche medicale (INSERM). We are grateful to Drs AM. Bertrand, E. Larger, J. M'Bemba, E. Requeda, M. Varroud-Vial, B. Vialettes for sending us patients and their contribution to this work. We thank the families for their cooperation and I. Le Gall and M.F. Legrand for technical assistance. This work was supported by the Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Conseil Régional de l'Ile de France.

TABLES AND FIGURES LEGENDS.

Table 1 : Location and characteristics of nucleotide promoter variants. 1. Location is given according to the A of the initiator Met codon denoted nucleotide +1. 2. Comparison of the promoter region sequence of the human, rat and mouse HNF-1 alpha genes. The length of the nucleotide identity is indicated

in brackets; 3. The Italy 1 family corresponds to a previously reported family (Gragnoli, et al., 1997). 4. The 27bp insertion sequence is CCCCAGCTCCAATGTTATCCGAGAAT. The bases 2 to 15 of the insertion correspond to a -228,-216 duplication (CCAGCTCCAATGT). 5 This conserved sequence corresponds to a species conserved purine-pyrimidine sequence.

Table 2 : Clinical profiles of probands. ¹ The number in brackets corresponds to the number of family members (first or second relatives) reported as being diabetic. Age at diagnosis, sex, duration of known hyperglycemia and present treatment are indicated.

Figure 1 : Segregation of the -119delG variant in the F92 family. Diabetic and nondiabetic subjects are indicated by filled and open symbols, respectively. The age at diagnosis, the present age, the treatment (Oral Hypoglycemic Agent; OHA or diet) and the genotype (N, normal; M, -119delG) are shown.

Figure 2 : Sequence comparison between the human HNF-1 α gene proximal promoter and the consensus for the binding of transcription factors localized at the variant sites. The location of variant are shown in bold type and boxed. The variants are indicated above. Nucleotides are numbered according to the A of the initiator ATG codon (boxed). The transcriptional start site at position -225 is indicated by an asterisk. The arrows represent the primers used for minimum promoter cloning.

Figure 3 : Effect of the -218T>C and the -283A>C HNF-1 α promoter variants on transcriptional activity. The results of the HepG2 cells (**A**) or the INS1 cells (**B**) transfected with the wild type, the -218T>C and the -283A>C constructs are indicated by filled, dashed and open boxes respectively. Relative Luciferase Units are expressed as means \pm S.D. in percentage of activity obtained with the wild type construct. * : significantly lower than the wild type construct (n=3, $P<0.05$).

REFERENCE LIST

- Amrolia PJ, Cunningham JM, Ney P, Nienhuis AW, Jane SM. 1995 Identification of two novel regulatory elements within the 5'- untranslated region of the human A gamma-globin gene. *J Biol Chem* 270:12892-8.
- Bach I, Yaniv M. 1993 More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 homeoprotein family are generated by alternative RNA processing (erratum in *EMBO J* 1994 Jan 15;13(2):492). *Embo J* 12:4229-42.

- Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB, Kuo CJ, Turk C, Graves MK, Edwards CA, Courtois G, Crabtree GR. 1990 HNF-1 shares three sequence motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev* 4:372-9.
- Blanche H, Hager J, Sun F, Dausset J, Cohen D, Froguel P, Cohen N. 1994 Nonradioactive screening of glucokinase mutations in maturity onset diabetes of the young. *Biotechniques* 16:866-8, 870, 873-6.
- Boutin P, Hani EH, Vasseur F, Roche C, Bailleul B, Hager J, Froguel P. 1997 Automated fluorescence-based screening for mutation by SSCP: use of universal M13 dye primers for labeling and detection. *Biotechniques* 23:358-62.
- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. 1998 A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat Genet* 18:69-71.
- Chevre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanche H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanné-Chantelot C, Velho G, Froguel P. 1998 Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 41:1017-23.
- Chouard T, Blumenfeld M, Bach I, Vandekerckhove J, Cereghini S, Yaniv M. 1990 A distal dimerization domain is essential for DNA-binding by the atypical HNF1 homeodomain. *Nucleic Acids Res* 18:5853-63.
- Cox RD, Southam L, Hashim Y, Horton V, Mehta Z, Taghavi J, Lathrop M, Turner R. 1998 UKPDS 31: Hepatocyte nuclear factor-1alpha (the MODY3 gene) mutations in late onset type II diabetic patients in the United Kingdom. *Diabetologia*:120-121.
- Dix DJ, Lin PN, Kimata Y, Theil EC. 1992 The iron regulatory region of ferritin mRNA is also a positive control element for iron-independent translation. *Biochemistry* 31:2818-22.
- Frain M, Swart G, Monaci P, Nicosia A, Stampfli S, Frank R, Cortese R. 1989 The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59:145-57.
- Frayling TM, Bulamn MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie AD, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI, Bain SC, Hattersley AT. 1997 Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes* 46:720-5.
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, et al. 1993 Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase. Definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 328:697-702.
- Geballe AP, Spaete RR, Mocarski ES. 1986 A cis-acting element within the 5' leader of a cytomegalovirus beta transcript determines kinetic class. *Cell* 46:865-72.

- Glucksmann MA, Lehto M, Tayber O, Scotti S, Berkemeier L, Pulido JC, Wu Y, Nir WJ, Fang L, Markel P, Munnely KD, Goranson J, Orho M, Young BM, Whitacre JL, McMenimen C, Wantman M, Tuomi T, Warram J, Forsblom CM, Carlsson M, Rosenzweig J, Kennedy G, Duyk GM, Thomas JD, et al. 1997 Novel mutations and a mutational hotspot in the MODY3 gene. *Diabetes* 46:1081-6.
- Gragnoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gragnoli F, Marozzi G, Bell GI. 1997 Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46:1648-51.
- Hansen T, Eiberg H, Rouard M, Vaxillaire M, Moller AM, Rasmussen SK, Fridberg M, Urhammer SA, Holst JJ, Almind K, Echwald SM, Hansen L, Bell GI, Pedersen O. 1997 Novel MODY3 mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene: evidence for a hyperexcitability of pancreatic beta-cells to intravenous secretagogues in a glucose-tolerant carrier of a P447L mutation. *Diabetes* 46:726-30.
- Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI. 1997 Mutation in hepatocyte nuclear factor-1 beta gene (TCF2) associated with MODY. *Nat Genet* 17:384-5.
- Kaisaki PJ, Menzel S, Lindner T, Oda N, Rjasanowski I, Sahm J, Meincke G, Schulze J, Schmechel H, Petzold C, Ledermann HM, Sachse G, Boriraj VV, Menzel R, Kerner W, Turner RC, Yamagata K, Bell GI. 1997 Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4 (erratum in *Diabetes* 1997 Jul;46(7):1239). *Diabetes* 46:528-35.
- Mansour SL, Grodzicker T, Tjian R. 1986 Downstream sequences affect transcription initiation from the adenovirus major late promoter. *Mol Cell Biol* 6:2684-94.
- Mantovani R. 1998 A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes. *Nucleic Acids Res* 26:1135-43.
- Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A. 1994 Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor 4 transcription factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem* 269:8944-51.
- Rao CD, Pech M, Robbins KC, Aaronson SA. 1988 The 5' untranslated sequence of the c-sis/platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. *Mol Cell Biol* 8:284-92.
- Reijnen MJ, Sladek FM, Bertina RM, Reitsma PH. 1992 Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6300-3.
- Stoffers DA, Stanojevic V, Habener JF. 1998 Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J Clin Invest* 102:232-41.

- Tian JM, Schibler U. 1991 Tissue-specific expression of the gene encoding hepatocyte nuclear factor 1 may involve hepatocyte nuclear factor 4. *Genes Dev* 5:2225-34.
- Vaxillaire M, Rouard M, Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Boriraj VV, Chevre JC, Boccio V, Cox RD, Lathrop GM, Dussoix P, Philippe J, Timsit J, Charpentier G, Velho G, Bell GI, Froguel P. 1997 Identification of nine novel mutations in the hepatocyte nuclear factor 1 alpha gene associated with maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Hum Mol Genet* 6:583-6.
- Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. 1998 Dominant-negative suppression of HNF-1alpha function results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism-secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *Embo J* 17:6701-13.
- Wilhide CC, Jin Y, Guo Q, Li L, Li SX, Rubin E, Bray PF. 1997 The human integrin beta3 gene is 63 kb and contains a 5'-UTR sequence regulating expression. *Blood* 90:3951-61.
- Yamagata K, Furuta H, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Cox NJ, Fajans SS, Signorini S, Stoffel M, Bell GI. 1996a Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* 384:458-60.
- Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le BM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI, et al. 1996b Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* 384:455-8.
- Yamagata K, Yang Q, Yamamoto K, Iwahashi H, Miyagawa J, Okita K, Yoshiuchi I, Miyazaki J, Noguchi T, Nakajima H, Namba M, Hanafusa T, Matsuzawa Y. 1998 Mutation P291fsinsC in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1alpha is dominant negative. *Diabetes* 47:1231-5.
- Yang WS, Nevin DN, Peng R, Brunzell JD, Deeb SS. 1995 A mutation in the promoter of the lipoprotein lipase (LPL) gene in a patient with familial combined hyperlipidemia and low LPL activity (erratum in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 Jan 9;93(1):524). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4462-6.

Figure 1

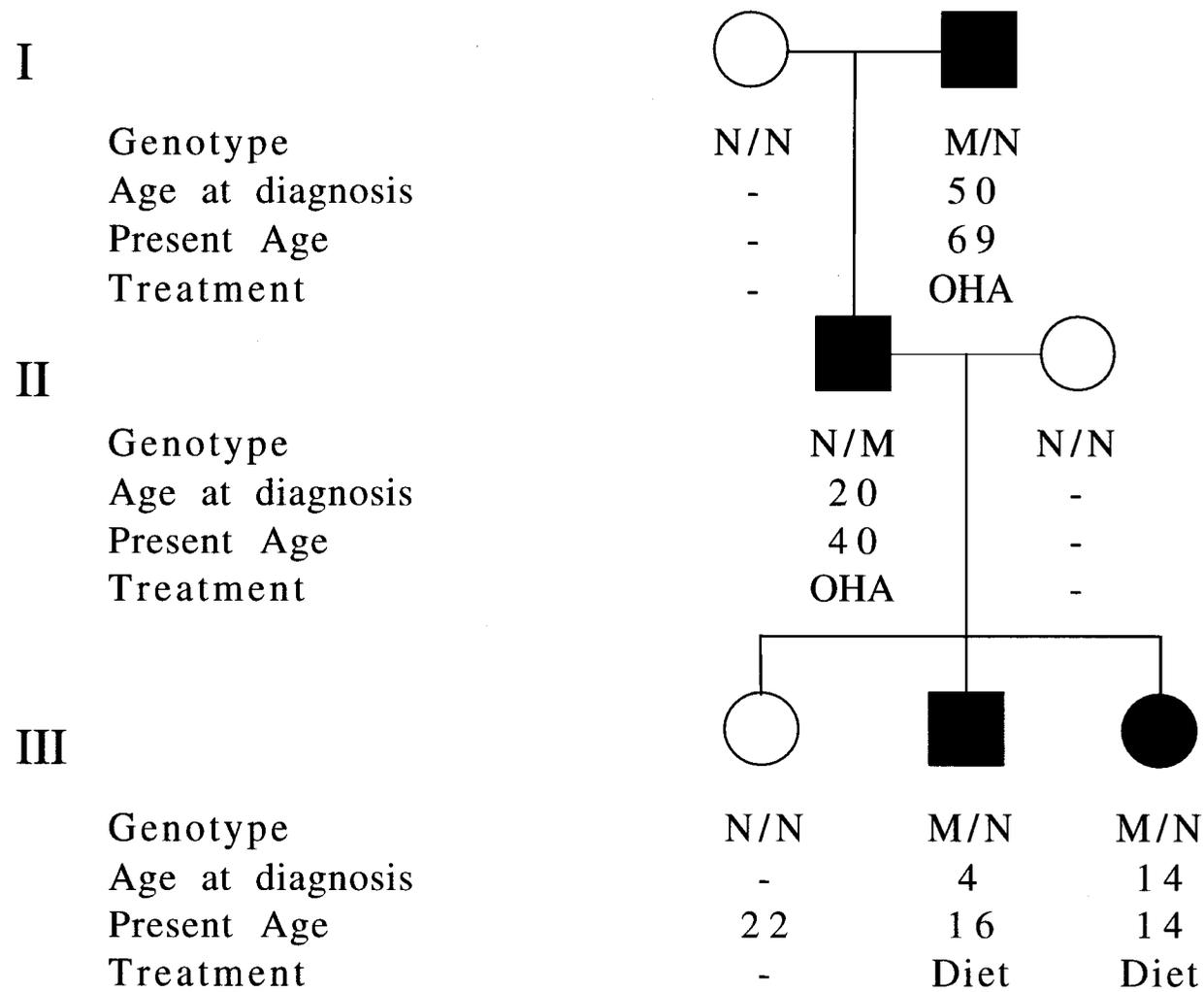


Figure 2

- 393 CCCCTCACCTGCGCCTCCCCACCCTCCCCTCTGCCCACTCCCATCGCAGGCCATAGCTCCCTGTCCCTCTCCGCTGCCATG
 AG

- 309 WY
 GCCTGCACTTTGCAGGGCTGAAGTCC^CAAAGTTCAGTCCCTTCGCTAAGCACACGGATAAATATGAACCTTGGAGAATTTCCC
 CA
 RGKNYAAAGKTCA (*HNF4α*)

* C
 - 225 CRRCCAATSRSMR (*NF-Y*)^{ins} T
 GCTCCA^ATGTAAACA^GACAGGCAGGGGCCCTG^ATTTCA^CGGGCCGCTGGGGCCAGGGTTGGGGGTGGGGGTGCCACAGGG
 CT
 CWRARYMAAYAWT (*HNF3*) CTGAWTCAN (*AP-1*)

- 141 TGGCTAGTGGGGTTTTGGG^{del}GGG^ACAGTGGGTGCAAGGA^GTTTGG^TTTTGTGTCTGCCGGCCGGCAGGCA^AACGCAACCCAC^GCGC
 GG
 CACGTGN

TGGGGGAGGCGGCTAGCGTGGTGGACCCGGGCCGCGTGGCCCTGTGGCA^{GCC}CGAGCCATGGTTTCT
 NW (*c-Myc/Max*) MetValSer

Table 1

Family number	Location ¹ and nucleotide change	Conservative position ²	Known binding sites for transcriptional factors
Italy 1 ³	-283A>C	yes (34nt)	HNF-4 alpha
F353	-218T>C	yes (>35nt)	NF-Y
F772	-207,-206ins27 ⁴	yes (>35nt)	HNF-3
F711	-187C>T	yes (15nt)	AP1
F92	-119delG	yes (12nt)	no
F463	-119G>A	yes (12nt)	no
F674	-97T>G	yes ⁵	no
F513	-62C>G	no	Myc/Max

Table 2

Family number	Family history ¹	Age at diagnosis	Sex	Duration of known hyperglycemia	Present treatment
F353	yes (2)	26	M	13	OHA
F772	yes (1)	19	M	10	OHA
F711	yes (1)	20	M	2	Diet
F92	yes (4)	4	M	12	Diet
F463	yes (2)	29	F	18	Insulin
F674	yes (2)	32	F	1	Insulin
F513	yes (1)	23	M	17	Insulin

I. Analyse des effets des mutations du MODY3 sur les propriétés fonctionnelles de la protéine HNF1A (publication n°1).

1. Construction des mutants HNF1 α .

A partir des études fonctionnelles et structurales réalisées autour d'HNF α et d'HNF1 β , des prédictions pouvaient être établies sur l'effet des mutations du MODY3 dans les différentes propriétés fonctionnelles de la protéine. Des délétions séquentielles du domaine de transactivation généraient des protéines capables de dimériser et de se fixer à l'ADN, mais se comportaient comme des dominants négatifs sur l'activité de la protéine sauvage. L'analyse des effets des mutations ponctuelles sur les propriétés fonctionnelles de la protéine, n'ayant jamais été réalisée auparavant, il était difficile de prévoir la nature des effets de la plupart des mutations du MODY3. Parmi toutes ces mutations, nous en avons sélectionné 10, dont 7 comprenaient les mutations ponctuelles faux sens résultant sur la substitution d'un seul acide aminé, il s'agit des mutations Y122C, R131Q, S142F, R159Q, K205Q, R272H et P447L (voir figure 4). Les 3 autres, étaient, la mutation non sens R171ter et les deux mutations P291fsinsC/ter et T547E548fsdelTG/ter, générant des protéines tronquées par un arrêt prématuré du cadre de lecture. Toutes ces mutations étaient associées au phénotype MODY3. Les 7 mutations faux sens et la mutation non sens R171ter étaient introduites dans l'ADNc HNF1 α humain dont l'expression est sous la dépendance du promoteur viral RSV (Rous Sarcoma Virus) dans le vecteur d'expression eucaryote RSV-HNF1. Les deux mutations " Frameshift " étaient placées dans le même ADNc humain (Figure 4), mais sous le contrôle du promoteur CMV (CytoMegaloVirus) dans le vecteur d'expression eucaryote pCDNA3.

Domaines fonctionnels

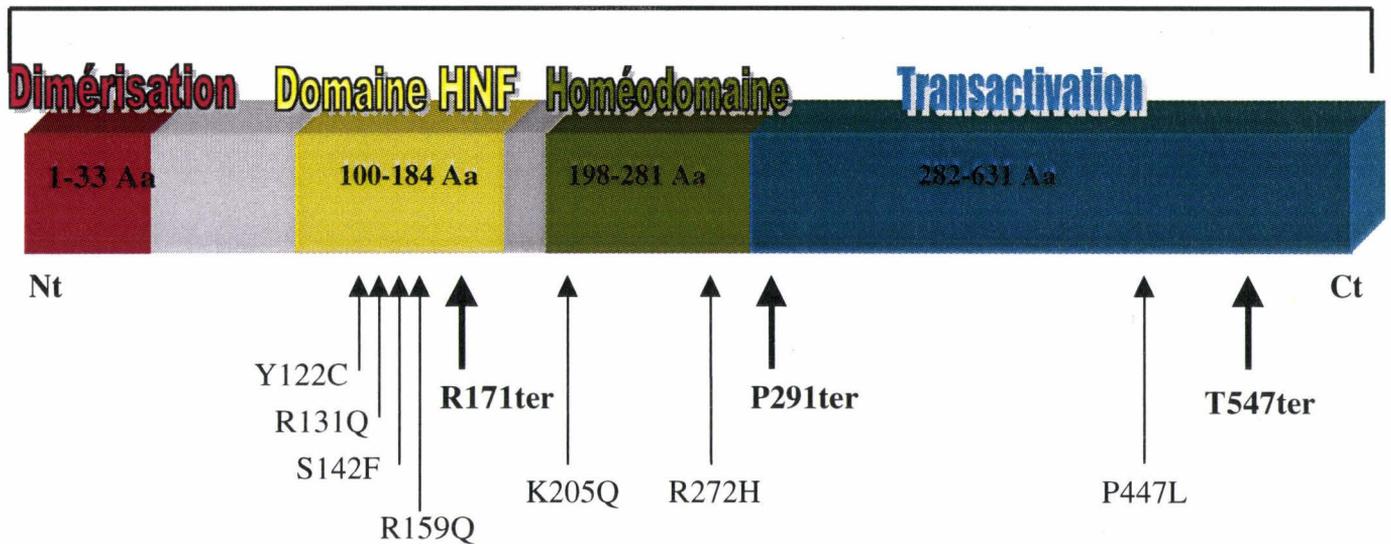


Figure 4 : Localisation des mutations dans les différents domaines fonctionnels de la protéine. Les mutations aboutissant à des protéines tronquées, par terminaison prématurée du cadre de lecture, sont indiquées en caractère gras.

2. Toutes les mutations diminuent l'activité transcriptionnelle de la protéine, dans les conditions de co-transfection transitoire.

L'effet des mutations sur le potentiel de transactivation, comparé à celui de la protéine sauvage, a été testé, en co-transfectant une quantité croissante du vecteur d'expression HNF1 α , avec une quantité constante du gène rapporteur CAT (Chloramphenicol Acetyl Transférase) dont l'expression, est sous le contrôle du promoteur chimérique β 28, comprenant trois éléments de réponse au facteur HNF1 en amont de la séquence TATA du gène de la β -fibrinogène de rat (β 28)₃CAT. Les transfections sont effectuées dans les cellules humaines de carcinome cervicale C33, dans les lesquelles, l'expression endogène du gène HNF1 α n'est pas détectée. En accord avec les résultats précédents, nous montrons qu'HNF1A active le vecteur rapporteur jusqu'à 50-70 fois. L'influence du co-facteur DCoH dans la capacité transactivatrice de la protéine a été étudiée. Dans nos conditions de co-transfection, nous n'observons pas d'amélioration significative de l'activité HNF1A (moins de deux fois). L'effet des mutations sur l'activité était comparée avec celle de la protéine sauvage, en co-transfectant une quantité croissante de vecteurs d'expression.

Toutes les mutations diminuent l'activité relative de la protéine à différents degrés, et peuvent être groupées selon ces variations en deux classes : **La classe I** peut rassembler toutes les mutations réduisant l'activité transcriptionnelle relative lorsque peu de vecteurs d'expression sont co-transfectés. Entre 10 et 200ng de vecteurs transfectés, nous observons une réduction de l'activité pour la mutation Y122C, comparée à celle de la protéine sauvage (voir figure 5, publication 1). Par contre, lorsque 1 µg de vecteurs sont transfectés, l'activité devient optimale, et l'activité de ce mutant n'est pas différente de celle de la protéine sauvage. Des profils similaires étaient aussi observés pour les mutants R131Q, R159Q, K205Q et R272H. **La classe II**, regroupe les mutants qui ont une activité très peu détectable. L'activité du mutant S142F devient détectable au delà de 200ng de vecteurs transfectés. Quand 1 µg de vecteurs d'expression sont introduits, l'activité du mutant reste très faible et ne rattrape pas celle de la protéine sauvage ($11 \pm 3,5$ fois vs $65 \pm 19,7$ fois) (voir figure 5, publication 1). Cette classe inclue les mutations P291fsinsC(ter) et T547E548fsdel TG(ter). Quelque soit la quantité de vecteurs transfectés, ces formes mutées ne montraient pas d'activité détectable. De façon inattendue, la mutation ponctuelle P447L montrait un profil similaire comparé à celui des deux mutations «frameshift» (voir figure 5, publication 1).

3. Les protéines mutées sont exprimées à différents niveaux.

Nous avons recherché l'origine de la réduction de l'activité transcriptionnelle de ces mutants. Une diminution de la stabilité de la protéine, une diminution de la capacité de fixation à l'ADN ou une diminution de la transactivation pourraient être incriminées. Nous avons évalué le niveau d'expression des protéines mutées dans les cellules transfectées par Western Blot. Nous montrons que la quantité de protéines mutées Y122C, R159Q, K205Q et P447L est réduite comparée à celle de la protéine sauvage (voir figure 3A, publication 1). Alors qu'aucune variation visible du niveau d'expression n'est observée entre les protéines mutées R131Q, S142F, R272H et la protéine sauvage (voir figure 3A, publication 1). Les protéines HNF1A sauvages et mutées) migraient sous forme d'une bande diffuse avec un poids moléculaire apparent compris

entre 92 et 98kD. Une bande migrante d'un poids moléculaire apparent inférieur à 30kD est reconnu par l'anticorps anti-HNF1 (rHNt-283, anticorps polyclonaux spécifiques dirigés contre le domaine amino-terminal de la protéine). Finalement, la quantité des protéines tronquées P291fsinsC et T547E548fsdelTG est plus élevée à celle de la protéine sauvage.

Pour rechercher si la réduction de la quantité de protéines observée pour les mutants Y122C et R159Q résultait d'une diminution de la stabilité, des expériences de cinétique de chasse ont été entreprises dans les cellules C33 transfectées. Les extraits nucléaires des cellules transfectées étaient préparés après un marquage métabolique suivi d'une chasse avec des acides aminés non radioactifs à des temps différents. La protéine HNF1A était alors immunoprécipitée en utilisant les anticorps polyclonaux rHNt-283, puis migrée dans un gel de polyacrylamide en condition non dénaturante (SDS-PAGE). Après un marquage de 15 minutes, et avant d'effectuer la chasse, le niveau de protéines des mutants Y122C et R159Q est diminuée, mais restait comparable à celui de la protéine sauvage. La réduction drastique du niveau d'expression des mutants ne se justifierais donc pas par un défaut de la synthèse de la protéine. En fait, après la cinétique de chasse, la réduction de la quantité de protéines mutées est beaucoup plus prononcée comparée à celle de la protéine sauvage (voir figure 4, publication 1). Un défaut de la translocation nucléaire était recherchée, pour expliquer cette réduction de l'activité transcriptionnelle. L'immunolocalisation de toutes les protéines mutées dans les cellules C33 était effectuée par immunofluorescence. Un signal nucléaire est observé pour les protéines mutées en utilisant l'anticorps rHNt-283, indiquant une accumulation de ces protéines au niveau du noyau. Pour les mutants Y122C, S142F, R272H et P291fsinsC(ter), un signal était aussi détecté dans le cytoplasme (voir figure 2, publication 1). Par contre, le mutant R171ter était le seul abondamment localisé à la fois, dans le noyau et dans le cytoplasme (voir figure 2, publication 1). Finalement, la réduction de l'activité transcriptionnelle de ces mutants ne se justifierais pas par un défaut de l'import nucléaire.

4. Certains mutants ne se fixent pas à l'ADN.

Des expériences de retard sur gel ont été effectuées pour tester la capacité de fixation des différents mutants. L'oligonucléotide double brin contenant l'élément de réponse au facteur HNF1 α du promoteur du gène codant le β -fibrinogène était utilisé sonde. Nous montrons un complexe retardé pour les mutants Y122C, R131Q, R159Q, K205Q, R272H et P447L. Alors que les cinq premières protéines montraient la même mobilité que celle de la protéine sauvage, le mutant P447L montrait un profil de migration, caractérisé par une bande migrant plus rapidement que celle de la protéine sauvage (voir figure 3B, publication 1). L'intensité plus marquée du complexe de fixation pour les deux protéines tronquées dans le domaine C-terminale, est justifiée par le niveau d'expression élevée de ces protéines. Ces protéines montraient une mobilité de complexes retardés plus rapides (voir figure 3B, publication 1). Comme prévu, le mutant R171ter ne présentait pas d'activité de fixation à l'ADN. Par contre, le mutant S142F n'était pas capable de se fixer à l'ADN. L'efficacité de la transfection et la qualité de la préparation des extraits nucléaires étaient contrôlées en co-transfectant dans les cellules C33, le vecteur d'expression E2TR. Le retard sur gel de ce complexe était réalisé pour tous les extraits des cellules transfectées (voir figure 3C, publication 1).

5. Certains mutants peuvent affecter l'activité de la protéine sauvage.

Nous avons recherché si certains de ces mutants pouvaient agir par un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine sauvage. Les cellules C33 étaient alors co-transfectées avec une faible quantité constante de vecteur exprimant HNF1 α sauvage (50 ng) et une quantité croissante (50ng- 1 μ g) de vecteurs exprimant les formes mutées d'HNF1 α . A l'exception du mutant Y122C, tous les mutants de classe I n'interféraient pas l'activité de la protéine sauvage mais augmentaient l'activité du gène rapporteur (voir figure 6A, publication 1). Les mutants de classe II pourraient être subdivisés en deux groupes. Dans le premier groupe, que nous pourrions nommer classe IIa, les mutants S142F et R171ter interféraient modérément l'activité de la protéine sauvage. Au contraire, les mutants de la classe IIb diminuait l'activité de la protéine sauvage co-exprimée dans

les cellules. Cette classe peut rassembler les mutants P447L et les mutants P291fsinsC et T547E548fsdelTG (voir figure 6C, publication 1).

II. Etudes fonctionnelles de variants du promoteur du gène HNF1 α , associés au MODY3 (publication n°3).

1. Des variations nucléotidiques sont identifiées dans la région promotrice du gène HNF1 α chez des individus MODY.

Des sujets de familles diabétiques, suspectés sur les critères du MODY, ont fait l'objet d'une recherche systématique de mutations dans les parties codantes des gènes codant la glucokinase et HNF1 α . Comme aucunes variations génétiques n'étaient détectées par PCR-SSCP et séquençage, les études de criblage étaient complétées par l'analyse de la région régulatrice du gène HNF1 α . Au total sept nouvelles mutations ont été identifiées et validées par séquençage chez les individus MODY (voir table 1, publication 3). Aucuns de ces variants n'étaient détectés dans les 250 autres individus MODY et dans les 51 sujets non diabétiques.

2. Etudes fonctionnelles des variants du promoteur proximal.

L'effet de ces variants sur l'activité transcriptionnelle a été recherché. L'activité du promoteur proximal (portion de -363 à -147 à partir du site d'initiation à la transcription +1), était mesurée en utilisant un gène rapporteur luciférase. Les études fonctionnelles étaient réalisées par transfection transitoire, à la fois dans les cellules d'hépatomes humaines HepG2 et dans les cellules β -pancréatiques de rat INS1 qui expriment un niveau transcriptionnel endogène HNF1 α . L'activité relative du promoteur était alors comparée à celle du promoteur comportant les variation -283A>C ou -218T>C. Ces mutations sont localisées respectivement dans les sites de fixation aux facteurs HNF4 α et NFY/HNF3 exprimés de façon constitutive .dans ces cellules. Nous montrons dans les 2 types cellulaires HepG2 et INS1, que les variants -283A>C et -218T>C maintiennent

respectivement une activité transcriptionnelle relative de 30% et 70%, comparée à l'activité du promoteur sauvage (n= 9, P<0,05; voir figure 3, publication 3).

III. Effets de l'hyperglycémie chronique sur l'activité et le niveau d'expression protéique HNF1 α dans les cellules HIT-T15 dites « glucotoxiques ».

1. Le niveau d'expression de la protéine ne varie pas entre les extraits de cellules cultivées avec 11.1mmol/l et 0.8mmol/l de glucose (figure 5A).

Les extraits nucléaires des cellules HIT-T15 cultivées aux passages P70 et P109-110, dans les concentrations de 0,8mmol/l et 11,1mmol/l de glucose, étaient comparés par Western Blot. Les anticorps rHNF-283 reconnaissent une bande majeure d'un poids moléculaire compris entre 92 et 96kDa dans les extraits des cellules C33 transitoirement transfectées par le vecteur d'expression RSV-HNF1. Cette bande était détectée dans les extraits des hépatocytes de rat et aussi bien dans ceux des cellules HIT-T15 cultivées aux passages précoces et tardives. Les résultats ne montraient pas de diminution visible de la quantité de protéines nucléaires HNF1 α dans les extraits de cellules cultivées avec 11,1mmol/l de glucose. Les expériences étaient réalisées en duplicate avec deux préparations d'extraits différentes (figure 5A).

2. La capacité de fixation à l'ADN ne diffère pas entre les extraits de cellules cultivées avec 11,1mmol/l et 0,8mmol/l de glucose (figure 5B et 5C).

La capacité de fixation à l'ADN de la protéine HNF1 α était aussi comparée entre les extraits nucléaires des deux groupes de cellules à différents passages. La formation d'un complexe spécifique ADN-protéine était détectée par retard sur gel, en utilisant des sondes d'oligodéoxynucléotides contenant soit les éléments de réponse au facteur HNF1 ou ceux du facteur ubiquitaire NFY (figure 5B et 5C). En utilisant la sonde contenant les éléments de réponse au facteur HNF1, un complexe majeur était détecté dans les cellules C33 transfectées avec le vecteur d'expression RSV-HNF1. Un complexe migrant à la même taille était détecté dans les

extraits de cellules HIT-T15 à passage précoce et ceux de cellules à passage tardif cultivées à 11,1mmol/l et 0,8mmol/l de glucose. L'intensité du complexe de fixation n'était pas différente entre les extraits de cellules cultivées à 11,1mmol/l et 0,8mmol/l et cela quelque soit le passage. Le complexe protéine –ADN était aussi incubé en compétition avec la sonde froide pour vérifier la spécificité de fixation. Le complexe observé était "supershifté" pour tous les extraits, en utilisant les anticorps polyclonaux (rHNT-283), montrant ainsi l'implication d'HNF1 α dans la formation de ce complexe. Un complexe formé avec la sonde comprenant les éléments de réponse NFY, et migrant à la même taille, était observé avec les extraits nucléaires des cellules HIT-T15 à passage précoce et ceux des cellules de passages tardifs cultivés avec 11,1mmol/l et 0,8mmol/l de glucose. Ces expériences étaient réalisées en duplicate avec deux préparations différentes. Ces résultats montrent que la capacité de fixation à l'ADN de la protéine HNF1A n'est pas altérée dans les extraits de cellules cultivées avec 11,1mmol/l de glucose.

3. L'activité du vecteur $\beta(28)_3$ LUC ne varie pas entre les cellules HIT-T15 cultivées avec 11.1 mmol/l et 0.8mmol/l de glucose (figure 6).

Une variation du potentiel de transactivation HNF1 α endogène était recherchée entre les 2 groupes de cellules. Le vecteur rapporteur $(\beta 28)_3$ LUC étaient transfecté dans les cellules HIT-T15 cultivées dans 0,8mmol/l (a) et 11,1mmol/l (b) de glucose aux passages tardifs 109-110. Dans les cellules C33, transitoirement co-transfectées avec le vecteur d'expression CMV-HNF1, l'activité relative $(\beta 28)_3$ LUC est jusqu'à 55 fois induite (figure 6A). L'activité relative ne varie pas entre les groupes a et b ($100 \pm 34\%$ vs $104 \pm 16\%$, n=3, P>0,05, figure 6B). Par contre, dans les cellules cultivées dans 11,1mmol/l comparée à celles cultivées avec 0,8mmol/l de glucose, l'activité est réduite d'un facteur 10, lorsque le vecteur $(\beta 28)_3$ CAT est utilisé ($100 \pm 37\%$ vs $11 \pm 8\%$, n=3, P<0,05, figure 6C). L'activité du promoteur minimum humain de l'insuline était mesuré. Nous rapportons dans ce rapport une réduction de l'activité relative du vecteur INSLUC dans les cellules cultivées dans les conditions b comparée à celles cultivées dans les conditions a ($100 \pm 13\%$ vs $42 \pm 7\%$, n=5, p<0,05, figure 3B). Avec le vecteur INSCAT, cette réduction de l'activité

du promoteur minimum est beaucoup plus marquée (100 ± 15 vs $5,1 \pm 0,4$, $n=3$, $P<0,01$, figure 6C).

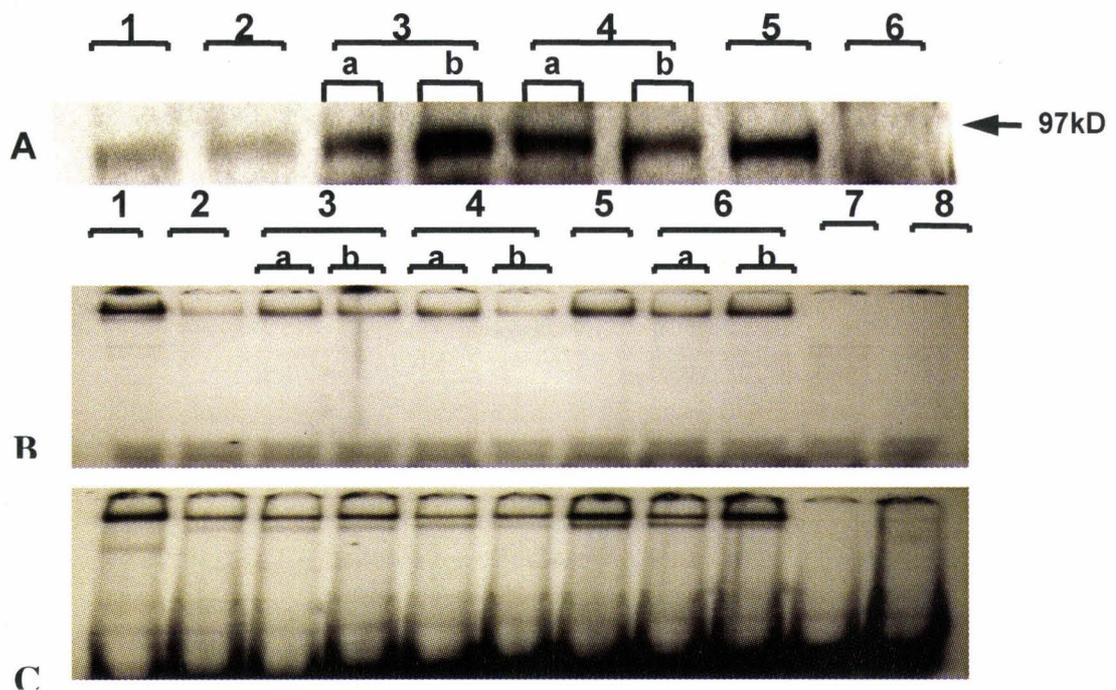


Figure 5 : A- détection par Western Blot de l'expression de la protéine HNF1 α , dans les extraits nucléaires des cellules C33 transfectées avec le vecteur d'expression RSV-HNF1 (ligne 5). La protéine n'est pas détectée dans les cellules C33 non transfectées (ligne 6). La ligne 1 représente les extraits d'hépatocytes de rat. La protéine est aussi détectée à la fois dans les cellules HIT-T15 à passage précoce (ligne 2), aux passages tardifs 109 (ligne 3) et 110 (ligne 4) cultivées dans 0,8mmol/l (a) et 11,1mmol/l (b) de glucose. **B-** Les analyses par retard sur gel ont été effectuées à partir des extraits nucléaires des cellules C33 non transfectées (ligne 7) et transfectées (ligne 1). Les lignes 2 et 5 correspondent respectivement aux extraits des cellules HIT-T15 aux passages 76 et 74. Les lignes 3, 4, et 6 représentent les extraits de cellules HIT-T15 aux passages 109, 110, et 108 cultivées dans les conditions a ou b. **C-** Analyse par retard sur gel de l'activité de fixation NFY.

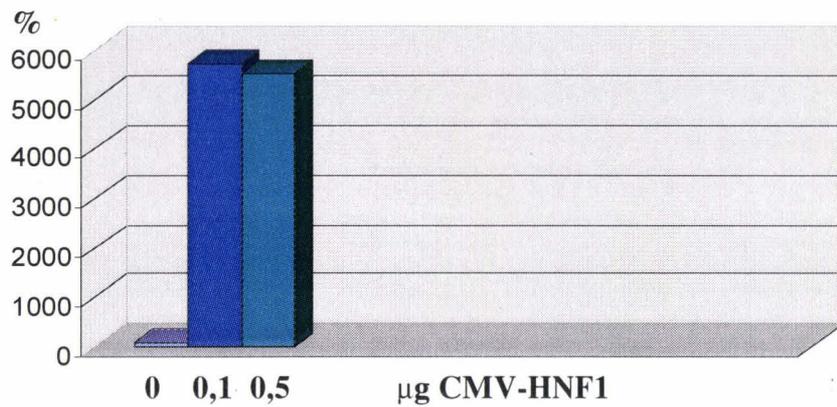
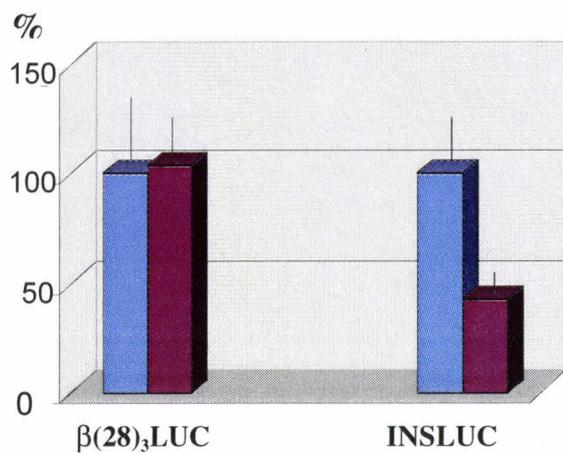
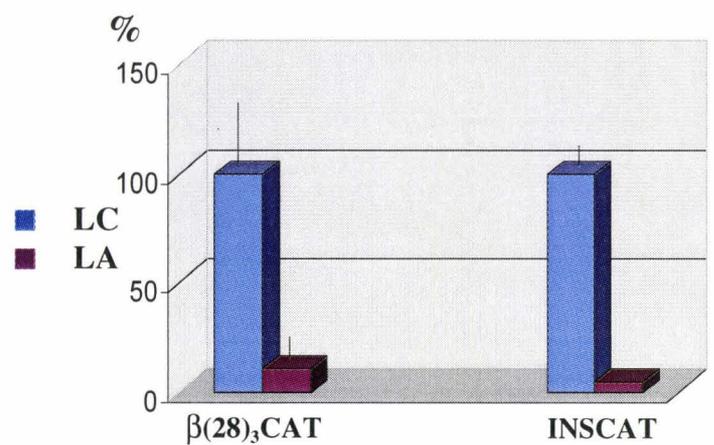
A**Activité relative normalisée****B****Activité relative normalisée****C****Activité relative normalisée**

Figure 6 : **A-** Activité du vecteur rapporteur $\beta(28)_3LUC$ dans les cellules C33, co-transfectées avec le vecteur d'expression CMV-HNF1 α . **B et C-** Mesure de l'activité luciférase et CAT dans les cellules HIT-T15 cultivées aux passages tardifs (109-110), avec 11,1mmol/l de glucose (LA) et 0,8mmol/l de glucose (LC). Les histogrammes reproduisent 3 expériences indépendantes à chaque fois réalisées en duplicate.

IV. Recherche de variations génétiques dans la région codante du gène HNF3 β associées au phénotype du MODY (publication n°2).

1. Des variations nucléotidiques identifiées dans le gène HNF3 β ne sont pas associées au diabète de type MODY.

Afin d'identifier un nouveau gène responsable du MODY, les individus des familles suspectées de phénotype MODY, faisaient l'objet d'une recherche systématique de mutations dans le gène HNF3 β . Le diabète chez ces individus n'étaient alors associé avec aucuns des gènes ou loci des 5 MODY (glucokinase, HNF1 α , HNF4 α , HNF1 β et IPF1). Les 3 exons et les jonctions introniques ont été directement séquencés après amplification par PCR, pour 21 individus probands non appariés issus de 21 familles. Au total, 6 variants ont été identifiés: Une transition A>G à la position -213 (4 paires de base en amont du site d'initiation de la transcription), les transversions C> T en position -63 dans l'exon 1 non traduit et G>C en + 32 dans l'intron 1. Dans l'exon 3, les polymorphismes C>T, A>G et G>A ont été trouvés respectivement dans les codons 97, 279 et 396 et ne modifient pas les acides aminés. Le génotypage de tous les variants, pour les études de fréquence et de ségrégation allélique familiale, a été réalisé par PCR-RFLPs. Tous ces polymorphismes, sont retrouvés avec la même fréquence chez les probands diabétiques et individus contrôles (voir table 3, publication n°2), et aucuns d'eux ne co-ségrègent avec le diabète dans les familles correspondantes. Tous sont distribués selon la loi d'équilibre de Hardy-Weinberg ($P<0,05$).

2. Pas d'évidence de liaison entre les marqueurs polymorphes et le phénotype diabétique de type MODY dans les familles.

Le gène HNF3 β était cartographié, par le panel d'hybrides par radiation, sur le chromosome 20p à 30 cRays (centiRays) (~850 kb) à proximité du marqueur SHGC-36334. Le

LOD score pour cette position est calculée à 10, 25. Trois marqueurs polymorphes, D20S912, D20S871 et D20S195, respectivement localisés à 2; 0 et 2,1 centimorgans du marqueur D20S184 (le plus proche du locus HNF3 β), ont été sélectionnés pour leur fort degré d'hétérozygotie. En utilisant ces trois marqueurs, une étude de liaison était alors entreprise dans 15 des 21 familles diabétiques informatives (les 6 autres ne sont pas informatives pour des analyses de liaison). Pour les trois marqueurs (D20S912, D20S871 et D20S195), la somme des LOD scores des 15 familles, pouvait exclure une liaison génétique entre ces marqueurs et le diabète dans ces familles (LOD score < -2 à $\theta = 0$). Néanmoins, le calcul du LOD score non cumulé à $\theta = 0$, pour chacun des marqueurs, ne pouvait exclure une liaison dans 4 familles ($-2 < \text{Lod score} < 3$) sans toutefois indiquer d'évidence de liaison.

DISCUSSION

I. La réduction de l'activité de la protéine HNF1, par différents mécanismes, expliquerait la transmission dominante du phénotype MODY3.

Les mutations réduisent à différents niveaux l'activité transcriptionnelle de la protéine HNF1. Toutes les mutations étudiées, localisées dans les régions codantes du gène HNF1 α , réduisent dans les conditions *ex vivo*, le potentiel de transactivation de sa protéine. Nous avons montré que ce potentiel peut être réduit, par une diminution de la stabilité de la protéine mutée, ou abolit, soit par une incapacité de la protéine mutée à se fixer à l'ADN ou par la perte de la capacité intrinsèque de la transactivation (mutants de la classe Iib). Nous avons aussi montré que les protéines mutées de la classe Iib sont capables d'agir en effet dominant négatif sur l'activité de la protéine sauvage. En effet, lorsque peu de vecteurs d'expression sont co-transfectés (50 ng) (quantité avec laquelle l'activité HNF1 n'est pas saturée), nos résultats ont montré un effondrement de l'activité de transactivation du complexe HNF1. Ces observations orientent ainsi l'interprétation en faveur de la formation d'un complexe hétéro- dimère inactif (HNF1 sauvage/ HNF1 muté), que d'un phénomène de compétition qui favoriserait essentiellement la forme mutée d'HNF1 à se fixer sur la séquence cible. Par ailleurs, d'autres travaux avaient relevé l'effet dominant négatif du mutant P291C dans les cellules β -pancréatiques de souris (MIN6) (Yamagata et al, 1998). Les auteurs montraient que la sur-expression de ce mutant réduit de 40% l'activité de la protéine sauvage endogène de manière dose dépendante (Yamagata et al, 1998). Au vue de l'ensemble de ces résultats, le mode dominant de la transmission du phénotype MODY3 peut s'expliquer par une réduction de l'activité transcriptionnelle de la protéine HNF1. D'autres pathologies humaines à transmission dominante, résultent d'une réduction de l'activité de gènes.

En effet, une réduction de l'activité transcriptionnelle a été récemment observée pour le gène HNF1 β portant les mutations non sens R177X et A263fsinsGG responsables du phénotype MODY5 (Tomura et al, 1999). Les auteurs rapportaient en outre, pour les deux mutants, un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine sauvage. Des mutations identifiées dans le gène codant l'antithrombine III, associées à la thromboembolie sévère chez l'homme, sont transmises de manière dominante. Ces mutations réduisent l'activité de l'antithrombine plasmatique (Manson et al, 1989). Des mutations localisées dans le gène codant le récepteur de l'hormone thyroïdienne β ont été identifiées dans des familles atteintes de résistance de l'hormone thyroïdienne. Des travaux montraient que les mutants du récepteur inactivaient le complexe dimère par un effet dominant négatif (Yagi et al, 1997).

L'inactivation de la protéine HNF1 α par un effet d'haploinsuffisance suffit au développement du phénotype MODY3. A l'exception des mutants rares de la classe II, la plupart des mutants, comme ceux de la classe I, n'agissent pas en effet dominant négatif sur l'activité de la protéine sauvage. Ces mutants se comportent ainsi dans le cas typique d'une haploinsuffisance. Autrement dit, cette observation suggère qu'une réduction du niveau d'expression suffit à induire le phénotype sévère du MODY3. Un autre argument qui plaide en faveur de ce mécanisme de l'haploinsuffisance, vient de l'identification des mutations de la région du promoteur du gène également associée au phénotype MODY3. En effet, nous avons rapporté au cours de nos travaux, l'existence de 7 nouvelles mutations localisées dans la région 5' non traduite (5'UTR) régulatrice du gène. Toutes ces mutations sont associées au phénotype MODY3. La région 5'-UTR est connue pour réguler la transcription (Amrolia et al, 1995) et la traduction de gènes eucaryotes et viraux (Dix et al, 1992 ; Geballe et al, 1986 ; Rao et al, 1988). De ce fait, les mutations localisées dans cette région du gène HNF1 α (très conservée entre le rat, la souris et l'homme), pourraient affecter soit le niveau de la transcription, soit la stabilité du messager ou l'efficacité de la traduction. Pour deux des mutations localisées dans les sites de fixation au facteur HNF3/NFY et HNF4, nous avons montré une réduction de l'activité relative du promoteur. Nos

résultats montrent ainsi qu'une réduction de l'expression du gène HNF1 α peut suffire au développement du diabète de type MODY3. D'autres syndromes humains ont été associées à des mutations identifiées au niveau des promoteurs de gènes. Par exemple, plusieurs mutations hétérozygotes ont été identifiées dans le promoteur du gène codant la lipoprotéine lipase chez des patients atteints d'hyperlipidémie familiale combinée et de maladie des artères coronaires. Les études fonctionnelles des différentes mutations, T(-39)C, G(-53)C et T(-93)G, montraient respectivement une réduction de l'activité relative du promoteur de 85%, 70-75% et 40-45% par rapport à celle du promoteur sauvage (Yang et al, 1996). L'implication de l'effet d'haploinsuffiance sur le développement de pathologie a déjà été montrée. Comme exemple, citons la souris invalidée du gène *jerky* sur un seul allèle qui développe des crises d'épilepsie fréquentes, rappelant l'épilepsie idiopathique humaine (Donovan et al, 1997).

Une légère diminution du niveau d'expression totale du gène HNF1 α entraîne un défaut sévère de l'insulino-sécrétion. En effet, si l'on considère le cas de la mutation HNF3/NFY, pour laquelle est observée une diminution de 30% de l'activité relative du promoteur, dans le contexte du patient hétérozygote, une réduction de 15% de l'activité totale de la protéine HNF1 α suffirait à induire un défaut sévère de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. Parmi les mutations de la partie codante, une faible réduction de l'activité totale est également observée pour le mutant R131Q de la classe I. Il semble donc que chez l'homme, le niveau d'expression du gène soit crucial dans la fonction de la cellule β du pancréas. En effet, chez la souris, à l'inverse, le même dysfonctionnement pancréatique est transmis de manière récessive. En fait, les souris nullizygotés sont diabétiques, alors que les souris invalidées hétérozygotes sont normoglycémiques et ont une tolérance au glucose normale. Une explication serait que le niveau d'expression protéique HNF1 α soit en excès chez ces souris, mais pas chez l'homme.

Toutes les mutations semblent être associées au même phénotype diabétique chez les individus MODY3. Une question qui vient à poser au regard des différents effets fonctionnels des mutations est : le phénotype diabétique est-il similaire entre les individus porteurs de différentes

mutations ?. A ce sujet, il n'existe pas d'études de corrélation clinique entre la nature des mutations et le degré de sévérité du diabète chez les patients. Quelques observations ont été relevées et semblent indiquer très peu de différences entre la sévérité du défaut de l'insulino-sécrétion des patients MODY3 et la nature des mutations (M. Vaxillaire, communication personnelle). Une étude comparative entre les individus des différentes classes (I, IIa et IIb) et celles comportant les mutations de la région du promoteur, en fonction du degré de sévérité du diabète pourrait donc être entreprise.

Le mécanisme d'haploinsuffisance pourrait être l'unique mécanisme à l'origine du phénotype MODY3. En l'absence de corrélation clinique précise entre les différentes mutations et le phénotype des diabétiques, et compte tenu du modèle des souris invalidées, un mécanisme unique à l'origine du phénotype MODY3, pourrait être proposé. Une des possibilités serait, que toutes les mutations agissent en effet dominant négatif. Dans ce cas, nos résultats ne confortent pas cette hypothèse, et révéleraient en outre, les limites des transfections transitoires à reproduire les conditions exactes survenant dans les cellules β pancréatiques. Comme aucune variation n'est observée avec une faible quantité de vecteurs transfectée pour les mutants de classe I (50 ng), cela supposerait que cette quantité est déjà en excès pour pouvoir visualiser un effet dominant négatif des mutants de cette classe. Chez la souris nullizygote, l'inactivation totale du gène réduit l'espérance de vie de l'animal et entraîne de nombreuses dysfonctions tissulaires. Considérant l'importance des anomalies que pourrait ainsi engendrer chez l'homme l'inactivation totale du gène, l'autre possibilité, consisterait à écarter l'hypothèse d'un mode commun de transmission par un effet dominant négatif. Dans ce cas, il serait possible que les mutants non sens de la classe IIb, n'agissent pas en dominants négatifs *in vivo*. En effet, cette hypothèse est d'autant plus plausible depuis qu'il a été montré que l'expression d'un gène portant une mutation non sens n'aboutit pas sur une protéine tronquée. L'argument est basé sur l'existence d'un mécanisme qui propose une voie alternative orientant un transcrite mature muté non sens vers une voie de dégradation. Ce mécanisme a été mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans* et

quelques organismes eucaryotes supérieurs. Ainsi, à l'exception du mutant faux sens P447L, les 2 mutants non sens de cette classe IIb qui réduiraient la stabilité des ARNm, se comporteraient typiquement comme dans le cas d'une haplo-insuffisance. Alors, les conditions de transfection transitoire, dans les cellules C33, ne refléteraient peut être pas l'effet de ces mutants *in vivo*, puisqu'à l'inverse nous montrons une augmentation de la quantité protéique produite par l'expression des deux mutants non sens. Toutefois, si ce mécanisme de surveillance des ARNm a été démontrée pour les mutants non sens, elle reste cependant moins justifiée pour les mutants faux sens et ne pourrait exclure un effet dominant négatif possible du mutant P447L décrit dans ce rapport.

II. Le niveau d'expression du gène HNF1 α serait important pour le maintien de la fonction β -pancréatique.

HNF1 α n'est pas une cible de l'hyperglycémie chronique. Une explication de l'origine du diabète chez les individus MODY3, est que des mutations primitives dans les régions codantes ou régulatrices du gène HNF1 α entraînant un dysfonctionnement de sa protéine dans les cellules β -pancréatiques, engendrent des troubles de l'insulino-sécrétion et l'hyperglycémie chronique. Il est connu que l'hyperglycémie chronique accentue le défaut de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose, par un mécanisme moléculaire encore mal compris. Une hypothèse actuelle basée sur un modèle *ex vivo*, propose que l'hyperglycémie réduise l'expression de facteurs de transcription du gène impliquée dans la régulation de la transcription du gène de l'insuline (phénomène de la « glucotoxicité »). Un de nos objectifs consistait alors à rechercher si l'expression du gène HNF1 α et/ ou l'activité de sa protéine pouvait être affectée par l'hyperglycémie chronique dans les cellules β -pancréatiques. L'expression et l'activité du gène HNF1 α étaient alors comparées entre les cellules HIT-T15 cultivées à 11,1mmol/l (a) et à la concentration physiologique de 0,8mmol/l (b) de glucose. Par western blot et retard sur gel, nous n'avons observé respectivement aucune

variation apparente de la quantité de protéine nucléaire et de l'activité de fixation à l'ADN entre les extraits des 2 groupes de cellules. Nous montrons dans les cellules cultivées avec 11,1mmol/l de glucose, une diminution de l'activité du promoteur du gène humain de l'insuline, en utilisant le gène rapporteur CAT sous la dépendance de la région régulatrice du gène humain de l'insuline (INSCAT). En utilisant cette construction, la variation que nous observons a déjà été reproduite (Sharma et al, 1995). Lorsque le vecteur rapporteur INSLUC est utilisé, la différence d'activité entre les cellules cultivées avec 11,1mmol/l et 0,8mmol/l est toujours observée, mais est beaucoup moins forte comparée au vecteur INSCAT. Le potentiel de transactivation de la protéine HNF1 était comparé entre les deux groupes de cellules. En utilisant le gène rapporteur luciférase, l'activité ne varie pas entre les cellules cultivées avec 11,1 mmol/l et 0,8 mmol/l de glucose. Cependant, lorsque le gène rapporteur CAT est utilisé, son activité chute d'un facteur 10 dans les cellules cultivées avec 11,1 mmol/l de glucose. Lorsque l'on compare la réduction de l'activité du promoteur de l'insuline, une réduction d'un facteur 10 est observé en utilisant le gène CAT, par rapport au gène de la luciférase, dans les mêmes conditions de transfection. La variabilité de l'activité CAT, causée par une diminution de l'expression du gène, peut être liée à un biais expérimental. De plus comme nous n'observons ni de diminution de l'expression, ni de l'activité de fixation HNF1 α , l'hypothèse est plausible.

Une altération de l'activité HNF1 α par l'hyperglycémie entraînerait un phénotype sévère de type MODY. Une altération primitive de l'activité HNF1 α conduit à un phénotype diabétique drastique de type MODY. Ceci suggère aussi qu'une réduction de l'activité HNF1 par un effet de l'hyperglycémie peut induire un phénotype aussi sévère que celui observé chez les individus MODY. Or le défaut de l'insulino-sécrétion de la plupart des diabétiques de type 2 est en général modéré, et ces diabétiques atteignent très rarement la valeur d'hypoinsulinémie rencontrée chez les patients MODY3. Cette observation pourrait donc appuyer en faveur qu'HNF1 ne soit pas une cible de l'hyperglycémie.

HNF1 α est directement impliquée dans le mécanisme de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. La découverte de mutations associées au phénotype MODY3, a conduit quelques travaux à mieux comprendre la fonction du gène HNF1 α dans le mécanisme de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. Dans les cellules β -pancréatiques murines (INS-1), la sur-expression induite d'un mutant dominant négatif (il s'agissait d'une mutation non associée au MODY3, provoquant une troncature du domaine de transactivation), diminue la capacité de ces cellules à sécréter de l'insuline en réponse au glucose et à l'arginine. Cette diminution était alors corrélée avec une réduction du métabolisme oxydatif mitochondrial et la transcription des gènes codant la Pyruvate Kinase et GLUT2. Ces observations suggèrent que des effets similaires pourraient être attribués au moins aux mutants de la classe IIb. D'autre part, si une réduction de l'expression du gène HNF1 α suffit au développement du MODY3, une hypothèse serait que cette réduction de l'expression du gène, puisse aussi entraîner une diminution de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose et de l'expression de ses gènes cibles dans les cellules β . Pour étayer cette hypothèse, une solution serait d'envisager une approche dans laquelle, des cellules exprimeraient des oligonucléotides ou des ARN antisens spécifiques. Dans ces cellules, les niveaux d'expression des gènes cibles et le mécanisme de l'insulino-sécrétion en réponse à différents sécrétagogues pourraient alors être explorés.

Si la fonction du gène HNF1 α dans les cellules β -pancréatiques n'est pas encore bien élucidé, en revanche, dans le tissu hépatique, HNF1 α est impliqué dans la régulation de l'expression de nombreux gènes du métabolisme des glucides et des lipides. Par conséquent, des anomalies fonctionnelles HNF1 α pourraient aussi induire un dysfonctionnement hépatique. L'hyperglycémie sévère observée chez les patients MODY3 pourrait alors résulter d'un défaut combiné des tissus hépatiques et pancréatiques. Certains travaux rapportaient une production endogène du glucose anormalement élevée chez des patients MODY3 (Surmely et al, 1998). Cette surproduction, n'étant que partiellement supprimée au cours d'un clamp d'hyperinsulinémie

modérée, suggère une augmentation constitutive anormale de la production hépatique de glucose chez ces patients MODY3.

III. Les gènes qui régulent l'expression ou l'activité du gène HNF1 α : Des gènes du MODY?.

Le gène HNF3 β est un gène potentiel au diabète de type MODY. Le réseau de régulation des facteurs nucléaires hépatiques (HNFs) semble primordial à la fonction normale des cellules β -pancréatiques. Parmi les cinq gènes du MODY actuellement identifiés, trois appartiennent à cette classe des HNFs (HNF1 α /MODY3, HNF1 β /MODY5 et HNF4 α /MODY1). Plusieurs travaux ont montré qu'HNF4 α et HNF1 β sont capables d'interagir avec HNF1, pour en moduler soit son activité ou son expression. Des mutations dans le gène HNF4 α et dans son site de fixation dans le promoteur du gène HNF1 α provoquent respectivement les formes MODY1 et MODY3. Une hypothèse qui découle donc est que les gènes qui peuvent moduler l'expression ou l'activité du gène HNF1 α , soient également impliqués dans un diabète de type MODY. Depuis que des mutations dans le site de fixation aux facteurs HNF3 sont associées au MODY3, nous avons recherché l'implication du gène HNF3 β dans l'origine du diabète de type MODY dans 21 familles françaises. Le diabète dans ces familles, n'était associé avec aucuns des loci MODY connus. Au total, 6 variants ont été identifiés et sont à ce jour les seuls connus pour ce gène. Tous étaient retrouvés avec la même fréquence chez les individus contrôles. Les analyses de liaison pouvaient exclure l'implication du gène dans 11 des 15 familles informatives. Comme des variations génétiques n'ont pas été recherchées dans les régions régulatrices, l'implication du gène ne pouvaient pas être clairement exclue par des analyses de liaison dans les 4 autres familles. Compte tenu de l'hétérogénéité génétique et l'existence de formes rares du MODY, il est possible que des mutations rares dans le gène codant HNF3 β responsables du diabète dans la population humaine existent. Comme les mutations dans les gènes codant HNF1 β , HNF4 α et IPF1 ont été identifiées dans des familles isolées et n'ont jamais été retrouvées dans d'autres populations. L'origine

ethnique est un déterminant génétique contribuant à l'identification de mutations. Certaines mutations ont été préférentiellement retrouvées que dans une seule ethnie, comme la mutation dans le gène HNF1 β qui a été retrouvée uniquement dans une famille japonaise. Considérant ces observations, il est possible que nous ne disposons pas de familles suffisamment nombreuses, et hétérogènes sur le plan ethnique, pour l'identification d'éventuelles mutations délétères dans le gène HNF3 β .

Etant donné la fonction pléiotrope d'HNF3 β , il est concevable que ce dernier ne soit pas impliqué dans une forme d'un diabète de type MODY. Par ailleurs, dans les cellules β -pancréatiques, l'expression de certains gènes, dont l'activité est cruciale dans la fonction spécifique β -pancréatique, est régulée par le facteur HNF3 β , comme celle du gène PDX1 (MODY4), dont l'inactivation totale entraîne une agénésie pancréatique, mais aussi l'expression des gènes HNF1 α (MODY3) et HNF4 α (MODY1).

D'autres gènes candidats peuvent être proposés. Les cofacteurs impliqués dans la formation du complexe actif avec la protéine HNF1 α pourraient être associés au phénotype MODY. Une mutation dans le gène codant HNF1 β a été associée au phénotype MODY5. Si le rôle du facteur HNF1 β sur la régulation transcriptionnelle du gène HNF1 α n'est pas connu, en revanche, les deux facteurs sont capables d'interagir pour former des complexes actifs sur l'activité transcriptionnelle *ex vivo*. Le diabète chez les individus du phénotype MODY5, pourrait alors en partie résulter d'un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine HNF1 α .

Le cofacteur DCoH, en plus de son activité déhydratase, intervient dans la stabilisation du complexe dimère HNF1. Chez l'homme, des mutations localisées dans le gène codant DCoH conduisent à une hyperphénylalaninémie avec un défaut de la cascade métabolique impliquant le cofacteur (Citron et al, 1993), mais n'entraînent pas de diabète. Ces mutations sont localisées dans le domaine impliqué dans l'activité enzymatique qui n'intervient pas dans l'interaction avec les dimères HNF1 α . Les mutants sont capables de se fixer *ex vivo* avec le dimère HNF1 α . Bien que ce cofacteur ne module que légèrement l'activité du complexe, lorsqu'il est sur-exprimé dans les

conditions *ex vivo*, son implication dans l'activité transcriptionnelle dans les conditions *in vivo* est encore mal connue. Ainsi il serait possible que des mutations altérant l'aptitude de ce cofacteur à interagir avec le dimère HNF1 α puisse aussi induire un diabète de type MODY. Cette hypothèse a été considérée par notre laboratoire. Des études de liaisons en utilisant des marqueurs microsatellites localisées à proximité du gène n'indiquaient cependant aucune liaison avec le diabète dans les 11 des 15 familles informatives, dans ces mêmes ou nous avons exclu le gène HNF3 β (JC Chèvre, communication personnelle).

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

Depuis que des mutations ont été identifiées dans le gène codant HNF1 α , peu de travaux se sont intéressés aux effets fonctionnels de ces mutations associées au phénotype MODY3. Ainsi, nous avons montré que chaque mutation étudiée affecte l'activité transcriptionnelle de la protéine HNF1 à différents niveaux. Le mécanisme moléculaire qui expliquerait le mode de transmission dominant du phénotype MODY3 ne semble pas unique. Les mutations induisent soit un effet par haploinsuffisance, et c'est le cas de la plupart des mutations, ou un effet dominant négatif sur l'activité de la protéine sauvage, mais n'est représenté dans ce cas que par quelques rares mutations. Cette observation souligne désormais que chez l'homme, contrairement au modèle des souris invalidées, le niveau d'expression du gène HNF1 α est crucial au fonctionnement normal des cellules β du pancréas et déterminerait aussi le développement du diabète. Aussi Le diabète de type 3 figure parmi les cas peu fréquents de pathologie humaine à transmission dominante et à forte pénétrance, ou une légère réduction de l'expression du gène impliqué est suffisante à induire le phénotype sévère. Par ailleurs, ce niveau d'expression et l'activité du facteur HNF1 ne sont pas affectés par l'hyperglycémie chronique. Ainsi, le mécanisme moléculaire par lequel l'hyperglycémie chronique affecte l'insulino-sécrétion n'impliquerait pas un défaut du facteur HNF1 α . L'ensemble de ces travaux apportent des arguments supplémentaires quant aux conséquences fonctionnelles des mutations du gène dans le contexte biologique des cellules β du pancréas. Dans ces cellules, l'activité HNF1 α est déterminante dans la fonction de l'insulino-sécrétion en réponse au glucose. En effet, quelques travaux ont montré que la sur-expression d'une forme dominante négative HNF1, diminue la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose. Dans un modèle similaire, Il serait alors intéressant d'étudier l'effet des mutations des différentes classes sur le mécanisme de l'insulino-sécrétion et sur l'expression des gènes cibles d'HNF1 α . Aussi, un modèle de cellules β -pancréatiques exprimant un transcrit ou des oligonucléotides antisens spécifiques à HNF1 α pourrait être effectué et comparé pour les mêmes effets aux modèles précédents. L'étude des effets physiologiques des différentes mutations, sur l'insulino-sécrétion, pourrait également être abordée par la réalisation de modèles de souris transgéniques sur-

exprimant spécifiquement dans les cellules β du pancréas les formes mutées ou antisens d'HNF1 α . L'expression conditionnelle des transgènes pourrait alors être réalisée selon un modèle utilisant le système de régulation d'expression contrôlée par la tétracycline. Ce modèle, serait alors basé sur l'expression d'un activateur dont l'expression est contrôlée par le promoteur de l'insuline (RIPE3A) et activée en présence de la tétracycline, et de l'expression du transgène dépendante de l'activateur. Ce système permettrait de suivre la physiologie d'une même souris soumise ou non à un régime contenant de la tétracycline. Toutes ces approches devraient apporter une meilleure compréhension du rôle du gène HNF1 α dans les cellules β - pancréatiques dont le but, de mieux cerner la physiopathologie du diabète, est de rechercher de nouveaux gènes potentiels au développement du diabète. Dans cette prospection, une approche pourrait consister à étudier les gènes capables de moduler l'activité ou l'expression d'HNF1 α . Parmi ceux-la, le gène HNF3 β reste un gène candidat d'un diabète de type MODY dans d'autres populations. Même si dans notre étude, son implication est clairement exclue dans la plupart des familles étudiées, elle reste encore envisagée pour certaines d'entre elles. L'identification des polymorphismes dans le gène HNF3 β permettra de mener des études cas/ témoins dans d'autres populations diabétiques de type 2 à début tardif ou précoce de type MODY.

Bibliographie:

- Ahlgren U, Jonhson J, Edlund H.: The morphogenesis of the pancreatic mesenchyme is uncoupled from that of the pancreatic epithelium in IPF1/PDX1- deficient mice. *Development* 122, 1409-1416, 1996.
- Anderson WF, Ohlendorf DH, Takeda Y, Matthews BW,,: Structure of the Cro repressor from bacteriophage λ and this interaction with DNA. *Nature* 290, 754-758, 1981.
- Antignac C, Arduy CH, Beckmann JS, Benessy F, Gros F, Medhioub M, Hildebrandt F, Dufier JL, Kleinknecht C, Broyer M, Weissenbach J, Habib R, Cohen D.: A gene for familial juvenile nephronophthisis (recessive medullary cystic kidney disease) maps to chromosome 2p. *Nature Genetics* 3, 342-345, 1993.
- Amrolia PJ, Cunningham JM, Ney P, Nienhuis AW, Jane SM.: Identification of two novel regulatory elements within the 5'- untranslated region of the human A gamma- globulin gene. *J Biol chem* 270, 12892-12898, 1995.
- Ashford ML, Bond CT, Blair TA, Adelman JP.: Cloning and functional expression of a rat heart KATP channel. *Nature* 370, 456-459, 1994.
- Avraham, K. B.; Prezioso, V. R.; Chen, W. S.; Lai, E.; Sladek, F. M.; Zhong, W.; Darnell, J. E., Jr.; Jenkins, N.A.; Copeland, N. G.: Murine chromosomal location of four hepatocyte-enriched transcription factors: HNF-3-alpha, HNF-3-beta, HNF-3-gamma, and HFN-4. *Genomics* 13: 264-268, 1992.
- Bach I, Galcheva GZ, Mattei MG, et al: Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics* 8, 155-164, 1990.
- Bach I, Mattei MG, Cereghini S and Yaniv M: two members of an HNF1 homeoroetin family are expressed in human liver. *Nucleic Acid Res* 19, 3553-3559, 1991.
- Bach I, pontoglio M and Yaniv M: StructureoF the gene encoding hepatocyte nuclear Factor 1 (HNF1). *Nucleic Acids Res* 20, 4199-4204, 1992.
- Bach I and Yaniv M: More potent transcriptional activators or a transdominant inhibitor of the HNF1 Homeoprotein family are generated by alternative RNA processing. *EMBO J* 12, 4229-4242, 1993.
- Backer JM, Myers MG Jr, Sun XJ, Chin DJ, Shoelson SE, Miralpeix M, White MF.: Association of IRS-1 with the insulin receptor and the phosphatidylinositol 3'-kinase. Formation of binary and ternary signaling complexes in intact cells. *J Biol Chem* 268, 8204-8212, 1993.
- Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 20, 87-93, 1981.
- Barrera-Hernandez G, Wanke IE, Wong NCW: Effects of diabetes mellitus on hepatocyte nuclear factor 1 decreases albumin gene transcription. *J Biol Chem* 271: 9969-9975, 1996.
- Barrera-Hernandez G, Wanke IE, Wong NCW: Phlorizin or vanadate treatment reverses impaired expression of albumin and hepatocyte nuclear factor 1 in diabetes rats. *Diabetes* 45: 1217-1222, 1996.
- Bartkowski S, Zapp D, Weber H et al: Developmental regulation and tissue distribution of the liver transcription Factor LFB1 (HNF1) in xenopus laevis. *Mol Cell Bio* 13, 421-431, 1993.
- Baumhueter S, Mendel DB, Conley PB et al: HNF1 shares three sequences motifs with the POU domain proteins and is identical to LF-B1 and APF. *Genes Dev* 4, 372-379, 1990.

Beckmann JS, Richard I, Hillaire D, Broux O, Antignac C, Bois E, Cann H, Cottingham Jr RW, Feingold N, Feingold J, Kalil J, Lathrop GM, Marcadet A, Masset M, Mignard C, Passos Bueno MR, Pellerin N, Zatz M, Dausset J, Fardeau M, Cohen D. A gene for limb-girdle dystrophy maps to chromosome 15 by linkage. *CR Acad Sci PARIS* ; 312 (Série III) : 141-148, 1991.

Bell GI, Xian KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Cox NJ.: Gene for non insulin dependant diabetes mellitus (maturity onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 1484-1488, 1991.

Bingle, C. D.; Gowan, S.: Molecular cloning of the forkhead transcription factor HNF-3-alpha from a human pulmonary adenocarcinoma cell line. *Biochim. Biophys. Acta* 1307: 17-20, 1996.

Blumenfeld M, Maury M, Chouard T, Yaniv M and Condamine H: Hepatic nuclear Factor 1 (HNF1) a wider distribution than products of its known target genes in developing mouse. *Development* 113, 589-599, 1991.

Bodmer W, Bailey C, Bodmer J, Bussey H, Ellis A, Gorman P, Lucibello F, Murday V, Rider S, Scambler P, Sheer D, Solomon E, Spurr N. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328, 614-616, 1987.

Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M.: Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47, 1033-1040 1986.

Brooks AR, Blackhart BD, Haubold K, Levy-Wilson B.: Characterization of tissue-specific enhancer elements in the second intron of the human apolipoprotein B gene. *J Biol Chem* 266, 7848-7859, 1991.

Cereghini S, Blumenfeld M, Yaniv M: A liver-specific factor essential for albumin transcription differs between differentiated and dedifferentiated rat hepatoma cells: *Genes Dev* 8, 957-974, 1988.

Cereghini S, Raymondjean M, Carranca AG, Herbomel P and Yaniv M: Factors involved in control of tissue specific expression of albumin gene. *Cell* 50, 627-638, 1987.

Cereghini S, Yaniv M and Cortese R: Hepatocyte dedifferentiation and extinction is accompanied by a block in the synthesis of mRNA coding for the transcription factor HNF1/LFB1. *EMBO J* 9, 2257-2263, 1990.

Cereghini S, Ott MO, Power S, Maury M: Expression patterns of vHNF1 and HNF1 homeoproteins in early postimplantation embryos suggest distinct and sequential developmental roles. *Development* 116, 783-797, 1992.

Ceska TA, Lamers M, Monaci P, Nicosia A, Cortese R, Suck D. : The X-ray structure of an atypical homeodomain present in the rat liver transcription factor LFB1/HNF1 and implications for DNA binding. *EMBO J* 12, 1805-1180, 1993.

Chevre JC, Hani EH, Boutin P, Vaxillaire M, Blanche H, Vionnet N, Pardini VC, Timsit J, Larger E, Charpentier G, Beckers D, Maes M, Bellanne-Chantelot C, Velho G, Froguel P.: Mutation screening in 18 Caucasian families suggest the existence of other MODY genes. *Diabetologia* 41, 1017-1023, 1998.

Chevre JC, Hani EH, Stoffers DA, Habener JF, Froguel P. Insulin promoter factor 1 gene is not a major cause of maturity-onset diabetes of the young in French Caucasians. *Diabetes* 47, 843-844, 1998.

Chouard T, Blumenfeld M, Bach I, Vandekerckhove J, Cereghini S, Yaniv M: A distal dimerization domain is essential for DNA-binding by the atypical HNF1 homeodomain. *Nucleic Acids Res* 18, 5853-5863, 1990.

- Citron BA, Davis MD, Milstien S, Gutierrez J, Mendel DB, Crabtree GR, Kaufman S.: Identity of 4a-carbinolamine dehydratase, a component of the phenylalanine hydroxylation system, and DCoH, a transregulator of homeodomain proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11891-11894, 1992.
- Clark A, Cooper GJS, Lewis CE, et al. Islet amyloid formed from diabetes associated peptide may be pathogenic in type 2 diabetes. *Lancet*, 231-234, 1987.
- Cockell MD, Stolarczyk S, Frutiger DJ, Hughes O, Hegenbuchle O, Wellauer PK.: Binding sites for hepatocyte nuclear factor 3b or 3g and pancreas transcription factor 1 are required for efficient expression of the gene encoding pancreatic a-amylase. *Mol Cell Biol* 15, 1933-1941, 1995.
- Costa RH, Grayson DR, Darnell JE Jr .: Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol*, 1415-1425, 1989.
- Davies MJ, Rayman G, Gray IP, Day JL, Hales CN.: Insulin deficiency and increased plasma concentration of intact and 32/33 split proinsulin in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabet Med* 10, 313-320, 1993.
- De Francesco R, Pastore A, Vecchio G, Cortese R.: Circular dichroism study on the conformational stability of the dimerization domain of transcription factor LFB1. *Biochemistry* 30, 143-147, 1991.
- DeFronzo RA.: Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 37, 667-687, 1988.
- DeFronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E.: Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care* 15, 318-368, 1992.
- Denecke B, Bartkowski S, Senkel S, Klein HL and RyFFel GU: Chimeric liver transcription factors LFB1 (HNF1) containing the acidic activation domain of VP16 act as positive dominant interfering mutants. *J Biol Chem* 268, 18076-18082, 1993.
- Deryckere F, Byrnes L, Wagner A, McMorrow T and Gannon F: Salmon HNF1: cDNA sequence evolution, tissue specificity and binding to the salmon serum albumin promoter: *J Mol Biol* 247, 1-10, 1995.
- De Simone V, De Magistris L, Lazzaro D et al. LFB3, a heterodimer homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J* 10, 1435-1443, 1991.
- Dix DJ, Lin PN, Kimata Y, Theil EC.: The iron regulatory region of ferritin mRNA is also a positive control element for iron-dependant translation. *Biochemistry* 31, 2818- 2822, 1992.
- Donovan PD, Harden C, Gal J, Ho L, Sibille E, Trifiletti R, Gudas LJ, Miklos T.: Sensitivity to jerky gene dosage Underlies Epileptic Seizures in Mice. *Journal of Neuroscience* 17, 4562-4569, 1997.
- Duncan SA, Navas MA, Dufort D, Rossant J, Stoffel M.: Regulation of a Transcription Factor Network Required for Differentiation and Metabolism. *Science* 281, 692-695, 1998.
- Eizirik DL, Korbitt GS, Hellerstrom C.: Prolonged exposure of human pancreatic islets to high glucose concentrations in vitro impairs the b-cells function. *J clin Invest* 90, 1263-1268, 1992.
- Emmens LA, Landers DW, Moss LG.: Hepatocyte nuclear factor is expressed in a hamster insulinoma line and transactivates the rat insulin I gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7300-7304, 1992.
- Fajans SS.: Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes care* 13, 49-64, 1990.
- Feingold J. Le déséquilibre de liaison. *Médecine/Sciences*, 7 : 161-168, 1991

- Felig DM, Brusilow SW, Boyer JL Hyperammonemic coma due to parenteral nutrition in a woman with heterozygous ornithine transcarbamylase deficiency.: *Gastroenterology* 109, 282-284, 1995.
- Fiedorek FT, Kay ES.: Mapping of the insulin promoter factor 1 gene (ipf1) to distal mouse chromosome 5. *Genomics* 28, 581-584, 1995.
- Frain M, Swart G, Monaci P, et al: The liver-specific transcription Factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DNA binding domain. *Cell* 59, 145-157, 1989.
- Freyd G, Kim SK, Horvitz HR.: Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344, 876-9, 1990.
- Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, et al.: Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non dependant diabetes mellitus. *Nature* 356, 162-164, 1992.
- Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt MA, Beckmann JS, Bell GI, Cohen D : Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase : definition of a subtype of diabetes mellitus. *New Eng. J. Med.* 328, 697-702, 1993.
- Froguel P. : Tracking down genes to cure diabetes: an achievable task for the 21st century?. *Diabetes Metab* 23, 8-13, 1997.
- Furuta H, Iwasaki N, Oda N, Hinokio Y, Horikowa Y, Yamagata K, Yano N, Sugahiro J, Ogata M, Ohgawara H, Omori Y, Iwamoto Y and Bell GI.: Organization and partial sequence of the hepatocyte nuclear factor-4 alpha/MODY1 gene and identification of a missense mutation, R127W, in a Japanese family with MODY. *Diabetes* 46, 1652-1657, 1997.
- Geballe AP, Spaete RR, Mocarsky ES.: A cis-acting element within the 5' leader of a cytomegalovirus beta transcript determines kinetic class. *Cell* 46, 865-872, 1986.
- Gehring WJ.: Homeo boxes in the study of development. *Science* 236, 1245-1252, 1987.
- Gidh-jain M, Takeda J, Xu LZ, et al.: Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependant (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity/ Implications for structure/function relationships. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1932-1936, 1993.
- Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I, Howard BH.: The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6777-6781, 1982.
- Gragoli C, Lindner T, Cockburn BN, Kaisaki PJ, Gragnoli F, Marozzi G, Bell GI.: Maturity-onset diabetes of the young due to a mutation in the hepatocyte nuclear factor-4 alpha binding site in the promoter of the hepatocyte nuclear factor-1 alpha gene. *Diabetes* 46, 1648-1651, 1997.
- Gusella J, Wexler N, Conneally P. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306 : 234-238, 1983.
- Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Philippi A, Poller W, Velho G, Carcassi C, Contu L, Julier C, Cambien F, Passa P, Lathrop M, Kindsvogel W, Demenais F, Nishimura E, Froguel P : A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with non-insulin-dependent-diabetes mellitus. *Nature Genet* 9, 299-304, 1995.
- Hainault I, Guerre-Millo M, Guichard C, Lavau M.: Differential regulation of adipose tissue glucose transporters in genetic obesity (fatty rat). Selective increase in the adipose cell/muscle glucose transporter (GLUT 4) expression. *J Clin Invest* 87, 1127-1131, 1991.

- Hall J, Lee M, Newman B, Morrow J, Anderson L, Huey B, King M. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250, 1684-1689, 1990.
- Harada R, Dufort D, Denis-Larose C, Nepveu A.: Conserved cut repeats in the human cut homeodomain protein function as DNA binding domains. *J Biol Chem* 269, 2062-2067, 1994.
- Harrison SC, Aggarwal AK.: DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu Rev Biochem* 59, 933-969, 1990.
- Harrison SC.: A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* 353, 715-719, 1991.
- Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI.: Mutation in hepatocyte nuclear -1-beta gene (TCF2) associated with MODY.
- Hattersley AT.: Maturity-onset diabetes of the young. *Baillière's Clinical Paediatrics* 4, 663-680, 1996.
- Hauer CR, Rebrin I, Thony B, Neuheiser F, Curtius HC, Hunziker P, Blau N, Ghisla S, Heizmann CW.: Phenylalanine hydroxylase-stimulating protein/pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase from rat and human liver. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 268, 4828-4831, 1993.
- Herr W, Sturm RA, Clerc RG, Corcoran LM, Baltimore D, Sharp PA, Ingraham HA, Rosenfeld MG, Finney M, Ruvkin G and Horvitz HR: *Gene Dev* 2, 1513-1516, 1988.
- Horikawa Y, Iwasaki N, Hara M, Furuta H, Hinokio Y, Cockburn BN, Lindner T, Yamagata K, Ogata M, Tomonaga O, Kuroki H, Kasahara T, Iwamoto Y, Bell GI : Mutation in hepatocyte nuclear factor-1-beta gene (TCF2) associated with MODY. (Letter) *Nature Genet.* 17 : 384-385, 1997.
- Ip YT, Poon D, Stone D, Granner DK, Chalkley R.: Interaction of a liver-specific factor with an enhancer 4.8 kilobases upstream of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* , 3770-3781, 1990.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, Corvol P. Molecular basis of human hypertension : role of angiotensinogen. *Cell* 71, 169-180, 1992.
- Jonson J, Carlsson L, Hedlund T, Edlund H.: Insulin-promoter-factor-1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606-609, 1994.
- Julier C, Hyer RN, Davies J, Merlin F, Soularue P, Briant L, Cathelineau G, Deschamps I, Rotter JJ, Froguel P, et al.: Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature* 354, 155-159, 1991.
- Kaestner, K. H.; Hiemisch, H.; Luckow, B.; Schutz, G.: The HNF-3 gene family of transcription factors in mice: gene structure, cDNA sequence, and mRNA distribution. *Genomics* 20: 377-385, 1994.
- Kahn CR.: Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 43, 1066-1084, 1994.
- Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T.: Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. *Nature* 344, 879-882, 1990.
- Kaufman DL, Clare-Salzler M, Tian J, Forsthuber T, Ting GS, Robinson P, Atkinson MA, Sercarz EE, Tobin AJ, Lehmann PV.: Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature* 366, 69-72, 1993.

- Kissinger CR, Liu BS, Martin-Blanco E, Kornberg TB, Pabo CO.: Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579-590, 1990.
- Kristie TM, Sharp PA.: Interactions of the Oct-1 POU subdomains with specific DNA sequences and with the HSV α -trans-activator protein. *Genes Dev* 12B, 2383-2396, 1990.
- Kritis AA, Ktistaki E, Barda D, Zannis VI, Talianidis I.: An indirect negative autoregulatory mechanism involved in hepatocyte nuclear factor-1 gene expression. *Nucleic Acids Res* 21, 5882-5889, 1993.
- Ktistaki E, Talianidis I.: Modulation of hepatic gene expression by hepatocyte nuclear factor 1. *Science* 277, 109-112, 1997.
- Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell JE, Crabtree GR.: A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification. *Nature* 355, 457-461, 1992.
- Kubo Y, Reuveny E, Slesinger PA, Jan YN, Jan LY.: Primary structure and functional expression of a rat G-protein-coupled muscarinic potassium channel. *Nature* 364, 802-806, 1993.
- Lai E, Prezioso VR, Tao WF, Chen WS, Darnell JE Jr.: Hepatocyte nuclear factor 3 α belongs to a gene family in mammals that is homologous to the *Drosophila* homeotic gene fork head. *Genes Dev* 3, 416-427, 1991.
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL.: The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240, 1759-1764, 1988.
- Lazzaro D, De Simone V, De Magistris L, Lehtonen E, Cortese R: LFB1 and LFB3 homeoproteins are sequentially expressed during kidney development. *Development* 114, 469-479, 1992.
- Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC.: Beta-cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion. *Diabetes Care* 15, 442-455, 1992.
- Leiting B, De Francesco R, Tomei L, Cortese R, Otting G, Wuthrich.: The three-dimensional NMR-resolution structure of the polypeptide fragment 195-286 of the LFB1/HNF1 transcription factor from rat liver comprises a nonclassical homeodomain. *EMBO J* 12, 1797-1803, 1993.
- Lemaigre FP, Durviaux SM, Truong O, Lannoy VJ, Hsuan JJ, Rousseau GG.: Hepatocyte nuclear factor 6, a transcription factor that contains a novel type of homeodomain and a single cut domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 18, 9460-9464, 1996.
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329, 1988-1992, 1993.
- Lin B, Morris DW, Chou JY.: Hepatocyte nuclear factor 1 α is an accessory factor required for activation of glucose-6-phosphatase gene transcription by glucocorticoids. *DNA Cell Biol* 17, 967-974, 1998.
- Lin B, Morris DW, Chou JY.: The role of HNF1 α , HNF3 γ , and cyclic AMP in glucose-6-phosphatase gene activation. *Biochemistry* 46, 14096-14106, 1997.
- Lindler T, Gagnoli C, Furuta H, Cockburn BN, Petzold C, Rietzsch H, Weiss U, Schulze J, Bell GI.: Hepatic function in a family with a nonsense mutation (R154X) in the Hepatocyte nuclear factor-4 α /MODY1 gene. *J Clin Invest* 100, 1400-1405, 1997.

- Liu S, McLeod E, Jack J.: Four distinct regulatory regions of the cut locus and their effect on cell type specification in *Drosophila*. *Genetics* 127, 151-159, 1991.
- McKay DB, Steitz TA.: Structure of catabolite gene activator protein at 2.9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. *Nature* 290, 744-749, 1981.
- Malaisse WJ, Lebrun P, Yaylali B, Camara J, Valverde I, Sener A.: Ketone bodies and islet function: ⁴⁵Ca handling, insulin synthesis, and release. *Am J Physiol* 259, E117-122, 1990.
- Manson, H. E.; Austin, R. C.; Fernandez-Rachubinski, F.; Rachubinski, R. A.; Blajchman, M. A.: The molecular pathology of inherited human antithrombin III deficiency. *Transfusion Med. Rev.* III, 264-281, 1989.
- Matchinsky FM.: Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cell and hepatocytes. *Diabetes* 30, 647-652, 1990.
- Mendel DB, Khavari PA, Conley PB, Graves MK, Hansen LP, Admon A, Crabtree GR.: Characterization of a cofactor that regulates dimerization of a mammalian homeodomain protein. *Science* 254, 1762-1767, 1991.
- Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR: HNF1-alpha and HNF1-beta (vHNF1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Gene Dev* 5, 1042-1056, 1991.
- Menzel S, Yamagata K, Trabb JB, Nerup J, Permutt MA, Fajans SS, Menzel R, Iwasaki N, Omori Y, Cox NJ, et al.: Localization of MODY3 to a 5-cM region of human chromosome 12. *Diabetes* 44, 1408-1413, 1995.
- Miller CP, McGehee RE, Hebener JF.: IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J* 13, 1145-1156, 1994.
- Miller J, McLachlan AD, Klug A. : Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 6, 1609-1614, 1985.
- Mincheva A, Lichter P, Schutz G, Kaestner KH.: Assignment of the human genes for hepatocyte nuclear factor 3-alpha, -beta, and -gamma (HNF3A, HNF3B, HNF3G) to 14q12-q13, 20p11, and 19q13.2-q13.4. *Genomics* 39, 417-419, 1997.
- Mincheva, A.; Lichter, P.; Schutz, G.; Kaestner, K. H.: Assignment of the human genes for hepatocyte nuclear factor 3-alpha, -beta, and -gamma (HNF3A, HNF3B, HNF3G) to 14q12-q13, 20p11, and 19q13.2-q13.4. *Genomics* 39: 417-419, 1997.
- Miquerol L, Lopez S, Cartier N, Tulliez M, Raymondjean M, Kahn A.: Expression of the L-type pyruvate kinase gene and the hepatocyte nuclear factor in exocrine and endocrine pancreas. *J Biol Chem* 269, 8944-8951, 1994.
- Misler S, Barnett DW, Pressel DM, Gillis KD, Scharp DW, Falke LC.: Stimulus-secretion coupling in beta-cells of transplantable human islets of Langerhans. Evidence for a critical role for Ca²⁺ entry. *Diabetes* 41, 662-670, 1992.
- Moran A, Zhang HJ, Olson LK, Harmon JS, Poitout V and Robertson RP.: Differentiation of glucose toxicity from Beta Cell Exhaustion during the Evolution of defective Insulin Gene expression in the Pancreatic Islet Cell Line, HIT-T15. *J Clin Invest* 99, 534-539, 1997.
- Neufeld EJ, Skalnik DG, Lievens PM, Orkin SH.: Human CCAAT displacement protein is homologous to the *Drosophila* homeoprotein, cut. *Nat Genet* 1, 50-55, 1992.

Nicosia A, Monaci P, Tomei L, De Francesco R, Nuzzo M, Stunnenberg H, Cortese R.: A myosin-like dimerization helix and an extra-large homeodomain are essential elements of the tripartite DNA binding structure of LFB1. *Cell* 61, 1225-1236, 1990.

Nicosia A, Tafi R, Monaci P: trans-dominant inhibition of transcription activator LFB1. *Nucleic Acids Res* 20, 5321-5328, 1992.

Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T.: IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J* 12, 4251-4259, 1993

Olson LK, Redmon JB, Towle HC, et al.: Chronic exposure of HIT cells to high glucose concentrations paradoxically decreases insulin gene transcription and alters binding of insulin gene regulatory protein. *J Clin Invest* 92: 514-519, 1993.

Olson LK, Sharma A, Peshavaria M, et al.: Reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 cells chronically exposed to a supraphysiologic glucose concentration is associated with loss of STF-1 transcription factor expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9127-9131, 1995.

O'Neil KT, Hoess RH, DeGrado WF .: Design of DNA-binding peptides based on the leucine zipper motif. *Science* 249,774-778, 1990.

O'Rahilly SP, Nugent Z, Rudenski AS, Hosker JP, Burnett MA, Darling P, Turner RC : Beta-cell dysfunction rather than insulin sensitivity, is the primary defect in familial type 2 diabetes. *Lancet* 2, 360-364, 1986.

Ott MO, Rey CJ, Cereghini S and Yaniv M: vHNF1 is expressed in epithelial cells of distinct embryonic origin during development and precedes HNF1 expression. *Mech Dev* 36, 47-58, 1991.

Otting G, Qian YQ, Billeter M, Muller M, Affolter M, Gehring WJ, Wuthrich K.: Protein-DNA contacts in the structure of a homeodomain-DNA complex determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy in solution. *EMBO J* 10, 3085-3092, 1990.

Pabo CO, Lewis M.: The operator-binding domain of lambda repressor: structure and DNA recognition. *Nature* 298, 443-7, 1982.

Pani L, Overdier DG, Porcella A, Qian X, Lai E, Costa RH.: Hepatocyte nuclear factor 3 beta contains two transcriptional activation domains, one of which is novel and conserved with the Drosophila fork head protein. *Mol Cell Biol* 12, 3723-3732, 1992

Pastore A, De Francesco R, Barbato G, Castiglione Morelli MA, Motta A, Cortese R .: 1H resonance assignment and secondary structure determination of the dimerization domain of transcription factor LFB1. *Biochemistry* 30, 148-53, 1991.

Philippe J.: Hepatocyte-nuclear factor 3 beta gene transcripts generate protein isoforms with different transactivation properties on the glucagon gene. *Mol Endocrinol* 3, 368-374, 1995

Piaggio G, Tomei L, Toniatti C, De Francesco R, Gerstner J, Cortese R.: LFB1/HNF1 acts as a repressor of its own transcription. *Nucleic Acid Res* 22, 4284-4290, 1994.

Pietrangelo A and Shafritz AD.: Homeostatic regulation of hepatocyte nuclear transcription factor 1 expression in cultured hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 182-186, 1994.

Pilkis SJ, Granner DK.: Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annu Rev Physiol* 54, 885-909, 1992.

- Pimenta W, Mitrakou A, Capani F, Yki-Järvinen H, Gerich J. b-cell dysfunction with normal insulin sensitivity in glucose tolerant first-degree relatives of caucasian NIDDM patients. *Diabetes*, 41 (suppl1) : 143A (Abstract), 1992.
- Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, Frank BH, Galloway JA, Van Cauter E. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J med* 318 : 1231-1239, 1988.
- Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Poggi Bach J, Babinet C and Yaniv M: Hepatocyte Nuclear Factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria and renal Fanconi syndrome. *Cell* 84, 575-585, 1996.
- Pontoglio M, Sreenan S, Røe M, Pugh W, Ostrega D, Doyen A, Pick AJ, Baldwin A, Vehlo G, Froguel P, Levisetti M, Bonner-Weir S, Bell GI, Yaniv M and Polonsky KS: defective Insulin Secretion in Hepatocyte Nuclear Factor 1a-deficient Mice. *J Clin. Invest* 101, 2215-2222, 1998.
- Querfurth HW, Wijsman EM, St George-Hyslop PH, Selkoe DJ.: Beta APP mRNA transcription is increased in cultured fibroblasts from the familial Alzheimer's disease-1 family. *Brain Res Mol Brain Res* 28, 319-337, 1995.
- Randle PJ.: Glucokinase and candidate genes for type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 269-275, 1993.
- Raney AK, Easton AJ, Milich DR, McLachlan A .: Promoter-specific transactivation of hepatitis B virus transcription by a glutamine- and proline-rich domain of hepatocyte nuclear factor 1. *J Virol* 65, 5774-5781, 1991.
- Rao CD, Pech M, Robbins KC, Aaronson SA.: The 5' untranslated sequence of the c-sis/platelet-derived growth factor 2 transcript is a potent translational inhibitor. *Mol Cell Bio* 8, 284-292, 1988.
- Rausa FM, Ye H, Lim L, Duncan SA, Costa RH.: In situ hybridation with 33P-labeled RNA probes for determination of cellular expression patterns of liver transcription factors in mouse embryos. *Methods*, 29-41, 1998.
- Rey-Campos J, Chouard T, Yaniv M and Cereghini S: vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J* 10, 1445-1457, 1991.
- Ringeisen F, Rey-Campos J, M Yaniv: The transactivation potential of variant hepatocyte nuclear factor 1 is modified by alternative splicing: *J Biol Chem* 268, 25706-25711, 1993.
- Robertson RP, Zhang HJ, Pyzdrowski KL, et al.: Preservation of insulin mRNA levels and insulin secretion in HIT cells by avoidance of chronic exposure to high glucose concentrations. *J Clin Invest* 90: 320-325, 1992.
- Rosselin G. Hormones et peptides neurodigestifs. In *Traité de Diabétologie*, Ed Pradel, 54-70, 1990.
- Santerre RF, Cook RA, Crisel RM, Sharp JD, Schmidt RJ, Williams DC, Wilson CP. : Insulin synthesis in a clonal cell line of simian virus 40-transformed hamster pancreatic beta cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4339- 4343, 1981.
- Surmely JF, Guenat E, Philippe J, Dussoix P, Schneiter P, Temler E, Vaxillaire M, Froguel P, Jequier E, Tappy L.: Glucose utilisation and Production in patients with Maturity Onset Diabetes of the Young caused by a mutation of the Hepatocyte Nuclear Factor-1a Gene. *Diabetes* 47, 1459-1462, 1998.
- Schaln-Jantti C, Härhänänen M, Groop LC. Impaired activation of glycogen synthase in people at risk of developing NIDDM. *Diabetes*, 41 : 598-604, 1992.

Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW.: The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 989, 25-48, 1989. Stoffel M, Froguel P, Takeda J et al.: Human glucokinase gene: isolation, Characterisation, and identification of two missense mutations linked to early-onset non insulin dependant. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7698-7702, 1992.

Sharma A, Olson LK, Robertson RP, et al.: The reduction of insulin gene transcription in HIT-T15 b cells chronically exposed to high glucose concentration is associated with the loss of RIPE3b1 and STF-1 transcription factor expression. *Mol Endocrinol* 9: 1127-1134, 1995.

Stoffers DA, Ferrer J, Clarke WL, Habener JF.: Early-Onset type II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nature Genet* 17, 138-141, 1997.

Stoffers DA, Stanojevic V, Habener JF.: Insulin promoter factor-1 gene mutation linked to early-onset type 2 diabetes mellitus directs expression of a dominant negative isoprotein. *J. Clin. Invest* 102, 232-241, 1998.

Stoffel M and Duncan SA.: The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4a regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* 94, 13209-13214, 1997.

Tanizawa Y, Matsutani A, Chiu KC, Permutt MA.: Human glucokinase gene: Isolation, structural characterization and identification of a microsatellite repeat polymorphism. *Molecular Endocrinology* 6, 1070-1081, 1992.

Tanizawa Y, Chiu KC, Province MA et al.: Two microsatellite repeat polymorphisms flanking opposite ends of the human glucokinase gene: use in haplotype analysis of welsh caucasians with type 2 (non insulin-dependant) diabetes mellitus. *Diabetologia* 36, 409-413, 1993.

Tattersall RB, Fajans SS. A difference between the inheritance of classic juvenile-onset and maturity onset type diabetes of young people. *Diabetes* 24, 44-53, 1975.

Thorens B, Porret A, Buhler L, Deng SP, Morel P, Widmann C.: Cloning and functional expression of the human islet GLP-1 receptor. Demonstration that exendin-4 is an agonist and exendin-(9-39) an antagonist of the receptor. *Diabetes* 42, 1678-1682, 1993.

Todd JA, Bell JI, McDevitt HO.: HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 329, 599-604, 1987.

Tomura H, Nishigori H, Sho K, Yamagata K, Inoue I, Takeda J.: Loss- of- function and dominant-negative Mechanisms Associated with Hepatocyte Nuclear Factor-1b Mutations in Familial Type2 Diabetes mellitus. *J Biol chem* 274, 12975-12978, 1999.

Tomei L, Cortese R, De Francesco R. : A POU-A related region dictates DNA binding specificity of LFB1/HNF1 by orienting the two XL-homeodomains in the dimer. *EMBO J* 11, 4119-4129, 1992.

Tournier-Lasserre E, Joutel A, Melki J, Weissenbach J, Lathrop GM, Chabriat H, Mas JL, Cabanis EA, Baudrimont M, Maciazek J, Bach MA, Bousser MG. Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy maps to chromosome 19q12. *Nature genetics* 3, 256-259, 1993.

Valarche I, Tissier-Seta JP, Hirsch MR, Martinez S, Goridis C, Brunet JF.: The mouse homeodomain protein Phox2 regulates Ncam promoter activity in concert with Cux/CDP and is a putative determinant of neurotransmitter phenotype. *Development* 119, 881-896, 1993.

Vallet V, Antoine B, Chafey P, Vandewalle A, Kahn A.: Overproduction of a truncated hepatocyte nuclear factor 3 inhibits expression of liver-specific genes in hepatoma cells. *Mol Cell Biol*, 5453-5460, 1995.

Vaisse C, Kim J, Espinosa R, Le Beau M, Stoffel M.: Pancreatic Islet Expression Studies and polymorphic DNA markers in the Genes encoding Hepatocyte Nuclear Factor-3a, 3b, 3g, 4g and-6. *Diabetes* 46, 1364-1367, 1997.

Van Schaftingen E, Draye JP, Van Hoof F.: Coenzyme specificity of mammalian liver D-glycerate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 186, 355-359, 1989.

Van Schaftingen E.: Glycolysis revisited. *Diabetologia* 36, 581-588, 1993.

Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P.: A gene for maturity onset diabetes of the young (MODY) maps to chromosome 12q. *Nat Genet* 9, 418-423, 1995.

Vionnet N, Stoffel M, Takeda J et al.: Nonsense mutation in the glucokinase gene causes early-onset non-insulin dependant diabetes mellitus. *Nature* 356, 721-722, 1992.

Wainwright B, Scambler P, Schmidtke J, Watson EA, Law HY, Farrall M, Cooke HJ, Eiberg H, Williamson R. Localization of cystic fibrosis to human chromosome 7cen-q22. *Nature*, 318 : 384-386, 1985.

Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB.: Dominant-negative of HNF1alpha results in defective insulin gene transcription and impaired metabolism- secretion coupling in a pancreatic beta-cell line. *EMBO J* 22, 6701- 6713, 1998.

Wu KL, Gannon M, Peshavara M, Offield MF, Henderson E, Ray M, Marks A, Gamer LW, Wright CVE, Stein R.: Hepatocyte Nuclear Factor 3b is involved in pancreatic b-cell-specific Transcription of the pdx-1 Gene. *Mol Cell Biol*, 6002-6013, 1997.

Yamagata K, Oda N, Kaisaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Boriraj VV, Chen X, Cox NJ, Oda Y, Yano H, Le Beau MM, Yamada S, Nishigori H, Takeda J, Fajans SS, Hattersley AT, Iwasaki N, Hansen T, Pedersen O, Polonsky KS, Bell GI, et al.: Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young. *Nature* 384, 455-458, 1996.

Yamamoto-Honda R, Tobe K, Kaburagi Y, Ueki K, Asai S, Yachi M, Shirouzu M, Yodoi J, Akanuma Y, Yokoyama S, Yazaki Y, Kadowaki T. Upstream mechanisms of glycogen synthase activation by insulin and insulin-like growth factor-I. *J Biol Chem* 270, 2729-2734, 1995.

Yagi H, Pohlenz J, Hayashi Y, Sakurai A, Refetoff S.: Resistance to thyroid hormone caused by two mutant thyroid hormone receptors beta, R243Q and R243W, with marked impairment of function that cannot be explained by altered in vitro 3,5,3'-triiodothyronine binding affinity. *J Clin Endocrinol Metab* 1997 May;82(5):1608-14

Yang WS, Nevin DN, Iwasaki L, Peng R, Brown BG, Brunzell JD, Deeb SS.: Regulatory mutations in the human lipoprotein lipase gene in patients with familial combined hyperlipidemia and coronary artery disease. *J Lipid Res* 12, 2627-2637, 1996.

Zangen DH, Bonner-Weir S, Lee CH, Latimer JB, Miller CP, Habener JF, Weir GC.: Reduced insulin, GLUT2, and IDX-1 in b-cells after partial pancreatectomy. *Diabetes* 46, 258-264, 1997.

Zapp D, Bartkowski S, Zoidl C, Klein HL and Ryffel GU: Genomic structure of the xenopus laevis liver transcription factor LFB1. *Gene* 134, 251-256, 1993.

