

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE I

U.F.R. DE BIOLOGIE

THÈSE

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille I

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

présentée et soutenue par :

Corinne LACQUEMANT

le 11 décembre 2000

Titre de la thèse:

**ÉTUDE GÉNÉTIQUE DE L'INSULINO-RÉSISTANCE, DU DIABÈTE ET DE LEURS
COMPLICATIONS CARDIO-VASCULAIRES**

Directeur de thèse :

Pr. Philippe FROGUEL

JURY

**Dr. Jean-Claude MICHALSKI
Pr. Alain KTORZA
Pr. José TIMSIT
Dr. François FONTAINE
Pr. Philippe 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 Dr. Jean-Claude MICHALSKI de le présider.

Je tiens particulièrement à exprimer ma très vive reconnaissance au Pr. Philippe FROGUEL pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de faire cette thèse dans son équipe. Son enthousiasme, sa spontanéité, sa compétence et son sens aïgu du long terme sont des qualités que j'ai beaucoup appréciées...et que je ne suis pas prête d'oublier.

Toute ma gratitude au Pr. Michel MARRE et au Dr. Juan RUIZ pour leur collaboration aux différents projets d'étude cas/témoin.

Je remercie particulièrement : le Dr. Francis Vasseur pour nos conversations enrichissantes, Christian Dina et Cécile Lecoœur pour leur travail d'analyses statistiques et pour avoir essayé de m'apprendre quelque chose dans ce domaine, le Dr. Stephan Francke pour ses conseils techniques et le Dr. Meera Manraj pour sa contribution au projet Maurice, Laetitia Corset et Saïda Lahkal pour le travail remarquable dans la réalisation technique du génome-scan, Myriam, Lirije, Ouiza et Christophe pour leur aide dans diverses démarches administratives, et mes amis les plus proches, Valérie, Christine, Manue, Christophe et Valentine pour leur soutien constant.

Je salue tous les autres membres de l'équipe CNRS *UPRES A 8090* que j'ai rencontrés depuis ces 5 dernières années : les personnes en charge de l'informatique, chercheurs, thésards, techniciens et recruteurs.

Je remercie vivement les patients ayant participé aux études cas/témoin et les familles Indo-Mauritiennes du génome scan. Sans eux, ce travail n'aurait pas été possible.

Enfin, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance à ma famille qui m'a toujours soutenue et encouragée. Je lui dédis ce travail.

Sommaire

Liste des publications	5
Liste des abréviations	6
Liste des figures et tableaux	9
1 Introduction générale	10
1.1 Le diabète sucré	10
1.1.1 Définition, prévalence et classification	10
1.1.2 Régulation de l'homéostasie glucidique	14
1.1.2.1 Equilibre entre production et consommation de glucose.....	14
1.1.2.2 Production hépatique de glucose	15
1.1.2.3 Utilisation périphérique du glucose	17
1.1.2.4 Sécrétion de l'insuline.....	18
1.1.2.5 Mécanismes d'action de l'insuline	23
1.1.2.6 Développement du pancréas, facteurs nucléaires et homéostasie glucidique ...	24
1.1.3 Diabète de type 1	27
1.1.3.1 Epidémiologie.....	27
1.1.3.2 Physiopathologie	28
1.1.4 Diabète de type 2	30
1.1.4.1 Epidémiologie.....	30
1.1.4.2 Physiopathologie	31
1.1.4.3 Diabète type 2 : maladie génétique.....	36
1.1.4.4 Facteurs génétiques du diabète type 2	42
1.2 L'athérosclérose : Maladie génétique et multifactorielle	46
1.2.1 Introduction	46
1.2.2 Facteurs génétiques de la maladie coronarienne dans la population générale.....	48
1.2.3 Limites des études génétiques dans la population générale	60
1.3 Le diabète et ses complications dégénératives	62
1.3.1 Epidémiologie.....	62
1.3.1.1 Introduction	62
1.3.1.2 Rôle de l'hyperglycémie.....	64
1.3.1.2.1 Dans la micro-angiopathie	64
1.3.1.2.2 Dans la macro-angiopathie.....	65
1.3.2 Physiopathologie	70
1.3.2.1 Introduction - Définitions	70
1.3.2.2 La néphropathie diabétique	76
1.3.2.2.1 Aspects physiopathologiques	76
1.3.2.2.2 Génétique de la néphropathie diabétique dans le diabète type 1.....	79
1.3.2.3 Diabète de type 2 et/ou le syndrome d'insulino-résistance et complications cardio-vasculaires	82
1.3.2.3.1 Aspects physiopathologiques et génétiques	82
1.3.2.3.2 Maladie multifactorielle	89
1.3.3 Insulino-résistance, diabète et athérosclérose à l'Ile Maurice	91
1.4 Les stratégies d'étude génétique	92
1.4.1 Définition de la génétique inverse ou clonage positionnel.....	92
1.4.2 Les outils de localisation génétique.....	93
1.4.2.1 Polymorphismes génétiques et transmission mendélienne.....	93
1.4.2.2 Le génotypage.....	97
1.4.2.3 Méthodes d'analyse statistique et populations	99

1.4.2.3.1	Etude de populations	99
1.4.2.3.2	Etudes familiales	100
1.4.3	Les différentes approches de localisation génétique	105
1.4.3.1	Approche « gène candidat ».....	106
1.4.3.2	Approche régions candidates.....	107
1.4.3.3	Approche génome entier.....	108
2	Objectifs et stratégies adoptées dans le cadre de ce travail	110
	Présentation générale.....	111
2.1	Approche « gène candidat ».....	112
2.1.1	Etude du gène vWF	112
2.1.2	Etude du gène PPAR α	123
2.2	Approche « génome entier ».....	136
2.2.1	Introduction : Historique de l'île Maurice.....	136
2.2.2	Matériel et méthodes	137
2.2.2.1	Introduction	137
2.2.2.2	Caractérisation et sélection des familles.....	138
2.2.2.3	Détermination des génotypes.....	144
2.2.2.4	Les analyses de liaison	147
2.2.3	Résultats.....	151
3	Discussion générale et perspectives	169
4	Références bibliographiques.....	184
	Abstract.....	217

Liste des publications

Ce mémoire constitue la synthèse d'une partie des travaux rapportés dans les articles suivants :

Article 1 : p. 115

" Association between high von Willebrand factor levels and the Thr789Ala vWF gene polymorphism but not with nephropathy in Type I diabetes ".

Lacquemant C, Gaucher C, Delorme C, Chatellier G, Gallois Y, Rodier M, Passa Ph, Balkau B, Mazurier C, Marre M, Froguel Ph, and the GENEDIAB study group, and the DESIR study group.

Kidney International, 2000, 57, 1437-1443

Article 2 : p. 126

" Mutation screening of the PPAR α gene in Type 2 diabetes associated with coronary heart disease ".

Lacquemant C, Lepretre F, Pineda-Torra I, Manraj M, Charpentier G, Ruiz J, Staels B, Froguel Ph.

Diabetes & Metabolism, 2000, 26, 393-401

Liste des abréviations

ABC1	ATP-binding cassette member 1
ACC	AcétylCoA-carboxylase
ACE	Angiotensin converting enzyme
ACRP30	Adiponectine
ACTH	Adrenocorticotropin hormone
ADCY9	Adenylate cyclase type 9
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADP	Adénosine Diphosphate
AGE	Advanced glycosylation end product
AGT	Angiotensinogen
ALP	Atherogenic lipoprotein phenotype
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
APM	affected Pedigree Member
Apo	Apolipoprotein
ARN	Acide ribonucléique
ATHS	Atherosclerosis locus
ATIR	angiotensin II sub-type 1 receptor
ATP	Adénosine Triphosphate
BK	Bradykinine
BMI	Body mass index
B2R	Bradykinine 2 receptor
CADASIL	Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy syndrome
CDX3	Caudal-Type Homeobox 3
C/EBPs	CCAAT/enhancer binding proteins
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CHD	Coronary Heart Disease
cM	centimorgan
CPT	Carnitine-palmitoyl-CoA transférase
CYP11	Gène chimérique produit entre les gènes CYP11B1 et CYP11B2
CYP11B1	Stéroïde-11 β -hydroxalase
CYP11B2	Aldostérone synthase
DAG	Diacylglycérol
DGGE	Denaturing gradient gel electrophoresis
DID	Diabète type 1
DNID	Diabète type 2
ECG	Electrocardiogramme
EDTA	Éthylène diamino tétra-acétate
EGF	Epidermal growth factor
EST	Expressed Sequenced Tag
FADH ₂	Flavine adénosine dinucléotide
FCHL	Familial Combined Hyperlipidemia
FGF	Fibroblast growth factor
FVII	Factor VII
GAD	Glutamic Acid Decarboxylase

GCK	Glucokinase
GDH	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
GIP	Gastric inhibitory peptide ou glucose-dependent insulintropic polypeptide
GLP1	Glucagon-like peptide 1
GLUT	Transporteur de glucose
G6P	Glucose-6-phosphatase
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HDL	High density lipoprotein
HK	Hexokinase
HLA	Human leucocyte antigen
HNFs	Hepatocyte nuclear factors
HPLC	High performance liquid chromatography
HRG	Histidine-rich glycoprotein
HSD11B2	11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase
HTA	Hypertension artérielle
HYPLIP1	Locus de susceptibilité à l'hyperlipidémie combinée familiale (chromosome 1)
HYPLIP2	Locus de susceptibilité à l'hyperlipidémie combinée familiale (chromosome 11)
IAPP	Islet amyloïde polypeptide
IB1	Islet brain 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IG	Intolérance au glucose
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunoglobuline G
IM	Infarctus du myocarde
IP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
IPF1	Insulin Promoter Factor 1
IRE	Récepteur à l'insuline
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1
KNG	Kininogène
KO	Knock-Out
LADA	Low auto-immune diabetes of the adult
LCAT	Lécithine-cholestérol acyl transférase
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LPL	Lipoprotein lipase
MAP	Mitogen activated protein
MIDD	Maternally Inherited Diabetes and Deafness
MIF	Macrophage Inhibiting Factor
MLB	Maximum-likelihood-binomial
MLS	Maximum lod score
MODY	Maturity Onset Diabetes of the Young
MTTP	Microsomal triglyceride transfer protein
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NeuroD	Neurogenic differentiation factor
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Pression artérielle
PAD	Pression artérielle diastolique
PAI-1	Plasminogen activator inhibitor 1

PAS	Pression artérielle systolique
PBFE	Peroxisomale bifunctional enzyme
PC	Protein convertase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEPCK	Phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGI2	prostacycline
PHA2A	Locus de susceptibilité au Pseudohyperaldostéronisme type II (chromosome 1)
PHA2B	Locus de susceptibilité au Pseudohyperaldostéronisme type II (chromosome 17)
PHA2C	Locus de susceptibilité au Pseudohyperaldostéronisme type II (chromosome 12)
PON	Paraoxonase
QTL	Quantitative trait locus
Ras	rat sarcoma viral oncogene
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SCNN1B	Sous-unité β de la pompe sodium épithéliale rénale
SCNN1G	Sous-unité γ de la pompe sodium épithéliale rénale
SHRSP	Stroke-prone spontaneously hypertensive rat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SOD1	Superoxide dismutase 1
SSCP	Single strand conformation polymorphism
SUR	Sulfonyl urea receptor
TDT	Transmission Disequilibrium Test
TGF	Transforming Growth Factor
TNF α	Tumor Necrosis Factor alpha
t-PA	tissue-plasminogen activator
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VIP	Vasoactive intestinal peptide
VLDL	Very low density lipoprotein
VNTR	Variable number of tandem repeat
vWF	von Willebrand Factor
WHO	World Health Organization

Liste des figures et tableaux

Figure 1: Métabolisme du glucose dans l'hépatocyte.....	16
Figure 2: Sécrétion de l'insuline dans la cellule β -pancréatique.....	22
Figure 3: Mécanismes d'action de l'insuline.....	24
Figure 4: Pathogénèse du diabète type 2, rôle des troubles de l'insulinosécrétion et de l'insulinorésistance.....	32
Figure 5: La fonction endothéliale : physiopathologie.....	79
Figure 6: Hypothèse d'étude de la susceptibilité génétique à la néphropathie diabétique dans le diabète type 1.....	81
Figure 7: Mécanisme physiopathologique au niveau de la voie de signalisation intra-cellulaire de l'insuline dans les tissus vasculaires.....	85
Figure 8: Facteurs de prédiction et pathogénèse du diabète type 2.....	91
Figure 9: Utilisation du polymorphisme génétique pour l'analyse de liaison.....	97
Figure 10: Stratégies d'études génétiques.....	106
Figure 11: Carte géographique situant l'île Maurice.....	136
Figure 12: Description du panel 09 comprenant 11 marqueurs dans une gamme de taille de 100 à 350 pb.....	145
Figure 13: Cycles d'optimisation d'une PCR multiplexe.....	146
Figure 14: Courbe de l'analyse multi-point sur le chromosome 3 (CHD).....	158
Figure 15: Courbe de l'analyse multi-point sur le chromosome 16 (CHD).....	159
Figure 16: Courbe de l'analyse multi-point sur le chromosome 8 (DNID).....	160
Figure 17: Courbe d'analyse de liaison multi-point dans la région 16p11.....	161
Figure 18: Courbe d'analyse multi-point dans la région 3q24-q25 (DNID).....	162
Figure 19: Courbe d'analyse multi-point dans la région chromosomique 1p35-p34.....	163
Figure 20: Courbe d'analyse multi-point dans la région chromosomique 1p22-p21.....	164
Figure 21: Courbe d'analyse multi-point du chromosome 4.....	165
Figure 22: Courbe d'analyse multi-point dans la région 3p12-p11.....	166
Figure 23: Courbe d'analyse multi-point du chromosome 10.....	167
Figure 24: Courbe d'analyse de liaison du chromosome 12.....	168
Tableau 1: Critères diagnostiques du diabète sucré et de l'intolérance au glucose chez l'adulte. .	11
Tableau 2: Facteurs de risque du diabète de type 2.....	13
Tableau 3: Dyslipoprotéïnémies familiales monogéniques et formes communes.....	53
Tableau 4: Les syndromes d'HTA et Hypertension essentielle.....	58
Tableau 5: Liste de facteurs de risque coronarien.....	61
Tableau 6: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients Indo-Mauritiens sélectionnés selon statut IG et/ou diabète type 2.....	141
Tableau 7: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients Indo-Mauritiens sélectionnés selon le statut IM et/ou CHD.....	142
Tableau 8: Description des 103 familles Indo-Mauritiennes.....	147
Tableau 9: Descriptif des phénotypes qualitatifs et quantitatifs.....	149
Tableau 10: Descriptif des phénotypes catégorisés.....	150
Tableau 11: Résultats des analyses de liaison multi-point avec CHD et diabète type 2.....	156
Tableau 12: Résultats des analyses de liaison multi-point d'autres régions chromosomiques ...	157

1 Introduction générale

1.1 Le diabète sucré

1.1.1 Définition, prévalence et classification

Le diabète sucré, défini par une hyperglycémie chronique, est une pathologie complexe de prévalence croissante dans le monde, touchant actuellement 4% de la population occidentale et jusqu'à 7% aux USA (King, Diabetes Care, 1993). Des études récemment réalisées à l'échelle mondiale montrent que 124 millions d'individus sont actuellement diabétiques, et l'on s'attend à ce que ce chiffre passe à 221 millions en l'an 2010 (Amos AF, Diabetic Med, 1997). L'importance d'une maladie se mesure en partie par le nombre de sujets atteints, mais surtout par le coût économique et social qu'elle entraîne. Ce sont les complications dégénératives micro- et macro-vasculaires (voir infra) qui font toute la gravité du diabète (King H, Diabetes Care, 1998). Ainsi, la prévalence élevée de diabète associé à ses complications cardio-vasculaires se traduit par un fardeau économique assez considérable, coûtant annuellement, par exemple pour les Etats Unis, plus de cent milliards de dollars.

Le diabète sucré (en grec, diabetes mellitus) englobe de nombreuses entités cliniques et une hyperglycémie peut être la conséquence de mécanismes physiopathologiques différents (voir infra). Les progrès dans la compréhension de cette maladie ont amené la diabétologie à reconsidérer les critères diagnostiques et la classification des différentes formes de diabète, en fonction à la fois des stades cliniques et des causes de l'hyperglycémie. Fondés sur des études épidémiologiques, les critères de diagnostic (Tableau 1) et la classification des diabètes ont ainsi été définis et approuvés par l'Organisation Mondiale de la Santé (Alberti KGMM, Diabetic Med, 1998).

Concentrations de glucose en mmol /l (g/l)	sang veineux total	sang capillaire total	plasma du sang veineux
diabète sucré			
- à jeun	≥ 6,1 (1,1)	≥ 6,1 (1,1)	≥ 7,0 (1,26)
ou			
2h après charge orale de glucose	≥ 10,0 (1,8)	≥ 11,1 (2,0)	≥ 11,1 (2,0)
Intolérance au glucose (IG ou IGT)			
- à jeun	< 6,1 (1,1)	< 6,1 (1,1)	< 7 (1,26)
et			
- 2h après charge orale de glucose	≥ 6,7 < 10,0 (1,2-1,8)	≥ 7,8 < 11,1 (1,4-2,0)	≥ 7,8 < 11,1 (1,4-2,0)
Glycémie à jeun modérée (IFG ou MFH)			
- à jeun	≥ 5,6 < 6,1 (1,0-1,10)	≥ 5,6 < 6,1 (1,0-1,10)	≥ 6,1 < 7 (1,10-1,26)
et/ou			
- 2h après charge orale de glucose	≤ 6,7 (1,20)	< 7,8 (1,40)	< 7,8 (1,40)

Tableau 1: Critères diagnostiques du diabète sucré et de l'intolérance au glucose chez l'adulte. Recommandations de 1998 de l'OMS (charge orale de glucose : 75 g de glucose dilués dans 250 à 300 ml d'eau ingérés en 5-10 minutes), concentrations de glucose en mmol /l (g/l).

Les valeurs de glycémie à jeun et à 2h ont été définies comme seuil de risque égal de micro- et macro-angiopathies. Pour les sujets intolérants au glucose, l'hyperglycémie modérée est considérée comme un symptôme de diabète sucré ou comme un indice de diabète pouvant se révéler dans le futur mais sans certitude absolue. Le suivi de ces patients est nécessaire afin de rechercher la survenue d'une hyperglycémie chronique patente, et parce que certains d'entre eux constituent une catégorie à plus grand risque de complications vasculaires sans pour autant qu'ils ne deviennent diabétiques (voir infra : Syndrome X plurimétabolique).

L'hyperglycémie, quelle qu'en soit la cause, est subdivisée en différentes catégories :

1- insuline indispensable à la survie [diabète de type 1 (auto-immun) ou anciennement diabète insulino-dépendant (DID)].

2- insuline indispensable au contrôle métabolique, mais non à la survie.

3- insuline non indispensable, c'est à dire recours à un traitement par des méthodes non pharmacologiques ou par des médicaments autres que l'insuline.

Ces deux dernières catégories [diabète de type 2 (non auto-immun) ou anciennement diabète non insulino-dépendant (DNID)] devraient mettre un terme à la confusion entre l'insulino-dépendance et l'insulinothérapie (pour les patients diabétiques insulino-nécessitants ou encore insulino-requérants).

Ainsi, on distingue deux types principaux de diabète sucré :

- Le diabète de type 1 se caractérise par l'effondrement de la sécrétion d'insuline du fait de la destruction sélective des cellules β insulino-sécrétrices (qui constituent 60 à 70% des cellules endocrines du pancréas) suite à un processus autoimmun complexe. Environ 15% des diabétiques sont insulino-dépendants, c'est-à-dire que l'insulinothérapie est indispensable à leur vie. Le diabète de type 1 survient dans 80% des cas avant l'âge de 40 ans et s'accompagne souvent d'une perte de poids corporel d'où sa terminologie ancienne de diabète juvénile ou diabète maigre.

- Le diabète de type 2 est le plus fréquent des diabètes sucrés et regroupe près de 85% des diabétiques des pays développés. Parfois faussement appelé diabète de l'âge mûr ou diabète gras, le diabète de type 2 apparaît généralement après l'âge de 40 ans et est souvent associé à une obésité (80%) ; les sujets qui en sont atteints sont le plus souvent traités à l'aide d'antidiabétiques oraux (18% en France) et/ou un régime (60%/22% en France) (Blazy D, Diabetes & Metab, 1993). Par contre, 15% des sujets présentant un diabète de type 2 (8% en France) nécessitent une insulinothérapie bien qu'aucune réaction auto-immune ne soit détectable. Le début de la maladie est difficile à dater compte tenu du caractère très lent et progressif du développement de l'hyperglycémie dans la majorité des cas, et de l'absence de symptômes prédictifs exacts pendant de nombreuses années (Harris MI, Diabetes Care, 1992). Cependant, le développement du diabète type 2 présente des facteurs de risque (Tableau 2).

Parent (s) diabétique (s) non insulino-dépendant (s)
Obésité, surpoids, sédentarité
Naissance d'un enfant de poids > 4 Kg (ou > 4.5 Kg dans les pays où le poids de naissance est anormalement élevé)
élévation transitoire de la glycémie lors : - d'une grossesse - de la prise de contraception orale oestroprogestative - d'un traitement aux corticoïdes

Tableau 2: Facteurs de risque du diabète de type 2.

Il existe d'autres types de diabète type 2 regroupés dans une troisième catégorie. Ces diabètes sont pour la plupart liés à la malnutrition, à des atteintes pancréatiques (pancréatite, chirurgie pancréatique, hémochromatose), à des excès de sécrétion hormonale (hypercortisolisme, acromégalie), à des médicaments diabétogènes ou à des syndromes rares généralement d'origine génétique (comme les syndromes de Down, Klinefelter, Turner, Prader Willi...). Le diabète de type 2 peut également résulter de défauts génétiques de l'insulino-sécrétion et exister chez des sujets jeunes (avant 40 ans) et même adolescents ; dans ces derniers cas, est retrouvée une très forte agrégation familiale de diabète de type 2, qualifié de MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young). D'autres formes de diabète de type 2 peuvent être apparentées au diabète de type 1, car elles sont associées à une réaction auto-immune de type similaire, même si elle paraît plus progressive. On parle alors de LADA (Low auto-immune diabetes of the adult) (Zimmet P, Diabetes Res Clin Pract, 1996).

1.1.2 Régulation de l'homéostasie glucidique

1.1.2.1 Equilibre entre production et consommation de glucose

Chez les mammifères, alors que les entrées et les sorties de glucose dans le plasma sont à chaque instant différentes, la glycémie varie dans des limites assez étroites (4-9 mmol/l). Cela implique l'existence d'une régulation précise de la glycémie.

A l'état post-absorptif, le foie est le seul organe produisant du glucose par l'intermédiaire de deux voies métaboliques : 1) la glycogénolyse qui libère le glucose stocké sous forme de glycogène en période absorptive rend compte de 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 glucoformateurs (alanine, glutamine), assure 25% de la production de glucose.

Le foie produit du glucose à un taux équivalent à l'utilisation périphérique basale du glucose (100 à 200 g/j) ; le cerveau, dont l'utilisation quasi exclusive du glucose ne dépend pas de l'insuline, est l'utilisateur principal de glucose (50 à 100 g/j) ; le reste est utilisé par les autres tissus non insulino-dépendants tels que la rétine, la médullaire rénale et les érythrocytes, de même que par le muscle au repos et le tissu adipeux pour lesquels l'utilisation de glucose est insulino-dépendante. Le muscle trouve alors l'essentiel de son énergie dans l'oxydation des acides gras provenant du tissu adipeux. Ainsi, dans les périodes de jeûne, la diminution de la concentration de l'insuline va permettre l'initiation de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse et l'utilisation du glucose essentiellement par les tissus non insulino-dépendants. Le glucagon joue alors un rôle majeur en stimulant à la fois glycogénolyse et néoglucogénèse hépatiques (Pilkis, Ann Rev Physiol, 1992).

La régulation de l'homéostasie glucidique en réponse à une charge orale de glucose se fait grâce à deux mécanismes: 1) le foie diminue sa production de glucose (d'environ 50%) et

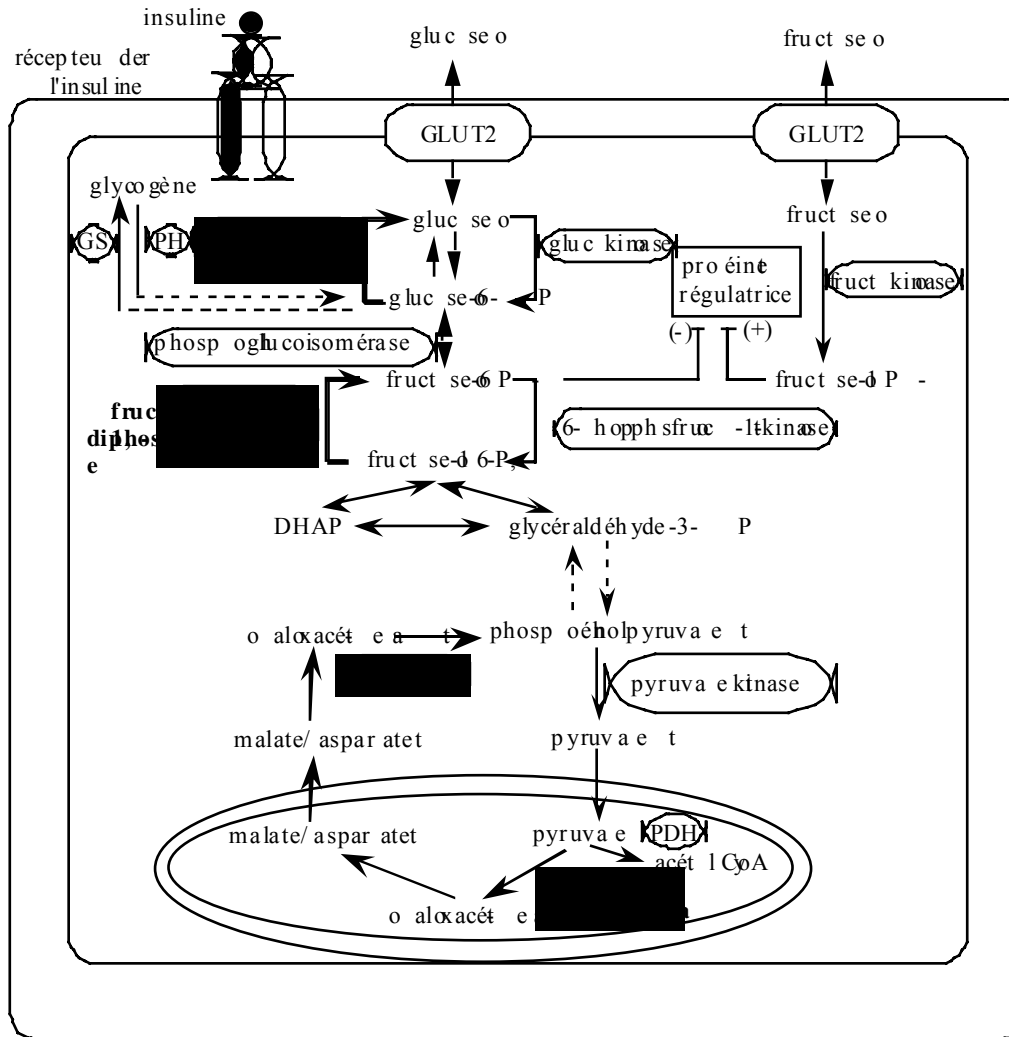
capte 25-35% de la charge de glucose. Il y a donc une utilisation nette du glucose par le foie qui reconstitue ainsi ses stocks de glycogène. 2) les tissus périphériques augmentent leur utilisation du glucose et captent 65% du glucose ingéré. Cette captation de glucose se fait essentiellement par les muscles qui l'utilisent surtout dans les processus non oxydatifs (synthèse de glycogène, synthèse de lipides) et accessoirement pour l'oxyder. Sécrétée en réponse à l'augmentation de la glycémie, l'insuline, hormone anabolisante, inhibe la production hépatique de glucose, et surtout elle stimule la captation du glucose dans les tissus insulinosensibles (muscles, tissu adipeux) et sa conversion en glycogène (Felig P, 1995).

1.1.2.2 Production hépatique de glucose

Deux voies métaboliques, sous régulation enzymatique et hormonale, interviennent en période de jeûne : la néoglucogénèse et la glycogénolyse. Le stockage intrahépatique de glycogène étant modeste, la production de glucose par le foie en cas de jeûne prolongé est essentiellement accomplie par la néoglucogénèse. La glycolyse et la néoglucogénèse hépatiques présentent certaines étapes communes (Figure 1), et c'est l'activité relative des enzymes clés qui détermine si l'hépatocyte est un producteur ou un consommateur de glucose. Il existe quatre enzymes spécifiques de la néoglucogénèse qui permettent de franchir les étapes très exergoniques de la glycolyse : la pyruvate carboxylase, la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la fructose-1,6 biphosphatase et la glucose-6-phosphatase.

La néoglucogénèse est contrôlée par plusieurs hormones : insuline, glucagon, catécholamines, vasopressine, angiotensine et glucocorticoïdes. Les effets hormonaux peuvent être très rapides par modification des propriétés cinétiques des enzymes (changements de l'état de phosphorylation, variation de la concentration d'un effecteur allostérique comme le fructose-2,6-biphosphate) ou plus lents par le contrôle de la transcription des gènes codant pour ces enzymes (Granner D, J Biol Chem, 1990).

Les changements de l'activité de la néoglucogénèse jouent un rôle considérable dans les adaptations de l'organisme adulte au jeûne, aux régimes pauvres en glucides ou lors de l'exercice physique prolongé, ainsi que dans les anomalies métaboliques responsables de l'hyperglycémie chronique franche.



En période post-absorptive, le foie produit du glucose par les deux voies de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse. La néoglucogénèse et la glycolyse ont partiellement des étapes communes. Les étapes spécifiques de la néoglucogénèse sont indiquées en gras. GLUT2: glucose transporteur 2; GS: glycogène synthase; PH: phosphorylase; PDH: pyruvate déshydrogénase; PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase; DAHP: dihydroxy-acétyl phosphate

Figure 1: Métabolisme du glucose dans l'hépatocyte.

1.1.2.3 Utilisation périphérique du glucose

L'événement initial dans le métabolisme intra-cellulaire du glucose est son transport facilité à travers la membrane cellulaire au moyen d'un transporteur spécifique. Il existe 5 isoformes différentes qui sont codées par des gènes distincts dont l'expression est tissu-spécifique et qui ont des caractéristiques fonctionnelles différentes (Bell G, Diabetes Care, 1990). GLUT1 et GLUT3, bien qu'ubiquitaires, sont exprimés essentiellement dans les érythrocytes et le cerveau. Leur Km bas pour le glucose autorise l'apport basal en glucose dans ces cellules. Par contre, GLUT2 a une faible affinité pour le glucose ($K_m = 15-20 \text{ mmol/l}$) et n'est donc pas saturé par les concentrations plasmatiques physiologiques de glucose. Dans le foie, cette caractéristique autorise un transport bidirectionnel du glucose, fonction de la glycémie. Ainsi, lorsque les concentrations de glucose sont élevées, la captation du glucose par le foie est augmentée, tandis que dans les périodes de jeûne, le glucose est relargué par le foie. Dans l'épithélium tubulaire proximal du rein et l'épithélium digestif, le transport du glucose de la lumière vers le compartiment intra-cellulaire est actif et utilise les cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{glucose}$. GLUT2, lui, assure le transport du glucose à l'extérieur de la cellule au niveau de la membrane baso-latérale de l'épithélium (Elsas LJ, Annu Rev Mes, 1992). Dans la cellule β pancréatique, GLUT2 est un composant essentiel de la réponse insulino-sécrétoire au glucose (Orsi L, PNAS, 1990). GLUT4 est l'isoforme exprimée dans le muscle et le tissu adipeux et a un Km pour le glucose de 5 mmol/l , proche de la concentration plasmatique normale du glucose. Le transport de glucose est donc l'étape limitante du métabolisme du glucose dans ces tissus. L'insuline augmente rapidement la captation de glucose dans ces tissus, en permettant la translocation des transporteurs GLUT4 d'un compartiment intra-cellulaire à la surface membranaire (Guerre-Millau M, Diabetes & Metab, 1989). GLUT5, lui, est présent dans les cellules intestinales où il est supposé contribuer à l'absorption intestinale de glucose (Elsas LJ, Annu Rev Mes, 1992).

Dès son entrée dans la cellule, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate (G6P). Cette étape est assurée par la famille des hexokinases. Les hexokinases I, II et III (HKI, HKII et HKIII) ont des K_m très faibles pour le glucose (0.1-0.0001 mmol/l). Dans le muscle et le tissu adipeux où HKII est exprimée, l'étape limitante n'est donc pas la phosphorylation mais le transport du glucose. L'hexokinase IV, ou Glucokinase (GCK) n'est exprimée que dans le foie et la cellule β pancréatique et présente des caractéristiques biochimiques différentes de celles des autres isoformes. Elle est spécifique du substrat glucose, a un K_m élevé de 5 mmol/l correspondant à la concentration physiologique du glucose et présente une courbe sigmoïde de saturation pour le glucose. De plus elle n'est pas inhibée par son produit de réaction le glucose-6-phosphate. En conjonction avec GLUT2, GCK fait partie intégrante du "glucose sensor" qui régule la sécrétion d'insuline dans la cellule β -pancréatique. Dans le foie, la glucokinase influence les changements du métabolisme intra-cellulaire du glucose en réponse à une charge orale en glucose. Stimulée par le glucose dans la cellule β pancréatique et par l'insuline dans le foie, la glucokinase est au centre d'un système complexe permettant le maintien d'une glycémie normale après les repas (Matschinsky FM, Diabetes, 1990).

Les principales voies métaboliques du glucose, une fois phosphorylé en G6P, sont : 1) le stockage sous forme de glycogène, 2) la glycolyse anaérobie générant pyruvate et lactate, 3) la glycolyse aérobie avec oxydation dans le cycle tricarboxylique de Krebs, la voie métabolique produisant le plus d'énergie, 4) la conversion en acides gras (lipogénèse) et stockage sous forme de triglycérides et 5) à un moindre degré, l'oxydation dans la voie des pentoses (Felig P, 1995).

1.1.2.4 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 insulinosécrétoires rapides (Figure 2).

La réponse insulinosécrétoire 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, 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, Nature, 1993; Ashford MLJ, Nature, 1994). Le métabolisme oxydatif du glucose 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 (Misler S, Diabetes, 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 Ca^{++} -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 2).

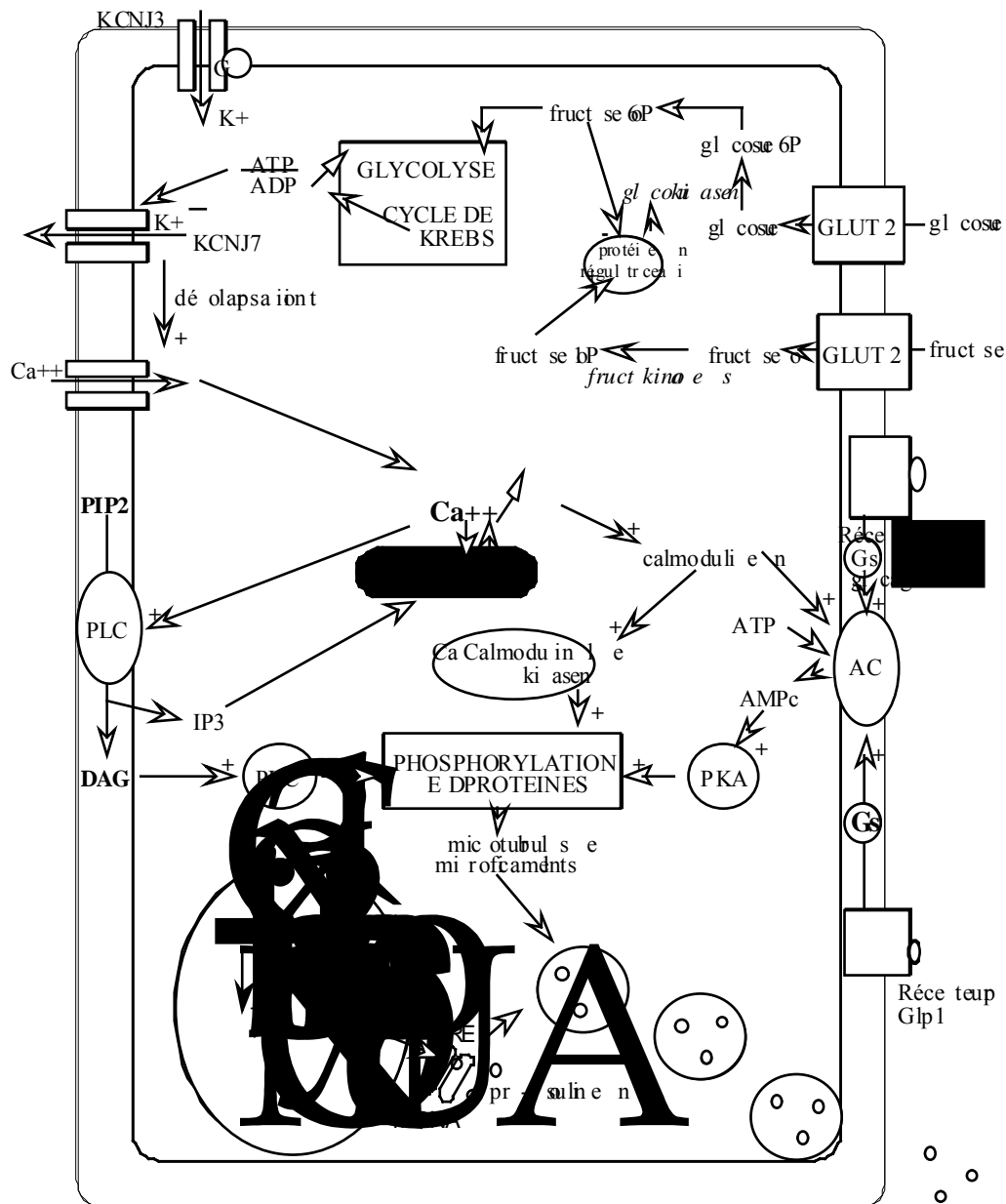
La glucokinase, en contrôlant la première étape du métabolisme oxydatif du glucose jouerait un rôle de "glucose sensor" ou "glucorécepteur" et régulerait ainsi la sécrétion de l'insuline en réponse au glucose. Une protéine régulatrice de la GCK (Glucokinase-Regulatory-Protein) a été récemment identifiée dans le foie et l'îlot (Van Schaftingen E, Eur J Biochem, 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, Diabetologia, 1993). Les autres enzymes limitant le flux glycolytique dans la cellule β -pancréatique sont la phosphofructo-1-kinase et la pyruvate kinase (Randle PJ, Diabetologia, 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 insulinothropes : sécrétine, cholécystokinine, gastrine, VIP (vasoactive intestinal peptide), entéroglucagon, GIP (gastric inhibitory peptide ou glucose-dependent insulinothropic polypeptide), GLP-1 (glucagon-like peptide 1). Ces peptides, par la stimulation de récepteurs couplés à une protéine Gs 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'insulinosécrétion (Thorens B, Diabetes, 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 Ca^{++} et activation de la calmoduline par l'IP3 et l'activation d'une protéine kinase C- α par le DAG et le Ca^{++} (Leahy JL, Diabetes Care, 1992).

D'autres voies biochimiques semblent également être très impliquées dans le processus d'insulino-sécrétion, telles que celle des messagers secondaires lipidiques. Dans cette voie dite "voie anaplérotique", les dérivés du malonyl-coA/acides gras seraient les transducteurs des signaux métaboliques, et l'acétylCoA-carboxylase (ACC) ainsi que la carnitine-palmitoyl-CoA transférase (CPT I et II) seraient les enzymes clés (Prentki M, Physiol Rev, 1987 ; Brun T, Diabetes, 1996).



**EXOCYTOSE
D' INSULINE ET DE
PEPTIDE C**

AC = Adénylate cyclase
 Gs = G-protein stimulant
 Gp1 = G-protein inhibiteur
 PLC = Phospholipase C
 PIP2 = Phosphatidylinositol 2t
 DAG = Diacylglycerol
 IP3 = Inositol 3t
 KCNJ7 = cana K+ IATP-dépendant
 KCNJ3 = cana K+ couplé à une protéine G

PKC = protéine kinase C
 PKA = protéine kinase AMPc
 Gp1 = G-protein inhibiteur
 ISL1 = *Islet-1*
 Cdx3 = *Caudal-type homeobox 3*
 GLUT 2 = transporteur de glucose
 KCNJ2 = cana K+ couplé à une protéine G

Figure 2: Sécrétion de l'insuline dans la cellule β -pancréatique

1.1.2.5 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 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'IRS1 (Insulin Receptor Substrate 1). En se complexant avec la phosphatidylinositol 3'-kinase et autres protéines intra-cellulaires ayant un domaine SH2, IRS1 jouerait ainsi un rôle crucial dans la transmission du signal insulinique (Backer JM, JBC, 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), les enzymes permettant la synthèse du glycogène et des lipides, et les protéines impliquées dans l'action de l'insuline sur l'expression des gènes et la croissance cellulaire (Figure 3) (Kahn CR, Diabetes, 1994). La stimulation de la glycogène synthase par l'activation de la Ras-MAP kinase est cependant controversée (Yamamoto-Honda R, J Biol Chem, 1995).

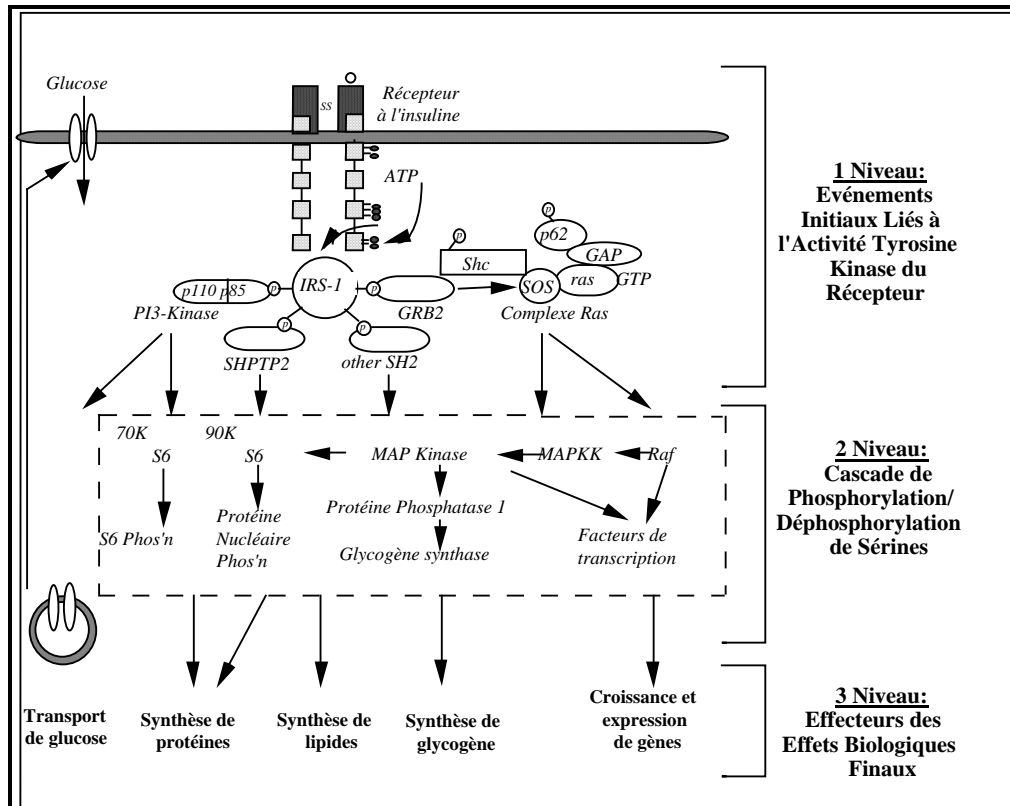


Figure 3: Mécanismes d'action de l'insuline (d'après Kahn CR, Diabetes, 1994)

1.1.2.6 Développement du pancréas, facteurs nucléaires et homéostasie glucidique

Le pancréas endocrine est organisé en groupes de cellules appelés îlots de Langerhans constitués de 4 types cellulaires : les cellules α , β , δ et PP, lesquelles sécrètent respectivement le glucagon, l'insuline, la somatostatine et le polypeptide pancréatique. Les quatre types de cellules dérivent initialement d'une cellule précurseur multipotente, et s'en différencient séquentiellement durant le développement embryonnaire (Alpert S, Cell, 1988). Des homéogènes, exprimant des facteurs de transcription à homéodomaine joueraient un rôle majeur dans ces processus de développement et de différenciation cellulaire (Gehring WJ, Science, 1987). Ces mêmes facteurs agiraient également dans l'îlot mature afin de maintenir l'état différencié et de contrôler l'expression de certains gènes de protéines clés (Gehring WJ, Science, 1987). Ainsi, dans le

processus en plusieurs étapes de la sécrétion d'insuline, la régulation de la transcription de son gène restreint spécifiquement la synthèse d'insuline à la cellule bêta. Le niveau et la spécificité β pancréatique de l'expression du gène de l'insuline sont régulés par un groupe de protéines nucléaires qui se lient à des séquences spécifiques de la région promotrice du gène de l'insuline et interagissent avec les protéines de la machinerie transcriptionnelle pour activer ou réprimer sa transcription. Certains de ces facteurs sont restreints dans leur profil d'expression mais jusqu'à présent, aucun activateur vraiment spécifique de la cellule bêta n'a été trouvé.

L'homéoprotéine IPF-1 (STF1/IDX1/PDX1) en synergie avec NeuroD spécifie une partie du phénotype bêta dont l'activation du gène de l'insuline mais active aussi le gène de la somatostatine (Ohlsson H, EMBO J, 1993 ; Leonard J, Molec Endocr, 1993 ; Miller CP, EMBO J, 1994) et le gène du polypeptide amyloïde (IAPP/amyline) (Watada H, Biochem Biophys Res Commun, 1996 ; Madsen OD, Horm Metab Res, 1997). L'inactivation ciblée du gène *Ipfl* chez la souris résulte en l'incapacité du pancréas à se développer menant à l'agénésie du pancréas (Jonson J, Nature, 1994). Des souris chez lesquelles le gène IPF1 a été spécifiquement invalidé dans les cellules bêta développent un diabète à l'âge adulte et montrent qu'IPF1 active l'expression de l'insuline, de l'IAPP et de Glut2 et inhibe celle du glucagon (Ahlgren U, Genes Dev, 1998).

Les facteurs nucléaires hépatiques (HNFs) sont une classe hétérogène de facteurs de transcription conservés au cours de l'évolution et nécessaires à la différenciation et au métabolisme cellulaire. L'extinction de beaucoup de fonctions hépatiques et leur ré-expression sont corrélées à l'extinction et l'expression du facteur nucléaire hépatique-4 (HNF4), un membre de la superfamille des récepteurs des hormones stéroïdes et thyroïdiennes. HNF4 est impliqué dans la régulation des gènes codant la pyruvate kinase ou la phospho-énol pyruvate kinase (Lai E, Trends Biochem Sci, 1996). Il existe 2 isoformes d'HNF4 dans le foie humain (Chartier FL, Gene, 1994). HNF-4 α est principalement exprimée dans le foie, le rein et l'intestin mais aussi

dans les îlots pancréatiques et les cellules d'insulinome. En plus d'HNF4, les îlots pancréatiques expriment d'autres protéines de cette famille de facteurs nucléaires, comme HNF1, HNF3 et HNF6 (Vaisse C, Diabetes, 1997). HNF-4 α est un régulateur clé dans la hiérarchie transcriptionnelle puisqu'il contrôle aussi l'expression du facteur de transcription HNF1 (TCF1), qui à son tour active l'expression d'un grand nombre de gènes spécifiques du foie, y compris ceux impliqués dans les métabolismes du glucose, du cholestérol et des acides gras (Stoffel M, Proc Nat Acad Sci, 1997). Le facteur nucléaire hépatique 1 (HNF1/HNF-1 α /LFB1/APF/TCF1), activateur transcriptionnel à domaine homéo, contrôle l'expression de plusieurs gènes spécifiquement hépatiques (GLUT2, les chaînes α et β du fibrinogène, l'albumine, l' α -foetoprotéine, la pyruvate kinase hépatique, la transthyretine, l'aldolase B, et la protéine de surface large du virus de l'hépatite B et de l' α -1 antitrypsine ...) (Wang H, EMBO J, 1998 ; Courtois G, Science, 1987 ; Bach I, Genomics, 1990). HNF-1 α est exprimé de façon prépondérante dans le foie et le rein. Des souris invalidées pour le gène HNF1 par recombinaison homologue meurent lors de la période de sevrage dans un tableau de cachexie progressive avec une hépatomégalie importante. Le gène codant la phénylalanine hydrolase s'éteint complètement, donnant lieu à une phénylcétonurie. Les souris mutantes souffrent aussi d'un syndrome de Fanconi sévère dû à un dysfonctionnement des tubules rénaux proximaux. La perte massive du glucose dans l'urine qui en résulte conduit à une perte d'énergie et d'eau (Pontoglio M, Cell, 1996). HNF1 est aussi référencé comme HNF-1 α (HNF1A) à cause de l'existence d'un homologue appelé HNF-1 β (vHNF/LFB3/TCF2), qui présente une forte conservation du domaine de dimérisation N-terminal et de l'homéodomaine de fixation à l'ADN, mais diffère à l'extrémité C-terminal (Mendel DB, Genes Dev, 1991 ; De Simone V, EMBO J, 1991 ; Rey-Campos J, EMBO J, 1991). Les transcripts HNF-1 β sont présents dans les cellules différenciées d'hépatome humain HepG2 ainsi que dans le foie de rat et le niveau de transcript est 10 à 20 plus faible que celui d'HNF-1 α . HNF-1 β peut s'hétérodimériser avec HNF-1 α in vitro (Abbott C, Genomics,

1990 ; Bach I, Nucleic Acids Res, 1991). L'ARNm TCF2 est exprimé dans les îlots pancréatiques de souris, ce qui suggère qu'il fonctionne avec HNF-1 α pour réguler l'expression génique dans ce tissu.

D'autres gènes comme ISL1 (LIM/homeodomain Islet 1 gene), CDX3 (caudal-type-homeodomain 3 gene) et LMX1 23 (German MS, Genomics, 1994), PAX6 (Sander M, Genes Dev, 1997), C/EBP β (Lu M, J Biol Chem, 1997 ; Seufert J, J Clin Invest, 1998) produisent des protéines pouvant se lier à la région activatrice du gène de l'insuline, régulant ainsi son expression (Tanizawa Y, Diabetologia, 1999). Ou encore récemment décrit, les gènes IB1 et MIF (Macrophage Inhibiting Factor), produisant des facteurs de transcription β pancréatique régulant l'expression du gène de l'insuline et de GLUT2 qui présente une expression transcriptionnelle contrôlée de façon dose-dépendante par la concentration du glucose (Waeber G, Diabetes Metab Res Rev, 1999 ; Waeber G, Proc Natl Acad Sci, 1997). L'ensemble de ces facteurs intervient généralement pour maintenir le potentiel pancréatique des cellules insulino-sécrétrices.

1.1.3 Diabète de type 1

1.1.3.1 Epidémiologie

L'étude du diabète de type 1 a progressé grâce à la standardisation des protocoles d'études épidémiologiques dans le cadre d'un travail financé en grande partie par la Communauté européenne, l'enquête EURODIAB ACE, à laquelle ont collaboré les 12 pays de la CEE (à l'exception de l'Allemagne et de la République d'Irlande), ainsi que l'Autriche, la Finlande, la Hongrie, la Norvège, la Pologne, la Roumanie, la Slovénie et, hors Europe, Israël. Près de 16 800 000 enfants ont ainsi été mis sous surveillance parmi lesquels 3 060 ont été atteints de diabète type 1 durant cette période. Les chiffres d'incidence annuelle ont été standardisés pour l'âge, pour 100 000 sujets de moins de 15 ans, dans chaque pays (ou région) et pour chaque sexe.

Il existe une importante variation d'un pays à l'autre, puisque l'incidence annuelle du diabète type 1 chez les moins de 15 ans va de 5.1 pour 100 000 en Roumanie à 42.9 pour 100 000 en Finlande, avec une majorité de pays en dessous de 10 pour 100 000. S'il existe bien, dans l'ensemble, des taux élevés en Europe du Nord et des taux bas dans les pays du pourtour méditerranéen et de l'est de l'Europe, le gradient croissant sud-nord connaît de remarquables exceptions avec le taux particulièrement important en Sardaigne, qui contraste avec les autres régions d'Italie, et l'incidence faible du diabète type 1 en Pologne comparativement aux pays de même latitude. On observe également une décroissance de l'Ouest vers l'Est. Singulièrement, les pays des bords de la Baltique, Estonie, Lettonie, Lituanie et Pologne présentent tous des taux très bas par rapport à la Finlande voisine. Ces constatations suggèrent que ce gradient géographique, en fait irrégulier, recouvre des facteurs autres que purement climatiques ou génétiques, qui restent à identifier. Une étude française intégrée à EURODIAB ACE, dans 4 provinces (Aquitaine, Lorraine, Basse-Normandie et Haute-Normandie) complétée par une autre étude préalable en 1988, dans les mêmes régions, avait montré un taux d'incidence annuelle du diabète type 1 de 7.1 pour 100 000 chez les moins de 15 ans (Fuller JH, Diabetic Med, 1989). Les taux, bien qu'un peu différents d'une région à l'autre, ne différaient pas significativement. En dehors de l'Europe, une croissance de l'incidence du diabète type 1 a été également notée au Japon et en Nouvelle-Zélande alors que le taux paraissait stable aux USA. Sur l'ensemble des études, il semble que le risque de diabète type 1 soit le même chez le garçon que chez la fille.

1.1.3.2 Physiopathologie

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune d'origine multifactorielle, où facteurs génétiques et environnementaux contrôlent son apparition et son développement. Le rôle des facteurs génétiques dans l'incidence du diabète de type 1 est attesté par des études de jumeaux monozygotes montrant un taux de concordance de 30 à 40% pour son apparition (Barnett AH,

Diabetic Med, 1989). Ce taux de concordance non absolu rend compte de l'importance des facteurs environnementaux dans le développement du diabète type 1. Au cours de cette affection, les lymphocytes s'infiltrant dans le pancréas et contribuent à détruire les îlots de Langerhans, et tout particulièrement les cellules β productrices d'insuline. Ce processus d'infiltration est accompagné de réponses humorales et de réactions immunes vis-à-vis de nombreux antigènes naturellement endogènes aux cellules bêta-pancréatiques. Parmi ces antigènes, la glutamate décarboxylase (Glutamic Acid Decarboxylase, GAD), enzyme du métabolisme neuronale, a été récemment démontré comme un auto-antigène clé dans le déclenchement de la réaction auto-immune, avant que celle-ci ne s'étende à d'autres antigènes insulaires (Kaufman D, Nature, 1993 ; Tisch R, Nature, 1993).

Ces processus auto-immuns sont vraisemblablement déterminés par la composante génétique. Ainsi, la région du complexe majeur d'histocompatibilité HLA sur le chromosome 6p21 (locus désigné IDDM1, et en particulier les allèles HLA DR et DQ) reste le déterminant génétique majeur dans la susceptibilité au diabète de type 1 (Todd JA, Nature, 1987). Cependant d'autres régions du génome jouent un grand rôle dans le déterminisme génétique de cette affection. A cet égard, les études systématiques du génome dans des collections de familles diabétiques de type 1 ont récemment permis de localiser au moins une dizaine de loci de prédisposition au diabète de type 1 chez l'homme, dont le mieux connu est situé sur le chromosome 11p15 (désigné IDDM2). Le VNTR de la région promotrice du gène de l'insuline a été identifié comme étant IDDM2, et l'on commence à comprendre le mécanisme physiopathologique mis en cause par ce déterminant génétique : ainsi, l'allèle de susceptibilité au diabète de type 1 d'IDDM2 serait responsable d'une diminution de l'expression thymique du très petit nombre de cellules exprimant le gène de l'insuline, conduisant à un défaut de tolérance immunitaire vis à vis de cet autoantigène (Pugliese A, Nature Genetics, 1997). D'autres loci à effet non négligeable ont été également localisés sur les chromosomes 15q, 11q13, 6q25, 2q31,

6q27, 3q, 10, ou 14q (désignés respectivement IDDM3, IDDM4, IDDM5, IDDM7, IDDM8, IDDM9, IDDM10 et IDDM11).

1.1.4 Diabète de type 2

1.1.4.1 Epidémiologie

Le diabète type 2, souvent silencieux pendant des années, est une entité pathologique qui se prête mal à l'approche épidémiologique. Cent millions d'êtres humains sont atteints de diabète de type 2 (Edgington SM, Biotechnology, 1994), avec en revanche une prévalence globale très variable. Celle-ci est parfois faible : 1,6% chez les Chinois ou virtuellement 0% chez les Papous de Nouvelle Guinée ; au sein d'autres ethnies, elle est très élevée : 14% chez les Mexicains-Américains du Texas et chez les Arabes d'Oman ; mais cette prévalence peut atteindre des proportions énormes au sein de certains groupes ethniques : 41% chez les Nauréens de Micronésie ou un peu plus de 50% chez les Indiens Pimas natifs d'Amérique du Nord (Fujimoto WY, Diabet Med, 1996). Dans le monde occidental, une forte prévalence du diabète type 2 est retrouvée aux Etats-Unis et en Italie du Sud, atteignant 6,6 % des sujets de plus de 20 ans (Harris MI, Diabetes, 1987). En France métropolitaine, la prévalence globale estimée par plusieurs études est de 2% à 2,5% tous âges confondus, mais pourrait être plus élevée compte tenu du taux de mortalité par complications dégénératives du diabète type 2 (Delcourt C, 1996).

Ces données contrastent fortement avec celles dont on disposait, il y a seulement une dizaine d'années. Le diabète type 2 y apparaissait presque exclusivement restreint aux populations Caucasiennes (blanches) des sociétés industrialisées, avec des prévalences inférieures à 2 % (Charles MA, Diabetes, 1991). Certaines ethnies présentent une forte prévalence de diabète alors qu'elles n'ont pas adopté le mode de vie de style occidental. L'urbanisation rapide qui a gagné certaines populations s'est accompagnée d'un accroissement très important de la proportion

des diabétiques surtout dans les villes (Newman WP, Diabetes Care, 1994). Cela a pu être mis en évidence aux USA et en France (Blazy D, Diabetes & Metab, 1993 ; King H, Diabetes Care, 1993). C'est pourquoi le diabète type 2 pourrait atteindre de plus en plus de sujets, dans la presque totalité des populations du globe.

1.1.4.2 Physiopathologie

Le diabète type 2 est une maladie dont la pathogénie et l'étiologie sont très complexes et encore assez mal connues (De Fronzo RA, Diabetes Care, 1992). Cependant, il a été reconnu depuis longtemps, grâce à des études épidémiogénétiques et prospectives ayant porté sur les aspects physiologiques de la maladie, que le diabète type 2 est la conséquence de deux processus (Figure 4) : 1) une diminution de la sensibilité tissulaire aux effets hypoglycémisants de l'insuline (insulino-résistance) au niveau du muscle squelettique, du tissu adipeux et du foie, et 2) la déficience d'insulino-sécrétion se traduisant par l'incapacité des cellules β pancréatiques à contrecarrer de manière appropriée cette résistance périphérique. Ces deux défauts sont présents, l'un et/ou l'autre, plusieurs années avant le développement du diabète type 2 alors que les sujets sont encore normoglycémiques (Lillioja S, N Engl J Med, 1993). De plus, une fois que l'hyperglycémie chronique du diabète type 2 est établie, tous les éléments normalement impliqués dans l'homéostasie glucidique semblent être déréglés, et il est alors impossible d'affirmer la nature de l'anomalie primitive en cause (DeFronzo, 1992, 1997).

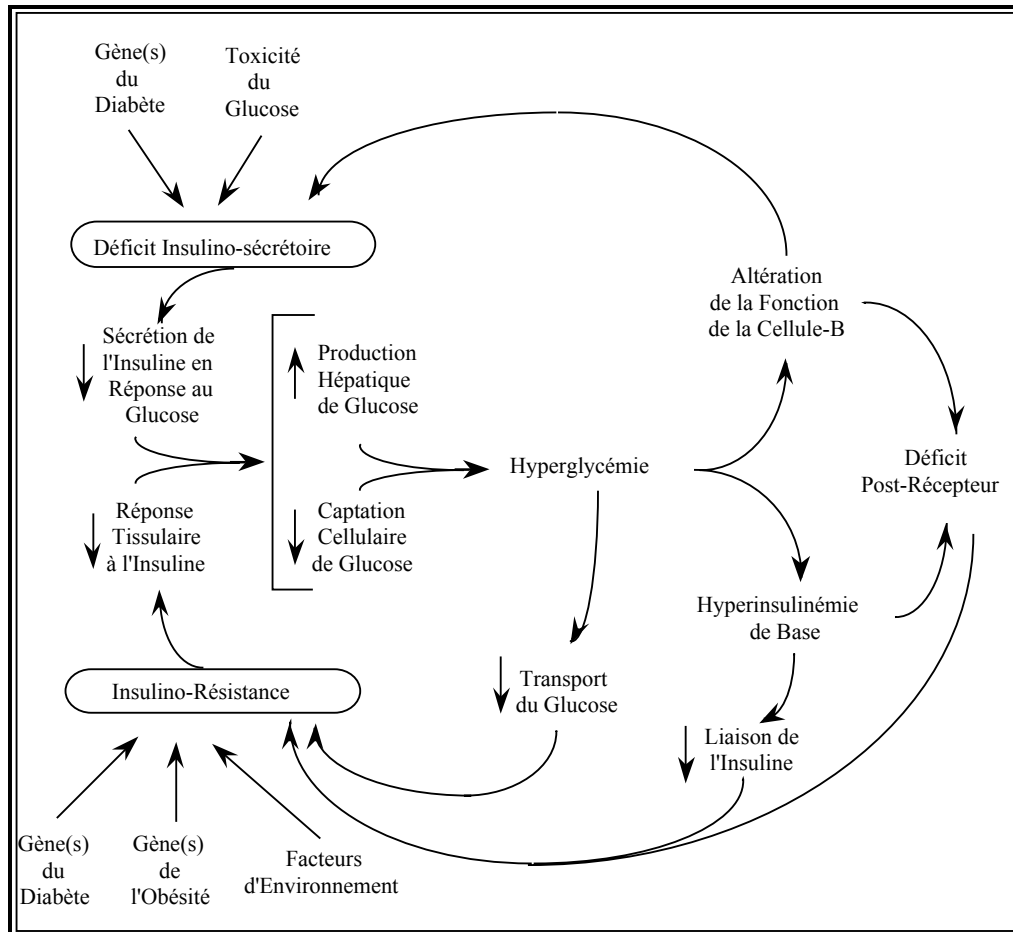


Figure 4: Pathogénèse du diabète type 2, rôle des troubles de l'insulinosécrétion et de l'insulinorésistance

1) Différentes anomalies qualitatives et quantitatives de l'insulino-sécrétion ont été identifiées chez les diabétiques type 2 :

- diminution prononcée (ou l'absence totale) de la phase précoce de sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et retard marqué de la seconde phase (Fujita Y, Diabetes, 1975 ; Cerasi E, Acta Endocrinol, 1967).

- les pics fréquents (~ toutes les 10 minutes) de pulsativité de l'insulino-sécrétion sont absents ; l'amplitude et la périodicité des oscillations lentes (~ toutes les 90 minutes) sont réduites (O'Rahilly SP, Lancet, 1986 ; Polonsky KS, N Engl J med, 1988). Ces défauts impliquent

rarement un hypoinsulinisme, mais surtout ont pour conséquence une inefficacité marquée de l'action de l'insuline.

- l'insulinémie peut être réduite sans jamais atteindre le stade d'insulinopénie totale. Elle peut également être normale ou franchement élevée, notamment chez l'obèse diabétique. Mais en réalité, il faut interpréter ce niveau insulinémique avec prudence, car en le corrélant directement à la glycémie, on peut considérer sans ambiguïté que le diabète type 2 est caractérisé par une insulinopénie franche (DeFronzo RA, Diabetologia, 1992).

- libération excessive de précurseurs immatures de l'insuline : pro-insuline intacte, pro-insuline clivée en 32-33. La libération anormale de ces précurseurs peut être due à des défauts primaires de maturation polypeptidique (impliquant les endopeptidase PC1, PC2,...). Le pourcentage de ces molécules précurseurs, qui n'ont pas l'activité biologique de l'insuline mature, peut représenter la moitié de l'insuline sécrétée par le pancréas chez les patients diabétiques type 2 (Davies MJ, Diabet Med, 1993).

- diminution de la masse β pancréatique des îlots de Langerhans (Leahy JL, Diabetes Care, 1990). En outre, les îlots contiennent des dépôts d'un matériel amyloïde fibrillaire dans lequel l'amyline (islet amyloid polypeptide ou IAPP, polypeptide pancréatique co-sécrété en même temps que l'insuline) se retrouve en excès chez les diabétiques en comparaison aux non diabétiques. Un rôle pathogénique de ce peptide a été suggéré dans le diabète type 2, mais reste très controversé (Edgington SM, Biotechnology, 1994). D'autres anomalies notables dans le diabète type 2 se manifestent aussi par l'altération de la potentialisation par le glucose des effets d'autres sécrétagogues (GIP, GLP1,... etc.).

2) L'insulino-résistance correspond à une diminution de la sensibilité tissulaire (muscle, tissu adipeux, foie) aux effets de l'insuline. Il est établi depuis longtemps que l'hyperinsulinisme précède le développement du diabète type 2 (DeFronzo, Diabetes Care, 1992). En effet, la transition de l'état normoglycémique à l'état d'intolérance au glucose est souvent associée au

développement d'une importante insulino-résistance, alors que les insulinémies à jeun et post-absorptive sont remarquablement élevées (Saad MF, Lancet, 1989 ; Eriksson J, N Engl J Med, 1989). Pendant la période post-absorptive, la production hépatique de glucose est normale ou augmentée chez les diabétiques, en dépit d'un hyperinsulinisme fréquent à jeun, tandis que l'utilisation du glucose par les tissus périphériques est diminuée. Cette production hépatique de glucose est en effet étroitement corrélée au niveau de l'hyperglycémie à jeun chez les patients diabétiques type 2 (De Fronzo RA, J Clin Invest, 1985). Ceci suggère que chez ces patients, l'excès de production hépatique de glucose est un important facteur dans le développement de l'hyperglycémie à jeun. L'insuline, même à des taux de sécrétion élevés n'arrive pas à supprimer normalement la production hépatique de glucose. D'autre part, à l'état basal (en dehors de stimulation insulinique), la prise de glucose par le muscle est plus prononcée chez les sujets diabétiques type 2 que chez les normoglycémiques (Firth RG, J Clin Invest, 1986) ; ce flux anormalement élevé serait la conséquence de l'hyperglycémie chez les patients diabétiques type 2, l'excès de glucose dans le plasma amenant celui-ci à affluer plus massivement vers le muscle par diffusion facilitée. A l'état post-absorptif, l'oxydation du glucose est altérée et le flux net de glucose en glycogène est très diminué (Dall'Aglio E, Am J Physiol, 1985). En outre, l'activité de la glycogène synthase et la formation de glycogène dans le muscle sont affectées dans le diabète type 2 (Kida Y, J Clin Invest, 1990). L'excès en glucose tissulaire non-oxydé sera converti en lactate (substrat néoglucogénique) relargué dans le plasma sanguin, et par la suite repris par le foie dans la voie néoglucogénique. Par ailleurs et sous stimulation insulinique, le transport du glucose vers le muscle et le tissu adipeux est plutôt diminué chez les patients diabétiques type 2 comparativement aux sujets normoglycémiques (Ciaraldi TP, Diabetes, 1982 ; Dohm GL, J Clin Invest, 1988). La diminution du flux de glucose insulino-dépendant observée chez les diabétiques type 2 pourrait être attribuée à un défaut de translocation des transporteurs GLUT4 vers la surface cellulaire (Vogt B, Diabetologia, 1992). Ce défaut peut naître aussi à un niveau plus en amont tel

que dans l'activation par l'insuline de ce transporteur ou dans ses étapes post-traductionnelles. La résistance cellulaire généralisée à l'action de l'insuline peut ainsi prendre naissance à partir de plusieurs étapes de l'action normale de l'insuline. Elle peut impliquer aussi bien l'étape des événements proximaux liés à des modifications de la fixation de l'insuline à son récepteur ou de l'activité tyrosine kinase dans la cascade de phosphorylation-déphosphorylation, génératrice de messagers transducteurs, que l'étape des effecteurs finaux de l'action insulinique, impliquant les niveaux transcriptionnels ou autres (Kahn CR, Diabetes, 1994) (Figure 3). Le rôle de certains facteurs biologiques multipotents dans l'insulino-résistance a été récemment proposé : implication du TNF α (Tumor Necrosis Factor alpha) dans l'homéostasie glucidique dans divers tissus (Grunfeld C, Biotherapy, 1991).

L'hyperglycémie chronique ou glucotoxicité joue un rôle délétère chez les diabétiques type 2 en accentuant les anomalies de l'insulino-sécrétion et l'insulino-résistance (Karam JH, Horm Metab Res, 1996 ; Ling Z, Diabetes, 1996). La correction de l'hyperglycémie permet de rehausser l'insulino-sécrétion des sujets diabétiques type 2, et de réduire en partie les défauts de captage du glucose par le muscle (Henry RR, Ann Intern Med, 1996). L'hyperglycémie est à la fois un signe et un facteur aggravant des troubles de l'insulino-sécrétion et de la sensibilité à l'insuline.

Chez les diabétiques type 2 obèses, des taux élevés d'acides gras libres plasmatiques sont retrouvés généralement proportionnels à l'importance de la masse adipeuse (Unger RH, Diabetes, 1995). En période post-prandiale, le muscle capte, stocke ou utilise 60 % environ du glucose comme substrat énergétique. Lorsque ce tissu musculaire est exposé à des taux élevés d'acides gras libres, il les utilise préférentiellement au glucose ; ceci contribue chez les diabétiques type 2 à réduire le niveau de captage et d'utilisation du glucose et à aggraver l'insulino-résistance. De même, des concentrations élevées d'acides gras circulants favorisent la voie de la néoglucogénèse et par conséquent accentuent l'hyperglycémie. C'est le phénomène de lipotoxicité. Toute mesure

qui permet de réduire le taux des acides gras libres circulants favorise une meilleure sensibilité à l'insuline (Karam JH, Horm Metab Res, 1996).

Il est toutefois difficile de cerner l'anomalie d'origine dans le diabète type 2, et l'on peut penser que l'une des deux anomalies se déclenche discrètement à un stade donné, favorisant par conséquent, l'apparition de l'autre anomalie, celle-ci ne faisant qu'aggraver la première. Cependant, l'importance relative de ces deux anomalies varie considérablement d'un patient à l'autre ou chez un patient donné au cours de l'évolution de la maladie. A cet égard, des simulations mathématiques des effets unitaires des composantes métaboliques du diabète type 2 (l'insulino-résistance hépatique, l'insulino-résistance périphérique et la dysfonction insulino-sécrétoire) ont montré qu'aucune de ces composantes ne peut, à elle seule, expliquer toutes les altérations métaboliques observées dans le diabète type 2 (Rudenski AS, Metabolism, 1988). Le diabète 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 (De Fronzo RA, Diabetes, 1988 ; De Fronzo RA, Diabetes Care, 1992).

1.1.4.3 Diabète type 2 : maladie génétique

Les facteurs génétiques jouent un grand rôle dans l'étiologie du diabète type 2. Leur implication dans l'apparition du diabète repose sur un faisceau d'arguments :

1) Les études de gémellarité montrent une concordance quasi absolue dans l'apparition du diabète type 2, chez des jumeaux monozygotes (Barnett AH, Diabetologia, 1981).

2) Il existe une très forte agrégation familiale du diabète type 2. Ainsi, 38% des apparentés de premier degré à des patients diabétiques type 2 développent aussi le diabète, ainsi que 21% de leurs parents, comparés à 6% et 9% chez les contrôles (Köbberling J, 1982 ; McCarthy M, 1993). Lorsqu'un parent est diabétique, 20% des enfants deviendront diabétiques

avant l'âge de 60 ans et 40% le deviendront au cours de leur vie (Papoz L, Elsevier, 1982). Le diabète apparaît avant l'âge de 60 ans chez plus de 50% des enfants dont les deux parents sont diabétiques et chez 20 à 40% des frères et soeurs d'un sujet diabétique (Van d'Heim C, 1990).

3) Dans certaines ethnies, la prévalence du diabète type 2 est très haute, 50% chez les Indiens Pimas d'Arizona (Fujimoto WY, Diabet Med, 1996), 60% chez les Nauruëns du Pacifique (Zimmet P, Diabetes, 1978) et distribution bimodale de la glycémie, ce qui a suggéré au départ une origine monogénique à transmission autosomique dominante de la maladie, ce qui n'est pas nécessairement vrai, bien que cela puisse être le cas de certains groupes ethniques bien isolés.

4) Les formes monogéniques du diabète type 2 constituent une preuve non équivoque que la tolérance au glucose est déterminée génétiquement :

- ainsi, la transmission plus importante du diabète type 2 par les mères diabétiques, et la présence de familles de diabétiques à hérédité purement maternelle avec une apparition précoce du diabète (généralement avant l'âge de 45 ans), a conduit plusieurs équipes à étudier le rôle du génome mitochondrial, d'autant que certaines cytopathies mitochondriales s'accompagnent d'anomalies de la glycorégulation. Une mutation ponctuelle de l'ADN mitochondrial, située dans la séquence codant l'ARN de transfert de la leucine ($\text{ARN}_t^{\text{leu3243}}$), a été découverte dans des familles européennes et Japonaises, qui coségrégait avec un diabète type 2 et une surdité (Maternally Inherited Diabetes and Deafness, MIDD) (Van den Ouweland JM, Nat Genet, 1992 ; Awata T, Lancet, 1993). Environ 2% de MIDD ont été retrouvés dans la cohorte de familles diabétiques type 2 françaises (Vionnet N, Lancet, 1993). Là encore, des anomalies précoces de la sécrétion de l'insuline ont été montrées chez des sujets non diabétiques mais porteurs du variant 3243 de l'ADN mitochondrial (Velho G, Diabetes, 1996). En dehors de cette mutation ponctuelle (et peut-être de quelques autres mutations plus rares), des délétions exceptionnelles de larges portions de

l'ADN mitochondrial entraînent un diabète insulino-requérant, associées à d'autres pathologies en particulier d'ordre neurologique.

- quelques rares familles présentent des mutations du gène de l'insuline associées à des troubles de la glycorégulation (Gabbay KH, N Engl J Med, 1980). Ainsi des mutations de la séquence codante du gène de l'insuline ont été trouvées dans quelques familles, affectant soit le site de clivage de la pro-insuline (induisant un défaut de maturation de l'insuline et une hyper-pro-insulinémie), soit le site de liaison de l'insuline à son récepteur, résultant en une insuline biologiquement inactive et une hyperinsulinémie prononcée (Haneda M, N Engl J Med, 1984). Permutt et al. ont découvert un variant du promoteur du gène de l'insuline chez 5% des familles diabétiques de type 2 d'origine Afro-Américaine ; ce variant exprimé dans des cellules d'insulinome en culture, présente une diminution d'environ 50% de l'activité transcriptionnelle par rapport au promoteur normal du gène de l'insuline, et peut ainsi expliquer la transmission des troubles de la glycorégulation dans ces familles (Olansky L, J Clin Invest, 1992).

- l'exploration des syndromes d'insulino-résistance extrême, avec *acanthosis nigricans* (ou lépréchaunisme), a permis d'identifier des anomalies fonctionnelles majeures du récepteur de l'insuline, en particulier des mutations dans le domaine de l'activité tyrosine kinase de la molécule (Accili D, EMBO J, 1989). L'expression du gène du récepteur de l'insuline portant ces mutations dans des systèmes cellulaires eucaryotes a confirmé que les anomalies de ce gène entraînaient une altération sévère du transport du glucose et/ou de la synthèse de glycogène (Morgan R, Diabetes, 1990).

- la forme monogénique de diabète type 2, la plus fréquente et la plus étudiée, a été décrite au début des années mille neuf cent et appelée "Maturity Onset Diabetes of the Young" (ou MODY). Cette forme particulière de diabète type 2 survient chez le sujet jeune et se transmet de façon mendélienne sur un mode autosomal dominant (Tattersall RB, Diabetes, 1975) ; plusieurs gènes sont responsables de cette forme de diabète : le gène HNF4 α localisé sur le chromosome

20q (MODY1) (Bell GI, Proc Natl Acad Sci, 1991), le gène de la glucokinase (GCK) localisé sur le chromosome 7p (MODY2) (Froguel Ph, Nature, 1992), le gène HNF1 α localisé sur le chromosome 12q (MODY3) (Vaxillaire M, Nature Genetics, 1995), le gène IPF1 (Insulin Promoter Factor 1) situé sur le chromosome 13q (MODY4) (Stoffers DA, Nature Genet, 1997) et le gène TCF2 situé sur le chromosome 17q codant HNF-1 β (MODY5) (Horikawa Y, Nature Genet, 1997).

5) Certaines souches animales présentent spontanément et de manière transmissible d'une génération à une autre, des symptômes ressemblant au diabète type 2 humain. Dans les souches de souris (ob/ob) et (db/db) et de rats Wistar fatty (fa/fa) le diabète type 2 est associé à une obésité franche. Par contre, le modèle de rat GK (Goto et Kakisaki) obtenu par croisements successifs des rats les plus hyperglycémiques d'une population de rats Wistar normale au départ, présente, à partir de la quinzième génération, une hyperglycémie chronique stable non associée à une obésité. L'étude de ces modèles animaux est très utile pour mieux comprendre les mécanismes étiologiques et physiopathologiques du diabète type 2 (Portha B, 1990). Un modèle animal reproduit les caractéristiques polygéniques du diabète type 2 humain : insulino-résistance dans les muscles, les tissus adipeux et le foie, suivie d'un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques qui ne peuvent compenser en sécrétion d'insuline cette résistance (Kahn BB, Nat Genet, 1998). Une autre manière de mesurer et de comprendre les mécanismes d'action d'un gène est d'inhiber artificiellement son expression dans un modèle animal prédéfini. C'est le cas des souris KO (Knock-Out) homozygotes (les 2 copies sur chaque chromosome sont délétées ou ne sont pas exprimées) ou hétérozygotes pour un gène (une seule copie est délétée ou n'est pas exprimée). Des protéines de la signalisation de l'insuline et des transporteurs de glucose ou des facteurs de transcription pancréatiques ont été étudiés au moyen de modèles animaux après extinction des gènes d'intérêt.

Le KO du gène IRE est extrêmement sévère car les souris naissent à terme avec une hyperglycémie et une hypercétonurie provoquant leur mort dans les 72 heures, soulignant le rôle indispensable de ce gène (Accili D, Nature Genetics, 1996). Les souris KO pour IRS1 ont un retard de croissance, mais ne développent pas de diabète car l'insulino-sécrétion s'accroît pour compenser l'insulino-résistance modérée. Les souris doublement hétérozygotes pour IRE et IRS1 ont un taux d'expression de ces deux protéines divisé par deux et une insulino-sécrétion de 5 à 50 fois supérieure par rapport aux souris normales (Brüning JC, Cell, 1997). Les souris KO pour IRS2, isoforme d'IRS1, montrent un dysfonctionnement des cellules β pancréatiques qui ne peuvent compenser l'insulino-résistance, et une inhibition de la cascade de signalisation de l'insuline provoquant une insulino-résistance au niveau du foie et des muscles (Withers DJ, Nature, 1998). Le diabète type 2 se transmet par la suite de manière héréditaire dans la descendance de ces animaux. Plusieurs équipes ont pu démontrer les interactions synergiques entre diabétogènes, suggérant un déterminisme polygénique de l'intolérance au glucose et qu'une seule altération (un seul gène muté) souvent ne suffit pas à causer le diabète (Brüning JC, Cell, 1997 ; Accili D, Nature Genetics, 1996 ; Araki E, Nature, 1994).

Les souris KO pour GLUT4 montrent une glycémie quasi normale, mais souffrent d'un retard de croissance, et présentent un métabolisme du glucose et des lipides perturbé, une sensibilité à l'insuline plus basse et une augmentation de l'expression d'autres transporteurs de glucose comme GLUT2 dans le foie et GLUT1 dans le coeur (Katz EB, Nature, 1995). Il faut également noter que chez une souche de rat spontanément hypertendu et intolérant au glucose ainsi que chez le rat Wistar-Kyoto, l'expression de GLUT4 est augmentée pour compenser l'insulino-résistance des cellules du muscle, corrigeant ainsi le métabolisme du glucose. Récemment, une équipe a étudié des souris GLUT4 hétérozygotes pour un mutant du transporteur GLUT4 spécifique du muscle (Zisman A, Nat Med, 2000). Ces souris développaient une insulino-résistance à un stade

précoce de leur croissance ainsi que des anomalies de la tolérance au glucose et du métabolisme des lipides.

NKX2.2 est un facteur de transcription de type homeobox exprimé dans le système nerveux central et dans les cellules α , β et PP pancréatiques. Le KO du gène NKX2.2 développe une sévère hyperglycémie provoquant la mort des souris peu après la naissance, par un manque total de cellules β pancréatiques sécrétrices d'insuline et une diminution des cellules α et PP sécrétrices du glucagon (Sussel L, Development, 1998). NKX2.2 est donc un facteur de transcription indispensable à la différenciation des cellules β pancréatiques.

6) Le diabète type 2 est polygénique : si le rôle des facteurs génétiques dans l'étiopathogénie du diabète est indéniable, le mode de transmission familiale de la maladie n'est pas toujours clairement défini comme c'est le cas pour MODY. En effet, les aspects de la pathologie sont très hétérogènes, même dans les formes simples du MODY, et il est probable que les altérations primaires du diabète type 2 sont multiples, avec l'existence d'une multigénicité et d'une hétérogénéité génétique. Ainsi, si l'hyperglycémie chronique suffit à définir le diabète type 2, ses caractéristiques cliniques sont considérablement hétérogènes d'une ethnie à l'autre, et au sein même d'une population donnée (McCarthy M, 1993). Par ailleurs, l'analyse de grandes familles Caucasiennes et de paires de jumeaux a montré la non linéarité du risque de développer le diabète en fonction du degré de parenté. En simulant plusieurs modèles de transmission génétique, et en les appliquant à ces échantillons, seul le modèle polygénique (avec un gène "majeur", responsable de la maladie dans une proportion importante de malades et/ou qui explique une part majeure de la variance de la glycémie et quelques oligogènes ou gènes "mineurs", ainsi que des facteurs non génétiques) pourrait correspondre aux observations épidémiologiques (Risch N, Am J Hum Genet, 1990). Il serait donc nécessaire que plusieurs gènes soient mutés ou du moins présents conjointement sous certaines formes alléliques pour que les anomalies de la sécrétion ou de l'action de l'insuline apparaissent et conduisent, en des

circonstances favorables, au diabète. D'ailleurs, chez les Mexicains Américains d'Arizona, population plutôt isolée et homogène, Hanis et al. ont pu localiser, au sein de quelques centaines de familles atteintes, un locus majeur du diabète type 2 sur le chromosome 2q (NIDDM1) qui n'expliquerait la variance phénotypique de la tolérance au glucose qu'à hauteur de 30% dans cette population indiquant que d'autres diabétoènes, agissant seuls ou simultanément pour prédisposer au développement du diabète type 2, restent encore à mettre en évidence (Hanis CL, Nature Genet, 1996). D'ailleurs, Cox et al. ont montré récemment une interaction entre le locus NIDDM1 et un autre locus de susceptibilité sur le chromosome 15 (Cox NJ, Nat Genet, 1999). Ainsi, dans les populations ayant de nombreux fondateurs (Caucasienne par exemple), le mode de transmission génétique du diabète type 2 à début tardif serait hétérogène et complexe et impliquerait vraisemblablement plusieurs gènes en interactions selon un modèle polygénique.

1.1.4.4 Facteurs génétiques du diabète type 2

Dans les formes simples de diabète familial (5%-10%), une mutation d'un seul gène est suffisante pour entraîner une hyperglycémie chronique. Les diabètes monogéniques ont un début souvent précoce avec une forte pénétrance. Ceci a permis d'étudier des grands arbres généalogiques comportant de nombreux membres atteints de diabète de type MODY. Les patients MODY ont en général des concentrations normales ou basses d'insuline témoignant d'une anomalie primitive de l'insulinosécrétion (Velho G, Diabetes & Metabolism, 1997). Le gène du MODY le plus fréquent est probablement celui de la GCK (environ 60% des familles MODY en France), enzyme-clé du métabolisme cellulaire du glucose dans les cellules insulinosécrétoires du pancréas endocrine et dans les hépatocytes. Environ une centaine de mutations différentes ont été identifiées à ce jour, la plupart responsable de MODY2 (chromosome 7p) typique à début dans la petite enfance ou l'adolescence. La production in vitro de certains mutants a montré une diminution de l'activité enzymatique de phosphorylation du glucose (Gidh-Jain M, Proc Nat

Acad Sci,1993). Chez les patients MODY2, est observée une élévation du seuil glycémique induisant la libération de l'insuline et un décalage vers la droite de la courbe dose/réponse de la sécrétion d'insuline en fonction de la glycémie. La sécrétion d'insuline chez ces patients est globalement diminuée de moitié (Byrne MM, J Clin Invest, 1994 ; Velho G, Lancet, 1992). Dans le foie, la GCK joue un rôle important dans la captation hépatique postprandiale et le stockage du glucose. Le diabète par déficience en GCK est donc à la fois une maladie pancréatique et à un moindre degré une maladie hépatique (Velho G, J Clin Invest, 1996). L'étude génétique des familles MODY a aussi montré l'implication de gènes de facteurs nucléaires de transcription dans le développement de certains diabètes. La forme MODY3 liée à des mutations du gène HNF-1 α sur le chromosome 12q est relativement fréquente (20 à 50% des MODY), alors que les mutations des autres facteurs de transcription sont très rares. Différentes mutations du gène HNF-1 α ont été identifiées dans le diabète MODY3 (Yamagata K, Nature, 1996 ; Frayling TM, Diabetes, 1997 ; Byrne MM, Diabetes, 1996 ; Kaisaki PJ, Diabetes, 1997 ; Hegele RA, J Clin Endocr Metab, 1999) et le diabète type 1 (Yamada S, Diabetes, 1997). HNF-1 α est responsable d'un diabète sévère, de début post-pubertaire, rapidement évolutif et associé à des complications microangiopathiques précoces, rétinienne et rénales (Velho G, Diabetes Care, 1996). Des familles (MODY5, chromosome 17q) présentant des mutations du gène HNF-1 β , co-facteur d'hétérodimérisation d'HNF-1 α ont été décrites : les sujets atteints ont un diabète associé à une néphropathie non diabétique (Horikawa Y, Nature Genet, 1997) ou à un développement anormal du néphron (Bingham C, Kidney Int, 2000). Une mutation a été détectée chez des patients porteurs d'un syndrome caractéristique associant un diabète MODY5, un dysfonctionnement rénal et une malformation génitale (Lindner TH, Hum Molec Genet, 1999). Les relations entre HNF et rein restent inconnues : les facteurs HNF-1 sont fortement exprimés dans le rein, et la souris KO pour le gène HNF-1 α présente un syndrome de Fanconi rénal, responsable d'une glycosurie massive qui masque l'hyperglycémie (Pontoglio M, Cell, 1996). Plusieurs mutations

du gène HNF-4 α mises en évidence sur le chromosome 20q (MODY1) ont été associées au développement du diabète. Enfin, le rôle d'un facteur de transcription spécifique de l'îlot de Langerhans (IPF1, MODY4) a été montré : à l'état homozygote, une mutation entraîne une agénésie du pancréas, et à l'état hétérozygote un diabète de type 2 (Stoffers DA, Nature Genetics, 1997).

L'approche « gène candidat » a été la plus utilisée pour l'étude des formes polygéniques de diabète type 2. Cette approche consiste à étudier un gène codant une protéine qui intervient directement dans le maintien de l'homéostasie glucidique, ou qui est exprimée dans des tissus potentiellement impliqués dans la pathogénie du diabète type 2. Les gènes « diabétogènes » démontrés à ce jour sont exprimés dans la cellule β -pancréatique où ils interviennent dans l'insulino-sécrétion. Ainsi, des associations positives entre le diabète type 2 et des polymorphismes du gène GCK ont été observées dans des populations de noirs Américains et dans la population générale de l'île Maurice ("Créoles") (Permutt MA, Diabetes, 1992), mais l'étude de familles diabétiques a exclu le gène GCK comme gène majeur du diabète type 2 (Zouali H, Diabetes, 1993). Cependant, un variant du promoteur du gène GCK a été associé à une diminution significative de la réponse insulinosécrétoire au glucose chez des Américains d'origine japonaise ayant une tolérance normale ou intolérants au glucose (Stone LM, Diabetes, 1996). Une mutation ponctuelle, identifiée dans le gène du récepteur au glucagon (Hager J, Nature Genet, 1995), était associée au diabète type 2 dans des cohortes Françaises, Allemandes et Britanniques, mais n'a pas été retrouvée dans d'autres cohortes Allemandes, Hollandaises et Japonaises. En France, 5% des sujets diabétiques type 2 testés étaient porteurs de la mutation, qui co-ségrégait avec le diabète dans leurs familles. Des études *in vitro* ont démontré que l'affinité du récepteur muté pour le glucagon était 3 fois moins importante que celle du récepteur natif. Il se pourrait que les mécanismes physiopathologiques associés à cette mutation soient liés à l'action insulino-trope du glucagon. Le récepteur aux sulfamides (SUR) est une des deux sous-

unités des canaux potassiques ATP-dépendants, dont la fermeture est une étape-clé de l'exocytose d'insuline. Des associations entre des polymorphismes du gène SUR et le diabète type 2 ont été observées chez des diabétiques Britanniques et Américains (Inoue H, Diabetes, 1996), mais aucune liaison avec le diabète n'a été trouvée dans des études de fratries chez des diabétiques Mexicains Américains et Japonais. Une association de ces polymorphismes avec le diabète type 2 et avec une obésité morbide a été observée dans 5 à 8% de sujets de deux cohortes Françaises (Hani EH, Diabetes, 1997). L'association avec le diabète semble dépendante du surpoids dans ces cohortes de patients. La contribution d'un défaut génétique dans le gène SUR à l'obésité et à l'hyperglycémie pourrait être liée à une insulinosécrétion inappropriée chez des sujets déjà à risque de développer un diabète et une obésité par d'autres facteurs génétiques et environnementaux additifs. Ces observations soulignent les interactions complexes entre diabète et obésité. Parmi les gènes candidats à l'insulino-résistance, on retrouve le gène IRS-1, codant le messenger essentiel de l'action cellulaire de l'insuline. Deux mutations faux sens de ce gène, situées à proximité des sites de phosphorylation, ont été décrites chez 18% de patients diabétiques type 2 danois et retrouvées moins fréquemment de façon significative (6%) chez des non diabétiques (Almind K, Lancet, 1997). Bien que présentes dans des populations françaises, finlandaises et indiennes, ces mêmes mutations ne présentent des associations significatives que si on combine les données des 4 groupes ethniques. Dans une cohorte japonaise, d'autres mutations et polymorphismes du gène IRS-1 ont été associés à une diminution de la sensibilité à l'insuline et observés plus fréquemment chez des diabétiques que chez des non diabétiques (Ura S, Diabetologia, 1996). Cependant, les variants du locus IRS-1 ne co-ségrègent pas avec le diabète dans des familles diabétiques type 2 américaines. Toutes ces données suggèrent que des anomalies du gène IRS-1 puissent jouer un rôle mineur dans le développement du diabète type 2 dans certaines populations, en modulant le phénotype des patients, en particulier quand ils sont obèses. Il est très probable que certains gènes de susceptibilité au diabète type 2 produisent des

protéines de fonction inconnue ou non impliquées de façon évidente dans le métabolisme du glucose. Plusieurs groupes ont donc entrepris l'exploration du génome entier des sujets de familles, stratégie d'étude génétique communément appelée " génome scan ". C'est ainsi que Bell et al ont mis en évidence une région sur le chromosome 2 (2q37) liée au diabète type 2 dans des familles de Mexicains Américains (Hanis CL, Nature Genet, 1996). Environ 30% du risque génétique au diabète type 2 serait expliqué par ce gène encore inconnu appelé NIDDM1. Dans une seconde étude portée sur une population de familles relativement isolée de l'Ouest de la Finlande, aucune liaison génétique avec le diabète type 2 n'a pu être démontrée (Mahtani MM, Nature Genet, 1996). Cependant, quand les familles ont été séparées en fonction de leur réponse insulino-sensible au glucose, une liaison génétique très significative est apparue avec le diabète type 2 et le chromosome 12 (12q24.2) dans les familles les plus insulino-déficientes. Plus récemment, une autre région chromosomique (20q12-q13.1, NIDDM3) était liée au diabète type 2 dans des familles Finlandaises (Ghosh S, PNAS, 1999). Ce locus de susceptibilité au diabète avait déjà été localisé dans des familles Françaises (Zouali H, Hum Molec Genet, 1997). Les gènes dans ces 3 régions restent encore à l'heure actuelle à identifier.

1.2 L'athérosclérose : Maladie génétique et multifactorielle

1.2.1 Introduction

Les théories pathogéniques de l'athérosclérose sont très nombreuses, expliquées sans doute par le caractère multifactoriel de la maladie. Si la présence de dépôts de cholestérol dans les plaques d'athérome est connue depuis bien longtemps, les principaux événements peuvent être expliqués par la présence de différents types cellulaires (cellules musculaires lisses et endothéliales, monocytes, macrophages, lymphocytes T et B, cellules du tissu conjonctif). Différentes cytokines participent aux interactions entre ces cellules. L'intrication de ces différents

facteurs a permis de bâtir la théorie cellulaire inflammatoire et/ou proliférative de l'athérosclérose. Le caractère multifactoriel de la maladie coronarienne est expliqué non seulement par la présence de facteurs environnementaux comme le tabac mais aussi par l'existence de facteurs génétiques. En effet, la connaissance de son héritabilité est attestée par l'importance relative d'une histoire familiale (Underwood DA, Am J Cardiol, 1985) et par l'observation d'agrégation familiale de CHD (Jorde LB, Am J Cardiol, 1988). De plus, l'athérosclérose coronarienne ne ségrège pas comme un simple trait mendélien, attribuable à un seul gène à effet majeur. Ainsi, une agrégation familiale est toujours présente même après un contrôle vers la normalité des facteurs de risque classiques de CHD (Colditz GA, Am J Cardiol, 1991 et Am J Epidemiol, 1986). Par ailleurs, bien que les facteurs de risque classiques aient été contrôlés, le risque de décès par CHD comparé aux jumeaux dizygotes est 8 à 15 fois plus élevé chez les jumeaux monozygotes quand l'un d'eux a succombé prématurément suite à cette maladie (Marenberg ME, N Engl J Med, 1994).

La maladie coronarienne et la plupart de ces facteurs de risque sont considérés comme des traits complexes. Cette complexité se produit parce que, d'une part, plusieurs gènes sont impliqués dans la détermination d'un phénotype particulier (e.g. un taux plasmatique spécifique de cholestérol total) et, d'autre part, plusieurs phénotypes (e.g. classe de valeurs plasmatiques de cholestérol total) sont associés à un génotype particulier (Sing CF, 1990). D'un point de vue global, la complexité est attribuée à :

- un grand nombre de gènes influençant la susceptibilité à la maladie coronarienne dans une population donnée,
- des sous-groupes différents de gènes influençant la susceptibilité dans différentes familles,
- l'influence de facteurs classiques comme l'âge, le sexe, le régime alimentaire et le tabac sur la relation entre gènes et susceptibilité à la maladie coronarienne, et à

- un grand nombre de traits quantitatifs physiologiques et biochimiques intervenant entre les variations alléliques dans les loci génétiques et la variabilité interindividuelle dans la susceptibilité à la maladie coronarienne.

L'athérosclérose et ses complications, notamment l'infarctus du myocarde, est une pathologie extrêmement commune et grave. Son étude représente donc un intérêt majeur dans le domaine de la santé publique. Les études génétiques permettraient de mieux comprendre l'étiologie et la pathogénèse de cette maladie. De plus, en distinguant les populations à bas risque de celles à haut risque, elle permettrait une meilleure prise en charge des patients grâce à la modification des démarches diagnostique et thérapeutique.

1.2.2 Facteurs génétiques de la maladie coronarienne dans la population générale

Actuellement, de nombreux polymorphismes de gènes candidats ont été démontrés affecter la variabilité interindividuelle des facteurs de risque coronarien et des mécanismes physiopathologiques impliqués dans la pathologie coronarienne. La plupart de ces gènes ont été identifiés par un groupe travaillant sur de grandes cohortes. Il s'agit de l'étude ECTIM (Etude Cas/Témoin de l'infarctus du myocarde). Quatre échantillons de populations couvertes par des registres de cardiopathies ischémiques [WHO/MONICA (Wld Hlth Statist Annu, 1989)] ont été inclus dans cette étude : 3 en France, à Lille, Strasbourg et Toulouse et un en Irlande du Nord dans la région de Belfast. La France, au contraire de l'Irlande du Nord, est l'un des pays où la fréquence de la maladie coronarienne est la plus basse. Ainsi, aux âges moyens de la vie, le risque d'IM est 4 fois plus important chez l'homme et 8 fois plus important chez la femme à Belfast qu'à Toulouse. L'étude ECTIM permet donc la comparaison entre patients ayant survécu à un IM et témoins, et entre populations à haut et bas risque.

L'ApoE est une protéine impliquée dans le transport et le métabolisme des lipoprotéines dans le plasma. Elle est présente dans les VLDL et HDL, possède une grande affinité pour divers

récepteurs hépatiques et périphériques et a un rôle dans la conversion des VLDL en LDL par la LPL. L'ApoE constitue donc un élément clé dans le catabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides (Mahley RW, Science, 1988). Il existe 3 isoformes majeures de l'ApoE, issues du gène ApoE localisé sur le chromosome 19 (19q13.2). Elles se distinguent par l'existence de 2 polymorphismes fréquents (Cys112Arg et Arg158Cys). Ces polymorphismes génèrent 3 allèles appelés $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ (les plus fréquents) et $\epsilon 4$. La fréquence de ces allèles varie entre les populations et selon l'emplacement géographique (Gerdes LU, Genet Epidemiol, 1992). Ainsi, la fréquence de l'allèle $\epsilon 4$ est plus importante dans les populations noires en Afrique et aux USA (30%) et dans le Nord de l'Europe (20-25%). Par ailleurs, le polymorphisme de l'ApoE affecte le métabolisme et modifie le profil des lipoprotéines athérogènes. Les différents allèles présentent des capacités de liaison variables à leurs récepteurs : $\epsilon 2$ se liant moins bien que $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. La forme $\epsilon 4$ induit un métabolisme rapide des grosses particules lipoprotéiques riches en triglycérides. Mais, l'entrée massive de cholestérol dans les cellules entraîne une réduction du nombre des récepteurs des LDL et une diminution de la clairance des LDL athérogènes dont la concentration augmente dans le plasma. En présence d'ApoE2, en revanche, un nombre plus important de récepteurs est produit, ce qui induit une meilleure clairance des LDL athérogènes. Ce processus amène à considérer comme protectrice la forme $\epsilon 2$ qui est la moins efficace fonctionnellement. La forme "hyper-fonctionnelle" $\epsilon 4$, étant au contraire celle qui expose à une augmentation du risque coronarien. Le polymorphisme d'ApoE est par ailleurs un élément régulateur important dans la clairance des lipides provenant de l'alimentation (Weintraub MS, J Clin Invest, 1987). Le polymorphisme de l'ApoE semble ainsi favoriser des voies métaboliques différentes dont aucune ne peut être dans l'absolu considérée comme plus défavorable qu'une autre. C'est seulement le contexte nutritionnel ou génétique qui va déterminer le caractère défavorable ou non d'un allèle particulier. Dans l'étude ECTIM (Luc G, Arterioscler Thromb, 1994), l'effet protecteur de $\epsilon 2$ et l'effet délétère de $\epsilon 4$ ont été retrouvés sans ambiguïté. La présence de l'allèle $\epsilon 4$ a ainsi été

associée à un risque accru de maladie coronarienne, avec un risque relatif de 1,33 comparé à un risque relatif de 0,73 pour l'allèle $\epsilon 2$. Récemment, un autre polymorphisme situé dans la région régulatrice du gène ApoE a été associé et à un risque élevé de maladie coronarienne, indépendamment de la présence des autres variants génétique $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ et $\epsilon 4$. De plus, la présence de l'allèle délétère dans le promoteur était corrélée à une diminution des concentrations plasmatiques d'ApoE de manière dose-dépendante (Lambert JC, Hum Molec Genet, 2000). La susceptibilité à l'athérosclérose a également été étudiée pour le cluster de gènes ApoAI/CIII/AIV. Ces études d'association relatives à ce cluster comme pour le gène ApoE ont cependant montré des résultats contradictoires (Ordovas JM, Br J Nutr, 2000). D'autres gènes codant des protéines intervenant dans le métabolisme lipidique ont également été impliqués dans le développement de la maladie coronarienne. Ainsi, des anomalies plasmatiques de lipides ont été corrélées à un risque augmenté de CHD et associées à des mutations des gènes ApoB (Tybjaerg-Hansen A, N Engl J Med, 1998), CETP (Kuivenhoven JA, N Engl J Med, 1998), LPL (Mattu RK, Arterioscler Thromb, 1994 ; Jemaa R, J Lipid Res, 1995).

L'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ACE) est présente notamment dans les cellules endothéliales vasculaires et les cellules rénales épithéliales. Elle joue un rôle important dans la régulation de la pression sanguine et la prolifération des cellules musculaires lisses. Des études familiales ont montré qu'un effet génétique était un déterminant majeur de 50% de la variabilité interindividuelle des concentrations circulantes d'ACE (Cambien F, Am J Hum Genet, 1988). Par la suite, plusieurs études ont mis en évidence une association significative entre un polymorphisme du gène ACE (insertion/délétion de l'intron 19), des taux plasmatiques élevés de la protéine et le risque accru d'IM (Cambien F, Nature, 1992 ; Circulation, 1994).

L'inhibiteur 1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1), sécrété par les cellules endothéliales, les hépatocytes, les plaquettes et les cellules musculaires lisses, est un facteur primaire de la fibrinolyse. L'allèle 4G du polymorphisme 4G/5G de la région promotrice du gène

est responsable de l'augmentation des concentrations plasmatiques de PAI-1 et a été associé au développement de maladie coronarienne (Dawson SJ, J Biol Chem, 1993 ; Eriksson P, Proc Nat Acad Sci, 1995 ; Margaglione M, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998). En effet, les 2 allèles permettent la fixation d'un activateur transcriptionnel, tandis que l'allèle 5G seul permet la liaison d'une protéine répressive. En absence de cette dernière, le taux basal de transcription du gène PAI-1 est ainsi augmenté. Chez les individus porteurs de l'allèle 4G, l'activité fibrinolytique est ainsi diminuée avec, pour conséquence, un risque accru de thrombose. Des mutations de facteurs de la coagulation comme le β -fibrinogène (Humphries SE, Lancet, 1987 ; Behague I, Circulation, 1996) et le FVII (Lane A, Atherosclerosis, 1996 ; Humphries S, Thromb Haemost, 1996) ont elles aussi été associées au développement de l'athérosclérose à travers la variabilité de leurs taux plasmatiques.

Le TGF β (Transforming Growth Factor) est une cytokine circulant dans le plasma de façon inactive (Border WA, J Clin Invest, 1992). Elle joue un rôle majeur dans la modulation de la différenciation et la croissance cellulaire de divers tissus et dans la formation de la matrice extra-cellulaire. A travers divers mécanismes, la capacité variable de ce facteur de croissance pourrait être à l'origine d'une fonction endothéliale anormale (Dickson K, J Clin Invest, 1995 ; Gamble JR, J Immunol, 1993) et influencer le remodelage des tissus vasculaire et cardiaque (Ohno M, J Clin Invest, 1995 ; Takahashi N, J Clin Invest, 1994). L'étude ECTIM a détecté plusieurs variations génétiques de la région promotrice du gène TGF β et mis en évidence une association entre un de ces polymorphismes et la maladie coronarienne (Cambien F, Hypertension, 1996).

Une autre façon de "disséquer" le trait complexe "CHD" consiste à identifier et à étudier de manière spécifique les formes les plus héréditaires, dont la transmission peut être monogénique. C'est ainsi que plusieurs groupes se sont intéressés à l'étude de maladies

syndromiques, comme les dyslipidémies familiales ou relatives à l'hypertension artérielle, conférant aux individus atteints un risque accru d'athérosclérose.

Le diagnostic de dyslipidémie, basé sur la confrontation des données cliniques et du bilan lipidique standard (cholestérol total, triglycérides, HDL cholestérol), a permis de déterminer différentes classes de lipidémies qui recouvrent des entités pathogéniques très différentes. Les dyslipoprotéïnémies monogéniques ne sont pas rares (Tableau 3), elles compteraient pour 50 à 60% des dyslipidémies observées chez les coronariens (Genest JJ Jr, *Circulation*, 1992), les formes polygéniques ne comptant que pour environ 30% et les formes sporadiques pour moins de 20%. L'hétérogénéité est reflétée par l'absence de relations simples entre les « phénotypes » de dyslipidémie et le métabolisme des lipoprotéines, témoignant de la multiplicité des facteurs génétiques et d'environnement qui en déterminent la pathogénèse. La plupart des dyslipidémies sont hérissables et se présentent donc comme des maladies familiales, mais leur mode de transmission n'est pas univoque. Des enquêtes familiales, basées sur le type de dyslipidémies, sa gravité, sa précocité, celles de ses complications cardio-vasculaires et son mode de transmission dans la famille, ont orienté vers une hérédité mendélienne (monogénique) ou polygénique. Dans le premier cas, la prédisposition génétique dépend d'un seul gène au locus déterminant l'essentiel des caractères associés à la dyslipidémie, qui est généralement plus sévère et plus précoce. Dans le deuxième cas, plusieurs gènes interviennent à des degrés divers, souvent en interaction avec des facteurs d'environnement, pour favoriser l'apparition de l'anomalie lipidique, qui est souvent plus tardive.

Formes monogéniques	Dyslipoprotéinémies familiales	Hérédité	Gène (QTL)	Localisation chromosomique	Fréquence
	Hyperlipidémies Hyperchylomicronémie Familiale Hypercholestérolémie Familiale Défiance Familiale en ApoB100 Dysbétalipoprotéinémie Familiale Hyperlipidémie Familiale Combinée (FCHL)	AR AD AD AD, PLG AD, PLG	LPL ; ApoCII LDLR ApoB ApoE LPL ? (Triglycérides) (Cholestérol) (ApoB) Pepsinogène ApoAI, ApoCIII CETP	8p22 ; 19q13.2 19p13.2 2p24 19q13.2 8p22 1q21-q23, 11p 2q31, 10p11.2 10q11.2-10qter 21q21 11q13 11q23-q24 16	1/10 ⁶ 1/500 1/500 1/10 ⁴ 3-5/10 ³ 2/10 ³ très rare
	Hypobétalipidémies Hypobétalipoprotéinémie Abétalipoprotéinémie Hypoalphalipidémies Déficit en LCAT Déficit en ApoAI Maladie de Tangier	AD AR AR AD AR	ApoB MTTP LCAT ApoAI ABC1 ;	2p24 4q24 16 11q23-q24 9q22-q31	8/10 ³ très rare très rare très rare très rare
Formes communes (population générale)	Phénotype ALP Hypertriglycéridémie Hypoalphalipidémie (défiance en HDL)	? 	LDLR ; ATHS ? CETP SOD1 ApoAI/CIII/AIV (Triglycérides) (HDL) :(ApoAI/CIII/ AIV,ApoB,lipase,LPL ,LDLR) ABC1	19p13.2 16 6 11q23-q24 15q11.2-q13.1 9q22-q31	? ? ?

AR : autosomale récessive ; AD : autosomale dominante ; PLG : polygénique ; ATHS : atherosclerosis susceptibility ; en gras : gènes candidats ou QTL suggérés par les études familiales de liaison avec des marqueurs microsatellites

Tableau 3: Dyslipoprotéinémies familiales monogéniques et formes communes

La détection et la localisation de nombreux gènes du métabolisme des lipoprotéines a rendu possible la recherche ciblée de déterminants génétiques dans le développement des dyslipidémies par l'approche « gène candidat » (Tableau 3). L'approche directe, qui consiste à rechercher la mutation causale, a permis de détecter des déficits homozygotes, mais aussi des déficits hétérozygotes fréquents. L'approche indirecte a également été utilisée pour déterminer par liaison à l'aide de marqueurs polymorphes de type microsatellite, lequel des gènes potentiellement impliqués est effectivement responsable de l'anomalie familiale. Le gène étant identifié, les mutations responsables ont été recherchées. En raison de la diversité pathologique et génétique des anomalies lipidiques, nous ne discuterons dans ce paragraphe que des formes autosomales dominantes les plus fréquentes.

L'hypercholestérolémie familiale, caractérisée par des taux élevés de LDL cholestérol, résulte de défauts du récepteur LDL. Cette protéine membranaire ubiquitaire assure l'internalisation des LDL par interaction avec Apo B, entraînant une cascade de réaction sur le métabolisme du cholestérol. Cette voie majeure de régulation catabolise quotidiennement les 3/4 du LDL cholestérol. Les premières études du récepteur LDL chez des patients atteints d'hypercholestérolémie familiale (Kwiterovich PO Jr, J Clin Invest, 1974) ont rattaché les deux formes cliniques hétérozygotes et homozygotes à un effet de dose des mutations du récepteur aux LDL. Plus de 200 mutations naturelles ont été décrites sur le gène du LDLR dans différentes régions du monde. Certains gros remaniements géniques (insertions ou délétions) ou des mutations ponctuelles non-sens perturbent totalement l'expression et sont associés généralement aux formes cliniques les plus graves. D'autres se traduisent par la perte d'une fonction : liaison aux LDL, recyclage rapide vers la membrane, maturation intracytoplasmique, ancrage à la membrane ou internalisation. L'étude de marqueurs microsatellites a mis en évidence une indication de liaison dans la région du gène LDLR dans des familles caractérisées par un phénotype athérogène particulier (ALP, Atherogenic Lipoprotein Phenotype) (Nishina PM, Proc

Natl Acad Sci USA, 1992). Ce phénotype est une forme commune héritable de dyslipidémies qui se caractérise par une prépondérance de petites particules denses de LDL, des taux élevés de lipoprotéines riches en triglycérides et par une réduction de HDL. Selon les auteurs, des variations génétiques du LDLR ou d'un locus très proche (ATHS) pourraient être responsables des altérations métaboliques rencontrées dans le phénotype ALP, qui explique une proportion substantielle de la prédisposition familiale aux CHD dans la population générale. Ce résultat a été confirmé avec l'étude d'une population plus générale constituée de familles atteintes de CHD (Rotter JJ, Am J Hum Genet, 1996). L'équipe de Rotter a par ailleurs mis en évidence des liaisons du phénotype ALP avec le locus CETP sur le chromosome 16, le locus SOD1 sur le chromosome 6 et le cluster de gènes ApoA1/CIII/AIV sur le chromosome 11.

Une autre forme d'hypercholestérolémie (déficience en ApoB) et l'hypobétalipoprotéïnémie familiales sont associées à des mutations naturelles du gène Apo B. Les effets métaboliques de ces deux types de dyslipidémie ont contribué à cerner le rôle physiologique de l'Apo B. Dans la déficience en Apo B, la mutation R3500Q perturbe la liaison de l'Apo B100 (forme de sécrétion hépatique de l'Apo B) au LDLR, ce qui entraîne une hypercholestérolémie par défaut de catabolisme des LDL (Soria LF, PNAS, 1989). Plus d'une trentaine d'autres mutations du gène Apo B sont responsables du phénotype inverse : l'hypobétalipoprotéïnémie, qui se caractérise par la baisse des taux circulants de cholestérol LDL et d'Apo B. Les mutations se traduisent sous la forme d'une Apo B tronquée, intégrée à des lipoprotéines anormales dont la sécrétion est perturbée ou dont la conformation inhabituelle en accélère le catabolisme par la voie du LDLR. Ces défauts de structure expliquent les taux anormalement bas d'Apo B dans le plasma.

La dysbétalipoprotéïnémie familiale est une situation clinique dans laquelle l'Apo E joue un rôle majeur. Cette hyperlipidémie, qui résulte de l'accumulation plasmatique de lipoprotéines intermédiaires, reconnaît deux modes de transmission dans les familles : une forme rare

autosomique dominante et une forme plus fréquente polygénique. Dans la forme dominante, plus d'une dizaine de variants génétiques d'Apo E comprenant les allèles $\epsilon 3$, $\epsilon 2$ et $\epsilon 4$ ont été associés à la dysbétalipoprotéïnémie familiale (de Knijff P, Hum Mutat, 1994). Dans sa forme polygénique, la présence de l'allèle $\epsilon 2$ à l'état homozygote est une condition nécessaire sans qu'elle soit toutefois suffisante pour provoquer l'hyperlipidémie. Une autre anomalie génétique ou un régime alimentaire riche en graisses saturées fera apparaître cette hyperlipidémie particulière chez les sujets prédisposés.

L'hypertriglycéridémie familiale se caractérise par une distribution bimodale des taux circulants de triglycérides. Les taux de cholestérol restent cependant dans des limites normales. L'analyse d'une trentaine de marqueurs microsatellites a mis en évidence une liaison entre cette hyperlipidémie et la région chromosomique 11q13 contenant le gène pepsinogène. Par ailleurs, un polymorphisme de la région 3' non codante du gène Apo CIII, adjacente au gène Apo AI, a été associé à l'hypertriglycéridémie (Rees A, Lancet, 1983). Dans sa forme commune, l'exploration systématique du génome de familles Mexicaines Américaines a été récemment réalisée afin de détecter des loci de susceptibilité pouvant influencer les taux plasmatiques de triglycérides (QTL, quantitative trait locus). Cette étude a mis en évidence une région chromosomique de liaison en 15q11.2-q13.1 (Duggirala R, Am J Hum Genet, 2000).

L'hypertriglycéridémie est, par ailleurs, un trait communément rencontré dans la maladie de Tangier et l'hyperlipidémie combinée familiale (FCHL). Des mutations du gène ABC1 ont été associées dans la maladie de Tangier (Brooks-Wilson A, Nat Genet, 1999), qui est particulièrement caractérisée par une réduction du HDL cholestérol. Une forme commune de déficience en HDL existe dans la population générale. Ainsi, dans des familles de Mexicains Américains, un groupe s'est intéressé aux régions chromosomiques pouvant influencer le taux de HDL cholestérol (Mahaney MC, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995). Ils ont mis en évidence : des liaisons peu significatives avec la région du cluster de gènes ApoAI/CIII/AIV et le locus

ApoB ; et des liaisons plus fortes avec les loci de la lipase hépatique, de la lipase lipoprotéique et du LDLR. L'étude de familles d'Utah avec hypoalphalipoprotéinémie primaire (taux bas de HDL cholestérol) a été effectuée dans une région de 55 cM du chromosome 11 (Kort EN, Am J Hum Genet, 2000). Cette étude a détecté une région proche mais distincte du cluster de gènes ApoAI/CIII/AIV fortement liée aux taux bas de HDL cholestérol. Quant au syndrome lipidique FCHL, celui-ci est caractérisé soit par des taux élevés de cholestérol total ou de triglycérides soit par les deux. D'autre part, certaines familles FCHL présentent une prédominance de LDL de petite taille et des taux élevés d'Apo B. L'hétérogénéité clinique de cette affection reflète la multiplicité de facteurs génétiques de susceptibilité. A ce jour, quelques mutations du gène de la lipoprotéine lipase (LPL) ont été identifiées chez des patients FCHL mais aussi chez des patients CHD, représentatifs d'une population générale. Dans une population isolée de Finlande atteinte de FCHL (Pajukanta P, Nat Genet, 1998), l'utilisation de quelques marqueurs polymorphes de gènes candidats ont permis de mettre en évidence un nouveau locus (HYPLIP1) de susceptibilité dans la région du chromosome 1 (1q21-q23), adjacente au gène ApoAII. Ce résultat a été confirmé par l'étude de familles Allemandes et Chinoises (Pei W, Clin Genet, 2000), mais pas par celle de Aouizerat et al d'autres familles Allemandes avec l'étude de l'exploration systématique du génome (Am J Hum Genet, 1999). Par contre, ils ont détecté un autre locus (HYPLIP2) sur le chromosome 11p. Pajukanta et al ont, par la suite, exploré le génome de leur population Finlandaise enrichie de quelques familles avec 394 marqueurs polymorphes (Am J Hum Genet, 1999). Des loci additionnels étaient susceptibles d'affecter les taux de triglycérides (2q31, 10p11.2), de cholestérol total (10q11.2-10qter) et d'ApoB (21q21).

Un autre aspect de la physiopathologie de l'athérosclérose a été étudié : le système rénine-angiotensine. Ce mécanisme joue un rôle central dans la régulation de la pression sanguine. L'hypertension artérielle, entraînant et aggravant les lésions mécaniques de l'endothélium

vasculaire, est associée à l'augmentation du risque coronarien. La prédisposition génétique à l'hypertension artérielle (HTA) a été établie par de nombreuses études, montrant que le niveau de pression artérielle était en partie génétiquement déterminé. D'autres études ont mieux discerné la part génétique de la part environnementale en analysant des familles de jumeaux monozygotes et dizygotes et des familles où des sujets partagent le même environnement mais pas les mêmes gènes, ce qui est le cas des enfants adoptés. La génétique de l'HTA a été appliquée à l'étude de formes syndromiques et de l'hypertension essentielle (Tableau 4).

Formes monogéniques	Hérédité	Gène (locus)	Localisation chromosomique
Hyperaldostéronisme suppressible par glucocorticoïdes	AD	CYP11	8q21
Syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes	AD	HSD11B2	16q22
Syndrome de Liddle	AD	SCNN1B SCNN1G	16p13-p12 16p13-p12
Pseudohyperaldostéronisme type II	AD	(PHA2C) (PHA2A) (PHA2B)	12p13 1q31-q42 17q21-q22
Hypertension essentielle	?	AGT HTA et PA (QTL) ?	1q42-q43 17q 3, 11, 15, 16, 17

Tableau 4: Les syndromes d'HTA et Hypertension essentielle

Comme pour l'étude des dyslipidémies, ces formes particulières d'HTA ont offert la possibilité d'identifier le gène responsable par les techniques de clonage positionnel, grâce à des marqueurs microsatellites localisés dans le génome, sans a priori sur l'identité des gènes localisés dans les loci explorés. D'autres groupes ont réalisé des études de liaison génétique avec des marqueurs situés sur des gènes candidats pour ces pathologies d'HTA. Dans ses formes syndromiques, plus de 10 gènes ont été démontrés affecter la pression sanguine (Lifton RP,

Science, 1996). Pour la plupart, les mutations étaient rares, responsables d'effets quantitatifs augmentant ou diminuant la pression sanguine. Ces mutations altèrent la pression sanguine à travers une voie commune, modifiant la réabsorption rénale d'eau et de sel. Nous ne parlerons ici que des anomalies génétiques responsables d'hypertension. Ces anomalies sont rencontrées dans l'hyperaldostéronisme suppressible par les glucocorticoïdes, le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes et le syndrome de Liddle. Dans l'hyperaldostéronisme suppressible par les glucocorticoïdes, l'anomalie est due à la production d'un gène chimérique entre les gènes CYP11B1 et CYP11B2 situés sur le même chromosome et codant respectivement la stéroïde-11 β -hydroxalase et l'aldostérone synthase. Le gène chimérique possède la région la plus carboxyterminale de l'enzyme de l'aldostérone. En revanche, les régions régulatrices de ce gène additionnel sont celles de CYP11B1, ce qui provoque sa sensibilité à l'ACTH. Plusieurs mutations dans le gène HSD11B2 sur le chromosome 16q22 sont la cause d'hypertension dans le syndrome d'excès apparent de minéralocorticoïdes. Ce gène code la 11-Béta-hydroxystéroïde déshydrogénase, un complexe microsomal enzymatique agissant sur l'introconversion de cortisol et de cortisone. Dans le syndrome de Liddle, il existe des mutations à la fois de la sous-unité β et de la sous-unité γ de la pompe sodium épithéliale rénale, codées par les gènes SCNN1B et SCNN1G respectivement en 16p13-p12. Plus récemment, une équipe s'est intéressée à une forme autosomale dominante d'hypertension (Pseudohypoaldostéronisme type II), suggérant un défaut primaire des cellules tubulaires rénales. Chez tous les membres d'une famille multigénérationnelle Française, un génome scan de 383 marqueurs microsatellites a détecté une liaison significative dans la région 12p13 du chromosome 12, nommé locus PHA2C (Disse-Nicodeme S, Am J Hum Genet, 2000). Préalablement, Mansfield et al (Nat Genet, 1997) avaient démontré dans d'autres familles des régions chromosomiques liées à cette pathologie sur les chromosomes 1 (1q31-42) et 17 (17p11-q21), appelées respectivement loci PHA2A et PHA2B. Dans l'hypertension essentielle, des marqueurs microsatellites, situés dans la région du gène de

l'angiotensinogène (1q42-43), ont détecté une liaison de ce locus avec l'hypertension dans des familles Européennes (Caulfield M, New Eng J Med, 1994). Il y avait également des associations de ce locus angiotensinogène (AGT) avec l'hypertension. Une autre équipe a démontré qu'un locus proche mais probablement distinct d'ACE dans la région du chromosome 17 était lié à l'hypertension essentielle chez des familles Françaises et Anglaises (Julier C, Hum Molec Genet, 1997). Baima et al (Hypertension, 1999) ont confirmé la localisation d'un QTL lié à la pression sanguine sur le chromosome 17q dans une cohorte de familles Américaines. Afin de détecter d'autres régions ou gènes impliqués dans la régulation de la pression sanguine, l'étude systématique du génome a été effectuée avec 367 marqueurs polymorphes dans des familles d'individus Chinois selon leurs pressions sanguines (Xu X, Am J Hum Genet, 1999). Des liaisons génétiques ont été trouvées sur les chromosomes 3, 11, 15, 16 et 17.

1.2.3 Limites des études génétiques dans la population générale

De nombreux gènes peuvent donc être pertinents de la pathologie et du développement de l'athérosclérose. Cependant, son étude reste complexe en raison de la diversité clinique et génétique entre populations, et individus d'une même population. Par exemple, prenons le cas de l'étude Cas/Témoin du gène TNF α , codant une cytokine pouvant intervenir dans le processus inflammatoire de l'athérosclérose : l'étude ECTIM n'a pas détecté d'association significative entre ce gène et le risque coronarien dans des populations générales à haut risque de Belfast et de France. Cependant, un allèle d'un polymorphisme du promoteur de ce gène était plus fréquent à Belfast qu'en France et les patients porteurs de cet allèle étaient plus fréquemment obèses que les non porteurs (Herrmann SM, Eur J Clin Invest, 1998). Les résultats peuvent donc différer quand on passe d'une population générale à une population moins générale. C'est le cas également dans les études familiales de liaison relatives aux dyslipidémies. En effet, dès 1988, le phénotype ALP avait été associé de façon indépendante à un risque augmenté de CHD (Austin MA, JAMA,

1988). Or, récemment, une étude a démontré une association génétique entre le phénotype FCHL et les particules petites et denses de LDL (Allayee H, Am J Hum Genet, 1998). Les auteurs ont conclu que les déterminants génétiques de la taille des particules LDL étaient, au moins en partie, partagés entre les familles FCHL et les populations plus générales à risque élevé de CHD.

Par ailleurs, la difficulté de l'étude génétique de l'athérosclérose provient des nombreux facteurs de risque présents dans la population générale. Le tableau 5 les résume, de façon non exhaustive. Ces facteurs de risque coronarien sont le plus souvent utilisés lors d'études épidémiologiques et génétiques (Peyster AP, Epidemiologic Reviews, 1997).

Facteurs de risque coronarien établis	Facteurs de risque coronarien proposés
Age	Isoformes de l'ApoE
Sexe mâle	Lipoprotéine(a)
Histoire familiale de maladie coronarienne précoce	Hyperinsulinémie
Tabagisme	Taux plasmatiques réduits d'ApoA1
Obésité	Oxydation des particules lipoprotéiques
Hypertension	Sous-espèces de particules lipoprotéiques
Inactivité physique	Récepteur du LDL
Diabète	Fibrinogène
Taux plasmatiques élevés de cholestérol total et de LDL-cholestérol	Facteur VII
Taux plasmatiques bas de HDL-cholestérol	Plasminogène, PAI-1
	Hyperhomocystéinémie
	Angiotensine et ACE
	Cytokines

Tableau 5: Liste de facteurs de risque coronarien

La survenue de pathologies cardio-vasculaires est habituellement reliée à des différences d'exposition à l'environnement, l'alimentation étant le principal facteur incriminé. En effet, ces pathologies sont quasi inexistantes dans certaines populations où les apports alimentaires de graisses saturées ou de sel sont faibles. Il est, par ailleurs, établi que lorsque des populations à bas risque modifient leur mode de vie et adoptent une alimentation proche de celle des pays occidentaux industrialisés, de nombreux individus développent des troubles métaboliques affectant le dépôt des graisses, le métabolisme des lipides et des hydrates de carbone qui

favorisent le développement de l'athérosclérose et de ses complications. Ces effets globaux observés au niveau des populations rendent pourtant mal compte des effets de l'environnement au niveau individuel. La prédisposition individuelle aux maladies communes est donc en partie dépendante de facteurs génétiques.

Les patients diabétiques ont un risque cardio-vasculaire 2 à 3 fois supérieur à celui de la population générale (Kannel WB, *Circulation*, 1979). Or, le diabète est une pathologie complexe où facteurs environnementaux et génétiques sont étroitement associés. Les facteurs génétiques impliqués dans le développement de l'athérosclérose dans la population générale sont-ils aussi impliqués dans le développement des complications cardio-vasculaires du diabète ? De nombreuses autres questions se soulèvent : Combien de gènes sont responsables ? Quel est le nombre d'allèles de chaque gène et quelles sont leurs fréquences relatives ? Quelle est la relation unissant chaque allèle au risque de CHD ou aux différents facteurs de risque établis ? Est-ce que les gènes agissent à travers des voies de facteurs de risque mesurables (e.g. taux lipidique ou pression sanguine) ou à travers de nouvelles voies encore inconnues ou qui ne peuvent être directement mesurées *in vivo* ? Y a-t-il une évidence d'interactions entre gènes et/ou entre gènes et environnement ? Nous tenterons avec la suite de ce travail de répondre en partie à l'ensemble de ces préoccupations.

1.3 Le diabète et ses complications dégénératives

1.3.1 Epidémiologie

1.3.1.1 Introduction

Le risque (et le coût) lié au diabète est essentiellement dû à l'apparition de complications dégénératives micro- et macro-vasculaires, à long terme. La mortalité du diabétique est

augmentée, principalement à cause du développement de cardiopathies ischémiques, dont le risque est multiplié par 3 (Jarrett RJ, 1992). Les atteintes coronariennes représentent 25% des causes de décès chez les diabétiques entre 30 et 55 ans contre 6% dans la population générale. De plus, les diabétiques représentent une part importante des cas d'insuffisance rénale terminale, due à la fois à la néphropathie diabétique et à un risque plus élevé de néphropathie non diabétique (Catalano C, Nephrol Dial Transplant, 1992). Le pourcentage de diabétiques parmi les insuffisants rénaux en dialyse est en progression constante. Il atteint 8% en France et jusqu'à près de 25% aux USA et concerne dans 2/3 des cas des diabétiques type 2. Après 15 ans de diabète, environ 1/3 des hommes comme des femmes sont atteints de néphropathie diabétique avec des chiffres extrêmes de 10 à 72% selon les pays, la France semblant se situer parmi ceux pour lesquels la prévalence est la plus faible. Après 5 ans d'évolution chez les diabétiques type 1 et un délai plus court dans le diabète type 2, l'incidence augmente pour culminer vers 10 ans d'ancienneté du diabète et décroître après. La rétinopathie diabétique entraîne, dans une fraction des cas, une baisse de vision importante, voire la cécité. Elle reste l'une des principales causes de cécité avant 60 ans dans les pays occidentaux (Ghafour IM, Br J Ophthalmol, 1983 ; Nicolisi A, Int J Epidemiol, 1994). La rétinopathie diabétique est la première cause de cécité chez les sujets âgés de 20 à 64 ans. Ainsi, aux USA, 8% des sujets diabétiques sont aveugles ; 12% des diabétiques type 1 le sont après 30 ans de diabète et 7% des diabétiques type 2 après 20 ans de diabète. Enfin, l'amputation des membres inférieurs est beaucoup plus fréquente chez le diabétique, en raison des effets combinés de l'artériopathie des membres inférieurs et de la neuropathie périphérique. Ainsi, le risque d'amputation était multiplié par 10 chez les diabétiques dans une étude finlandaise (Siitonen OI, Diabetes Care, 1993). En France, une étude a montré que le coût médical était multiplié par 2 en présence de ses complications (Triomphe A, J Econ Med, 1993). C'est donc en raison de ces complications que le diabète constitue un important problème de santé publique.

La prévalence croissante de micro- et macro-angiopathies après un nombre d'années déterminé de diabète rend compte du rôle fondamental de l'hyperglycémie dans l'apparition et le développement de ces complications. Cependant, l'étude de l'épidémiologie des complications vasculaires du diabète est dominée par la différence entre la responsabilité de l'hyperglycémie dans la survenue de la micro-angiopathie et son rôle plus controversé dans le déterminisme de la macro-angiopathie.

1.3.1.2 Rôle de l'hyperglycémie

1.3.1.2.1 Dans la micro-angiopathie

Les études de cohorte (Pirart J, Diabetes & Metab, 1977 ; Klein R, Diabetes Care, 1995) et les études prospectives interventionnelles randomisées (étude du DCCT, N Engl J Med, 1993 et Reicher P, N Engl J Med, 1993 pour le diabète de type 1 ; étude de UKPDS, Lancet, 1998 et Ohkubo Y, Diabetes Res Clin Pract, 1995 pour le diabète type 2) ont permis de mettre en évidence les données suivantes quant au développement de la micro-angiopathie :

- le contrôle glycémique est au mieux évalué par le taux d'hémoglobine glyquée (HbA1c). Un taux normal est de 4 à 6% ; 7 et 9% correspondent à des glycémies moyennes de 1,5 et 2,1 g/l, respectivement et chaque augmentation de 1% au delà d'un taux de 6% correspond à une élévation de la glycémie moyenne de 0,3 g/l. A partir du seuil glycémique définissant le diagnostic de diabète (7 mmol/l), il existe une relation quasi-linéaire entre l'hyperglycémie et l'aggravation de la micro-angiopathie. L'existence d'un seuil glycémique à risque n'est pas contradictoire avec le constat d'une absence de seuil protecteur d'HbA1c lors du traitement du diabète de type 1 (DCCT, Diabetes, 1996),
- toutes les études internationales, quelles que soient les populations ou le type de diabète, ont confirmé la relation entre l'HbA1c et la micro-angiopathie : pour 1% d'HbA1c en plus, on observe une augmentation du risque de micro-angiopathie de 25 à 30% et à l'inverse, une

diminution de 1% d'HbA1c entraîne une diminution de 25 à 30% du risque de micro-angiopathie (UKPDS, Lancet, 1998 ; DCCT, Diabetes, 1995). En conséquence, les prévalences de rétinopathie sont identiques à Boston et à Tokyo, fonction de la durée du diabète, soit environ 25% à 10 ans, 50% entre 10 et 20 ans, plus de 75% après 20 ans (Krolewski AS, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 1996),

- même s'il existe des facteurs génétiques et environnementaux potentialisateurs ou aggravant (DCCT, Diabetes, 1997 ; Marre M, J Clin Invest, 1997), l'hyperglycémie est un agent causal important de la micro-angiopathie,
- dans les modèles animaux, les complications micro-vasculaires sont induites par l'hyperglycémie et réduites par la réduction de celle-ci (Mauer S, Diabetes, 1975),
- enfin, dans les essais thérapeutiques, une insulino-thérapie intensifiée visant à réduire l'hyperglycémie réduit le risque de survenue de micro-angiopathie (DCCT, N Engl J Med, 1993).

1.3.1.2.2 Dans la macro-angiopathie

L'hyperglycémie est-elle cause de macro-angiopathie ? Le rôle fondamental de l'hyperglycémie dans la survenue de micro-angiopathie chez le diabétique type 1 (DCCT, N Engl J Med, 1993) a conduit plusieurs auteurs à penser que ce qui était vrai pour la micro-angiopathie devait l'être également pour la macro-angiopathie (Skyler JS, Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 1996). Cependant, si plusieurs études (Kuusisto J, Diabetes, 1994 ; Malmberg K, Brit Med J, 1997) semblaient apporter les premières preuves en faveur de cette hypothèse, d'autres ont obtenu des résultats contradictoires quant au seul rôle de l'hyperglycémie dans le développement de macro-angiopathie dans le diabète (UKPDS, Lancet, 1988 ; étude Veteran, Arch Intern Med, 1997). Les différents arguments discutant du diabète comme facteur de risque cardio-vasculaire majeur sont les suivants :

- Les diabétiques type 2 par rapport aux sujets non diabétiques du même âge ont 2 à 3 fois plus de risque de mourir d'une cardiopathie ischémique (Kannel WB, *Circulation*, 1979 ; Laakso M, *Diabetes Reviews*, 1997). De plus, chez les femmes qui, une fois diabétiques, perdent toute protection vasculaire, le risque cardio-vasculaire en est d'autant majoré (Barrett-Connor EL, *JAMA*, 1991). L'atteinte coronaire représente la première cause de décès des diabétiques type 2 comme cela a été illustré par une étude rapportant la différence de surmortalité par insuffisance coronarienne entre diabétiques et non diabétiques (Haffner SM, *N Engl J Med*, 1998, 339). La mortalité est de 19% chez les non diabétiques ayant présenté un infarctus du myocarde antérieur alors qu'elle n'est que de 3,5% chez ceux n'en ayant pas présenté. Elle est par contre de 45% chez les diabétiques ayant présenté un infarctus et de 20% chez ceux qui en étaient indemnes. De ces données, on en déduit que la mortalité par insuffisance coronaire est comparable chez les patients non diabétiques ayant fait un infarctus (19%) à celle des diabétiques n'en ayant pas fait (20%).

- en terme de risque relatif, la puissance du diabète est identique que la population soit à haut ou bas risque cardio-vasculaire comme cela a été démontré dans une étude finnoise comparant la morbimortalité cardio-vasculaire entre l'Est et l'Ouest du pays, respectivement à haut et bas risque cardio-vasculaire (Laakso M, *Diabetologia*, 1995). Les odds ratio Est versus Ouest sont de 2 pour les non diabétiques et de 1.5 pour les diabétiques,

- l'importance du risque vasculaire absolu chez l'homme diabétique a été confirmée par l'étude du Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT, Stamler J, *Diabetes Care*, 1993). Le diabète, qui multiplie par 3 le risque vasculaire absolu, semble à lui seul plus puissant que l'association d'autres facteurs de risque cardio-vasculaire établis (tabagisme, hypercholestérolémie, HTA). Des résultats similaires ont été observés chez des femmes diabétiques (Manson JE, *Arch Intern Med*, 1991). L'incidence d'évènements coronariens était significativement augmentée avec un risque vasculaire multiplié par 4 à 5 pour les femmes diabétiques fumeuses versus les fumeuses

non diabétiques, pour les diabétiques hypertendues versus les hypertendues non diabétiques ou pour les diabétiques hypercholestérolémiques versus les hypercholestérolémiques non diabétiques.

Il est donc bien établi que le diabète est un facteur de risque cardio-vasculaire majeur. Cependant, s'agit-il d'un facteur causal ou d'un facteur potentialisateur ? De nombreuses études débattent de la responsabilité respective de la glycémie, de l'insulino-résistance et d'autres facteurs de risque cardio-vasculaire liés au diabète :

- ainsi, l'hyperglycémie est responsable d'une athérosclérose accélérée par le biais de la glomérulopathie diabétique. En effet, la présence d'une néphropathie diabétique multiplie par 10 le risque de mortalité cardio-vasculaire chez les diabétiques type 1 (Jensen T, Diabetologia, 1987 ; Tuomilehto J, Diabetologia, 1998). L'insuffisance rénale est responsable de l'association de facteurs de risque cardio-vasculaire (HTA, hyperlipidémie, tendance thrombogène) et d'un défaut d'élimination des produits terminaux de la glycation (Brownlee M, Diabetes Care, 1992). Dès le stade de la microalbuminurie, il existe une altération significative des facteurs de risque de macro-angiopathie, en particulier une dyslipoprotéïnémie et une augmentation du vWF et du fibrinogène (Jones SL, Br Med J, 1989). La question se pose en des termes quelque peu différents au cours du diabète type 2, dans la mesure où l'HTA et la microalbuminurie précèdent bien souvent l'apparition et en tout cas le diagnostic de diabète (Haffner SM, Arteriosclerosis, 1990). Ainsi, à l'inclusion des patients ayant une glycémie à jeun > 6 mmol/l, on notait une microalbuminurie dans 28% des cas (Howard WJ, Diabetes Res, 1990). La valeur pronostique de la microalbuminurie a été confirmée chez les diabétiques type 2 avec une ancienneté de diabète moyenne de 13 ans et un suivi de plus de 6 ans. La microalbuminurie était associée à un doublement de la mortalité cardio-vasculaire, et ce, indépendamment de l'âge, d'une HTA, d'une

hypercholestérolémie, d'un tabagisme et d'anomalies d'ECG de base (Dinneen SF, Arch Intern Med, 1997),

- l'hyperglycémie peut-elle être responsable de la macro-angiopathie en l'absence d'une glomérulopathie diabétique ? Une étude portant sur des diabétiques type 1 avec ou sans néphropathie diabétique (Krolewski AS, Am J Cardiol, 1987) a rapporté un taux de 35% de mortalité cardio-vasculaire cumulée. La moitié (18%) est survenue chez les diabétiques type 1 ayant une glomérulopathie diabétique, l'autre moitié (17%) survenant indépendamment de cette complication rénale. De plus, le risque vasculaire absolu était identique chez les hommes comme chez les femmes. Des résultats comparables ont été rapportés dans une étude du Steno Diabetes Center (Rossing P, Br Med J, 1996),

- de même, l'hyperglycémie peut-elle être responsable de la macro-angiopathie en l'absence de facteur de risque cardio-vasculaire ? L'étude des populations à haut risque de diabète de type 2 mais discordantes pour les autres facteurs de risque cardio-vasculaire classique est particulièrement informative (UKPDS, Diabetes Care, 1998 ; Chaturvedi N, Diabetologia, 1994 ; Knight TM, Br Heart J, 1992). Ainsi si l'on compare le risque cardio-vasculaire chez les Afro-Caraïbéens, les Indiens Pimas et les Asiatiques migrant, on constate que les Indiens Pimas qui ont comme seul facteur de risque le diabète, ont un risque d'amputation multiplié par 4 par rapport aux Américains Caucasiens diabétiques, alors qu'ils gardent une relative protection coronarienne et vasculaire cérébrale dans la mesure où ils n'ont ni HTA, ni tabagisme et un taux de LDL cholestérol particulièrement bas (Howard BV, Diabetes Care, 1993). Les Afro-Caraïbéens partagent la protection coronarienne en raison cette fois d'un taux de triglycérides bas et d'un taux élevé d'HDL cholestérol. Par contre, dans la mesure où ils sont fréquemment hypertendus, leur risque d'accident vasculaire cérébral est accru. A l'inverse, les migrants Asiatiques qui conjuguent l'ensemble des facteurs de risque cardio-vasculaire, ont un taux d'insuffisance coronaire multiplié par 2 par rapport aux Caucasiens diabétiques,

- enfin, l'hyperglycémie non diabétique est-elle un facteur ou un marqueur du risque d'insuffisance coronaire ? Il semble qu'il existe un seuil glycémique délétère après une longue période de perturbation latente de la tolérance au glucose (Balkau B, Diabetes Care, 1998). Une étude de suivi de patients non diabétiques avec infarctus du myocarde a montré que la glycémie à l'admission était significativement corrélée à la survenue d'un événement cardio-vasculaire majeur (Norhammar AM, Diabetes Care, 1999). L'hyperglycémie non diabétique semble ainsi constituer un marqueur du risque vasculaire. A cet égard, l'hyperglycémie après charge en glucose serait un meilleur prédicteur de la morbi-mortalité cardio-vasculaire que l'hyperglycémie à jeun, sûrement parce qu'elle reflète plus directement l'insulino-résistance métabolique, alors que l'hyperglycémie à jeun traduit surtout l'insulino-déficience (Shaw JE, Diabetologia, 1999). L'hyperglycémie non diabétique traduit en réalité un état d'insulino-résistance métabolique (ou syndrome X) dont le rôle athérogène ne semble pas secondaire à l'hyperinsulinémie mais à l'association des facteurs de risque cardio-vasculaire (HTA, dyslipidémie, anomalies des facteurs de coagulation). D'ailleurs, lorsque pour des raisons génétiques particulières, l'insulino-résistance ne s'associe pas à une hypertension et à une dyslipidémie comme c'est le cas chez les Indiens Pimas, elle ne semble pas par elle-même être un facteur important d'athérosclérose. Dans la population caucasienne, le rôle athérogène de l'insulino-résistance qui précède pendant 10 à 20 ans la survenue du diabète type 2, explique bien souvent que la maladie coronarienne soit présente avant même l'apparition du diabète. Par ailleurs, la San Antonio Heart Study (Haffner SM, Diabetes, 1992) a montré que l'élévation de l'insulinémie est associée après 8 ans d'évolution à un taux d'apparition d'HTA multiplié par 2, d'hypertriglycéridémie multiplié par 3.5 et de diabète type 2 multiplié par 5.

L'hyperglycémie a donc une triple signification vis-à-vis du risque cardio-vasculaire. Elle représente un facteur causal important d'athérosclérose avec cependant une responsabilité

variable selon le territoire vasculaire. Elle apparaît surtout comme un facteur potentialisateur majeur de la morbidité cardio-vasculaire induite par les dyslipidémies et par l'hypertension artérielle (Alberti KGMM, Diabetic Med, 1998). La puissance athérogène de l'hyperglycémie dépend ainsi de son association avec d'autres facteurs de risque cardio-vasculaire. Enfin, au stade de pré-diabète, l'hyperglycémie est un simple marqueur de l'insulino-résistance.

De plus, qu'il s'agisse du diabète type 1 ou du diabète type 2, les caractéristiques épidémiologiques des complications cardio-vasculaires du diabète, en particulier coronaires, sont différentes. En effet, les facteurs de risque coronaire présents dans le diabète de type 2 font des cardiopathies ischémiques les principales complications dégénératives mortelles du diabète alors que, dans le diabète de type 1, c'est principalement l'atteinte micro-angiopathique rénale qui représente le premier facteur de risque cardio-vasculaire. La nature des deux types de diabète étant différente, la pathogénie des complications qui les caractérisent, peut être différente. Ceci conduit donc à revoir l'épidémiologie des diabètes et de leurs complications dégénératives à la lumière de la physiopathologie.

1.3.2 Physiopathologie

1.3.2.1 Introduction - Définitions

Dans la mesure où l'excès de glucose ambiant engendre des complications particulières, on s'attend à un effet-seuil caractérisant l'incidence de ces complications. C'est ainsi qu'est apparu une nouvelle définition et classification du diabète sucré et des différentes catégories d'intolérance au glucose en se basant sur la notion de risque et non d'anormalité. En effet, seuls les sujets ayant une glycémie à jeun $> 1,40$ g/l (7,8 mM) ou une glycémie > 2 g/l (11 mM) à la 2ème heure risquent de développer les complications cliniquement parlantes de la micro-angiopathie : rétinopathie, neuropathie et néphropathie. Les sujets présentant une glycémie à jeun

intermédiaire (environ 1.15 g/l ou 6.3 mM) et la valeur-seuil définissant le diabète sucré ont un risque supplémentaire et proportionnel de macro-angiopathie dont les manifestations ne sont pas spécifiques du diabète, mais y sont plus fréquentes, plus précoces, et plus graves (WHO, 1980). Il est à noter que l'importance des facteurs de risque cardio-vasculaire classiques (HTA, dyslipidémie, obésité) est proportionnelle au degré d'hyperglycémie et positivement reliée au taux d'insulinémie dans cette zone de glycémie intermédiaire (Charles MA, Lancet, 1996).

La micro-angiopathie diabétique a une expression clinique majeure dans trois organes : la rétine, les nerfs et les glomérules. Elle est caractérisée anatomiquement par trois anomalies des capillaires : un épaissement de la membrane basale, une enflure des cellules endothéliales et, au stade ultime, la présence de thrombi obstruant leur lumière. Les modifications de la composition de la membrane basale, de la fonction de la cellule endothéliale, et de la fluidité sanguine qui accompagnent et concourent à constituer ces anomalies anatomiques ont été décrites de façon abondante. Elles sont toutes proportionnelles au degré d'hyperglycémie et à sa durée, et peuvent être, au moins partiellement, corrigées par la réduction de celle-ci (Chronic complications of diabetes, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994). L'hyperglycémie agirait comme une répétition d'agressions aiguës du métabolisme cellulaire liées à l'effet toxique du glucose (hypothèse « glucose ») aboutissant à des modifications macro-moléculaires et tissulaires irréversibles (Cagliero E, Diabetes, 1991). Trois mécanismes rendent compte de la constitution de la micro-angiopathie sous l'effet de l'hyperglycémie (Williamson JR, Diabetes, 1993 ; Tooke JE, Diabetes, 1995) :

Glycosylation non enzymatique (glycation) des protéines :

Le glucose peut former une base de Schiff avec la fonction aminée des résidus lysine des protéines (Maillard LC, CR Acad Sci, 1952). Cette réaction non-enzymatique est réversible. Elle conduit par le ré-arrangement dit d'Amadori à la formation de céto-amines selon une réaction faiblement réversible. Ces produits peuvent interagir pour former des sites de réticulation des

protéines aboutissant à la formation des produits dits « avancés » (AGE) de la glycosylation, brunissement des protéines, notamment du collagène, qui pourrait expliquer l'épaississement des membranes basales, le captage par ce collagène modifié de lipoprotéines ou d'IgG (Wautier JL, Rev Prat, 1998). De nombreuses protéines sont susceptibles de subir une glycation (Brownlee M, Diabetes Care, 1992) : l'hémoglobine subit une glycation (HbA1c) qui la fait utiliser comme marqueur de l'équilibre glycémique ; l'albumine glyquée augmente les capacités d'endocytose par la cellule endothéliale et participe à l'hyperméabilité vasculaire ; au niveau des lipides, la glycation des LDL réduit leur captation par leurs récepteurs normaux ; la liaison des LDL glyquées est réduite d'où en découle une diminution de l'efflux de cholestérol ; d'autres altérations fonctionnelles des protéines peuvent en résulter comme celles des immunoglobulines.

Voie des polyols :

Ce mécanisme est responsable du stockage du glucose dans les tissus non insulino-dépendants sous forme native ou modifiée. En présence d'une hyperglycémie, un détournement du métabolisme du glucose se produit, celui-ci au lieu d'être essentiellement oxydé dans la voie de la glycolyse se trouve dans la voie des polyols (Pugliese G, Metabolism, 1990). L'excès de glucose intra-cellulaire est réduit en sorbitol sous l'effet de l'aldose réductase. Le sorbitol est ensuite réduit en fructose par la sorbitol déshydrogénase. Cette accumulation tissulaire de sorbitol peut être directement incriminée dans la pathogénie de certaines complications avec des conséquences variables selon les tissus.

Effets du glucose sur l'expression génique :

L'excès de glucose peut agir en s'opposant à la réplication cellulaire ou au contraire en augmentant l'expression génique de nombreuses protéines aboutissant à des modifications morphologiques et fonctionnelles (Cagliero E, Diabetes, 1991 ; Haneda M, Diabetologia, 1991). Il existe ainsi une "mémoire de l'hyperglycémie" définie comme la persistance de la

surexpression génique induite par le glucose après plusieurs divisions cellulaires justifiant une normalisation glycémique la plus précoce possible (Lorenzi M, Diabetes, 1991).

En plus de ces anomalies biochimiques liées à la glucotoxicité, il existe des aspects cellulaires, rhéologiques (Takeda H, Diabetologia, 1988) et d'autres facteurs pathogéniques probablement impliqués. Ainsi, des anomalies hémodynamiques seraient liées à la vasodilatation capillaire généralisée induite par l'hyperglycémie. Ces modifications précèderaient les altérations structurales de la paroi vasculaire observées au cours du diabète : augmentation du débit sanguin local ; les artérioles incapables de répondre rapidement par une vaso-constriction adaptée, il en résulterait une augmentation de la pression de perfusion locale et une vaso-dilatation relative, une augmentation de la pression intra-capillaire et de la perméabilité vasculaire qui favoriserait la diffusion de l'albumine du plasma vers certains tissus (rétine, nerfs, aorte surtout), restant normale dans le cerveau et le muscle ; angiogénèse accrue qui s'en suivrait (forme proliférante de la rétinopathie) sous le contrôle de facteurs angiogéniques endogènes comme le FGF, le TGF β , le TNF, des altérations de la synthèse et de la réactivité à l'IGF1 et à l'EGF sont aussi invoquées dans la genèse des complications vasculaires du diabète (Ingber D, Nature, 1990). Par ailleurs, on décrit une diminution de la déformabilité des globules rouges, une augmentation de la viscosité plasmatique et une hyperagrégabilité plaquettaire chez le diabétique. Il existe une augmentation de la sensibilité des plaquettes aux agents pro-agrégants, précoce, précédant l'installation des complications vasculaires. Cette activation plaquettaire entraîne une production accrue de PDGF dont le rôle dans la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses de la lésion athéromateuse est connu. Il existerait également chez le diabétique une hyperfibrinémie et une orientation des facteurs de coagulation vers une hypercoagulabilité. Enfin, hormis l'hyperglycémie, il convient de rappeler le rôle pathogène sur l'apparition des complications d'autres facteurs tels que l'HTA, les dyslipidémies associées, le tabac, la grossesse (qui peut faire apparaître ou précipiter une rétinopathie) et le régime riche en protéines (néphropathie).

Si l'hyperglycémie est une condition nécessaire au développement des complications micro-vasculaires du diabète, elle n'est pas suffisante et il reste à expliquer d'une part la susceptibilité particulière de certains tissus aux complications, d'autre part l'inégalité individuelle devant les effets néfastes de l'hyperglycémie. La susceptibilité variable d'un tissu à l'autre aux effets toxiques du glucose a sa traduction au niveau expérimental. Ainsi, la réponse de la cellule endothéliale en culture aux effets du glucose est très variable selon l'organe d'origine et les extrapolations sont donc exclues. Cette variabilité peut tenir aux modalités diverses de régulation du transport intracellulaire du glucose. D'autre part, la multiplicité des cibles du glucose offre autant de possibilités de polymorphismes qu'il reste à caractériser.

La macro-angiopathie diabétique n'a pas de particularité anatomique par rapport à l'athérome observé chez les non diabétiques. Sa gravité clinique n'est pas fonction de la durée et de l'importance de l'hyperglycémie (Pirart J, Diabetes & Metab, 1977), bien que celle-ci puisse influencer sa constitution (modifications des composants lipidiques athérogènes et des facteurs de la coagulation). Elle est plus fréquente, plus précoce et plus grave que chez les non diabétiques et n'épargne pas les femmes diabétiques non ménopausées. Elle est proportionnelle à l'importance des facteurs de risque cardio-vasculaire associés. Cet excès de risque concerne aussi bien les diabétiques type 1 que les diabétiques type 2, et affecte aussi les sujets ayant une simple intolérance au glucose. Les mécanismes conduisant aux lésions athéromateuses sont probablement univoques, la maladie diabétique ne ferait qu'accélérer ses phénomènes. Les lésions des parois artérielles atteignent la matrice fibrocollagène (faite de tissu collagène, d'élastine et de complexes protéoglycannes), les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. La plaque d'athérome (Ross R, Nature, 1993) serait la conséquence d'une altération des interactions entre la paroi artérielle et le sang : la première lésion correspond aux stries lipidiques, accumulation de cellules spumeuses dans la couche sous-endothéliale des artères ; les cellules sanguines (monocytes, lymphocytes et macrophages surtout) interagissant avec les cellules

constitutives de la paroi artérielle sont la cause de réactions inflammatoires locales ; l'étape ultérieure serait la formation de la plaque fibreuse favorisant l'adhésion des plaquettes, libérant de nombreux facteurs de croissance (PDGF en particulier) accélérant la prolifération des cellules musculaires lisses ; cette lésion augmente de volume, subit une érosion au niveau de l'endothélium favorisant ainsi la thrombose ; les modifications plasmatiques font également partie du risque de macro-angiopathie avec augmentation de l'adhésivité et de l'agrégabilité des plaquettes et diminution de l'activité thrombolytique ; l'hyperglycémie chronique entraînant la glycation de protéines provoque une augmentation de la quantité des protéines glyquées en particulier dans la paroi des artères ; les AGEs sont également considérés comme « toxiques » y compris la production en quantité importante de radicaux libres ; enfin, le rôle athérogène des lipides a été démontré avec notamment les lipoprotéines LDL ; les cellules spumeuses adhèrent à la paroi artérielle puis migrent dans le sous-endothélium où elles se chargent en cholestérol provenant des LDL. Au niveau des macrophages, un système d'épuration (« éboueur » ou « scavenger ») reconnaît les LDL ayant subi des modifications chimiques : LDL acétylées, oxydées et glyquées. Cette dernière forme présente une durée de séjour dans la circulation, prolongée, accentuant sa glycation et son oxydation, peut-être même son immunogénicité ; chez les diabétiques type 2 (Laight DW, Diabetes Metab Res Rev, 1999), l'hypertriglycémie par excès de VLDL bêta, ces particules (celles de petites tailles surtout) seraient l'objet de modifications oxydatives et épurées par le récepteur scavenger ; enfin, un facteur thrombogène, le PAI-1, existeraient en quantité excessive dans le plasma du diabétique. Une fibrinolyse anormale potentiellement athérogène et thrombogène existe chez les diabétiques, elle aussi notée chez les sujets hyperinsuliniques, hypertriglycémiques surtout chez les sujets dont le rapport des périmètres taille/hanche est élevé (morphotype androïde ou répartition centrale des graisses). On insiste aujourd'hui sur la place prépondérante de l'hyperinsulinisme et de l'insulino-résistance,

les anomalies des lipoprotéines, l'excès de radicaux libres et non sur le seul rôle direct de l'hyperglycémie dans la forte susceptibilité à l'athérosclérose de la plupart des diabétiques.

1.3.2.2 La néphropathie diabétique

1.3.2.2.1 Aspects physiopathologiques

Compte tenu du jeune âge caractérisant le début du diabète type 1, ce n'est que plusieurs années après sa survenue, en règle générale après l'âge de 30 ans, que l'on observe un excès majeur de risque cardio-vasculaire et que l'atteinte coronarienne commence réellement à prendre place parmi les différentes causes de décès (Krolewski AS, N Engl J Med, 1987). L'incidence de cardiopathies ischémiques est de 1,4% chez ces patients âgés en moyenne de 27 ans alors qu'elle est de 5% après l'âge de 30 ans. Cet excès de risque est dû en partie à la présence de la néphropathie diabétique (Dorman JS, Diabetes, 1984). Celle-ci se caractérise essentiellement par une atteinte des glomérules. Les premières anomalies observées chez le diabétique sont une augmentation de la taille des reins et une hyperfiltration glomérulaire. Les signes cliniques essentiels sont la microalbuminurie (présence de faibles quantités d'albumine dans les urines), qui a une valeur pronostique de la fonction rénale future, et la protéinurie (présence de fortes quantités de protéines dans les urines), signe d'une néphropathie manifeste. Dans le diabète de type 1, l'incidence cumulative des cardiopathies ischémiques dépend de la présence ou non d'une albuminurie ou d'une protéinurie. Six ans après la découverte d'une protéinurie, 40% des diabétiques type 1 sont atteints de pathologie coronaire alors que seuls 6% le sont parmi ceux de même âge et de même durée de diabète mais indemnes de protéinurie (Jenssen T, Diabetologia, 1988).

Dans le diabète de type 2, le constat de néphropathie diabétique associée à la maladie coronarienne est quelque peu différent. En effet, si la néphropathie est spécifique du diabète,

l'inverse n'est pas vrai : les diabétiques peuvent être atteints de néphropathies non spécifiques du diabète. Celles-ci peuvent représenter une part importante des néphropathies atteignant les diabétiques type 2 (Zmirou D, *Nephrol Dial Transplant*, 1992 ; Parving HH, *Kidney Int*, 1992). L'hypertension artérielle ne semble pas favoriser par elle même la survenue de la micro-angiopathie diabétique, les hypertendus essentiels diabétiques de type 1 n'ayant pas plus de rétinopathie ou de glomérulopathie que les diabétiques type 1 normotendus. Par contre, l'existence d'une hypertension artérielle ou même d'une pression artérielle normale haute est un facteur aggravant de la micro-angiopathie rétinienne et rénale (Janka HU, *Diabetes*, 1989). La valeur pronostique d'une protéinurie (ou d'une microalbuminurie) est différente dans le diabète type 2. Au contraire des diabétiques type 1, les anomalies fonctionnelles rénales n'indiquent pas une néphropathie débutante ou établie, mais plutôt un risque de mortalité cardio-vasculaire majeur (Marre M, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 1994). La nature de cette indication pronostique est identique à celle établie pour l'existence d'une protéinurie dans la population générale (Kannel WB, *Am Heart J*, 1984). Les facteurs associés à une microalbuminurie (ou à une protéinurie) chez les diabétiques type 2 sont les facteurs de risque cardio-vasculaire (HTA, obésité, dyslipidémie) et, de façon minoritaire, l'hyperglycémie. Cette association entre facteurs de risque cardio-vasculaire et microalbuminurie se retrouve également dans la population générale (Marre M, *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 1994). Chez cette dernière, il existe également un lien entre microalbuminurie et hyperinsulinisme. Dans l'hypertension artérielle essentielle, une microalbuminurie n'apparaît que pour des valeurs très élevées de pression artérielle ; dans ce cas, la microalbuminurie semble secondaire à l'hypertension artérielle (rein « victime » de l'hypertension). Dans le diabète type 1, une microalbuminurie correspond à des chiffres de pression artérielle normaux ; l'albuminurie précède l'hypertension (rein « coupable » de l'hypertension). Dans le diabète type 2, les deux

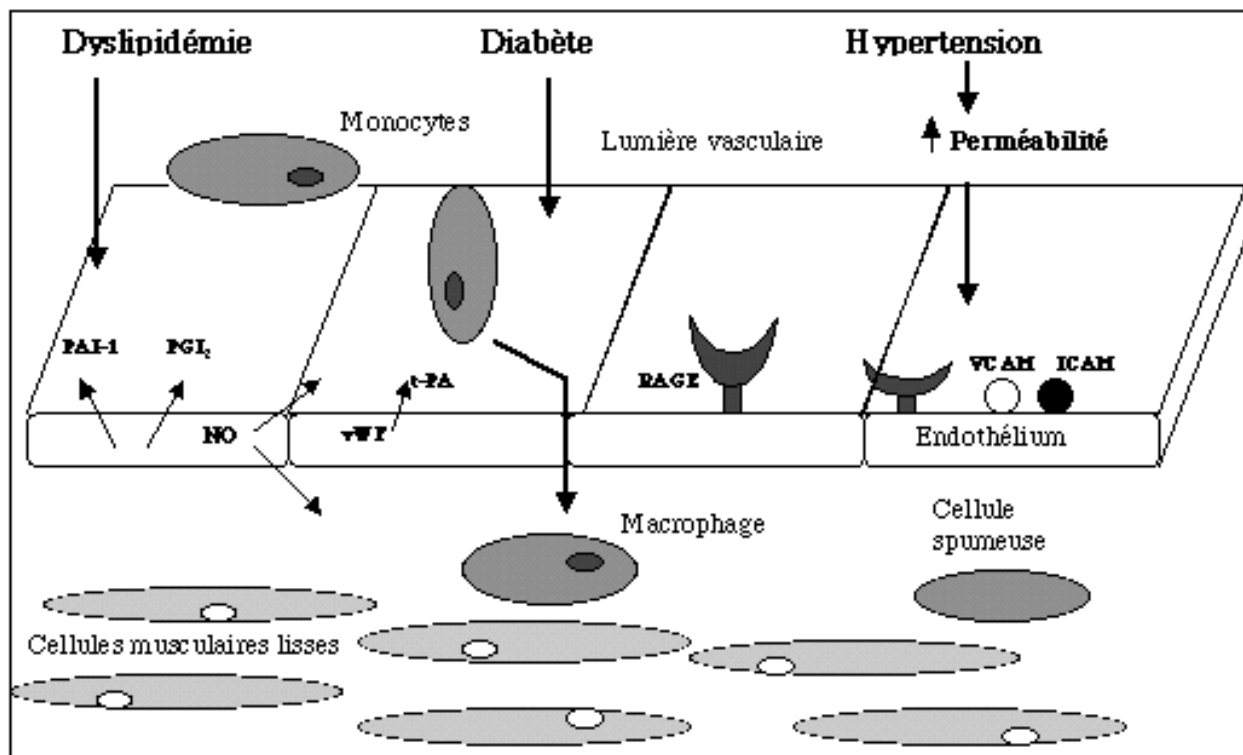
situations peuvent se rencontrer, et il est difficile de déterminer quelle est la (ou les) cause(s) de l'élévation de l'albuminurie et de la pression artérielle.

Chez les diabétiques type 1, l'albuminurie est associée à des facteurs établis de risque de coronaropathie : élévation de la pression artérielle, anomalies lipidiques (corrélation positive avec cholestérolémie, VLDL et cholestérol LDL, triglycéridémie, mais négative avec le cholestérol HDL) et dysfonction endothéliale avec troubles de la coagulation.

Les anomalies des lipoprotéines diffèrent selon le type de diabète et la qualité de l'équilibre glycémique. Dans le diabète de type 1 non traité, l'insulinopénie sévère est responsable d'anomalies lipidiques quantitatives. Cependant, l'insulinothérapie optimisée corrige toutes ces anomalies. Dans le diabète de type 1 traité et correctement équilibré, ne sont donc retrouvées que des anomalies qualitatives, contrairement au diabète de type 2 au cours duquel sont habituellement observées des anomalies quantitatives et qualitatives des lipoprotéines, (Ziegler O, 1990). Néanmoins, les anomalies qualitatives des lipoprotéines retrouvées dans le diabète type 1 traité sont susceptibles de donner au profil lipidique du patient un caractère athérogène alors que le taux plasmatique des différentes lipoprotéines apparaît normal.

L'endothélium revêt un rôle très important dans le contrôle de la fonction vasculaire et rénale. Il régule le tonus et la perméabilité vasculaires responsables en particulier d'une extravasation des monocytes qui interviennent à la phase initiale de la plaque d'athérome avec la transformation en macrophages qui se chargent en lipides (cellules spumeuses). Puis les cellules musculaires lisses prolifèrent, traversant la limitante élastique interne, migrent vers les centres lipidiques pour former la chape fibreuse. Enfin, les cellules mésangiales rénales prolifèrent et sont à l'origine des complications rénales (Bauters C, Arch Mal Cœur, 1998; Emmerich J, Arch Mal Cœur, 1998). Pour assurer ses fonctions, l'endothélium produit de nombreux facteurs (Schwartz CJ, Am J Cardiol, 1993 ; Ross R, Nature, 1993) tels que le NO, la prostacycline (PGI₂), l'endothéline, ACE, l'angiotensine II, le t-PA et PAI-1, le vWF, des molécules

d'adhésion et des cytokines (Figure 5). Chez le diabétique type 1, il est bien établi que la micro-angiopathie rénale débute précocément (Deckert T, Br Med J, 1996 ; Stehouver CDA, Eur J Clin Invest, 1996). Des anomalies primaires de ces facteurs pourraient être à l'origine de phénomènes thrombotiques. L'ensemble de ces facteurs constituent des gènes candidats potentiels pour le développement de la néphropathie diabétique. L'un d'entre eux, le gène vWF, fera l'objet d'une étude que nous présenterons dans le chapitre suivant.



□

Figure 5: La fonction endothéliale : physiopathologie

1.3.2.2.2 Génétique de la néphropathie diabétique dans le diabète type 1

Si l'hyperglycémie est une condition nécessaire, elle n'est pas suffisante au développement de la micro-angiopathie diabétique. Ceci est particulièrement vrai pour le risque de complication rénale, puisqu'à peine la moitié d'entre les diabétiques type 1 semblent à risque

de complication rénale, alors que tous peuvent développer des complications rétinienne. Il peut y avoir une base génétique à la modulation de ce risque. Cependant, si de nombreux marqueurs de risque génétique de cette néphropathie se profilent, les rôles de facteurs environnementaux restent déterminants sur ces éventuels terrains prédisposants. Ainsi, dans la mesure où toutes les complications du diabète type 1 sont secondaires à l'hyperglycémie de longue durée, la recherche d'une base génétique à la néphropathie diabétique s'intègre dans le cadre d'une recherche d'interaction gène/environnement. De plus, le développement des complications du diabète type 1 étant multifactoriel, des interactions gène/gène peuvent être supposées. Le concept d'une base génétique à la néphropathie diabétique est également conforté par la grande agrégation familiale de cette complication : ainsi, une néphropathie est retrouvée chez 83% des germains diabétiques de sujets diabétiques, contre seulement 17% quand le sujet index n'a pas de complication rénale (Seaquist ER, N Engl J Med, 1989). Ces patients souffrant de néphropathie diabétique ont un très fort risque de décès prématuré lié à une maladie cardio-vasculaire. L'interrogatoire familial retrouve une mortalité cardio-vasculaire multipliée par 3 et une hypertension artérielle deux fois plus fréquente, chez les parents de ces patients, suggérant l'importance de facteurs héréditaires dans la survenue des complications vasculaires du diabète. L'agrégation familiale des facteurs de risque cardio-vasculaire et rénal, suggère des mécanismes communs pouvant agir à la fois sur le risque de micro- et de macro-angiopathie. A cet égard, a été proposé un modèle d'étude de gènes candidats (Figure 6).

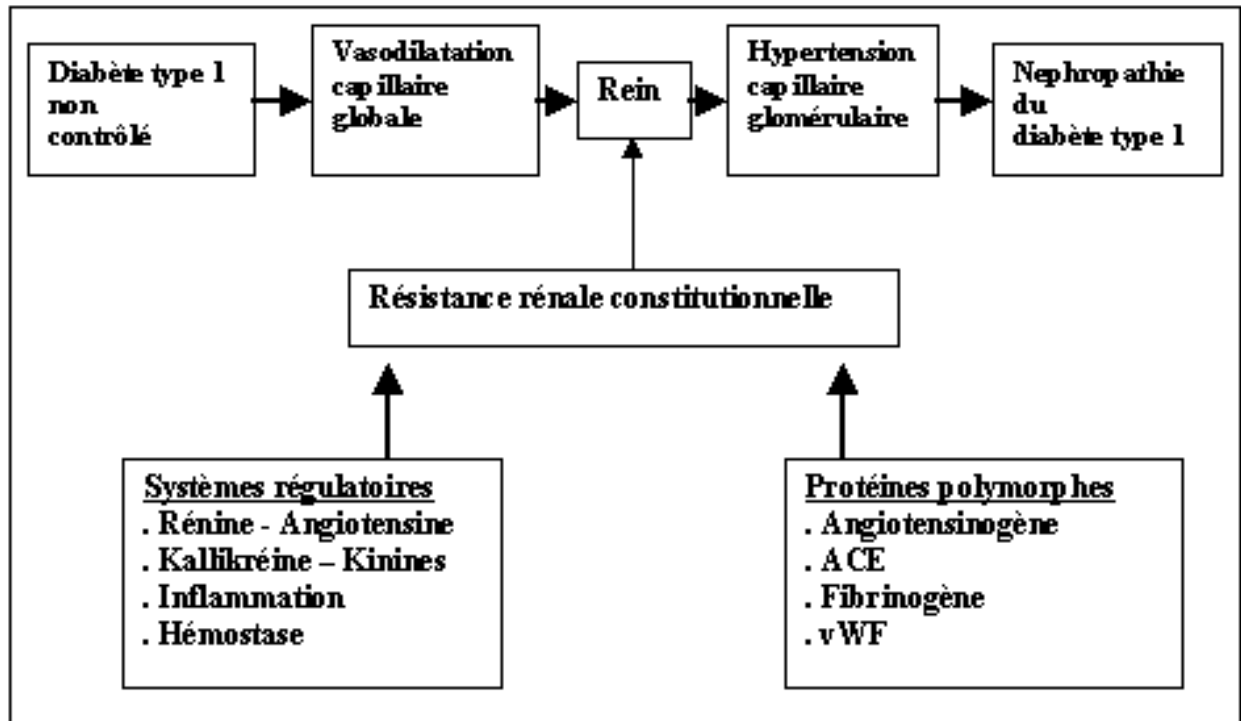


Figure 6: Hypothèse d'étude de la susceptibilité génétique à la néphropathie diabétique dans le diabète type 1

Le système rénine-angiotensine joue un rôle central dans la régulation de la pression artérielle et l'équilibre hydro-sodé. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est exprimée dans les cellules endothéliales de nombreux organes comme le poumon, le cœur et les artères. Un taux élevé d'ACE est considéré comme un marqueur d'une dysfonction endothéliale et a été associé à la néphropathie diabétique (Marre M, J Clin Invest, 1997). Le taux plasmatique d'ACE est génétiquement déterminé. Ainsi, un polymorphisme du gène ACE, situé sur le chromosome 17q, caractérisé par l'insertion d'une séquence de 287 nucléotides dans l'intron 16 expliquerait plus du tiers de la variance de la concentration d'ACE (Tiret L, Am J Hum Genet, 1992). De plus, l'effet de ce polymorphisme est co-dominant : les sujets DD ont un taux plus élevé que les sujets ID, les sujets II ayant les valeurs les plus basses. L'allèle D a été associé à un risque indépendant de survenue d'infarctus du myocarde dans la population générale (Cambien F, Nature, 1992), et également chez des patients diabétiques type 1 et 2 compliqués ou non de

néphropathie diabétique (Tarnow L, Diabetologia, 1995 ; Fujisawa T, Diabetes Care, 1995). De plus, l'étude de familles diabétiques type 2 compliquées de néphropathie diabétique ont mis en évidence des liaisons génétiques au niveau de 2 régions sur les chromosomes 7 et 20 qui pourraient déterminer la susceptibilité au développement de la néphropathie diabétique chez les Indiens Pimas (Imperatore G, Diabetes, 1998). Ces régions contiennent de potentiels gènes candidats tels que la NO synthase ou l'aldose réductase. Dans le diabète type 1, un locus de susceptibilité a été trouvé sur le chromosome 3q. Les gènes candidats dans cette région impliquent le récepteur ATIR (angiotensin II sub-type 1 receptor). Cependant, le rôle de ce gène n'a pas été mis en évidence avec l'étude de polymorphismes connus (Moczulski DK, Diabetes, 1998).

1.3.2.3 Diabète de type 2 et/ou le syndrome d'insulino-résistance et complications cardio-vasculaires

1.3.2.3.1 Aspects physiopathologiques et génétiques

Le diabète type 2 est en règle générale précédé par différentes anomalies (anomalies lipidiques, tensionnelles et de la fibrinolyse) qui sont en relation avec une résistance cellulaire à l'action de l'insuline, elle même compensée par une hyperinsulinémie jusqu'à un certain niveau qui empêche l'élévation glycémique. Au delà de ce niveau, l'hyperglycémie, puis le diabète, se développent (Reaven GM, Diabetologia, 1995 ; Saad MF, Am J Med, 1991). A côté des marqueurs prédéterminés que sont l'hérédité, le poids de naissance et l'âge, il existe des facteurs de risque liés à l'environnement et au comportement (Haffner SM, JAMA, 1990 ; Reaven GM, Diabetologia, 1995), facteurs bien mis en évidence par les études de migrants. Si l'obésité, mais aussi son ancienneté, est reconnue depuis longtemps comme facteur de risque important de diabète type 2, la distribution des graisses, en particulier au niveau du tronc, est aussi fortement

associée à son développement. Ce type d'obésité s'accompagne d'un risque accru de morbidité et de mortalité sans toutefois constituer une entité homogène puisque si statistiquement l'élévation de l'indice de masse corporelle accroît ce risque, de nombreux patients obèses échappent à ces complications (comme les Indiens Pimas qui souffrent d'une forte prévalence de diabète type 2 associé à l'obésité). Il en est de même pour les dyslipoprotéïnémies, l'hypercholestérolémie, l'hypertriglycémie et l'hypertension artérielle (DeFronzo RA, Neth J Med, 1997 ; Haffner SM, J Hypertens, 1997). L'afflux d'acides gras libres a de nombreuses conséquences métaboliques qui s'articulent autour du phénomène d'insulino-résistance, concept popularisé par Reaven (Diabetologia, 1995) sous le terme de syndrome X plurimétabolique. Ce dernier est constitué par une hyperinsulinémie, des anomalies de la tolérance au glucose (intolérance au glucose ou diabète avéré), une augmentation des triglycérides VLDL, une baisse du cholestérol HDL, une élévation tensionnelle et des anomalies des facteurs de coagulation. A ces éléments, il faut aussi probablement ajouter la microalbuminurie. L'élévation modérée de la glycémie et celle de l'insulinémie, en particulier à jeun, est également prédictive de diabète type 2 traduisant un état d'insulino-résistance. L'hyperinsulinémie à jeun s'intègre dans le cadre du syndrome X et de l'obésité à prédominance abdominale. L'insulinémie post-charge représente la capacité de réponse de la cellule β pancréatique à la stimulation glucosée. Quand cette capacité maximale est atteinte, puis quand la sécrétion insuliniq ue tend à s'épuiser, une anomalie de la glycorégulation apparaît puis un diabète de type 2 (Saad MF, Am J Med, 1991). A côté de ces éléments cliniques et biologiques, les attitudes comportementales, telles que l'activité physique et l'alimentation constituent des facteurs de risque du diabète de type 2 particulièrement importants (Bennett PH, 1992). De plus, le diabète type 2 est souvent considéré comme un modèle d'athérosclérose prématurée. En effet, le diabète type 2 associé aux éléments du syndrome X d'insulino-résistance expose les patients à un risque de 300% par rapport à la population générale d'avoir un infarctus du myocarde (DeFronzo RA, Diabetes Care, 1991). Si les diabétiques ont les mêmes facteurs de

risque de mortalité précoce que les sujets normoglycémiques, l'hyperinsulinisme et l'obésité prédisposent particulièrement à un décès prématuré chez les hommes diabétiques type 2 (Balkau B, BMJ, 1993).

L'insuline exerce une action vasodilatatrice propre. Les sujets intolérants au glucose ou atteints de diabète type 2 récent présentent souvent un hyperinsulinisme lié à l'insulino-résistance. Chez ses patients, l'action vaso-dilatatrice de l'insuline est altérée précocément, mais également lorsque le diabète est installé depuis plusieurs années (Stehouwer CDA, Cardiovasc Res, 1997). Par ailleurs, l'insuline peut provoquer une stimulation du système sympathique responsable d'une augmentation de flux sanguin, du rythme cardiaque et de la pression pulsée et peut donc contribuer à l'élévation de la pression artérielle. Celle-ci peut alors favoriser la formation de la plaque d'athérome, en particulier par augmentation de la perméabilité pariétale. Enfin, la vasodilatation périphérique induite par l'insuline favorise l'extraction du glucose par le muscle squelettique. Chez l'obèse et le diabétique type 2, le défaut de vasodilatation peut contribuer au défaut de l'activité métabolique de l'insuline (Laakso M, Diabetes, 1992). L'insulino-résistance vasculaire pourrait donc participer à l'insulino-résistance métabolique. Ainsi, un mécanisme physiopathologique (Figure 7) a été proposé au niveau de la voie de signalisation intra-cellulaire de l'insuline dans les tissus vasculaires (King GL, Elsevier, 1999).

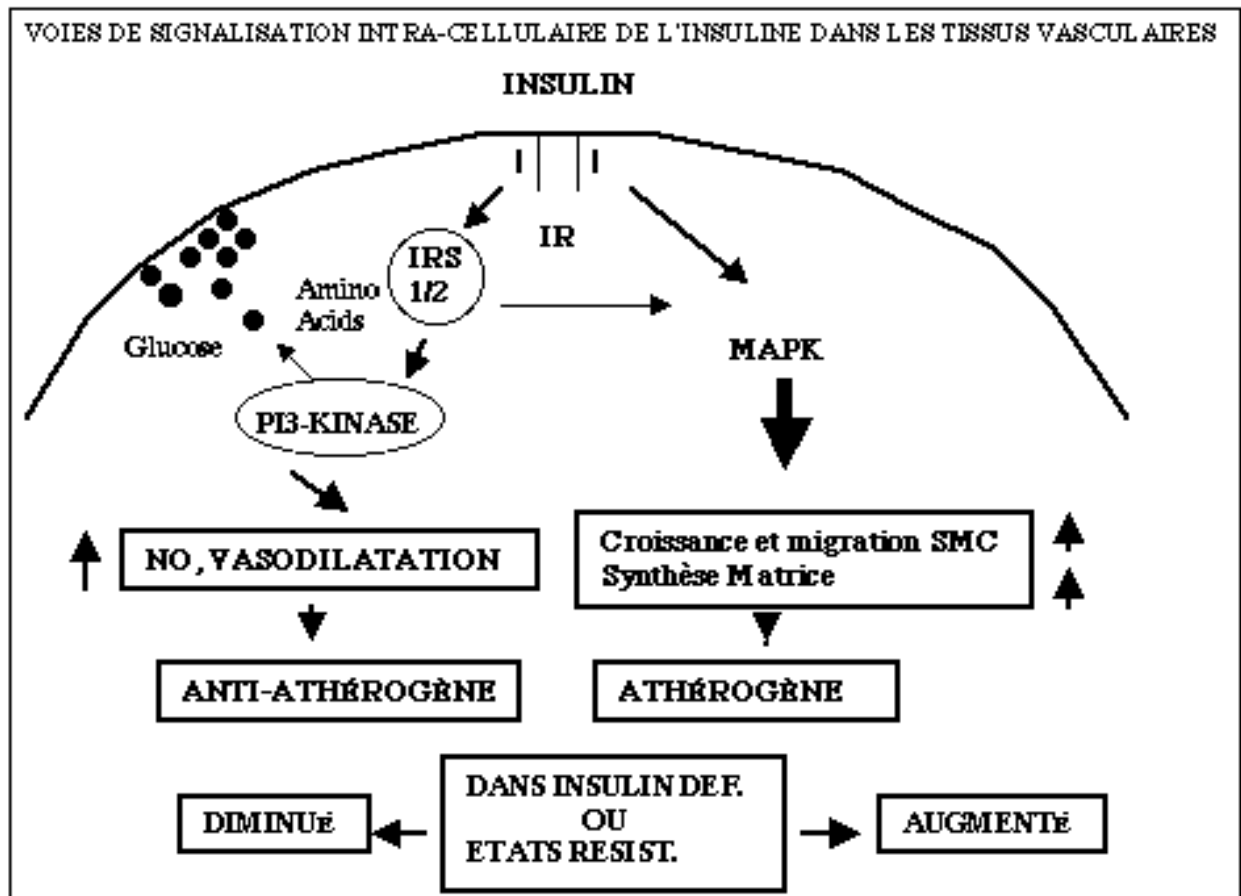


Figure 7: Mécanisme physiopathologique au niveau de la voie de signalisation intra-cellulaire de l'insuline dans les tissus vasculaires

Dans ces tissus, l'insuline présente deux types d'activité : anti-athérogène et athérogène. L'activité anti-athérogène est la capacité d'augmenter la production de NO (à travers l'activation précoce de la NOS ou de l'augmentation de l'expression de la NOS endothéliale), responsable de la vasodilatation et du retard de migration et de croissance des cellules artérielles musculaires lisses. La perte de cet effet dans les états d'insulino-résistance pourrait contribuer au développement de l'athérosclérose. Cependant, si l'hyperinsulinémie existe, celle-ci pourrait être impliquée dans le processus athérogénique en stimulant la croissance et la production de la matrice extracellulaire, qui nécessite généralement des concentrations élevées d'insuline. Un autre mécanisme par lequel l'insuline perd ses effets métaboliques, mais non ses effets de

croissance repose sur l'insulino-résistance sélective dans la voie de transduction du signal insuline, en raison d'un nombre important de récepteurs à l'insuline de forte affinité. Ces récepteurs peuvent activer deux voies de transduction différentes : la PI3-Kinase et la MAP kinase. L'activation de la voie de la PI3-Kinase par l'insuline nécessite la phosphorylation des récepteurs IRS1 et IRS2, ce qui n'est pas le cas dans la voie de la MAP kinase. Ainsi, dans l'insulino-résistance, l'activité de l'insuline sur la voie de la PI3-Kinase est perdue, impliquant par conséquent un risque augmenté d'athérosclérose. A cet égard, les souris KO pour IRS1 développent une hypertension et une hypertriglycémie, dévoilant pour IRS1 un nouveau rôle probable dans le développement des maladies cardio-vasculaires (Abe H, J. Clin. Invest, 1998).

L'HTA contribue à la majoration de l'adhésion cellulaire endothéliale. Ainsi, la E-sélectine plasmatique a été trouvée circulante à des taux élevés chez les hypertendus. Il semble donc que les forces de tiraillement soient responsables de la stimulation cellulaire endothéliale. Par ailleurs, le lien entre HTA et insulino-résistance a été mis en évidence par les travaux du groupe Ferranini (Ferranini E, N Engl J Med, 1987). En effet, lorsque l'on compare des sujets témoins et des sujets atteints d'une HTA, appariés pour l'âge et le poids, les sujets hypertendus présentent une résistance à l'action de l'insuline lors de clamps euglycémiques hyperinsulinémiques par rapport aux sujets témoins. La nature de ce lien reste à préciser. Certains arguments sont en faveur d'un lien physiologique entre hyperinsulinémie et HTA, faisant intervenir l'activité de la pompe à sodium proton, la natriurèse et le tonus sympathique (Rawe JW, Diabetes, 1981 ; DeFronzo RA, Diabetologia, 1981). Mais d'autres arguments sont en faveur d'un lien purement génétique. En effet, dans quelques ethnies (comme les Mexicains Américains), les sujets avec antécédents familiaux de diabète type 2 ont des insulinémies plus élevées et une fréquence d'HTA plus importante que ceux sans antécédents familiaux de diabète type 2 (Ferranini E, Diabetes Metab, 1989).

L'activité et le taux de PAI-1 et le taux de t-PA, ont été associés à une plus forte incidence d'accidents coronaires dans la population générale (Juhan Vague I, *Circulation*, 1996). On retrouve ces 3 facteurs témoins d'une hypofibrinolyse dans le diabète type 2 où ils sont fortement liés au syndrome métabolique d'insulino-résistance et plus spécifiquement aux facteurs de risque de cardiopathies ischémiques. Une étude (Charles MA, *Diabetes Care*, 1998) a démontré en effet des corrélations entre d'une part une hypofibrinolyse (activité et taux de PAI-1, taux de t-PA), et d'autre part, la glycémie et l'insulinémie à jeun, les triglycérides, le cholestérol HDL, la pression artérielle systolique et la répartition androïde des graisses (Rapport Taille/Hanches). La concentration d'antigène t-PA, de plus, n'est pas seulement liée à l'insulino-résistance comme les concentrations de PAI-1 mais aussi à l'inflammation et aux lésions des cellules endothéliales, son augmentation pouvant jouer un rôle dans le développement de maladies cardio-vasculaires avant l'apparition du diabète de type 2, et donc à un stade précoce d'insulino-résistance. Plusieurs variants génétiques de facteurs de la fibrinolyse ont été associés à la maladie coronarienne chez les diabétiques type 2 : un allèle du polymorphisme G455A du β fibrinogène et le variant 4G du polymorphisme 4G/5G du promoteur du PAI-1 (Carten AM, *Diabetes Care*, 1996 ; Mansfield MW, *Thromb & Haem*, 1995).

Outre les anomalies qualitatives présentes dans le diabète type 2, des anomalies quantitatives sont également retrouvées. En effet, l'hyperinsulinémie chronique qui accompagne l'insulino-résistance est à l'origine d'une dyslipidémie couramment retrouvée, avec une élévation des VLDL, lipoparticules véhiculant principalement les triglycérides dans le sang, et une diminution du taux de HDL, qui assurent principalement le transport inverse du cholestérol de la périphérie, en particulier des parois artérielles, vers le foie où il est catabolisé. L'augmentation de la production hépatique de triglycérides VLDL apparaît liée essentiellement à l'augmentation des substrats, acides gras et glucose, à la perte de l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production hépatique liée à l'insulino-résistance (Howard BV, *J Lipid Res*, 1987). Dans le syndrome

d'insulino-résistance avec hyperinsulinémie, il existe une diminution de l'activité de la lipoprotéine lipase et donc une diminution d'une des sources de production des HDL (Verges B, *Diabetologia*, 1989). Des facteurs génétiques sont aussi susceptibles d'intervenir dans le développement des troubles du métabolisme des lipides, notamment au niveau de leur oxydation. L'activité PON limite l'accumulation de lipides peroxydés en détruisant les lipides biologiquement actifs des LDL oxydés (Mackness MI, *FEBS*, 1991 ; Watson AD, *J Clin Invest*, 1995). Le rôle anti-athéromateux de la paraoxonase a été aussi montré par l'étude d'un modèle de souris exprimant très peu PON, et qui développe des lésions vasculaires (Shih DM, *J Clin Invest*, 1996). Il existe au moins 3 gènes de la paraoxonase, tous situés sur le chromosome 7q. L'allèle Arg du polymorphisme Gln191Arg du gène PON1 a été associé à un risque accru de maladie coronarienne dans la population diabétique française et japonaise (Ruiz J, *Lancet*, 1995 ; Odawara M, *J Clin Endocrinol Metab*, 1997). Par contre, des résultats contradictoires ont été publiés dans la population générale non diabétique (Sanghera DK, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997), confirmant l'interaction de l'hyperglycémie, source de stress oxydatif, et de ce polymorphisme génétique dans le développement de l'athérosclérose du sujet diabétique. D'autres facteurs génétiques ont été impliqués dans la survenue des complications cardiovasculaires chez les diabétiques type 2 : le polymorphisme XbaI de l'Apo B (Ukkola O, *Clinical Genetic*, 1993) et l'allèle E4 de l'Apo E.

L'anomalie majeure observée dans l'insulino-résistance est un dysfonctionnement du métabolisme des acides gras qui entraîne l'augmentation des concentrations d'acides gras libres et freine la réponse insulinique. De nombreuses études soulignent le rôle des acides gras libres dans le déterminisme du diabète sans toutefois expliquer les mécanismes réellement impliqués (Kahn BB, *Nat Genet*, 1998). Les récepteurs PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptors) α , $\gamma 1$, $\gamma 2$ et β/δ font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires (Isemann I, *Nature*, 1990). Ils sont fortement suspectés dans le mécanisme de la prise de poids, de l'insulino-

résistance et l'athérosclérose. En effet, ces facteurs de transcription régulent trois grandes fonctions contrôlées par l'insuline : l'expression des gènes des enzymes clefs de l'homéostasie lipidique, l'adipogénèse, et probablement aussi le transport du glucose (Djouadi F, J Clin Invest, 1998). PPAR γ 1 et γ 2 sont des isoformes résultant d'un épissage alternatif et différant de 28 acides aminés. Le variant génétique Pro12Ala de PPAR γ 2 (qui a une affinité pour son ligand et une activité transcriptionnelle supérieures à celles de PPAR γ 1) retrouvé dans une population Finlandaise, pourrait contribuer à la variabilité du BMI et de l'insulino-résistance dans la population générale (Deeb SS, Nat Genet, 1998). Les récepteurs PPARs représentent donc des gènes candidats potentiels au développement de l'insulino-résistance et de ces complications métaboliques et coronariennes associées. L'étude de l'un d'entre eux, le gène PPAR α , fera l'objet d'une étude génétique dans le chapitre suivant.

1.3.2.3.2 Maladie multifactorielle

Le caractère multifactoriel du diabète type 2 et/ou de l'insulino-résistance résulte de l'interaction de plusieurs gènes de prédisposition avec des facteurs d'environnement. En d'autres termes, cela signifie que si la plupart des sujets affectés sont porteurs d'allèles spécifiques de susceptibilité, aucun de ces gènes n'est à lui seul ni nécessaire ni suffisant pour conduire à la maladie. Les facteurs d'environnement, qu'ils soient nutritionnels (suralimentation, obésité) ou comportementaux (sédentarité), vont moduler l'expression clinique de la maladie chez les individus génétiquement prédisposés, soit en favorisant l'apparition du trouble de la tolérance au glucose soit en aggravant son évolution. La théorie dite du génotype d'épargne ("thrifty genotype") (Neel JV, 1965) postule que l'homme "sain" est génétiquement programmé (et sélectionné génétiquement depuis des millénaires) pour fournir des efforts dans sa quête de nourriture et épargner au maximum l'énergie en prévision des temps de disette. Toute dissociation entre ce patrimoine génétique et l'environnement pourrait conduire à l'apparition de

maladies métaboliques. La progression quasi épidémique du diabète dans les populations dont le mode de vie s'est récemment occidentalisé comme les Indiens Pimas est un argument en faveur de cette hypothèse (Knowler WC, Diabetes Metab Rev, 1990). Dans les modèles animaux de diabète type 2, le cas des rats des sables illustre également cette hypothèse: ce rat, lorsqu'il vit dans son environnement habituel (le désert du Sahara) est normoglycémique car son alimentation y est peu calorique. Dans les conditions de vie des rongeurs de laboratoire, il devient diabétique et obèse (Marquié G, Diabetes, 1984). La survenue des complications cardio-vasculaires du diabète type 2 semble, elle aussi, contrôlée à la fois par des facteurs génétiques et environnementaux. En effet, tous les sujets diabétiques ne développent pas de complications vasculaires, et seule une fraction d'entre eux en souffriront très tôt, sans que l'on puisse toujours corréler ces complications précoces à un équilibre glycémique désastreux. Ce risque vasculaire accru pourrait, dans une certaine mesure, être lié à des facteurs génétiques.

Il est donc en général indispensable que l'individu porteur d'un génotype à « risque » soit exposé à un ou plusieurs facteurs de risque environnementaux qui vont permettre l'expression phénotypique d'un trouble métabolique. En effet, les gènes de prédisposition aux traits complexes interviennent surtout dans les processus homéostatiques. Leur rôle est de maintenir les grands équilibres (pression artérielle, glycémie, poids...) malgré les variations souvent brutales d'un environnement qui peut franchement devenir délétère. Les polymorphismes génétiques portant sur ces gènes homéostatiques vont modifier la capacité de l'organisme de réagir aux agressions du milieu. La maladie multifactorielle doit être comprise comme la conséquence ultime d'une insuffisance réactionnelle de l'organisme aux facteurs de risque environnementaux. Pour résumer la situation actuelle en termes de facteurs de survenue du diabète type 2, on peut considérer qu'il existe d'un côté les facteurs indépendants de l'individu, de l'autre ceux qui en sont dépendants, et enfin, les intermédiaires qui vont conduire à la maladie par interaction des premiers et des seconds (Figure 8). Ces facteurs intermédiaires constituent le

syndrome X plurimétabolique dont les conséquences vasculaires, en particulier coronaires, peuvent se manifester indépendamment du diabète et souvent même avec lui.

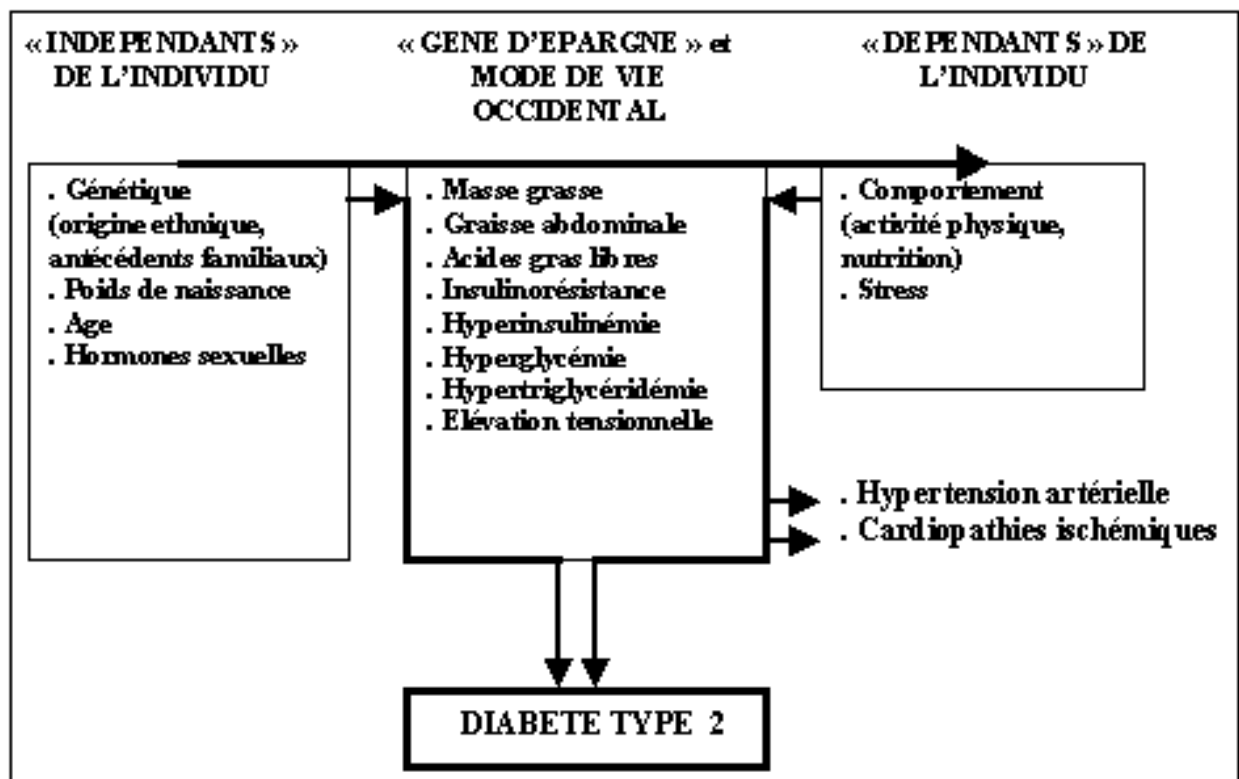


Figure 8: Facteurs de prédiction et pathogénèse du diabète type 2 (d'après Eschwege E, Dis Manage Health Outcomes, 1998)

1.3.3 Insulino-résistance, diabète et athérosclérose à l'Ile Maurice

La prévalence de l'intolérance au glucose et de diabète type 2 a considérablement augmenté dans la population de l'Ile Maurice (King H, Diabetes Care, 1993 ; Dowse GK, Diabetes, 1990). Depuis la seconde guerre mondiale, les Mauriciens ont de plus en plus développé un mode de vie associé à l'industrialisation. Par ailleurs, a été observé un changement net du profil de mortalité passant de la responsabilité prédominante de maladies infectieuses à celle plus importante actuellement de maladies chroniques non infectieuses comme

l'athérosclérose (Brissonnette LGG, World Health Stat Q, 1985). Les facteurs de risque associés à cette pathologie sont les anomalies du métabolisme du glucose (diabète type 2 ou intolérance au glucose), l'hyperinsulinisme, l'hypertriglycéridémie, l'obésité à prédominance abdominale, des taux bas d'HDL cholestérol et la présence d'une hypertension artérielle. L'ensemble de ces facteurs constitutifs du syndrome X métabolique sont présents de manière caricaturale dans la population mauricienne, qui semble être caractérisée par une fréquente diminution significative de la sensibilité à l'insuline (Zimmet PZ, Diabetic Med, 1994). Il est à noter la survenue très précoce (parfois avant 40 ans, même chez la femme) de maladie coronarienne, chez des sujets qui ne sont pas tous manifestement diabétiques, mais qui ont un syndrome X patent. L'agrégation familiale de CHD à l'île Maurice est en faveur de l'existence d'une composante génétique forte, relative au développement de l'athérosclérose précoce. Nous postulons donc l'existence dans la population Mauricienne d'un déterminisme génétique commun au diabète type 2 (plus de 10% de la population adulte est diabétique), au syndrome d'insulino-résistance et à la maladie coronarienne précoce. L'analyse génétique de familles mauriciennes fera l'objet d'une étude par exploration systématique du génome dans le second chapitre.

1.4 Les stratégies d'étude génétique

1.4.1 Définition de la génétique inverse ou clonage positionnel

Une faible fraction des gènes humains est connue : à peine plus de 5000 sur les 35 000 supposés exister (Aparicio SAJR, Nature Genetics, 2000). Plus de 30.000 ESTs (Expressed Sequenced Tag) ont été isolés et placés sur une carte physique, ce qui devrait rendre leur identification plus facile. L'isolement d'un gène peut passer par l'identification préalable et la caractérisation de son produit (protéine). Il s'agit de la démarche de la "génétique classique". L'abord génétique des maladies humaines repose souvent sur une démarche de clonage

positionnel, appelée aussi « génétique inverse », qui consiste, au contraire, à localiser puis à identifier les bases génétiques et moléculaires d'une maladie sans connaissance préalable de la voie biologique altérée (Orkin SH, Cell, 1986). A cette fin sont utilisées des études génétiques de familles et/ou de populations. Le clonage positionnel se réalise par deux types d'approches :

- l'approche « gène candidat » qui permet de mettre en cause ou au contraire d'exclure, certains gènes connus codant des protéines suspectées d'être responsables de la maladie.
- l'approche « génome entier » ou par exploration systématique du génome qui permet d'isoler un gène “inconnu” d'où l'on déduit la protéine correspondante.

1.4.2 Les outils de localisation génétique

La première étape vers la longue caractérisation des mutations délétères d'un gène responsable d'une maladie est donc la localisation génétique, c'est à dire la mise en évidence d'une liaison génétique entre un locus donné (défini par un marqueur génétique polymorphe) et la maladie, à l'aide de méthodes statistiques adaptées.

1.4.2.1 Polymorphismes génétiques et transmission mendélienne

Les résultats d'une étude génétique dépendent pour une large part du nombre et de la qualité des polymorphismes d'un locus ou d'une région génomique, c'est à dire leur degré de polymorphisme, qui se traduit par leur pourcentage d'hétérozygotie dans une population donnée. Chaque polymorphisme présente une certaine variabilité allélique, qui détermine son hétérozygotie (et informativité). L'hétérozygotie se définit par le pourcentage de sujets porteurs de deux allèles différents à un locus, dans une population donnée, et peut aller jusqu'à virtuellement 100% (Weber JL, Am J Hum Genet, 1989).

Il existe deux types de polymorphismes :

Les polymorphismes de séquence :

Ceux-ci sont dus le plus souvent à la substitution d'un nucléotide (Single Nucleotide Polymorphism, SNP), mais aussi à l'insertion/délétion d'une séquence nucléotidique. Ils sont localisés sur l'ensemble du génome, aussi bien dans les séquences introniques et inter-géniques que dans les séquences exoniques. On peut distinguer deux types de polymorphismes de séquence selon qu'ils intéressent ou non un site de restriction.

- Les polymorphismes de restriction ou RFLP : les RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) sont dus à l'apparition ou à la disparition de sites de restriction pour une endonucléase donnée. Classiquement, les RFLPs sont mis en évidence par la technique de Southern-Blot (Southern EM, J Mol Biol, 1975) après digestion du génome par des enzymes de restriction (endonucléases extraites à partir de bactéries, coupant l'ADN double-brin au niveau de séquences définies et spécifiques). Lorsque les séquences flanquant la mutation sont connues, il est possible d'amplifier l'ADN génomique *in vitro* par le procédé d'extension d'amorce "Polymerase Chain Reaction" ou PCR (Saiki RK, Science, 1988), avant la digestion enzymatique et l'électrophorèse des fragments sur gel d'agarose. Les RFLP sont des marqueurs bi-alléliques dont l'hétérozygotie maximale est de 50 % et donc assez peu informatifs. Ils ont été les premiers à être développés et utilisés dans l'étude des maladies génétiques avant la découverte des marqueurs microsatellites.

- Les SNPs non RFLP : les polymorphismes consistant en des variations ponctuelles non localisées dans des sites de restriction sont plus difficiles à mettre en évidence et recherchés principalement dans les régions codantes du génome. Cependant à l'heure actuelle, sont développées des techniques fondées principalement sur le principe d'hybridation qui permettent leur mise en évidence et leur génotypage tels que la chromatographie en phase liquide (HPLC), les puces à ADN, le mini-séquençage...

L'utilité des polymorphismes de séquence réside dans le fait qu'ils sont très abondants, souvent intragéniques ou à proximité de gènes d'intérêt, et par conséquent peuvent être utilisés dans des études d'association (études cas/témoins) comme dans des études intrafamiliales de transmission génétique de type TDT (Transmission Disequilibrium Test).

Les polymorphismes de répétition :

Ils regroupent les minisatellites hypervariables et les microsatellites.

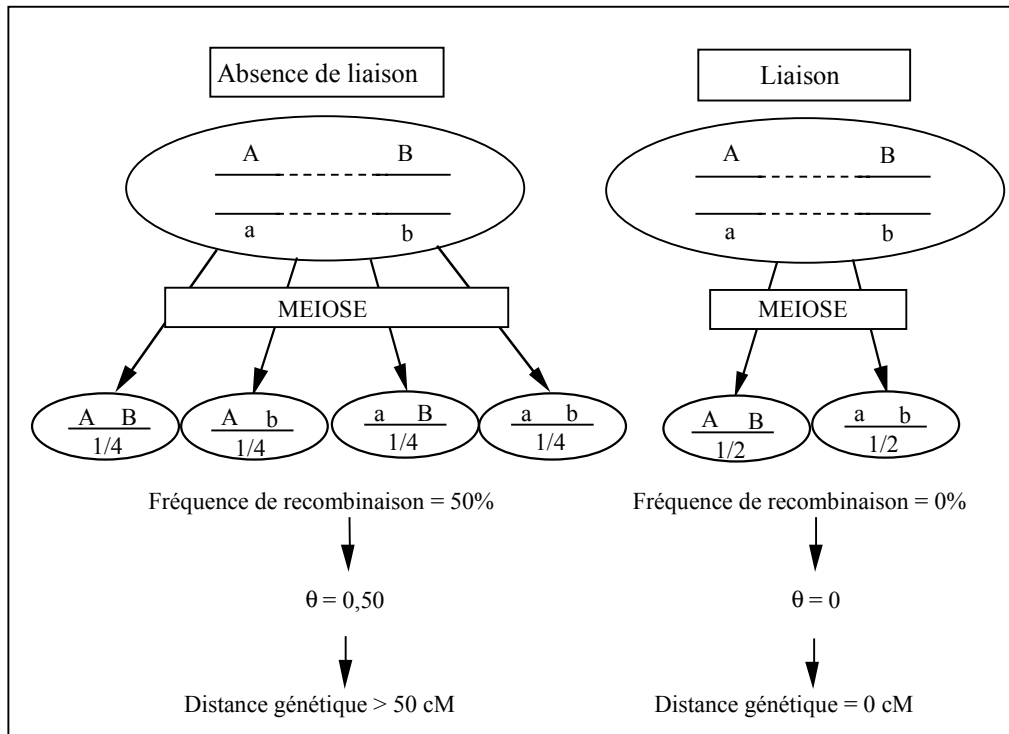
- Les minisatellites hypervariables : les minisatellites hypervariables (Jeffreys A, Nature, 1985) sont dus à la répétition variable (3 à 30 fois), en tandem, de séquences de 10 à 30 nucléotides (Variable Number of Tandem Repeat ou VNTR). Ils sont localisés de préférence dans les régions télomériques des chromosomes et sont mis en évidence soit par la technique de Southern-Blot, soit par la technique de PCR lorsque les séquences flanquantes sont connues. Les VNTR sont multi-alléliques et leur hétérozygotie est proche de 1.

- Les microsatellites : les microsatellites (Weber, Am J Hum Genet, 1989) sont des répétitions de 2 à 10 nucléotides, 10 à 60 fois. Il s'agit de répétitions de Cytosine-Adénosine ("poly CA") dans 90% des cas. Ils sont répartis de façon uniforme sur le génome, tous les 30 à 60 kb, et sont situés dans les régions introniques ou intergéniques du génome. Ils sont mis en évidence par la technique de PCR et sont également très polymorphes (hétérozygotie en majorité supérieure à 75-80%). Ce sont désormais les plus utilisés compte tenu de leur haute informativité.

Les cartes génétiques des polymorphismes anonymes, majoritairement des microsatellites de type (CA)_n, deviennent de plus en plus denses (Dib C, Nature, 1996 ; Weissenbach J, Clin Chem Lab Med, 1998).

Aujourd'hui, les polymorphismes les plus utilisés sont les microsatellites et les polymorphismes de restriction (RFLP ou Restriction Fragment Length Polymorphism).

Les marqueurs génétiques utilisés sont des polymorphismes génétiques, correspondant à toute séquence d'ADN qui présente une variabilité inter-individuelle au sein d'une espèce donnée que l'on peut mettre en évidence par des techniques de biologie moléculaire. Les polymorphismes génétiques se transmettent de façon mendélienne à travers les générations. L'estimation des distances génétiques entre marqueurs génétiques (localisation d'un locus) repose sur l'analyse de la ségrégation mendélienne. Celle-ci découle directement du caractère linéaire du matériel génétique (tous les gènes étant distribués linéairement sur 23 paires de chromosomes). Ainsi, lors de la transmission des chromosomes aux cellules germinales pendant la méiose, deux segments d'ADN ou marqueurs génétiques suffisamment proches l'un de l'autre sur un chromosome, seront hérités conjointement. Les événements de recombinaison génétique entre deux marqueurs, révélés par le réassortiment de leurs allèles sur le chromosome, étant proportionnels à la distance qui les sépare, il est alors possible de déterminer la localisation d'un des deux loci si celle de l'autre est connue. En d'autres termes, le taux de recombinaison méiotique (θ) entre deux loci, défini comme le rapport du nombre de gamètes recombinants sur le nombre de gamètes transmis, va permettre d'estimer la distance génétique en centimorgan (cM) qui les sépare. Il en est de même entre n'importe quel marqueur génétique et un trait phénotypique qui serait sous le contrôle d'un locus donné. Plus les loci (marqueurs génétiques) sont physiquement rapprochés, plus les chances de recombinaisons sont faibles, ils sont alors génétiquement liés (Figure 9). La génétique humaine profite alors de ce principe pour tester la liaison d'un trait phénotypique donné (maladies, traits quantitatifs... etc.) avec des marqueurs génétiques dont la position génomique est connue. Des cartes génétiques de plus en plus précises sont établies comportant l'ordonnement de ces polymorphismes le long des chromosomes et la distance génétique qui les sépare.



La liaison entre deux locus dépend de la fréquence des recombinaisons méiotiques, révélées par le réassortiment de leurs allèles sur le même chromosome. Le taux θ de recombinaison permet de calculer la distance génétique (exprimée en centimorgan).

Figure 9: Utilisation du polymorphisme génétique pour l'analyse de liaison

1.4.2.2 Le génotypage

Les polymorphismes sont étudiés par des techniques de biologie moléculaire. Alors que le génotypage des RFLPs se fait aisément lorsque sont connues les séquences flanquantes, celui des éléments répétitifs a été mis au point en combinant l'amplification in vitro (PCR ou polymérase Chain Reaction) (Saiki RK, Science, 1988) à l'hybridation classique, à l'aide de sondes spécifiques (Southern EM, J Mol Biol, 1975). Ces procédés étaient longs et fastidieux surtout lorsqu'il s'agissait de génotyper pour plusieurs marqueurs un grand nombre d'individus ou de familles. En plus, la détermination des génotypes peut être sujet à erreurs, notamment dans des étapes importantes telles que la lecture des génotypes et de leur saisie manuelle dans les bases de données informatiques, avant leurs analyses par des logiciels évaluant la liaison génétique. La technologie de l'ADN avançant rapidement, de nouveaux procédés de génotypage plus

performants ont été développés, utilisant différents marquages fluorescents des produits PCR à analyser et leur séparation sur séquenceur automatique. Cet appareil d'électrophorèse est équipé d'un laser et d'une caméra qui permettent la détection des fluorophores au cours de leur migration et de déterminer un grand nombre de génotypes d'une manière relativement sensible, rapide et sûre (Ziegle JS, Genomics, 1992 ; Schwengel DA, Genomics, 1994). Actuellement, des panels comprenant environ 10 à 15 marqueurs microsatellites chacun et recouvrant l'ensemble du génome humain sont mis au point et commercialisés pour un usage de routine (Perkin Elmer). Il est ainsi possible d'effectuer une étude systématique du génome avec actuellement 400 marqueurs génétiques polymorphes, grâce à des collections préétablies de ces panels. L'établissement de ces panels a été rendu possible, suite aux développements récents de la carte génétique des microsatellites humains, qui compte plus de 5000 microsatellites (Dib C, Nature, 1996 ; Weissenbach, J Clin Chem Lab Med, 1998). Il est ainsi possible de réaliser le génotypage simultané, avec les combinaisons optimales de plusieurs microsatellites, couplés à différents fluorochromes. Ceci permet, grâce à la grande variabilité de taille des microsatellites et la diversité des fluorochromes disponibles (4 fluorophores), d'étudier simultanément jusqu'à environ une vingtaine de marqueurs, sur un même échantillon d'ADN. Ainsi on peut désormais se passer des étapes d'hybridations successives, de révélations et de saisie qui étaient purement manuelles et par conséquent fastidieuses et sources d'erreurs. Avec cette nouvelle technique, la saisie des génotypes dans la base de données génétiques est alors automatique. Ces procédés de génotypage sont très performants et de plus en plus utilisés dans des projets de cartographie de gènes de maladies humaines. Le succès de la majorité des récents projets d'étude systématique du génome dans les syndromes humains est en partie attribuable à ces procédés de récolte des données nécessaires aux études de liaison semi-automatisées et plus rapides.

1.4.2.3 Méthodes d'analyse statistique et populations

Toutes les méthodes d'analyse génétique ont en commun de chercher les corrélations entre génotypes et phénotypes. Mises au point au départ pour l'analyse de traits monogéniques (en particulier la méthode des lodscores), elles ont évolué au fur et à mesure de l'avancement des recherches épidémio-génétiques dans le domaine des traits complexes. Pratiquement, les études familiales cherchent la co-transmission d'un gène ou variant génique avec le trait pathologique, alors que les études de populations (dites aussi d'association ou de cas/témoins) cherchent une éventuelle distorsion des fréquences alléliques d'un marqueur (locus ou variant génique) entre une cohorte d'atteints et une cohorte de non atteints. Chaque méthode présente aussi bien des avantages que des inconvénients.

De nombreuses méthodes d'analyse génétique ont été développées et le choix de la méthode utilisée dépend de la population étudiée.

1.4.2.3.1 Etude de populations

Les études d'association permettent aussi d'étudier le rôle possible d'un locus dans une maladie génétique. Ces études cherchent une différence dans les fréquences alléliques d'un marqueur donné (séquence répétitive, gène, mutation ponctuelle, réarrangement chromosomique, ou autres...) entre deux groupes de sujets de même origine ethnique et contrastés par le trait pathologique étudié. Cette approche ne nécessite aucune indication sur le mode de transmission de la maladie, sa pénétrance, ni sur sa fréquence dans la population générale (Cox NJ, Diabetes, 1989). En dépit de cet avantage non négligeable, le problème majeur de l'étude d'association est le risque d'engendrer de fausses corrélations positives, quand les fréquences alléliques à un locus sont très différentes entre cas et témoins. En effet, un trait plus fréquent dans un groupe ethnique peut alors être associé de manière positive avec un allèle marqueur qui est également plus

fréquent dans ce seul groupe en question. Ceci est rencontré lorsque les deux populations étudiées ne sont pas appariées selon des facteurs très importants tels que l'âge, le sexe, l'origine ethnique (Cox NJ, Diabetes, 1989). Pour remédier au problème, il faut s'assurer de l'homogénéité de la population étudiée et chercher à répliquer les résultats positifs. Une autre solution consiste à utiliser des témoins internes aux familles de l'étude comme les conjoints ou les apparentés non atteints (Schaid DJ, Am J Hum Genet, 1994). Les études cas/témoins ne sont actuellement utilisées que pour tester des gènes candidats et non encore pour des études systématiques du génome. Une différence statistiquement significative des fréquences alléliques (ou génotypiques) au locus testé indique un effet pathogène possible dans l'intervalle génétique en question (mise en évidence d'un "linkage disequilibrium") (Turner RC, Diabetes, 1995). Les études d'association ont permis dès 1984 de suspecter le rôle du promoteur du gène de l'insuline dans le diabète de type 1 (Bell GI, Diabetes, 1984), désigné par la suite IDDM2, alors que les études familiales étaient peu contributives (jusqu'à l'utilisation de la méthode de TDT). On peut aussi citer le gène du récepteur au glucagon dans le diabète de type 2 (Hager J, Nature Genet, 1995). Ces études d'association ont également joué un rôle clé en impliquant le gène ACE dans l'infarctus du myocarde (Cambien F, Nature, 1992) et le gène de l'apolipoprotéine E dans la longévité (Schächter F, Nature Genet, 1994).

1.4.2.3.2 Etudes familiales

Analyses paramétriques

L'outil le plus performant de la génétique inverse est l'étude de liaison, ou de "linkage", qui recherche dans des familles comportant plusieurs sujets atteints, la transmission conjointe, à travers les générations, d'un polymorphisme génétique et du trait pathologique. Cette coségrégation traduit une liaison génétique, permettant d'impliquer dans le déterminisme de la maladie, un gène localisé dans une région particulière du génome (Lathrop GM, Elsevier, 1990).

La liaison génétique est attestée par le calcul statistique d'un lodscore (« Logarithme of Odds »), qui est égal au logarithme décimal du rapport de vraisemblance de deux hypothèses opposées : l'hypothèse H1 "il y a liaison" où le taux de recombinaison est inférieur à 0,5 et l'hypothèse H2 "il n'y a pas liaison" correspondant à un taux de recombinaison maximal de 0,5 (50% de recombinants dans la descendance). Les Lodscores se calculent par famille et ils sont additifs (test séquentiel). Si le lodscore maximal est supérieur à 3, la liaison génétique entre les deux loci peut être affirmée à 1/1000, ce qui correspond à un risque d'erreur de type 1 (alpha égal à 5% (i.e. il existe 1 chance sur 20 que cette indication de liaison soit due au hasard). La distance génétique D (en centimorgan), qui sépare les deux loci liés, peut être calculée à partir du taux de recombinaison Theta qui correspond au lodscore maximal, grâce à la formule d'Haldane ($D = -1/2 \log(1 - 2\theta)$). Il est alors possible d'estimer la distance physique qui sépare les deux loci. En effet, un taux de recombinaison de 1% correspond à une distance génétique de 1 centimorgan soit, en moyenne, à une distance physique de 10^6 paires de bases. Si le lodscore est inférieur à -2 (risque alpha égal à 5%), la liaison est exclue pour la valeur Theta du taux de recombinaison correspondante. S'il est compris entre -2 et +3 le résultat n'est pas significatif et ne permet pas de conclure.

Les analyses de "linkage" sont paramétriques et nécessitent de connaître (d'établir) le mode de transmission de la maladie, sa pénétrance et sa fréquence dans la population générale. Cette technique a fait ses preuves dans la localisation de maladies héréditaires monogéniques, comme la mucoviscidose (Wainwright B, Nature, 1985) ou la myopathie des ceintures (Beckmann JS, CR Acad Sci, 1991). Cependant, le pouvoir de détection d'une liaison génétique pour une maladie multifactorielle associant l'insulino-résistance, le diabète type 2 et l'athérosclérose comme à l'Ile Maurice est beaucoup plus faible. D'une part, l'association de ces différentes pathologies rend compte du caractère polygénique et cliniquement hétérogène de la maladie, bien que l'isolement de cette population suggère un caractère génétiquement homogène.

D'autre part, il est difficile de recruter de grandes familles comportant des sujets atteints sur plusieurs générations, compte tenu du début généralement tardif de la maladie et de la mortalité précoce de nombreux diabétiques. La simulation mathématique des conditions d'une maladie comme le diabète type 2 (Lathrop GM, Elsevier, 1990) montre une probabilité faible de conclure positivement (inférieure à 20%) si deux conditions essentielles ne sont pas remplies : réunir un nombre suffisant de familles (très supérieur à 100) et diminuer l'hétérogénéité des familles par rapport à la maladie. Ainsi l'utilisation exclusive de cette analyse peut conduire à une exclusion fallacieuse de certains loci. Il semble donc judicieux de recourir aux méthodes d'analyse non paramétriques dans l'étude de l'insulino-résistance, du diabète type 2 et de l'athérosclérose.

La méthode paramétrique des Mod-scores (Hodge SE et al. Genet Epidemiol 1994) est fondée sur celle des lodscores. Cependant, lorsque le mode de transmission de la maladie et sa pénétrance ne sont pas connus, le programme permet de calculer le lodscore avec tous les modèles possibles et sélectionne celui pour lequel le lodscore est le plus élevé. De ce fait, le rapport de vraisemblance de la méthode des lodscores qui est $Z(\Theta) = \log(L(\Theta)/L(0,5))$, devient $M(\Theta) = \log_{\max \Phi} (L(\Theta; \Phi)/L(0,5; \Phi))$, avec Φ représentant les modèles testés et Θ le taux de recombinaison. M est donc le lodscore maximisé sur différents modèles. Afin d'éviter un nombre trop important de calculs et pour explorer l'espace des modèles réalistes, un des paramètres est fixé : les Mod-scores ont été calculés pour 5 valeurs possibles de prévalence de la maladie dans la population générale (1‰, 5‰, 1%, 3% et 5%). Le programme utilisé a été spécialement élaboré par Martin Farrall au Wellcome Trust Centre for Human Genetics à Oxford. Il est fondé sur la version 2.1 du programme FASTLINK et a été adapté pour pouvoir utiliser les banques PVM version 3.3.

Analyses non paramétriques

Ces méthodes d'analyse ne nécessitent pas de connaître le mode de transmission de la maladie ["sib-pair analysis", "Affected Pedigree Member", "Transmission Disequilibrium Test" (TDT)]. Elles sont donc principalement utilisées pour l'étude des maladies polygéniques. Mais certaines d'entre elles peuvent également être utiles pour l'étude de maladies monogéniques.

Les études familiales portant sur des paires de germains (frères et soeurs) (études de "sib-pair") recherchent un excès de concordance des allèles dans les paires de frères et soeurs atteints, par rapport à ce que voudrait le hasard (Bishop DT, Am J Hum Genet, 1990). Le principe de cette méthode peut se schématiser comme suit :

Si, à un locus donné, le père est porteur des allèles A et B et la mère des allèles C et D, il existe 4 génotypes possibles pour leurs enfants : AC, AD, BC et BD.

Si le génotype du premier enfant est : AC

Le deuxième enfant peut être :

	AC	AD	BC	BD
--	----	----	----	----

Nombre d'allèles identiques

par descendance (ibd) :	2	1	1	0
-------------------------	---	---	---	---

Proportion d'allèles ibd (x_i) :	1	1/2	1/2	0
--------------------------------------	---	-----	-----	---

Probabilité pour avoir ce

génotype ibd (p_i) :	1/4	1/4	1/4	1/4
--------------------------	-----	-----	-----	-----

Sous l'hypothèse nulle de ségrégation au hasard du marqueur étudié chez des frères et soeurs affectés, la proportion estimée d'allèles partagés identiques par descendance est la suivante :

$\sum p_i x_i = 1/4 \times 1 + 1/2 \times 1/2 + 1/4 \times 0 = 1/2$; (où x_i est la proportion d'allèles identiques par descendance soit 1, 1/2 ou 0 et p_i est la probabilité d'avoir cette proportion x_i d'allèles identiques par descendance, soit 1/4, 1/2 et 1/4 en cas de ségrégation au hasard)

Si l'allèle de la maladie est lié au marqueur étudié (déséquilibre de liaison), alors la proportion d'allèles du marqueur partagés identiques par descendance est supérieure à $1/2$: $\sum p_{ixi} > 1/2$.

Ainsi, deux individus affectés d'une même fratrie ont une chance sur quatre d'avoir deux allèles parentaux identiques, une chance sur deux d'en avoir un identique et une chance sur quatre de n'en avoir aucun en commun. Un test de χ^2 est effectué entre les fréquences observées et les fréquences attendues et il existe une indication de liaison (seuil de significativité) pour une valeur de p inférieure ou égale à 0,05. Ce test est beaucoup plus puissant lorsque les génotypes parentaux sont connus ou déduits à partir des autres membres de la fratrie (réalisant ainsi les conditions d'identité par descendance -*ibd-identical by descent*- plutôt que d'identité par état -*ibs-identical by state*-). Cette méthode est non paramétrique et a l'avantage de ne pas tenir compte du mode de transmission de la maladie dans le calcul. Elle s'est révélée efficace pour démontrer le rôle de l'angiotensinogène dans l'hypertension artérielle chez l'homme, qui présente les mêmes difficultés d'analyse que le diabète type 2 (Jeunemaitre X, Cell, 1992). Des simulations statistiques auraient postulé que deux cents familles comportant une paire de sujets affectés dans la fratrie seraient nécessaires pour mettre en évidence l'effet d'un gène majeur du diabète type 2, c'est à dire un gène en cause dans un grand nombre de patients et/ou expliquant une grande part de la variance de la glycémie (Rich SS, Diabetes, 1990).

La méthode APM (affected Pedigree Member), développée par Weeks et Lange (Am J Hum Genet, 1988), qui recherche un excès de concordance des allèles parmi l'ensemble des paires de sujets affectés des familles. Cette méthode a été utilisée efficacement pour localiser un gène de susceptibilité à la maladie d'Alzheimer sur le chromosome 19 (Pericak-Vance MA, Am J Hum Genet, 1993).

Le test de déséquilibre de transmission (TD test), lui, recherche un excès de transmission d'un allèle rare, d'un parent porteur à ses enfants atteints. C'est ainsi qu'a pu être

impliquée la région du gène de l'insuline dans le déterminisme génétique du diabète insulino-dépendant (Julier C, Nature, 1991 ; Spielman RS, Am J Hum Genet, 1993).

La méthode MLB (“maximum-likelihood-binomial method”) est fondée sur la distribution binomiale des allèles parentaux parmi les enfants au sein de familles nucléaires, c’est à dire qu’elle compare la ségrégation observée des allèles parmi les enfants à ce qui est attendu en cas de non liaison.

1.4.3 Les différentes approches de localisation génétique

La recherche des gènes de susceptibilité de l’insulino-résistance, du diabète sucré et de ses complications cardio-vasculaires est compliquée par l’hétérogénéité de la maladie et par l’absence de marqueurs génétiques comme le système HLA dans le diabète insulino-dépendant (Todd JA, Nature, 1987). C’est pourquoi, plusieurs stratégies sont nécessaires pour l’étude génétique d’une maladie polygénique, en combinant plusieurs types d’études familiales et des études de populations. Ces outils variés permettent d’envisager les trois approches complémentaires que sont l’étude des gènes candidats, l’étude des régions candidates et l’étude systématique du génome à l’aide de marqueurs anonymes (Figure 10).

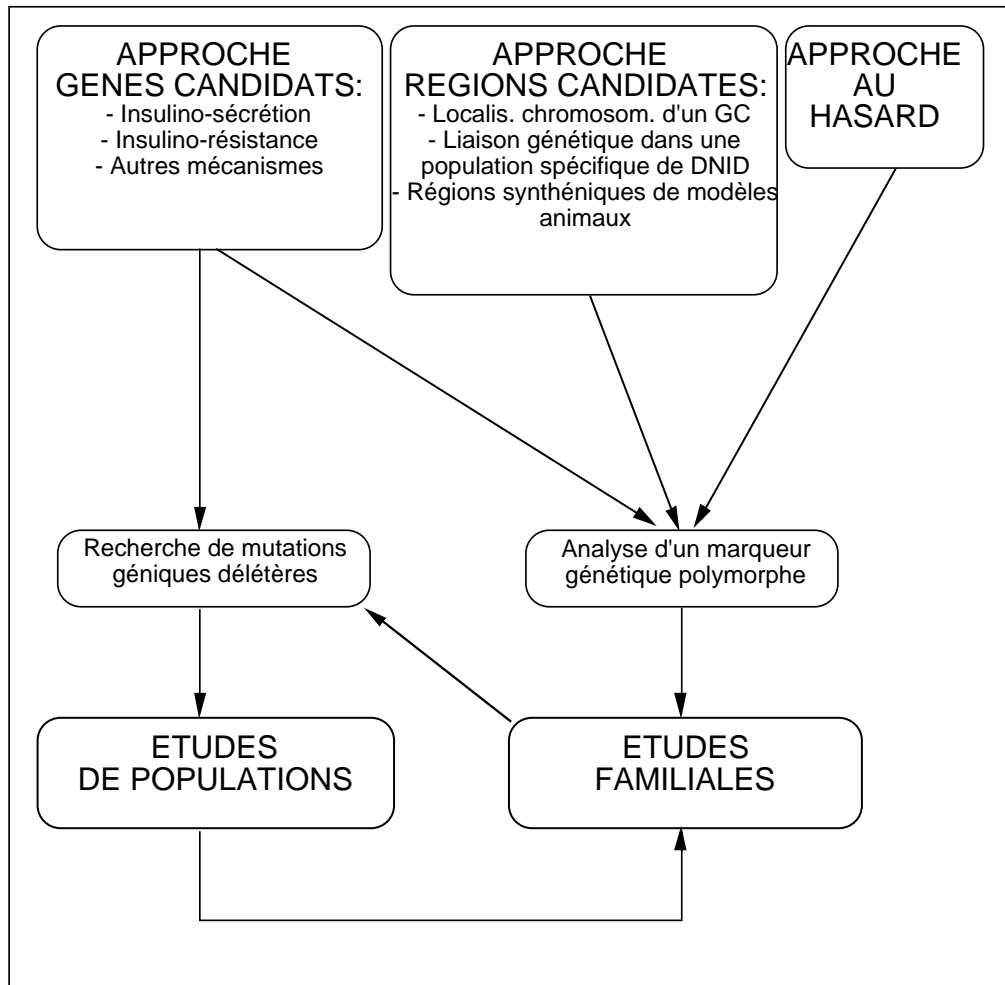


Figure 10: Stratégies d'études génétiques

1.4.3.1 Approche « gène candidat »

En se fondant sur des données pertinentes des études biochimiques, physiologiques, et métaboliques, on peut a priori définir des voies biologiques susceptibles d'être anormales dans une pathologie donnée. Au sein de ces voies biologiques, certaines protéines jouent des rôles clés, leurs gènes correspondants sont alors qualifiés de "gènes candidats".

L'approche "gène candidat" ne peut être conduite que lorsque le gène en question est cloné, cartographié sur le génome humain. Pour étudier le rôle d'un gène candidat, il est nécessaire de combiner plusieurs méthodes. Une stratégie consiste à mettre en évidence, en premier, une liaison génétique entre un marqueur du gène et le trait pathologique (études de

population ou familiales) et de rechercher ensuite des mutations dans le gène. Ceci nécessite qu'un polymorphisme ait été caractérisé dans ou à proximité du gène. Des études de ségrégation intra-familiale et/ou de population seront de nouveau nécessaires pour incriminer le(s) variant(s) identifié(s) comme facteur causal de la maladie. Une autre stratégie consiste à rechercher directement, chez des sujets atteints, des mutations dans le gène -puisqu'il est connu- et de réaliser secondairement les études de familles et/ou de population qui permettront d'évaluer leur rôle dans la pathogénie de la maladie. Des techniques de criblage moléculaire direct telles que le séquençage direct d'ADN, les méthodes de criblage fondées sur la conformation d'ADN (SSCP ou DGGE) ou les techniques de détection des hétéroduplex d'ADN représentent les différents outils de cette approche.

Compte tenu qu'actuellement, près de 20% de la totalité des gènes humains sont clonés, on comprend clairement les limites et la portée d'une telle approche bien qu'elle soit très fastidieuse si l'on considère toutes les protéines d'ores et déjà impliquées dans l'homéostasie glucidique par exemple.

1.4.3.2 Approche régions candidates

Une région chromosomique définie par des marqueurs génétiques anonymes et comportant un gène par exemple, dans le cas du diabète sucré potentiellement impliqué dans l'apparition d'une hyperglycémie, est considérée comme une région candidate. Il peut s'agir de gènes candidats dont la localisation chromosomique est connue mais pour lesquels on ne dispose pas de marqueurs génétiques spécifiques, de gènes ou loci localisés dans des modèles animaux de diabète et dont la région synténique est connue chez l'homme (comme par exemple les mutations *db*, *ob* et *tubby* localisées respectivement sur les chromosomes 1p, 7q et 11p chez l'homme), de gènes ou loci pour lesquels une association ou une liaison génétique a été démontrée dans une autre population de sujets diabétiques (comme les gènes de la NO synthase et de l'aldose

réductase mis en évidence dans le diabète type 2 compliqué de néphropathie). Dans des modèles animaux des maladies humaines, on peut espérer localiser plus facilement les gènes de susceptibilité, car il est possible de travailler sur populations "pures" et de contrôler les facteurs environnementaux. 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 (Darling S, Curr Opin Genet Dev, 1996).

1.4.3.3 Approche génome entier

Enfin, le (ou les) gène(s) impliqué(s) dans le développement des différentes pathologies étudiées codent peut-être des protéines de fonction inconnue ou dont la fonction ne paraît pas de façon évidente concerner ces pathologies. L'approche génome entier ou dite "au hasard" (random approach), complémentaire à l'étude des gènes et régions candidates, consiste à explorer de façon systématique le génome des individus de familles atteintes à l'aide de centaines 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 à la maladie, et par un déséquilibre de liaison dû à cette proximité, leur servir de marqueur (Feingold J, Médecine/Sciences, 1991). Cette méthode présente l'avantage d'étudier tout le génome, et ainsi d'évaluer le rôle potentiel de chaque région chromosomique. Les caractéristiques génétiques et cliniques de la maladie étudiée ont des répercussions directes sur la puissance de cette méthode. La liste des maladies monogéniques et/ou hétérogènes localisées grâce à cette approche s'allonge d'années en années: la chorée de Huntington (Gusella J, Nature, 1983), la mucoviscidose (Wainwright B, Nature, 1985), la polypose familiale (Bodmer W, Nature, 1987), le cancer du sein (Hall J, Science, 1990), la myopathie des ceintures (Beckmann JS, CR Acad Sci, 1991), la néphronophthise (Antignac C,

Nature Genet, 1993), le syndrome CADASIL (cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy) (Tournier-Lasserre E, Nature Genet, 1993), les MODY1 et 3 (Bell GI, PNAS, 1991 ; Vaxillaire M, Nature Genet, 1995)... L'efficacité de cette approche dans l'étude des maladies multifactorielles a été aussi démontrée. En effet, plusieurs gènes de susceptibilité au diabète type 1 ont été localisés par deux équipes différentes, grâce à une étude systématique du génome de familles diabétiques type 1 (Hashimoto L, Nature, 1994 ; Davies JL, Nature, 1994).

La suite logique de la localisation génétique d'un locus morbide est sa cartographie fine (recherche d'événements de recombinaison au sein d'haplotypes transmis afin de réduire l'intervalle de liaison), ensuite la construction de segments génomiques dans le but d'établir la carte des transcrits et identifier le gène morbide par criblage systématique des gènes clonés dans la région. Bien que son application ait été couronnée de succès dans un grand nombre de syndromes monogéniques (Collins FS, Nat Genet, 1992 ; 1995), ce processus, théoriquement et techniquement réalisable, présente souvent des difficultés non négligeables particulièrement lié au caractère hétérogène d'une maladie, et nécessite des efforts considérables avec la combinaison d'un large éventail de stratégies différentes.

2 Objectifs et stratégies adoptées dans le cadre de ce travail

Mon travail de thèse a pour objectif l'identification de gènes de susceptibilité au développement des complications cardio-vasculaires dans le contexte particulier du diabète. Nous avons pour cela combiné deux stratégies d'étude génétique, communément utilisées dans l'Unité *CNRS 8090* : l'approche « gène candidat » et l'exploration systématique du génome (« génome scan »). L'approche « gène candidat » est une méthode qui teste la présence d'un déséquilibre de liaison entre un ou des polymorphismes de séquences géniques et une pathologie donnée. Elle repose souvent sur la recherche d'une association entre la pathologie ou entre la variation inter individuelle d'un trait phénotypique lié à la pathologie et un polymorphisme génétique dans le cadre d'études cas/témoins. Cette stratégie a été appliquée à l'étude de deux gènes candidats, le facteur de coagulation vWF et le récepteur nucléaire PPAR α , dans deux populations diabétiques d'origine européenne et indienne de Pondichéry et présentant une maladie coronarienne ou indemnes de CHD symptomatique malgré un risque élevé de le développer, du fait de la présence de facteurs de risque environnementaux forts : diabète mal équilibré, maladie rénale. Parallèlement, l'exploration systématique du génome a été effectuée dans des familles Indo-Mauritiennes caractérisées par la présence de plusieurs membres atteints de CHD précoce, sur un fond de forte prévalence de diabète de Type 2 et d'insulino-résistance. Cette association symptomatique délétère appelée « X » ou plurimétabolique comporte plusieurs facteurs de risque coronarien comme l'intolérance au glucose ou le diabète type 2, l'hyperinsulinisme, l'obésité centrale, l'hypertension artérielle et des anomalies lipidiques et de facteurs de la coagulation. L'objectif était de localiser des gènes qui pourraient être communs au développement de ces différentes pathologies et qui joueraient un rôle important dans le pathophysiology de la maladie macrovasculaire associée au syndrome métabolique. Nos résultats actuels montrent l'intérêt de

cette dernière approche pour la dissection génétique de traits aussi complexes que la maladie coronarienne ou le syndrome d'insulino-résistance.

Présentation générale

Les études familiales d'apparentés diabétiques avec complications cardio-vasculaires sont difficiles en France en raison de la difficulté à trouver des familles multiplexes. C'est pourquoi la première stratégie d'étude génétique que nous avons employée repose sur la recherche d'une association entre une pathologie et un polymorphisme génétique dans le cadre d'études cas/témoins. Cette stratégie a été appliquée à l'étude du gène vWF (**Article 1**) et du gène PPAR α (**Article 2**). L'approche « gène candidat » est une méthode rationnelle qui a démontré son efficacité en identifiant le rôle du gène de la glucokinase dans le MODY, forme monogénique de diabète type 2, ou le rôle de l'angiotensinogène dans l'hypertension artérielle, pathologie multifactorielle. Cependant, il est très probable que certains gènes de susceptibilité à l'insulino-résistance, au diabète et à leurs complications cardio-vasculaires produisent des protéines de fonction inconnue ou non impliquées de manière évidente dans les métabolismes physiopathologiques de ces différentes pathologies. Ceci rend aléatoire la démarche « gènes candidats ». C'est pourquoi il est important d'entreprendre une stratégie d'étude génétique complémentaire comme l'« exploration systématique du génome ». Grâce à la carte de haute résolution de marqueurs génétiques très polymorphes établie par l'équipe de Jean Weissenbach (Weissenbach J, Clin Chem Lab Med, 1998), il est maintenant possible d'utiliser cette stratégie pour des maladies multifactorielles. Un préalable nécessaire à un tel projet est le recrutement de nombreuses familles avec la constitution d'une banque d'ADN et une caractérisation clinique de tous les membres de ces familles. Ceci a été effectué à l'île Maurice par le Dr. Meera Manraj depuis 1994 (Centre SSR). Actuellement, plus de 200 familles ont été déjà recrutées, comportant au moins un sujet coronarien diagnostiqué avant l'âge de 52 ans (diabétique ou non) et au moins

un autre membre de la fratrie avec CHD ou diabétique type 2. Un volume de 20 ml sang périphérique, prélevé sur EDTA pour chacun des individus, a permis la constitution d'une banque d'ADN. Parallèlement, plusieurs données biologiques et anthropométriques ont été recueillies afin de permettre la caractérisation clinique précise et l'attribution correcte du phénotype affecté ou non affecté. Ces données comportent l'étude du métabolisme du glucose et du profil lipidique, un bilan rénal, l'index de masse corporelle (BMI), le rapport taille/hanche, les pressions artérielles systolique et diastolique, un ECG ainsi qu'un questionnaire sur les facteurs de risque habituels et les antécédents familiaux de maladies cardio-vasculaires et/ou de diabète type 2. Environ 50% des sujets porteurs de CHD précoce sont diabétiques. Le caractère relativement homogène de cette population est dû à l'isolement géographique de l'île Maurice, ce qui facilite l'étude génétique au sein de cette population. Ainsi, en parallèle de l'étude « gène candidat », nous avons entrepris l'exploration systématique de 99 familles Indo-Mauritiennes afin de rechercher des loci majeurs liés au diabète type 2 et aux CHD dans le contexte particulier du syndrome d'insulino-résistance (**Chapitre 2.2**). Une partie de ce travail est rapportée dans un manuscrit en préparation : " *Genome wide scan in Mauritian families with Coronary Heart Disease shows a susceptibility loci on chromosome 16p* " (Francke et al).

2.1 Approche « gène candidat »

2.1.1 Etude du gène vWF

La néphropathie diabétique est cliniquement caractérisée par une protéinurie ou albuminurie persistante, de l'hypertension, une détérioration de la fonction rénale. L'endothélium vasculaire occupe une place cruciale et unique à l'interface du sang et des tissus. Il assure la régulation de processus variés tels que l'hémostase, la fibrinolyse, le contrôle vasomoteur et la perméabilité vasculaire (Borsum T, Virchows Archiv B Cell Pathol, 1991). Tous ces mécanismes

pourraient être impliqués dans la pathogénèse de la néphropathie diabétique (Kanwar YS, Lab Invest, 1984). Des taux plasmatiques élevés de vWF, une glycoprotéine synthétisée par les cellules endothéliales, représente un marqueur d'un dysfonctionnement endothélial généralisé (Editorial, Lancet, 1988). Or, le taux plasmatique de vWF est augmenté chez les patients ayant une excrétion urinaire d'albumine élevée, mais pas chez les patients atteints de diabète de type 1 bien équilibrés. Cependant, des études ont démontré qu'une augmentation du taux plasmatique de vWF précéderait la survenue de la micro-albuminurie d'environ 3 ans (Stehouwer CDA, 1997 ; Stehouwer CDA, J Nephrol, 1993). Il pourrait y avoir une base génétique à la modulation du taux plasmatique de vWF qui contribuerait chez les sujets diabétiques type 1 au développement de la néphropathie diabétique. C'est pourquoi nous avons étudié plusieurs polymorphismes du gène vWF (RFLPs) dans une population de patients diabétiques type 1 atteints ou non de néphropathie diabétique. Nous avons sélectionné ces polymorphismes, déjà détectés dans d'autres études et en raison de leur localisation privilégiée à côté ou dans des régions fonctionnelles du vWF, notamment au niveau de son interaction avec d'autres facteurs plasmatiques ou de récepteurs plaquettaires. Le génotypage de ces polymorphismes a été effectué par PCR et digestion enzymatique. Dans cette population, une augmentation des taux plasmatiques de vWF a été corrélée au développement de la néphropathie diabétique, indépendamment de la présence de CHD, et associée à l'allèle Ala789 du polymorphisme Thr789Ala de l'exon 18 (Rsa1). Cependant, aucune association significative n'a été démontrée entre ce polymorphisme du gène vWF et la présence de néphropathie diabétique. Ces résultats suggèrent que les taux plasmatiques élevés de vWF sont dus à un événement secondaire, probablement en raison d'un dysfonctionnement endothélial rénal. Cependant, le dysfonctionnement de l'endothélium vasculaire pourrait être l'événement initiateur dans l'athérogénèse. De nombreuses études ont confirmé la présence de matériel thrombotique à la fois au niveau de la surface du sous-endothélium et de la couche intimale la plus profonde des plaques d'athérosclérose. Ceci suggère

qu'il existe différents stades de thrombose et que l'organisation des évènements thrombotiques intervient dans le processus de progression de la plaque d'athérosclérose (Davies MJ, 1989). Il est bien établi que le diabète est un facteur de risque de développement prématuré d'athérosclérose, où le tissu cible prioritairement atteint est l'endothélium vasculaire (Steiner G, Diabetes, 1981 ; Ross R, Nature). La mortalité, par maladie cardio-vasculaire, est en effet 40 fois plus élevée chez les patients diabétiques type 1 atteints de cette complication. Des taux plasmatiques élevés de vWF représentent un facteur de risque cardio-vasculaire dans la population générale. Or, les taux plasmatiques de vWF sont anormalement élevés dans le diabète et corrélés au risque coronarien chez les patients diabétiques atteints de micro-angiopathies. Dans notre étude, les taux plasmatiques élevés de vWF ont été associés au développement de CHD. Nous nous sommes donc intéressés à une éventuelle implication du gène vWF sur le risque coronarien. L'allèle Ala789 du polymorphisme Thr789Ala a été fortement corrélé à la présence de CHD. De plus, cette association était indépendante des autres facteurs de risque coronarien classiques. Nous avons conclu que, dans notre population, le gène vWF pourrait contribuer au risque coronarien accru à travers l'augmentation de vWF plasmatique.

Article 1

Association between high von Willebrand factor levels and the Thr789Ala vWF gene polymorphism but not with nephropathy in type I diabetes

Corinne Lacquemant, Christine Gaucher, Catherine Delorme, Gilles Chatellier, Yves Gallois, Michel Rodier, Philippe Passa, Beverley Balkau, Claudine Mazurier, Michel Marre, Philippe Froguel and the GENEDIAB study group and the DESIR study group.

Kidney International, 2000, **57**, 1437-1443

2.1.2 Etude du gène PPAR α

Les PPARs jouent un rôle central dans le contrôle du métabolisme du glucose et des lipides, dans l'homéostasie énergétique et l'inflammation. Ces récepteurs nucléaires sont activés par les acides gras et leurs dérivés. Les fibrates sont des drogues hypolipémiantes utilisées en clinique dont le rôle est de diminuer les concentrations plasmatiques de triglycérides et d'augmenter celles du HDL cholestérol (Staels B, *Circulation*, 1998). Le récepteur PPAR α médie l'activité des fibrates sur les taux de HDL en induisant la transcription des gènes des apolipoprotéines majeurs des HDL, ApoAI et ApoAII. Par ailleurs, les fibrates exercent une action de diminution des triglycérides en augmentant la lipolyse lipoprotéique. Ceci est dû à une augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase et à une réduction de l'expression du gène ApoCIII. Ce mécanisme est suivi par une augmentation de la prise intracellulaire et de la dégradation β -oxydative des acides gras dans les tissus exprimant fortement PPAR α et où le catabolisme des acides gras est important. Ce dernier événement, combiné à une synthèse réduite de triglycérides et d'acides gras, résulte en une diminution de la production de VLDL par le foie. Les activateurs de PPAR α ont de plus un rôle dans la sensibilité à l'insuline à travers la réduction de l'hyperglycémie et de l'hyperinsulinémie. Récemment, une équipe a démontré que les activateurs de PPAR α diminuaient les concentrations sériques à jeun d'insuline et la réponse insulinaire suite à un test oral de tolérance au glucose chez des patients hyperinsuliniques porteurs du syndrome X plurimétabolique (Guerre-Milo et al, résultats non publiés). Les activateurs de PPAR α influenceraient l'homéostasie glucidique en augmentant le flux d'acides gras des tissus périphériques vers le foie. Dans les cellules musculaires lisses, ce mécanisme soulagerait l'inhibition médiée par les acides gras du dépôt de glucose stimulé par l'insuline et, ainsi, améliorerait l'insulino-résistance (Boden G, *Diabetes*, 1991). En plus de cette activité de diminution des lipides, PPAR α a un rôle dans la régulation de facteurs hémostatiques et dans

l'inflammation. PPAR α est aussi exprimé dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages. Certains fibrates influencent favorablement le taux plasmatique de facteurs hémostatiques comme le PAI-1 et le fibrinogène. La réduction médiée par les fibrates des concentrations de ces facteurs plasmatiques est due, en effet, à une diminution de leur expression via PPAR α (Arts J, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997 ; Schonfeld G, *Atherosclerosis*, 1994). L'activation de PPAR α résulte en une activité anti-inflammatoire par inhibition de l'expression de certaines cytokines comme TNF α ou des interleukines (Staels B, *Nature*, 1998). Sur le plan clinique, l'activité moléculaire des activateurs de PPAR α se traduit par une réduction des taux circulants de cytokines inflammatoires dans le sérum de patients hyperlipidémiques avec athérosclérose et traités par des fibrates (Madej A, *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1998).

L'insulino-résistance est un syndrome pluri-métabolique associant l'hyperinsulinisme, l'hypertension, des anomalies de la tolérance au glucose, des lipides et des facteurs de la coagulation (Reaven GM, *Annu Rev Med*, 1993). De plus, ces anomalies métaboliques sont souvent associées à une obésité centrale (Despres JP, *Nutrition*, 1993). Le cluster de ces nombreux facteurs de risque coronariens résulte en un risque accru d'athérosclérose qui est une cause majeure de mortalité dans le diabète de type 2 (Despres JP, *Curr Opin Lipidol*, 1994). Par ailleurs, la présence de déterminants génétiques, fortement suspectés, pourrait être impliqués dans le développement de ces différentes pathologies et anomalies métaboliques. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude génétique de PPAR α dans le diabète type 2 en raison de son rôle multiple à la fois dans le métabolisme des lipides, l'insulino-résistance, l'hémostase et l'inflammation. Cette étude a débuté par la recherche de polymorphismes ou mutations dans les régions codantes et deux exons non codants du gène PPAR α dans une population de patients diabétiques type 2 Caucasiens et Indiens à risque élevé de CHD. Après la détection de plusieurs variations génétiques, des études Cas/Témoin ont été entreprises dans deux populations de

patients Caucasiens et Pondichériens, contrastées par la présence de diabète type 2 et/ou de maladie coronarienne. Aucune association n'a été détectée entre le diabète ou la maladie coronarienne et des variants du gène PPAR α localisés dans des régions fonctionnelles importantes de ce récepteur. Cependant, le polymorphisme L162V était significativement associé à des taux élevés de lipides plasmatiques chez les Caucasiens diabétiques de Type 2 coronariens. Les patients porteurs de l'allèle muté Val162 présentaient des concentrations plus élevées en cholestérol total et en Apo B, comparés aux patients homozygotes sauvages. Une tendance vers des taux plus élevés de ces lipides a également été observée chez les patients diabétiques type 2 indemnes de maladie coronarienne. Il se peut que la présence de traitements anti-lipidémians chez nos patients amène à sous-estimer nos résultats statistiques. Nous avons conclu que le gène PPAR α n'est probablement pas un déterminant majeur impliqué dans le développement du diabète et de CHD dans nos populations. Il est toutefois possible que le gène PPAR α puisse contribuer de façon mineure au risque accru de maladie coronarienne dans le diabète de type 2 à travers la variabilité inter-individuelle de lipides plasmatiques athérogènes.

Article 2

**Mutation screening of the PPAR α gene in type 2 diabetes associated with coronary heart
disease**

Corinne Lacquemant, Frédéric Leprêtre, Ines Pineda Torra, Meera Manraj, Guillaume
Charpentier, Juan Ruiz, Bart Staels, and Philippe Froguel

Diabetes & Metabolism, 2000, 26, 393-401

2.2 Approche « génome entier »

2.2.1 Introduction : Historique de l'île Maurice

L'île Maurice fait partie de l'archipel des Mascareignes. Elle est située dans l'Océan Indien, à environ 2400 kilomètres de la côte Sud-Est de l'Afrique (Figure 11). N'ayant aucune ressource minérale, elle vit principalement du sucre, du textile et du tourisme.



Figure 11: Carte géographique situant l'île Maurice

L'île d'origine volcanique fut naguère explorée par les Arabes et les Portugais, colonisée ensuite par les Hollandais, les Français et enfin les Anglais. L'île prit son envol en 1968 en quittant le statut de colonie de la Couronne Britannique pour devenir indépendante et une République à part entière en 1992. Sur ce territoire exigu en pleine expansion économique, c'est

un micro-Etat où vivent plus d'un million de Mauriciens qui essaient de pratiquer tous les jours les valeurs tellement fragiles de la cohabitation. Indous, Tamouls, Musulmans, Catholiques, Protestants, Bouddhistes, qu'ils soient Indiens, Chinois, Franco-Mauriciens, Afro-Mauriciens ou de la population générale ("Créoles"), tous se forment une nation et un destin commun. La composition multiethnique de la population Mauricienne reflète son histoire : les colons Français ont amené les esclaves Africains de Madagascar et du continent Africain (la plupart d'Afrique de l'Ouest) afin de travailler dans les plantations de canes à sucre ; les Anglais ont cessé cette pratique, mais ont introduit en 1834 des travailleurs salariés d'Inde (aires de Calcutta, Bombay et Madras). La population est actuellement à 70% d'origine Indienne (53,6% d'Hindous et 16,4% de Musulmans), 2,1% sont Chinois et 27,9% constituent la population générale comprenant principalement des personnes d'ancêtres mixtes Indiens, Européens et Africains.

2.2.2 Matériel et méthodes

2.2.2.1 Introduction

Pour espérer mettre en évidence tous les gènes de susceptibilité au diabète et/ou CHD, il est nécessaire de mener, en parallèle à l'étude de gènes, une étude systématique du génome à l'aide de marqueurs anonymes polymorphes. Dans le cas d'une maladie monogénique, où l'utilisation des analyses de linkage est appropriée, le principe est simple puisqu'il s'agit d'exclure petit à petit le génome jusqu'à trouver un marqueur lié à la maladie dans les familles atteintes. En effet, pour chaque marqueur non lié à la maladie, le lod score est négatif ($Z < -2$) pour une valeur θ donnée du taux de recombinaison. Il est alors possible d'exclure la liaison de part et d'autre de ce marqueur, sur une distance génétique correspondant à θ (calculée par la formule d'Haldane). Le génome humain mesurant en moyenne 38 morgans, l'utilisation d'au moins 200 marqueurs espacés de 20 cM est nécessaire pour explorer l'ensemble du génome. C'est ainsi que Vaxillaire

et al ont localisé en 1995 le troisième gène du MODY sur le chromosome 12q, après avoir exclu 78% du génome avec 99 marqueurs. Depuis ces dernières années, le développement de la carte génétique a progressé. La cartographie génétique peut être, actuellement, réduite de moitié avec 400 marqueurs espacés de 10 cM.

L'exploration systématique du génome dans les pathologies multifactorielles est une tâche bien plus compliquée et représente un tout autre défi de la génétique humaine. La cartographie d'exclusion n'est pas possible dans le cas de maladies complexes, puisque l'utilisation des analyses de linkage conduirait à des exclusions fallacieuses et que l'utilisation des méthodes non paramétriques ne permet pas d'exclure des régions chromosomiques. La puissance de détection d'une liaison génétique avec les analyses de sib-pair dépend d'une part de l'informativité du marqueur et de sa distance avec le gène morbide, mais surtout de l'effet de ce gène dans l'apparition du trait pathologique dans les familles étudiées.

Compte tenu de l'existence de cartes génétiques précises, il paraît raisonnable d'espérer mettre en évidence un gène majeur relatif au développement du diabète et/ou de ses complications cardio-vasculaires par l'étude de marqueurs microsatellites polymorphes dans un nombre suffisant de familles. La carte génétique a été considérablement développée au laboratoire Généthon (Dib C, Nature, 1996). Elle comporte actuellement plus de 5000 microsatellites très polymorphes, espacés de 10 cM.

C'est pourquoi nous avons entrepris l'étude systématique du génome à l'aide de marqueurs polymorphes espacés de 10 cM sur des familles de la population Mauricienne avec athérosclérose précoce et présentant des troubles de l'homéostasie glucidique.

2.2.2.2 Caractérisation et sélection des familles

Le métabolisme du glucose a été caractérisé de la façon suivante : tolérance au glucose normale si glycémie à jeun < 7 mmol/l et glycémie à 2 heures < 7,8 mmol/l ; intolérance au

glucose (IG) si glycémie à jeun < 7 mmol/l et glycémie à 2 heures $\geq 7,8$ mmol/l ; diabète type 2 (DNID) si une histoire préalable de diabète avait déjà été déterminée ou si glycémie à jeun > 7 mmol/l ou si glycémie à jeun < 7 mmol/l et glycémie à 2 heures $\geq 11,1$ mmol/l.

Concernant le phénotype CHD, les cas diagnostiqués avaient déjà été pour la plupart documentés préalablement au recrutement. Ainsi, un patient était considéré comme CHD dans les cas suivants : diagnostic préalable d'infarctus du myocarde (IM) basé sur la présence d'au moins deux des cas suivants (douleur de poitrine de plus de 30 minutes, ECG, taux élevés d'enzymes cardiaques) ; ou histoire de revascularisation comme angioplastie ou pontage coronarien ; ou traitement pour l'angine de poitrine. Pour les patients préalablement non diagnostiqués CHD mais présentant des symptômes cliniques de CHD, un ECG et un électrocardiogramme ont permis de statuer sur la présence ou l'absence de maladie coronarienne.

Afin de privilégier les analyses par sib-pair, un groupe de familles Indo-Mauriciennes de même ethnie (origine du Nord de l'Inde) a été sélectionné sur la base suivante :

- au moins deux germains affectés par une coronaropathie précoce,
- au moins deux germains affectés par le diabète type 2 et/ou intolérants au glucose au sein d'une famille comprenant au moins un membre atteint de coronaropathie précoce.

Pour chaque famille de ces patients diabétiques et/ou CHD, ont été ajoutés au moins un germain non affecté et les parents lorsque cela était possible. Ce premier groupe représente un total de 103 familles comprenant 558 individus dont 357 patients intolérants au glucose ou diabétiques et 245 patients porteurs de complications cardio-vasculaires.

Sur l'ensemble de cette population de 558 individus Indo-Mauritiens, 22%, 2% et 40% d'entre eux sont sous traitements anti-diabétique, anti-lipidémiant et anti-hypertenseur, respectivement.

Les caractéristiques cliniques et biologiques de ces patients sont données dans les tableaux 6 et 7, en fonction de leur tolérance au glucose et de leur atteinte coronarienne, respectivement.

	IG + DNID			DNID		
	Non Affectés (n=201)	Affectés (n=357)	P ^a	NonAffectés (n=313)	Affectés (n=245)	P ^a
Sexe (M/F)	113/88	189/168	NS	165/148	137/108	NS
Age (ans)	49 ± 11	51 ± 11	0,01	49 ± 11	52 ± 11	0,0004
Age diagnostic DNID (ans)	/	46 ± 12	/	/	46 ± 12	/
IM + CHD (N/O)	128/73	185/172	0,007	210/103	103/142	<0,0001
IM (N/O)	160/41	254/103	0,03	254/59	160/85	<0,0001
Age diagnostic IM (ans)	45 ± 7	46 ± 9	NS	46 ± 9	46 ± 8	NS
Glycémie à jeun (mmol/l)	4,9 (4,4-5,6)	6,4 (4,8-12,6)	<0,0001	5,0 (4,4-5,8)	7,8 (5,3-14,0)	<0,0001
Glycémie à 2 heures (mmol/l)	6,2 (4,4-7,3)	10,1 (7,9-15,1)	<0,0001	6,8 (4,7-9,9)	12,3 (8,8-19,9)	<0,0001
Insulinémie à jeun (mmol/l)	9 (3,4-20,7)	14,5 (6,3-36,7)	<0,0001	9,9 (3,5-24,7)	15,5 (6,5-39,8)	<0,0001
Insulinémie à 2 heures (mmol/l)	77,1 (24,8-192,1)	117,8 (36,6-266,1)	<0,0001	92,4 (33,1-227,6)	93,4 (24,5-226,9)	NS
IMC (kg/m²)	23,5 ± 3,8	24,8 ± 3,9	0,0001	23,9 ± 3,9	24,9 ± 3,8	0,003
Rapport taille/hanche						
Hommes	0,91 (0,83-0,96)	0,93 (0,86-1,02)	<0,0001	0,91 (0,84-0,97)	0,94 (0,87-1,03)	<0,0001
Femmes	0,81 (0,74-0,90)	0,84 (0,76-0,92)	0,007	0,81 (0,74-0,90)	0,85 (0,77-0,92)	0,0002
PAS (mmHg)	129 ± 24	137 ± 25	0,0004	130 ± 23	139 ± 29	<0,0001
PAD (mmHg)	81 ± 12	83 ± 12	NS	81 ± 12	84 ± 12	0,03
Cholestérol total (mmol/L)	5,1 (3,9-6,5)	5,2 (4,1-6,6)	0,01	5,1 (4,0-6,4)	5,3 (4,0-6,6)	0,01
LDL cholestérol (mmol/l)	3,4 (2,4-4,6)	3,5 (2,4-4,8)	NS	3,4 (2,4-4,6)	3,5 (2,4-4,8)	NS
Triglycérides (mmol/l)	1,3 (0,7-2,9)	1,6 (0,8-3,3)	<0,0001	1,3 (0,7-2,9)	1,6 (0,9-3,4)	<0,0001

^a Test Chi² pour les variables qualitatives ; Variables quantitatives : test Anova : moyenne ± DS ou test Kruskal-Wallis quand variables ne suivent pas une loi normale : médiane (min-max) ; ^b Consommation : 0=absente ; 1=occasionnelle ; 2=modérée ; 3=grande ; ^c Tabagisme : 0=absent ; 1=ex-fumeur ; 2=fumeur

Tableau 6: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients Indo-Mauritiens sélectionnés selon statut IG et/ou diabète type 2

	CHD			IM		
	Non Affectés (n=313)	Affectés (n=245)	P ^a	NonAffectés (n=414)	Affectés (n=144)	P ^a
Sexe (M/F)	124/189	178/67	<0,0001	176/238	126/18	<0,0001
Age (ans)	49 ± 12	53 ± 10	<0,0001	50 ± 12	51 ± 9	NS
Age diagnostic DNID (ans)	45 ± 11	46 ± 12	NS	46 ± 12	45 ± 10	NS
Age diagnostic IM (ans)	/	46 ± 9	/	/	46 ± 9	/
Glycémie à jeun (mmol/l)	5,3 (4,5-9,8)	5,8 (4,6-11,9)	0,0005	5,4 (4,5-10,0)	5,8 (4,5-12,3)	0,02
Glycémie à 2 heures (mmol/l)	7,6 (5,0-12,0)	7,7 (4,7-13,8)	NS	7,5 (5,0-12,4)	7,9 (4,7-13,7)	NS
Insulinémie à jeun (mmol/l)	11,3 (4,4-29,5)	13,4 (5,0-36,4)	0,009	12,4 (4,6-30,2)	12,4 (5,0-36,4)	NS
Insulinémie à 2 heures (mmol/l)	90,0 (29,4-252,3)	97,3 (28,4-211,3)	NS	92,5 (30,0-226,7)	92,6 (27,6-245,6)	NS
IMC (kg/m²)	24 ± 4	25 ± 3	NS	24 ± 4	24 ± 3	NS
Rapport taille/hanche						
Hommes	0,91 (0,83-0,98)	0,93 (0,87-1,01)	<0,0001	0,92 (0,84-0,99)	0,93 (0,87-1,01)	0,03
Femmes	0,82 (0,74-0,90)	0,85 (0,77-0,94)	0,005	0,83 (0,75-0,91)	0,86 (0,77-0,94)	0,02
PAS (mmHg)	132 ± 23	136 ± 27	NS	135 ± 34	131 ± 25	NS
PAD (mmHg)	82 ± 11	83 ± 13	NS	82 ± 12	82 ± 12	NS
Cholestérol total (mmol/L)	5,1 (3,9-6,5)	5,3 (4,2-6,7)	0,0007	5,1 (4,0-6,5)	5,4 (4,3-6,9)	0,001
LDL cholestérol (mmol/l)	3,4 (2,3-4,5)	3,6 (2,5-4,9)	0,002	3,4 (2,3-4,6)	3,6 (2,6-5,0)	0,001
Triglycérides (mmol/l)	1,3 (0,7-2,8)	1,6 (0,9-3,4)	<0,0001	1,4 (0,7-3,0)	1,6 (0,9-3,4)	0,009
Consommation Alcool (0/1/2/3)^b	213/47/23/30	143/49/30/23	NS	282/66/2937	74/30/24/16	0,0006
Tabagisme ((0/1/2)^c	247/17/49	122/75/48	<0,0001	318/34/62	51/58/35	<0,0001

^a Test Chi² pour les variables qualitatives ; Variables quantitatives : test Anova : moyenne ± DS ou test Kruskal-Wallis quand variables ne suivent pas une loi normale : médiane (min-max) ; ^b Consommation : 0=absente ; 1=occasionnelle ; 2=modérée ; 3=grande ; ^c Tabagisme : 0=absent ; 1=ex-fumeur ; 2=fumeur

Tableau 7: Caractéristiques cliniques et biologiques des patients Indo-Mauritiens sélectionnés selon le statut IM et/ou CHD

L'analyse statistique des données cliniques et biologiques (Tableaux 6 et 7) révèlent les caractéristiques suivantes chez les Indo-Mauritiens :

- Dans la population générale, la distribution de la glycémie varie selon que l'on étudie ce paramètre biologique dans une population importante et génétiquement hétérogène telle que la nôtre (population Caucasienne) ou des populations restreintes, isolats humains tels que les indiens Pimas d'Amérique, ou de certaines îles de Micronésie (Stern MP, Diabetes Care, 1991). Dans des populations non homogènes sur le plan ethnique et à prévalence moyenne de diabète, cette distribution est unimodale, c'est à dire qu'il existe un continuum dans la distribution des valeurs, depuis les valeurs strictement normales jusqu'aux valeurs pathologiques. En revanche, dans une population homogène et à haut risque de diabète type 2, la distribution des glycémies est bimodale. Dans notre population de patients Indo-Mauritiens, les associations très significatives relatives aux valeurs de glycémie rendent compte d'une bimodalité de la distribution des glycémies. Cette prévalence du diabète type 2 très élevée suppose a priori une transmission génétique plus probablement " monogénique ".
- L'intolérance au glucose et le diabète type 2, fortement associés à la présence de maladie coronarienne, rend compte d'une forte prévalence de CHD dans cette population. De plus, sont observés des taux anormalement élevés d'insuline. Un déterminisme génétique pourrait être commun au développement de ces différentes pathologies par le biais de l'insulino-résistance. Par ailleurs, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinisme sont significativement mais faiblement corrélés voire non associés à la présence de CHD, suggérant que d'autres gènes sont probablement impliqués et spécifiques de la coronaropathie.
- Un excès de poids reflété par l'indice de masse corporelle est de nature à majorer l'insulino-résistance. Dans notre population de patients Indo-Mauritiens, les indices de masse corporelle se situent dans les limites normales de poids normal. De plus, tous les excès de poids ne s'accompagnent pas du même degré d'insulino-résistance. Il existe schématiquement deux types

d'excès de poids selon la répartition des graisses appréciée par le rapport taille/hanche : répartition «androïde» (si le rapport taille/hanche est supérieur à 0,90 chez l'homme ou supérieur à 0,80 chez la femme) et répartition «gynoïde». Une répartition androïde est un élément important en faveur de l'existence d'une insulino-résistance, et est aussi un marqueur d'un risque plus important d'hypertension artérielle et de complications cardio-vasculaires. Cette répartition de type «androïde» est caractéristique dans notre population et concerne les hommes aussi bien que les femmes.

- Les pressions sanguines systoliques et diastoliques sont en moyenne dans les limites normales. Cependant, les patients intolérants au glucose et/ou diabétiques tendent vers un état d'hypertension comparés aux patients non atteints. Aucune association n'est observée chez les patients CHD et/ou avec infarctus du myocarde versus les patients non atteints. L'hypertension semble ainsi ne pas être un facteur de risque majeur de CHD, bien que les valeurs de pressions sanguines soient à la limite d'un état hypertendu chez ces patients.
- Enfin, l'hypertriglycémie est fortement associée, d'une part, à l'intolérance au glucose et/ou au diabète et, d'autre part, au développement de CHD et/ou d'infarctus du myocarde.

L'ensemble de ces données cliniques et biologiques reflète dans notre population Indo-Mauritienne une forte prévalence du syndrome X métabolique associant l'insulino-résistance avec les anomalies de l'homéostasie glucidique, l'hypertension artérielle, la maladie cardio-vasculaire, les dyslipidémies et l'obésité centrale.

2.2.2.3 Détermination des génotypes

L'exploration systématique du génome a été réalisée grâce à l'utilisation de 400 marqueurs microsatellites de type poly(CA). Ces marqueurs, développés par Perkin Elmer (Applied Bio-System), sont regroupés en 28 panels de 10 à 20 marqueurs (*linkage mapping set, version 2*).

Compte tenu du grand nombre de génotypes à réaliser ($558 \times 400 = 223200$ génotypes), il est indispensable de disposer d'une technologie fiable, qui en réduisant le nombre de manipulations permettra de limiter les erreurs humaines et de réduire le coût des manipulations. La technique de "multiplexing" que nous avons utilisée répond en partie à ces préoccupations. Pour un même échantillon d'ADN, les produits d'amplification PCR des différents marqueurs d'un panel sont poolés ensemble par coprécipitation et déposés dans un même puits sur un gel de séquence. Ceci est rendu possible par l'association dans un panel de marqueurs porteurs de l'un des 3 types de molécules fluorophores (FAM, HEX et NED) et amplifiant des fragments du génome de taille différente (Figure 12).

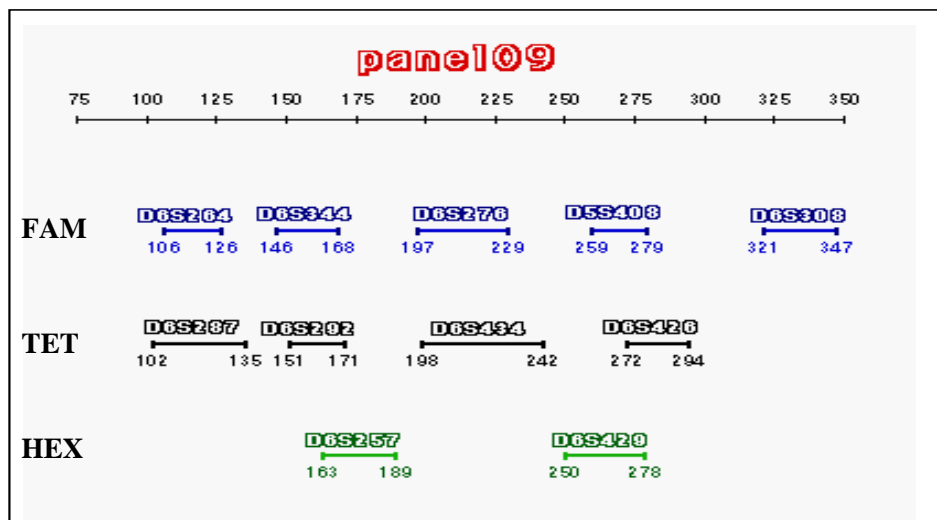


Figure 12: Description du panel 09 comprenant 11 marqueurs dans une gamme de taille de 100 à 350 pb

Certaines régions de la carte définie par Perkin Elmer sont cependant peu couvertes (écart entre 2 marqueurs > 10 cM). Des marqueurs additionnels ont donc été sélectionnés (14 marqueurs) pour combler ces régions en respectant un écart entre 2 marqueurs d'environ 10 cM.

Pour la PCR multiplexe, nous avons utilisé une Taq polymérase thermostable, la Taq GOLD de Perkin Elmer, une température d'hybridation unique pour tous les marqueurs (55°C) et un tampon réactionnel unique à concentration élevée en $MgCl_2$ (2.5 mM). La difficulté est

l'optimisation de chacune des PCR : pour la première amplification, tous les marqueurs sont à la même concentration. Par la suite, les concentrations de chacun des couples d'amorces ont été ajustées afin d'obtenir un résultat optimal (Figure 13) avant de réaliser les amplifications de l'ensemble des 558 patients.

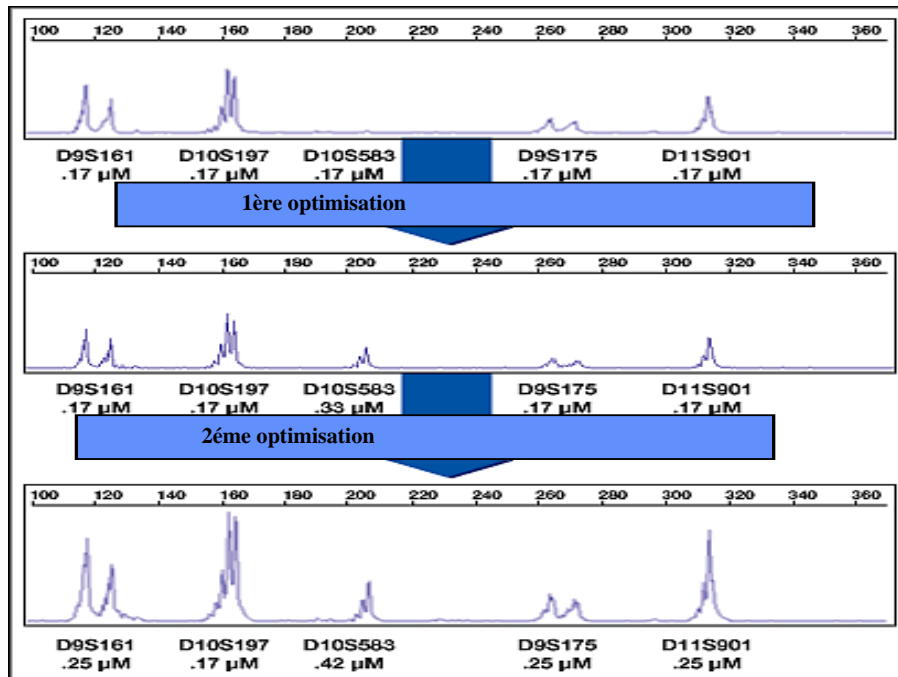


Figure 13: Cycles d'optimisation d'une PCR multiplexe

Les fragments amplifiés par PCR multiplexes et co-précipités sont séparés par électrophorèse sur séquenceur semi-automatique ABI 377. L'analyse des gels a été effectuée grâce à l'utilisation du logiciel Genescan® 3.0, puis les génotypes ont été codés et assignés avec le logiciel Genotyper® 2.0. Tous les génotypes ont été lus en double aveugle afin de réduire le nombre d'erreurs. Le logiciel Ped-check 1.1 a été utilisé pour déterminer les incompatibilités de génotypage (O'Connell JR, Am J Hum Genet, 1998).

2.2.2.4 Les analyses de liaison

Comme le diabète type 2 et ses complications cardio-vasculaires, liés à l'insulino-résistance, sont des maladies hétérogènes cliniquement et donc aussi probablement génétiquement, nous avons trié nos familles en sous-groupes plus homogènes cliniquement, en fonction de la sévérité de leur hyperglycémie et de la sévérité de leur état cardio-vasculaire. Quatre groupes principaux de paires de germains ont ainsi été constitués, ayant chacun un statut phénotypique différent : 1) DNID, 2) IG, 3) IM, 4) CHD. Les groupes IG et CHD regroupent, respectivement, les intolérants au glucose + diabétiques et les CHD + IM. Les patients intolérants au glucose ou CHD sont fortement susceptibles de développer un diabète ou un infarctus du myocarde, respectivement. La constitution de ces 2 derniers sous-groupes permet d'augmenter le nombre de paires de germains et, ainsi, la puissance des tests statistiques appliqués. Ils représentent des phénotypes dits " larges ", par comparaison aux phénotypes " stricts " indicateurs d'un état pathologique déclaré. Un excès de concordance a été recherché dans chacun de ces groupes, non seulement sur le total des paires possibles dans les fratries, mais également sur les paires indépendantes. Le tableau 8 décrit précisément chacun des principaux sous-groupes.

	Individus affectés	Fratries indépendantes	Paires de germains possibles
DNID (ou NIDDM)	245	67	298
IG	357	82	599
IM (ou MI)	144	35	52
CHD	245	79	206

NIDDM : non-insulin diabetes mellitus; MI (myocardial infarction)

Tableau 8: Description des 103 familles Indo-Mauritiennes

Afin de détecter d'autres gènes liés préférentiellement ou communément aux différentes caractéristiques du syndrome X métabolique, d'autres sous-groupes relatifs à des traits qualitatifs et/ou quantitatifs ont également été constitués (Tableau 9 et 10). La constitution de sous-groupes de phénotypes catégorisés (Tableau 10) permet, d'une part, de tenir compte des facteurs de risque déterminés de développement et de la sévérité de la maladie et, d'autre part, d'augmenter la robustesse des analyses statistiques lorsque les variables quantitatives ne suivent pas une distribution normale. Pour ces dernières utilisées dans les sous-groupes de phénotypes quantitatifs (Tableau 9), le Z-score a également été utilisé afin d'augmenter la puissance des tests statistiques appliqués. Il correspond à la déviation standard de la valeur d'une variable donnée par comparaison avec la valeur moyenne observée dans une population donnée et selon le sexe si nécessaire.

Phénotypes qualitatifs	HTA (hypertension) ou HBP (High Blood pressure) 0 = non atteint 1 = affecté si histoire d'HTA ou si PAS > 140 mmHg et/ou PAD > 90 mmHg
	IRS (insulino-résistance) Statuts non atteint (0) et atteint (1) déterminés en fonction du sexe et selon 3 classes de caractères : - des mesures anthropométriques (IMC, rapport taille/hanche, taille) - le profil lipidique (triglycérides, HDL cholestérol, traitement lipides) - l'état d'insulino-résistance (IG ou DNID, taux d'insuline, HOMA, traitement diabète). 0 = non atteint 1 = atteint si au moins 2 classes positives présentes
Phénotypes quantitatifs	Taille (T), Rapport taille/hanche (T/H ou WHR), Indice de masse corporelle (IMC ou BMI), Créatininémie, Uricémie, AgeDNID, AgeCHD, SexAgeCHD, AgeIM, SexAgeIM Z-score
	HDLcorr, LDLcorr, TTcorr, TRIGLYcorr, Rapport HDLsTRIGLY Valeurs plasmatiques corrigées selon l'âge, le sexe, la consommation d'alcool, le tabagisme et le traitement du diabète. Les individus sous traitement des lipides ont été supprimés. Z-score

WHR : waist to hip ratio ; BMI : body mass index ; TT : cholestérol total ; TRIGLY : triglycérides

Tableau 9: Descriptif des phénotypes qualitatifs et quantitatifs

Phénotypes qualitatifs catégorisés	IGDNIDcat 1 = non affecté 2 = IG 3 = DNID	CHDIMcat 1 = non affecté 2 = CHD 3 = IM
	DiabHD 1 = autre 2 = si IRS ou IG ou DNID 3 = si (IRS ou IG ou DNID) et CHD 4 = si (IRS ou IG ou DNID) et (CHD et IM)	
	AlcoolCons 0 = jamais 1 = consommation d'alcool 1 fois par semaine 2 = consommation d'alcool 2-3 fois par semaine 3 = consommation d'alcool plus de 3 fois par semaine	
	Tabac1 0 = jamais 1 = dans le passé 2 = fumeur	Tabac2 0 = non fumeur ou dans le passé 1 = fumeur
Phénotypes quantitatifs catégorisés	Tcat, T/Hcat, IMCcat Statut catégorisé en déciles selon l'âge et le sexe	
	AgeCHDcat, AgeIMcat Statut catégorisé en déciles selon l'âge et le sexe	AgeDNIDcat Statut catégorisé en déciles selon l'âge
	HDLcorrcat, LDLcorrcat, TTcorrcat, Triglycorrcat, Rapport HDL/TRIGLYcorrcat Valeurs plasmatiques corrigées selon la consommation d'alcool, le tabagisme et le traitement du diabète et catégorisées en déciles selon l'âge et le sexe. Les individus sous traitement antilipidémiant ont été supprimés	
	HDLcat, LDLcat, TTcat, TRIGLYcat, Rapport HDLsTRIGLYcat Valeurs plasmatiques catégorisées en déciles par âge et selon le sexe	
HDLrecatNDiab Valeurs plasmatiques catégorisées en déciles par âge et selon le sexe chez les individus non diabétiques		

Tableau 10: Descriptif des phénotypes catégorisés

Les analyses de liaison ont été réalisées grâce essentiellement à l'utilisation de deux méthodes d'analyse statistique : Mls (Maximum Lod Score) et Mlb (Maximum Likelihood Binomial). Ces méthodes sont respectivement mises en oeuvre dans les logiciels Mapmaker/Sibs V2.1 et Genehunter V1.0. La première méthode (Kruglyak L, Am J Hum Genet, 1995) est un rapport du maximum de vraisemblance (Mls) sur 3 paramètres. La vraisemblance est maximisée comme fonction des probabilités IBD $p(\text{ibd}=0)$, $p(\text{ibd}=1)$ et $p(\text{ibd}=2)$, (z_0 , z_1 et z_2 respectivement) et les résultats sont comparés aux valeurs de vraisemblance sous l'hypothèse nulle de non liaison (0,25, 0,5 et 0,25 respectivement). Ce rapport suit une fonction de chi-2 avec 1 et 2 degré(s) de liberté. Il y a indication de liaison lorsqu'une déviation significative des valeurs de vraisemblance observées par rapport à celles attendues sous l'hypothèse nulle est obtenue. Alors que les parents n'ont pu être inclus dans l'étude, cette méthode permet d'estimer les probabilités de tous les génotypes parentaux possibles quand un nombre suffisant de paires de germains le permettait. Le test statistique de la seconde méthode (Abel L, Am J Hum Genet, 1998) estime pour une catégorie la proportion moyenne d'allèles identiques donnée par descendance (π). Cette proportion est attendue égale à 0,5 en cas de transmission mendélienne indépendante du statut. Un π significativement supérieur à 0,5 est pris pour indication de liaison. Ce test est basé sur un rapport de vraisemblance suivant une fonction de chi-2 avec 1 et 2 degré(s) de liberté.

2.2.3 Résultats

Tous les individus ont été génotypés à l'aide des 400 marqueurs du set initial. Des PCR avaient échoué et il a été nécessaire parfois de refaire complètement les manipulations (PCR, dépôt, gels de séquence). La distance moyenne entre les marqueurs est de 9,24 cM. Des incompatibilités ont été recherchées à l'aide du logiciel Ped-Check 1.1 (O'Connell JR, Am J Hum

Genet, 1998). Ainsi, les 18 marqueurs du chromosome X ont été prioritairement analysés afin de déterminer les anomalies de transmission mendélienne. De la sélection initiale, 3 familles ont été supprimées des analyses pour incompatibilités récurrentes. Les tests statistiques ont donc été appliqués à l'étude de 99 familles complexes comprenant 535 patients.

Sont présentés les meilleurs résultats obtenus par comparaison des différentes méthodes statistiques (Mls et Mlb). Les tableaux rendent compte, de façon détaillée, des indications de liaisons pour chaque phénotype en donnant les lod-scores, les p-values, le locus le plus proche ou dans un intervalle de marqueurs et leur position en cM. Pour une meilleure clarté de présentation de ces résultats, une seule forme de trait (qualitatif, Z-score ou catégorisé) est prise en compte pour un phénotype donné. Par ailleurs pour les mêmes raisons, les indications de liaison faibles ne sont pas, pour certaines, présentées dans les tableaux et figures. Les analyses statistiques, menées en premier lieu sur les 4 traits qualitatifs principaux (IG, DNID, CHD et IM), ont révélé des régions de liaison sur les chromosomes 3 et 16 relatives au développement de CHD et sur le chromosome 8 relative à la présence de diabète type 2 (résultats non montrés). D'autres marqueurs proches de ces loci ont été étudiés afin, d'une part, de confirmer nos résultats et, d'autre part, pour débiter la technique dite de « Fine Mapping » dont le but est de réduire l'intervalle génétique de liaison à moins de 1 cM. Ont ainsi été utilisés trois sets de 10, 9, et 10 marqueurs microsatellites additionnels au niveau des régions chromosomiques 3q27, 8q23 et 16pter-p13, respectivement. L'analyse de ces marqueurs microsatellites additionnels a confirmé la liaison des régions des chromosomes 3, 8 et 16 avec le diabète ou la maladie coronarienne. Nos études de liaison ont mis en évidence d'autres régions chromosomiques intéressantes. Cependant, actuellement, aucun marqueur microsatellite additionnel dans ces régions n'a été étudié. Ces résultats restent donc à confirmer.

Une indication de liaison avec la présence de CHD a été détectée sur le chromosome 3q27 (Tableau 11, Figure 14). Cette indication de liaison était plus significative pour le phénotype

strict IM (MM1b : lod-score=2.19, p-value=0.0007 ; MM1s : lod-score=2.37, p-value=0.00089). Aucun autre trait clinique ou biologique n'était lié dans cette région. Dans la région du chromosome 16pter-p13, une indication de liaison est également observée en présence de CHD (Tableau 11, Figure 15). Cette même région est fortement liée avec les taux plasmatiques de HDL cholestérol. L'intensité de cette liaison diminue lorsque l'analyse statistique des concentrations de HDL cholestérol est effectuée uniquement chez les individus non diabétiques (HDLrecatNDiab). D'autres indications de liaison ont été détectées avec le développement d'IM seul dans la région du chromosome 13pter-p13 à 12.9 cM (D13S175) (MM1b : lod-score=1.85, p-value=0.0017 ; MM1s : lod-score=1.84, p-value=0.0031) et sur le chromosome 19p13.1 à 38.05 cM (D19S221) (MM1b : lod-score=1.54, p-value=0.0038 ; MM1s : lod-score=1.79, p-value=0.0036). Deux régions du chromosome 11 ont été liées au développement d'IM, l'une en pter (D11S1338 à 17 CM environ, 11p15.5) et, l'autre en qter (11q21-q23, D11S898, 148.13 cM) (MM1b : lod-score=1.556, p-value=0.0037 ; MM1s : lod-score=1.75, p-value=0.004). Le pic de liaison en pter est d'intensité légèrement inférieure à celle du pic en qter.

Sur le chromosome 8q23, une indication de liaison a été observée en présence de diabète type 2 (Tableau 11, Figure 16). Des indications de liaison pour l'âge d'IM, les taux plasmatiques de LDL cholestérol et le phénotype déterminé d'insulino-résistance chevauchent cette région. Ont également été détectées des indications de liaison faibles pour l'hypertension à 127.05 cM (D8S1705-D8S270) (MM1b : lod-score=0.94, p-value=0.018) et en présence de CHD à 137.62 (D8S1699) (MM1b : lod-score=0.81, p-value=0.02 ; MM1s : lod-score=1.29, p-value=0.12). Plusieurs indications de liaison chevauchantes dans la région 16p11 ont été observées par rapport au développement de l'intolérance au glucose et de diabète type 2, et du phénotype déterminé d'insulino-résistance (Tableau 11, Figure 17). Quant aux concentrations plasmatiques d'HDL cholestérol, celles-ci restent liées dans la même région pour l'ensemble des sujets diabétiques et/ou non diabétiques. Dans une autre région du chromosome 3, un résultat positif d'indication de

liaison est détecté avec le développement de diabète type 2 en 3q24-q25 (Tableau 11, Figure 18). Cette même région tend à être liée avec l'âge de diagnostic de diabète (D3S1292-D3S1569, 167.86 cM) (MM1b : lod-score=0.89, p-value=0.021).

L'analyse de traits quantitatifs relatifs à des taux plasmatiques ou à l'âge de diagnostic (QTL) et de l'hypertension a révélé plusieurs autres régions de liaison. Ainsi, sont observées des indications de liaison dans la région 1p35-p34 pour l'âge de diagnostic de CHD et de cholestérol total (Tableau 12, Figure 19), dans la région 1p22-p21 pour le cholestérol total et le HDL cholestérol (Tableau 12, Figure 20) et dans la région 4p14-p13 quant au phénotype déterminé d'insulino-résistance, de cholestérol total et de LDL cholestérol (Tableau 12, Figure 21). Cependant, dans ces régions, aucune indication de liaison n'est détectée avec le développement d'anomalies de tolérance au glucose ou de maladie coronarienne. Sur le chromosome 3 dans la région 3p12-p11, des indications de liaison chevauchantes ont été mises en évidence avec le taux plasmatique d'HDL cholestérol chez les individus non diabétiques et l'hypertension (Tableau 12, Figure 22). Quand, à la fois, les patients diabétiques type 2 et non diabétiques sont pris en compte, les taux plasmatiques d'HDL cholestérol restent liés dans cette région mais de façon moins significative (D3S1300-D3S1285, 113.01 cM) (MM1b : lod-score=0.897, p-value=0.021). Pour le phénotype d'hypertension seul, une indication de liaison a été détectée dans la région chromosomique 11q13.1-q14.3 à 112.78 cM (D11S1314) (MM1b : lod-score=1.23, p-value=0.0086 ; MM1s : lod-score=1.578, p-value=0.006). La région 10q23-q24 montre une indication de liaison avec le cholestérol total et l'âge de diagnostic de CHD (Tableau 12, Figure 23). Une tendance d'indication de liaison avec la présence de CHD est, par ailleurs, observée dans la même région (D10S192, 137.04 cM) (MM1b : lod-score=0.66, p-value=0.04 ; MM1s : lod-score=2.19, p-value=0.0013). Dans la région pter-p13 du chromosome 12, sont révélées des indications de liaison avec l'âge de diagnostic de CHD et d'IM (Tableau 12, Figure 24). Cette même région reste liée mais peu significativement au développement de CHD et,

particulièrement, d'IM (D12S352-D12S99, 3.16cM) (MM1b : lod-score=0.79, p-value=0.028 ;
MM1s : lod-score=1.50, p-value=0.007).

Tableau 11: Résultats des analyses de liaison multi-point avec CHD et diabète type 2

Localisation chromosomique	Position (cM)	Locus	Phénotype	Méthode statistique		MMIs	
				MMIb Lod-score	p-value	Lod-score	p-value
3q27 *	220.74	D3S1565	CHDIMcat	1.66	0.0028	/	/
16p13-pter *	8.69	D16S3027	CHD	2.06	0.001	3.03	0.00018
	14.95	D16S423	HDLcat	2.66	0.0002	/	/
8q23 *	119.53	D8S279	AgeIMcat	2.13	0.0009	/	/
	124.41	D8S1705	DNID	1.24	0.008	2.59	0.0005
	127.16	D8S270	LDLcorrcat	1.32	0.0068	/	/
	140.30	D8S267	IRS	1.41	0.005	1.90	0.0027
16p11	48.52	D16S3103	HDLrecatNDiab	1.399	0.0056	/	/
	52.90	D163041	DNID	1.32	0.0067	1.55	0.0065
	52.90	D163041	IG	1.21	0.0090	0.97	0.0278
	68.85	D16S415	IRS	2.65	0.0002	2.13	0.0016
3q25-q24	164.85	D3S1292-D3S1569	DNID	1.74	0.0023	2.03	0.0020

* Des marqueurs microsatellite additionnels analysés dans ces régions ont confirmé les indications de liaison

Tableau 12: Résultats des analyses de liaison multi-point d'autres régions chromosomiques

Localisation chromosomique	Position (cM)	Locus ou intervalle	Phénotype	Méthode statistique		MIs	
				Mlb Lod-score	p-value	Lod-score	p-value
1p34-p35	51.97	D1S2697-D1S199	ZsexAgeCHD	2.057	0.0010	/	/
	53.91	D1S2697-D1S199	TTcat	1.49	0.0044	/	/
1p21-p22	116.75	D1S2890	HDLcorrcat	1.25	0.0081	/	/
	121.20	D1S230	TTcorrcat	1.227	0.0087	/	/
3p11-p12	101.25	D3S1566-D3S1271	HDLrecatNDiab	1.687	0.0027	/	/
	107.83-120.77	D3S1566-D3S1271	HBP	1.64	0.0029	0.94	0.030
4p13-p14	44.95	D4S419	TTcat	1.93	0.0014	/	/
	47.29	D4S419	LDLcat	1.77	0.0021	/	/
	47.29	D4S419	IRS	2.12	0.00088	2.67	0.0004
10q24-q23	130.61		TTcat	2.019	0.0012	/	/
	137.04		ZsexAgeCHD	2.81	0.0002	/	/
12p13-pter	6.32	D12S352-D12S99	ZsexAgeIM	1.72	0.0024	/	/
	17.39	D12S352-D12S99	ZsexAgeCHD	2.71	0.0002	/	/

Figure 14: Courbe de l'analyse multi-point sur le chromosome 3 (CHD)

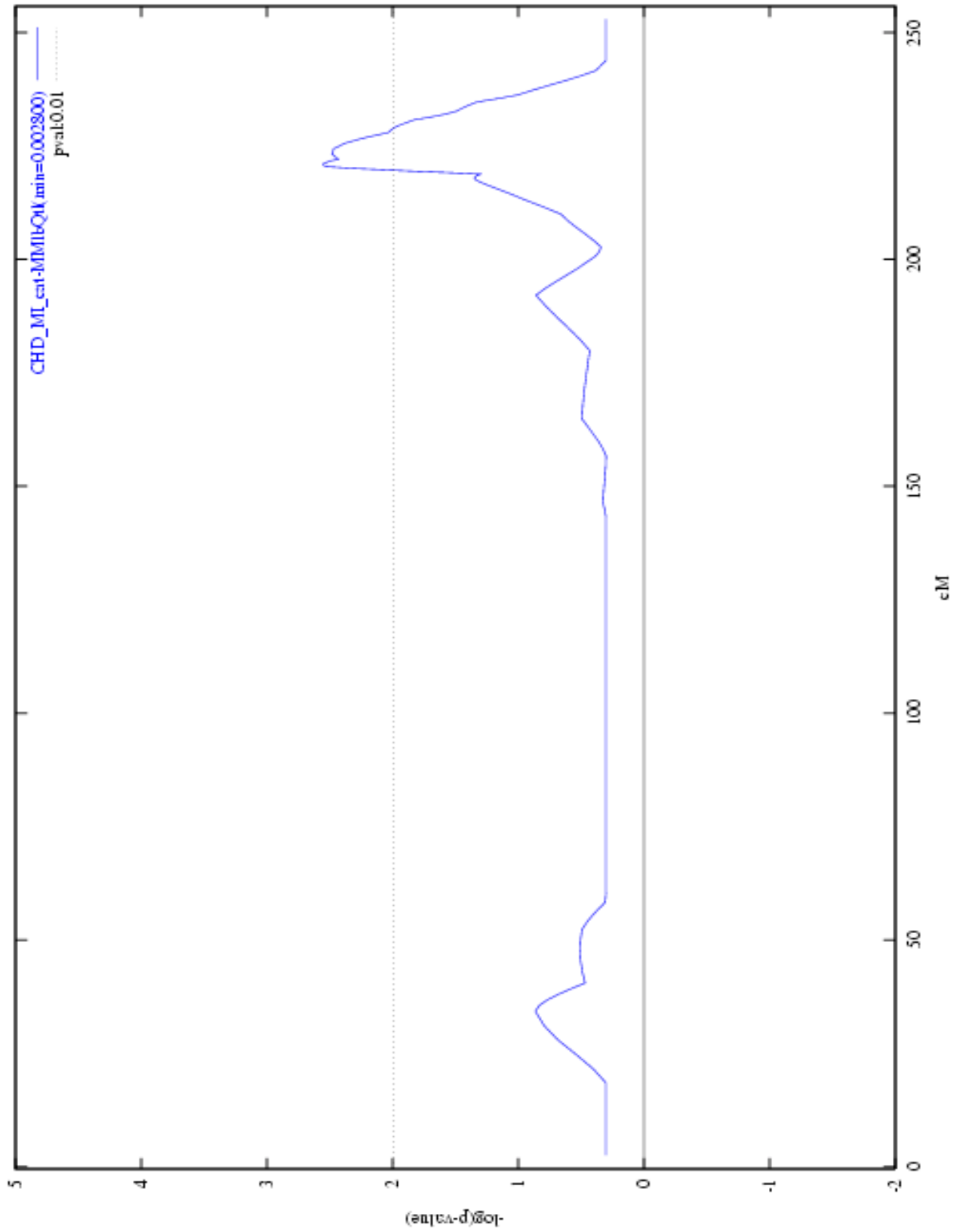


Figure 15: Courbe de l'analyse multi-point sur le chromosome 16 (CHD)

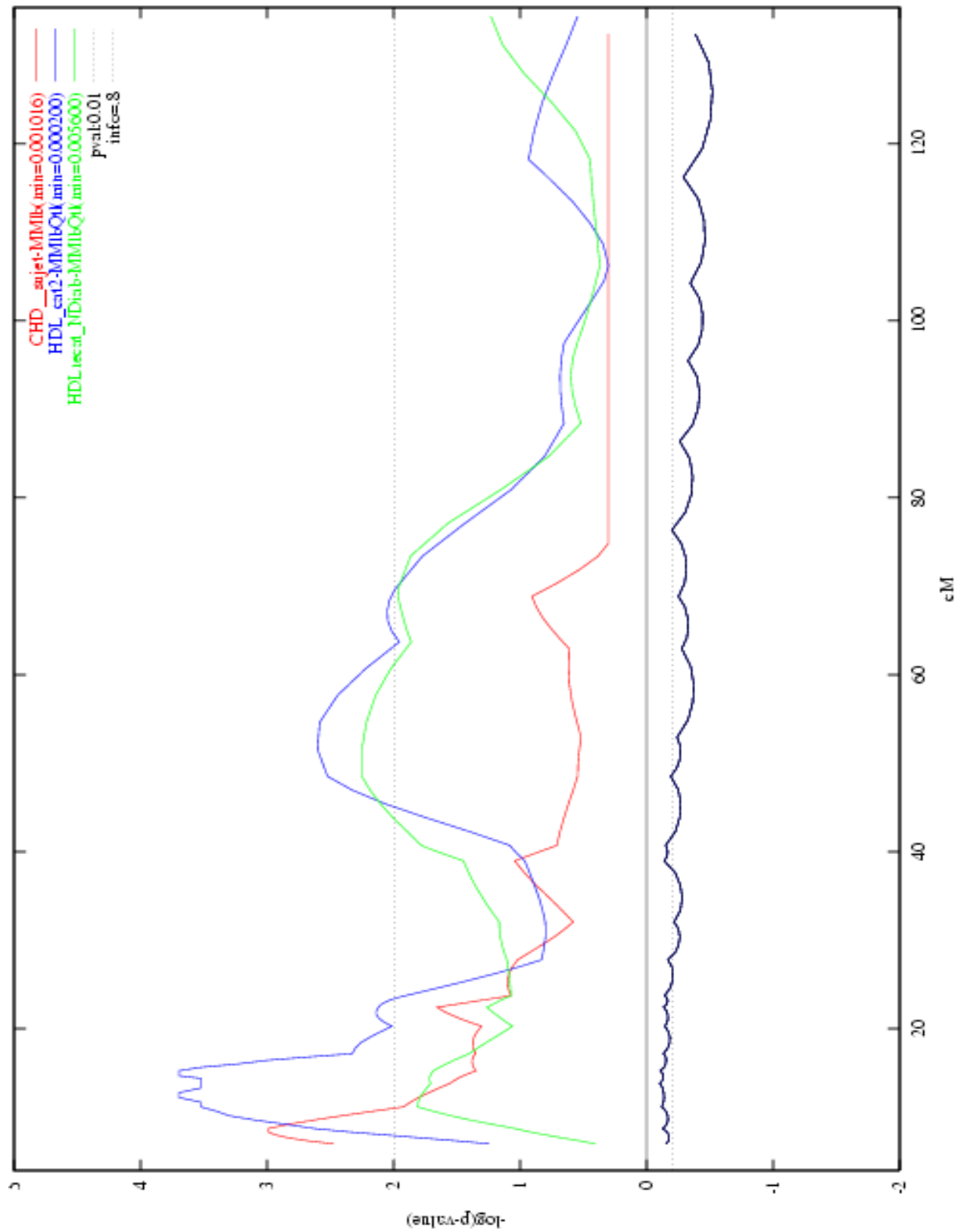


Figure 16: Courbe de l'analyse multi-point sur le chromosome 8 (DNID)

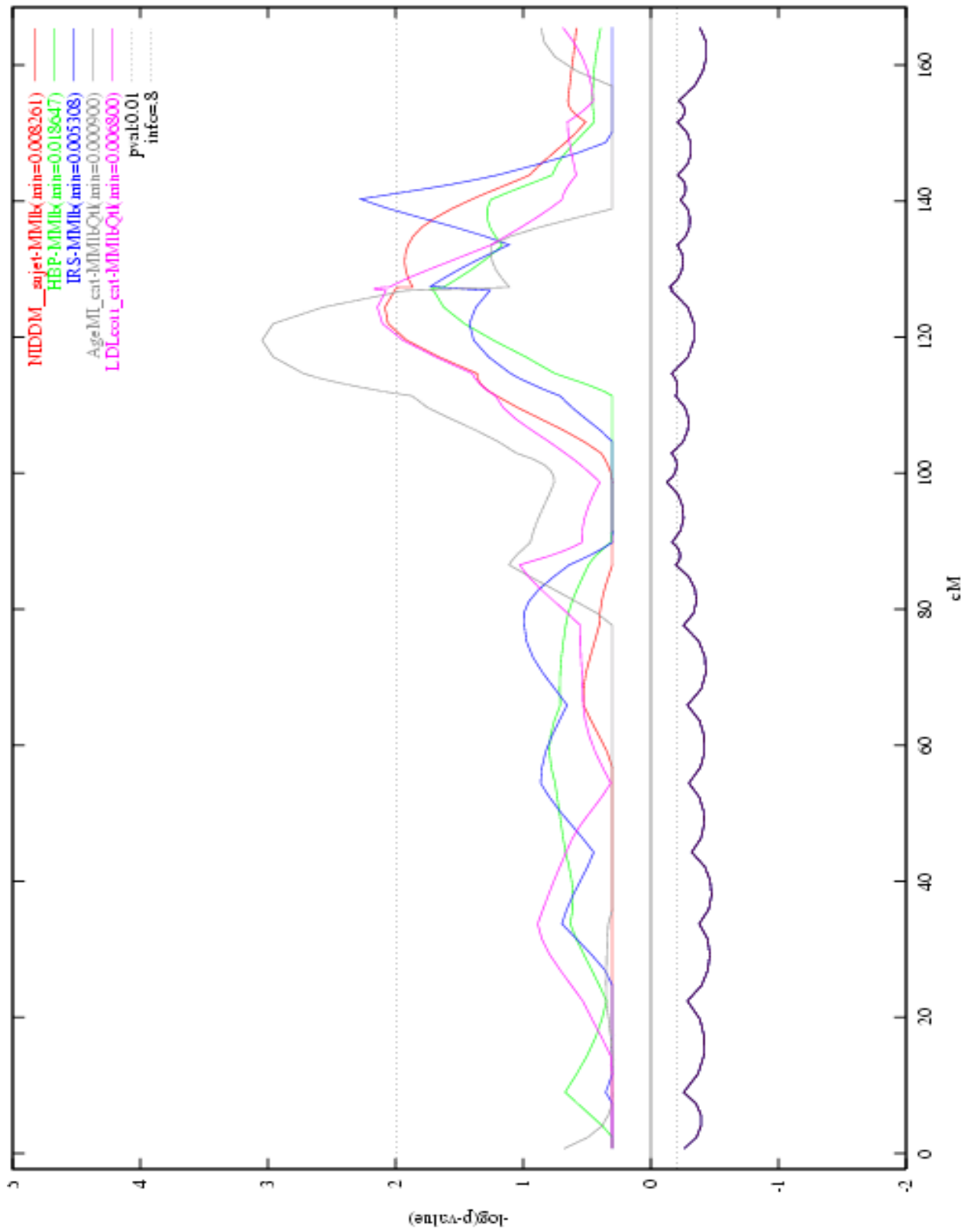


Figure 17: Courbe d'analyse de liaison multi-point dans la région 16p11

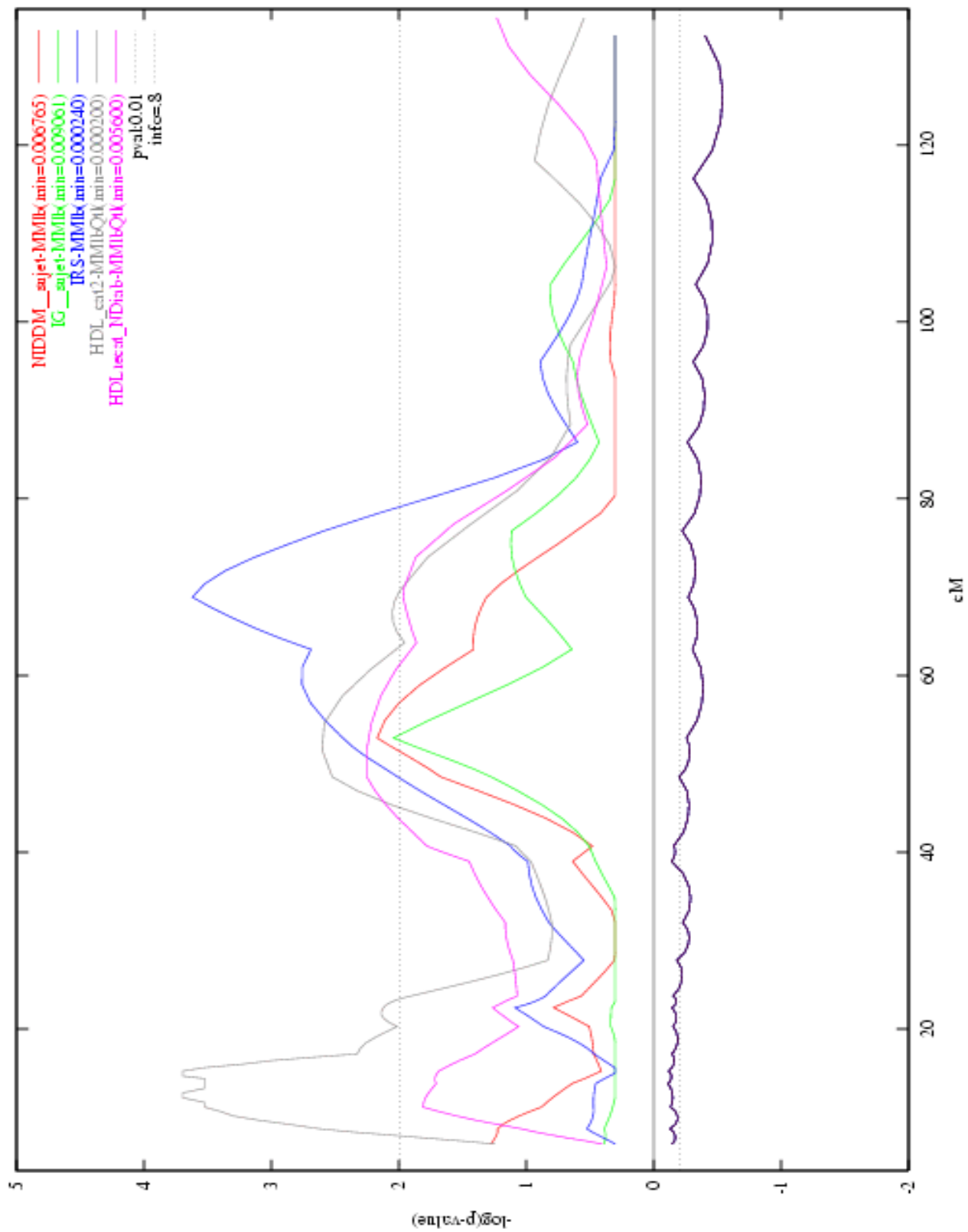


Figure 18: Courbe d'analyse multi-point dans la région 3q24-q25 (DNID)

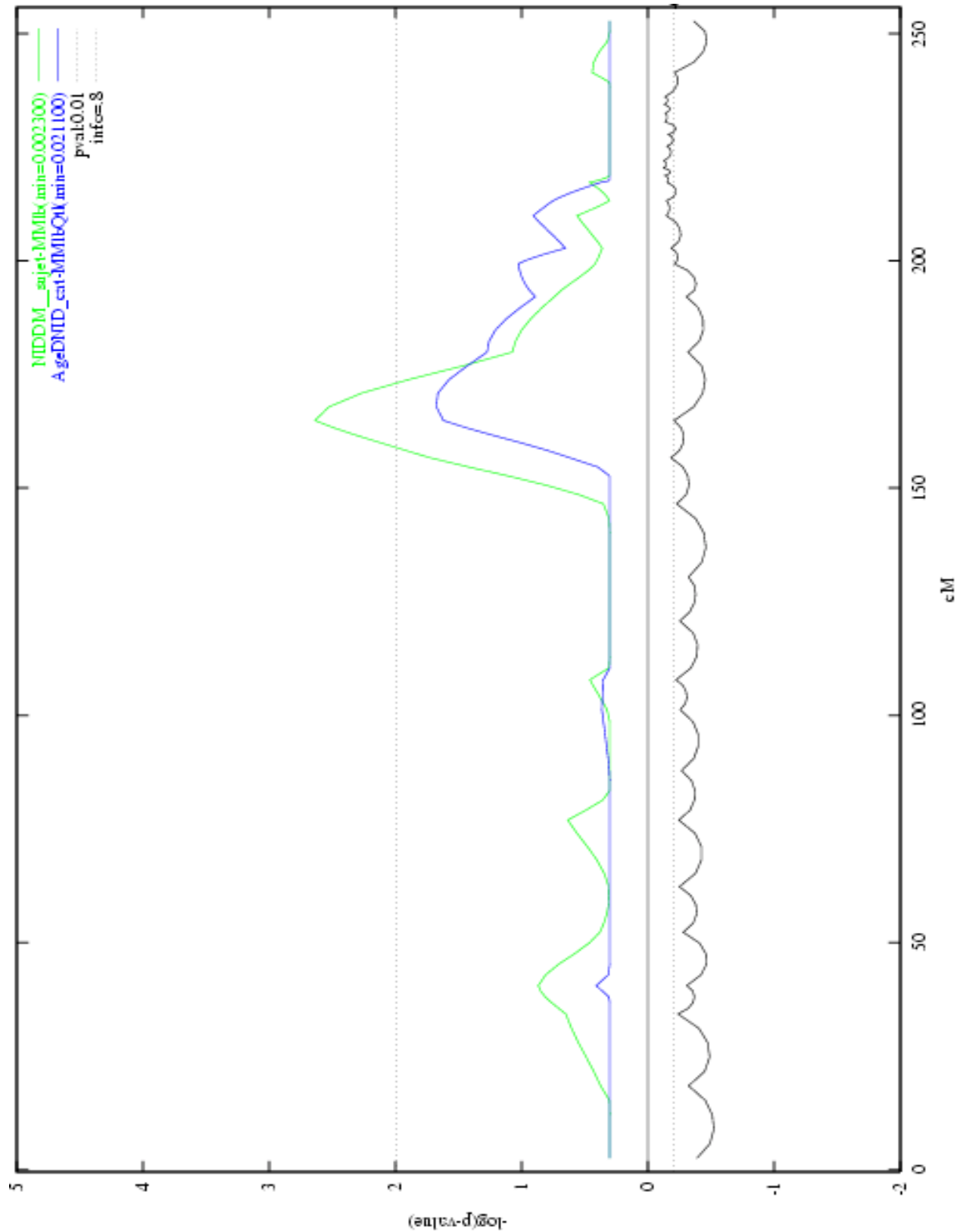


Figure 19: Courbe d'analyse multi-point dans la région chromosomique 1p35-p34

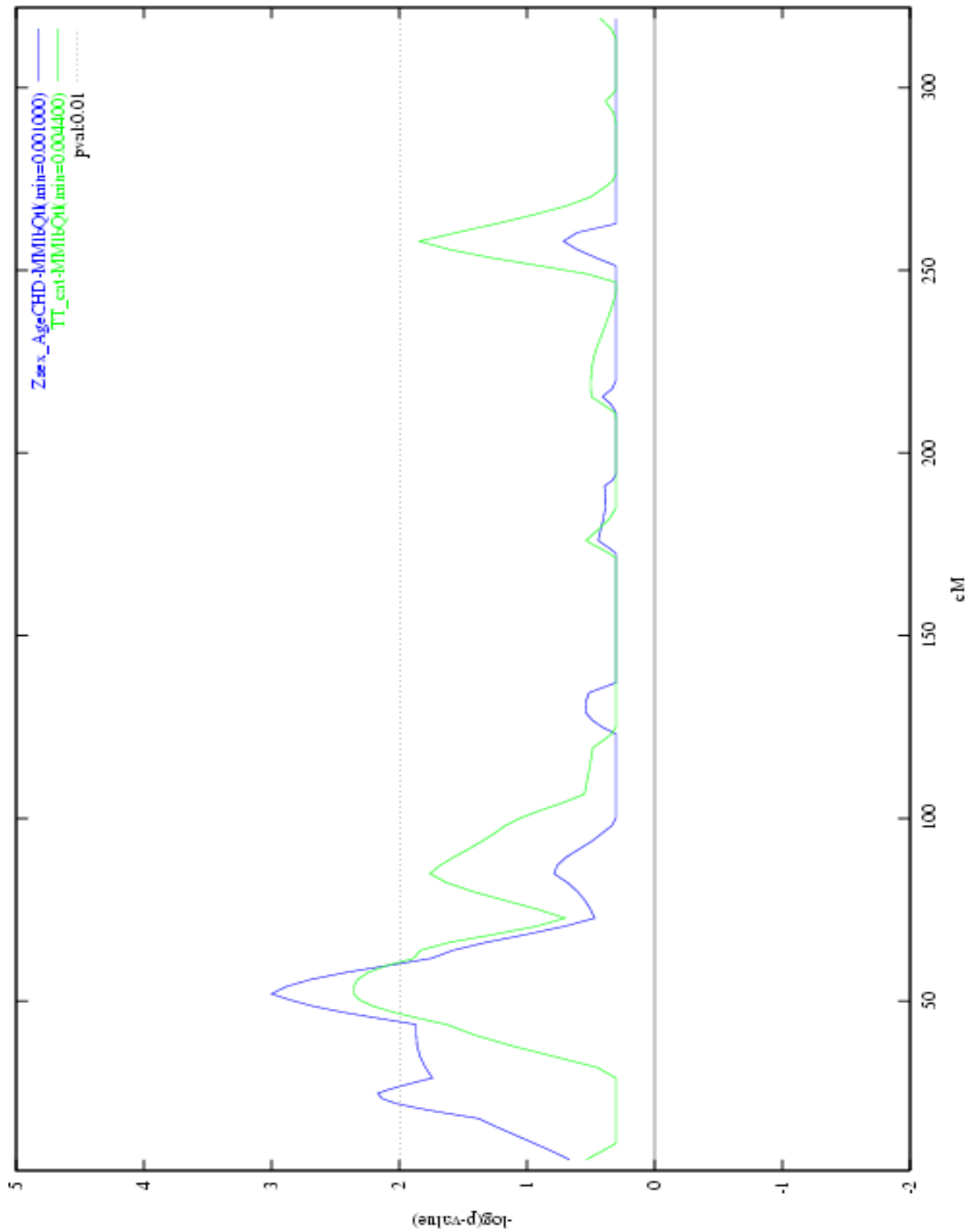


Figure 20: Courbe d'analyse multi-point dans la région chromosomique 1p22-p21

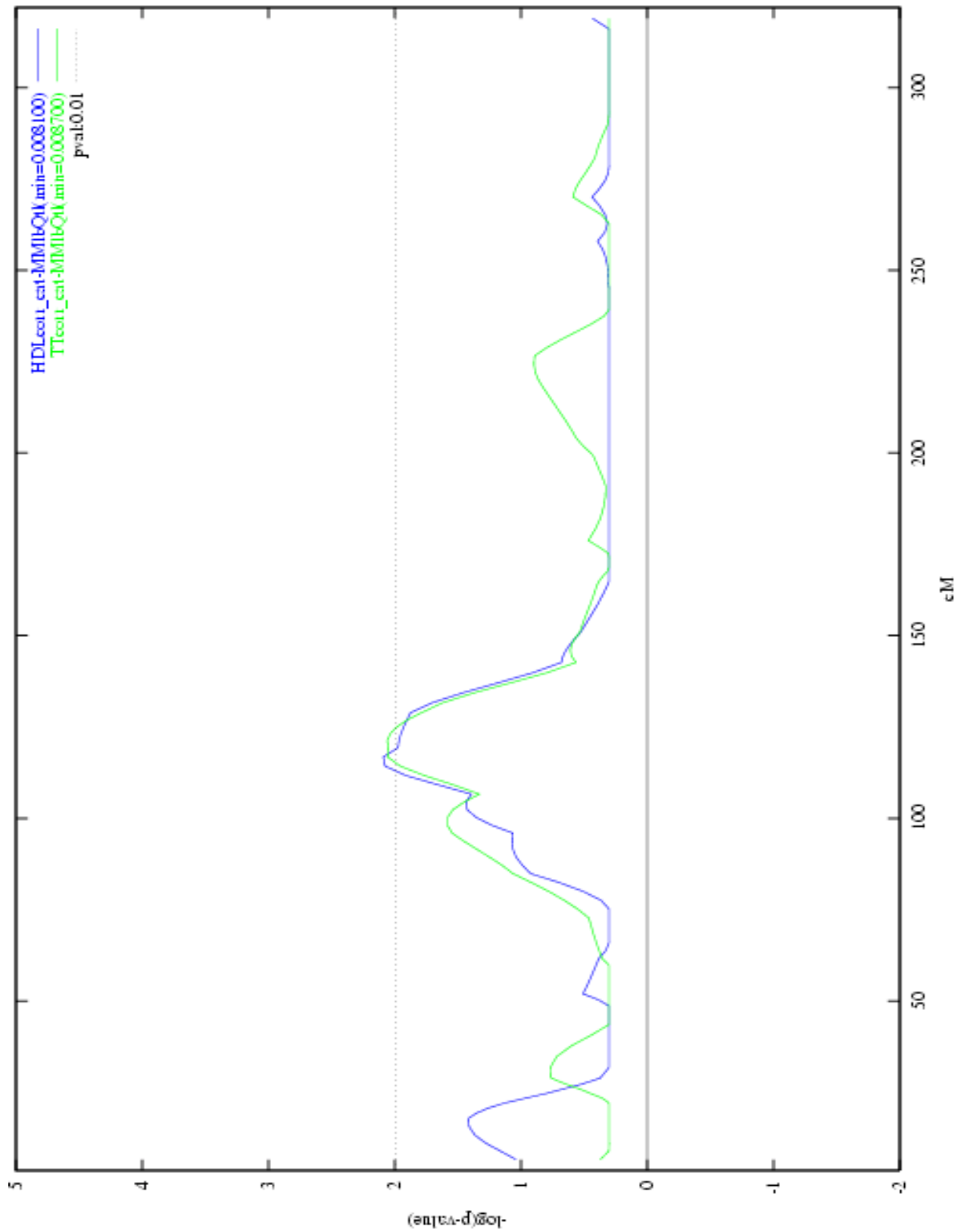


Figure 21: Courbe d'analyse multi-point du chromosome 4

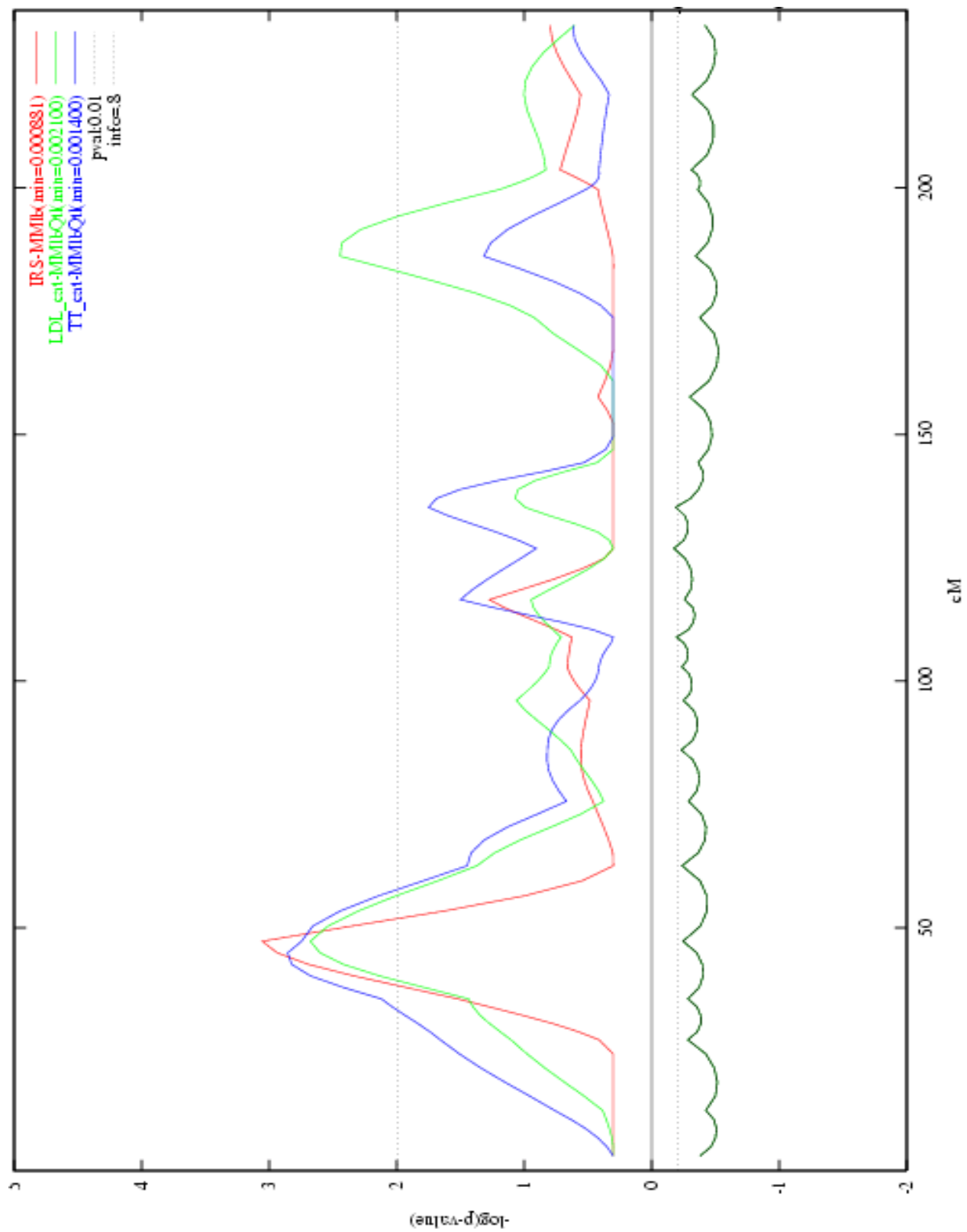


Figure 22: Courbe d'analyse multi-point dans la région 3p12-p11

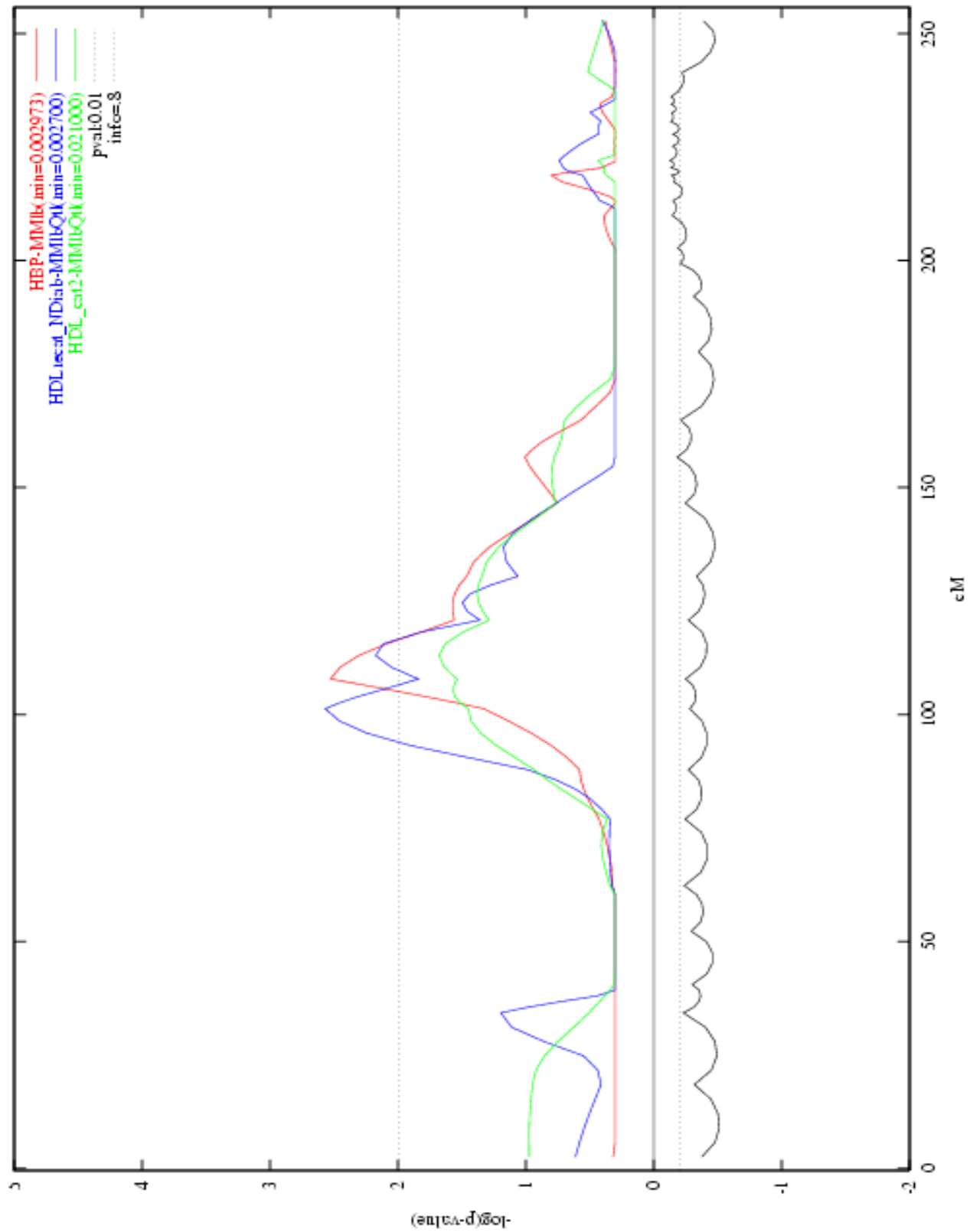


Figure 23: Courbe d'analyse multi-point du chromosome 10

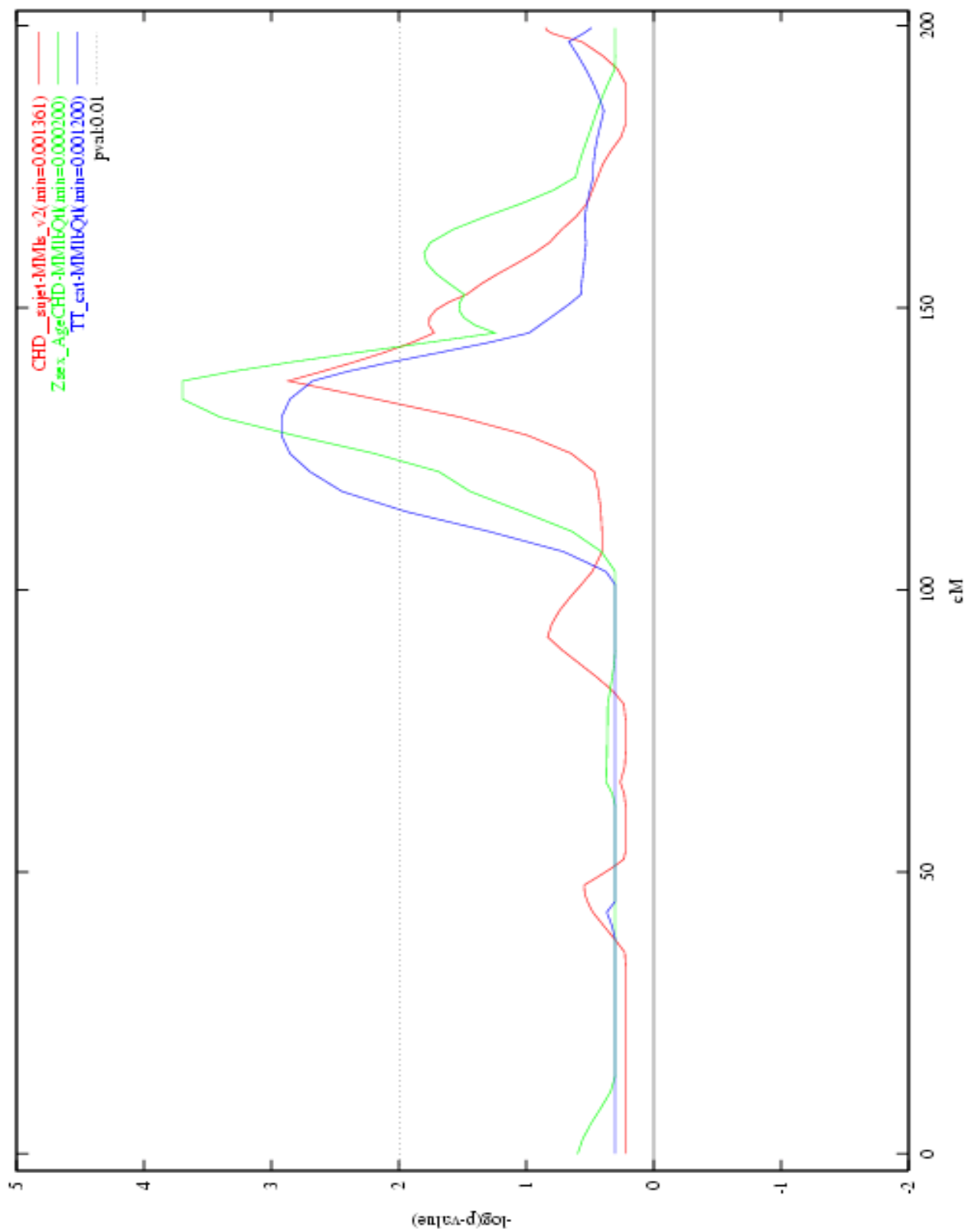
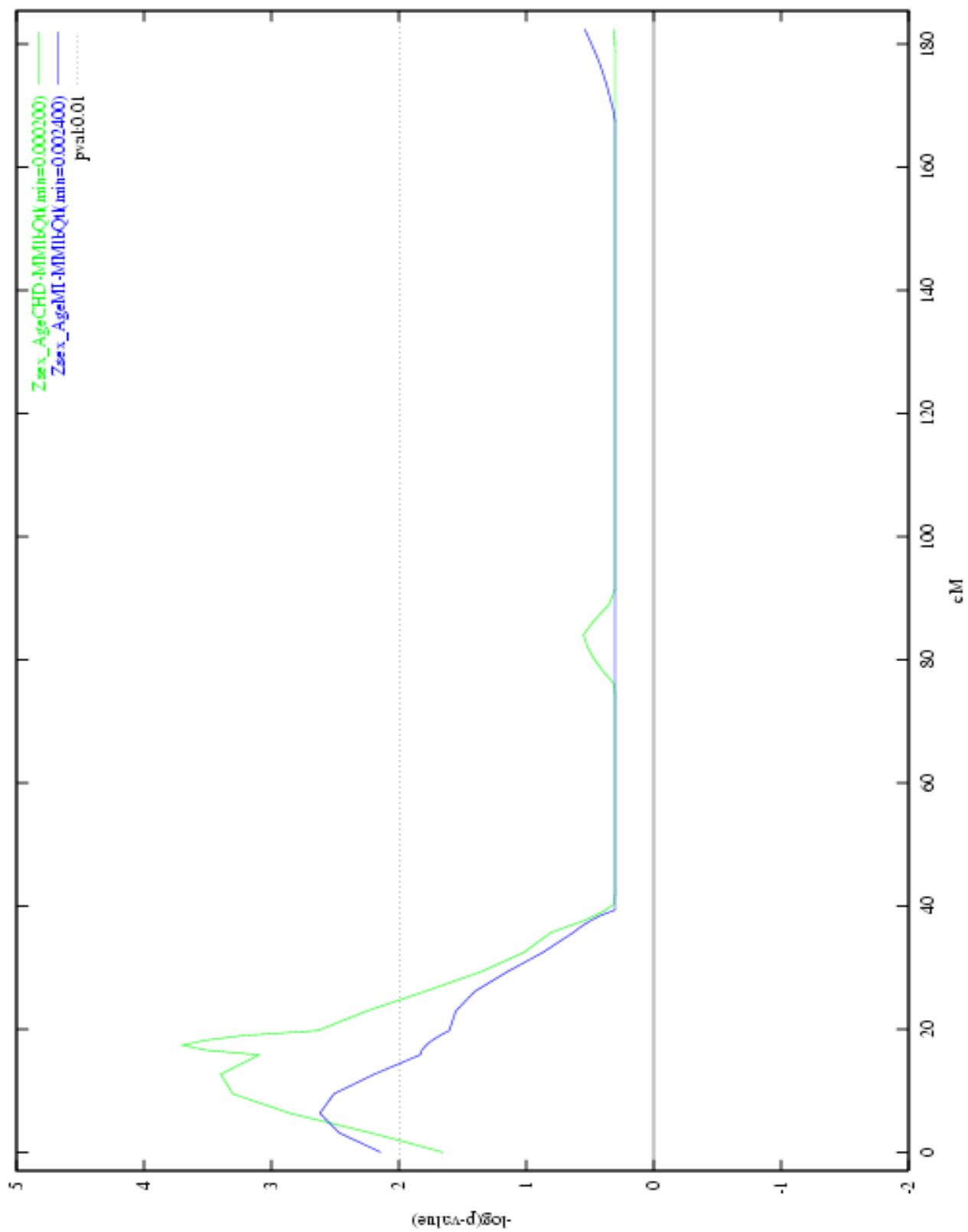


Figure 24: Courbe d'analyse de liaison du chromosome 12



3 Discussion générale et perspectives

Le diabète et ses complications cardio-vasculaires sont des maladies héréditaires comme en témoigne la concordance pour l'affection des jumeaux monozygotes ou l'agrégation familiale de ces pathologies. L'étude de ces maladies reste cependant difficile en raison de leur complexité. En effet, les généticiens dans leur recherche de gènes de susceptibilité se heurtent à de nombreuses difficultés propres aux maladies multifactorielles où facteurs génétiques et facteurs d'environnement sont étroitement intriqués dans l'expression clinique de la maladie.

Le diabète, une maladie complexe à étudier génétiquement

Le problème le plus crucial est l'hétérogénéité du diabète. Celle-ci se retrouve à tous les niveaux : hétérogénéité clinique avec grande variabilité dans le degré d'hyperglycémie et dans le contrôle de l'équilibre glycémique, la présence d'un surpoids ou non, un âge de survenue du diabète plus ou moins tôt dans la vie ; hétérogénéité métabolique avec prédominance d'une insulino-résistance pour les uns, d'un trouble de l'insulino-sécrétion pour les autres ; hétérogénéité génétique comme le MODY où 5 gènes au moins sont en cause, des mutations des gènes de l'insuline, du récepteur de l'insuline, d'un gène mitochondrial, de la glucokinase sont en cause dans certaines formes de diabète type 2 familial, des mutations des gènes de l'IRS1 et du récepteur au glucagon participent à la susceptibilité au diabète dans sa forme polygénique. Cette hétérogénéité clinique se retrouve au niveau des complications dégénératives du diabète. En effet, le risque accru de mortalité diffère selon qu'il s'agisse du diabète type 1 ou du diabète type 2. Ainsi, la néphropathie diabétique représente le premier facteur de risque de mortalité dans le diabète type 1, tandis que, dans le diabète type 2, c'est l'association des anomalies du métabolisme du glucose au cluster de facteurs de risque de maladie cardio-vasculaire comme l'hypertension artérielle ou les dyslipidémies, regroupés sous le nom de syndrome X métabolique

ou insulino-résistance. Ce syndrome, parmi les plus de 60 syndromes héréditaires de pathogénie différente associé au diabète type 2 (Prader Willi, myopathies mitochondriales, ...) reflète à lui seul l'hétérogénéité physiopathologique.

Combien de gènes sont impliqués dans le diabète et/ou dans le développement de ses complications cardio-vasculaires ? Dans la première hypothèse (hypothèse oligogénique), chaque gène impliqué aurait un effet important sur le niveau de la glycémie, par exemple ; dans la seconde (hypothèse polygénique), chaque gène aurait un effet faible, difficile par conséquent à apprécier. Ces deux hypothèses ne sont pas incompatibles, et l'on peut très bien imaginer une pathologie avec un nombre important de gènes dont certains interviennent habituellement pour une faible part, mais qui ont malgré tout la potentialité de jouer un rôle important. On peut concevoir qu'un allèle rare d'un gène ait un impact important, tandis que d'autres allèles, plus fréquents, ont un impact faible ou même nul voire protecteur (hétérogénéité allélique comme par exemple dans la mucoviscidose). C'est en tout cas la combinaison de certains facteurs génétiques et leur interaction avec des facteurs d'environnement qui induit en définitive le processus pathogène. Aussi, dans l'analyse des facteurs génétiques, il faut tenir compte du nombre de gènes impliqués, de l'importance des différents allèles dans la pathogénie (allèles de susceptibilité), et de la fréquence de ces allèles.

Le recrutement de familles, la première clé d'une étude génétique

Il se pose le problème du choix de la stratégie d'étude génétique. Les études familiales, qui recherchent une liaison génétique entre certains allèles d'un marqueur et la maladie, sont irremplaçables. Mais quelles familles et combien sont nécessaires ? Compte tenu de la survenue tardive de la maladie et de la mortalité précoce des patients diabétiques, il est difficile de trouver des familles nucléaires avec sujets affectés sur plusieurs générations, condition idéale pour les analyses de liaison. Le plus souvent, seule une génération vivante est atteinte. C'est pourquoi, pour prendre en compte l'hétérogénéité clinique et génétique de la maladie et la petite taille des

familles analysables, un très grand nombre de familles sont indispensables, 200 pour certains et d'autres avancement le nombre de 300...

Une cohorte de 180 familles Mauritiennes a été recrutée avec, dans la mesure du possible, tous les membres vivants de ces familles, incluant les parents, les frères et soeurs, les enfants... Ceci permet, d'une part d'augmenter l'informativité des familles : il est possible de déduire les génotypes parentaux à partir des génotypes d'une grande fratrie; d'autre part de caractériser au mieux le type de pathologies dans ces familles. L'analyse génétique de ces familles reste cependant compliquée. En effet, les anomalies de l'intolérance au glucose sont associées aux différents facteurs du syndrome X plurimétabolique. Si l'on prend le cas de l'étude de la ségrégation du diabète et de l'obésité dans des familles d'Indiens Pimas, celle-ci a montré que le diabète non associé à un surpoids a une composante beaucoup plus familiale que le diabète associé à un surpoids (Hanson RL, Diabetes, 1995). Il paraît donc logique d'étudier séparément les différents sous-groupes dont la pathologie a peut-être des étiologies communes ou différentes. C'est ainsi que nous avons regroupé certaines familles en sous-groupes plus homogènes cliniquement et donc probablement génétiquement, ce qui devrait faciliter l'identification du ou des gènes responsables de l'insulino-résistance, du diabète et/ou de la maladie coronarienne dans les différents sous-groupes. Ceci nous contraint donc à étudier des groupes de plus petite taille. C'est pourquoi le Dr. Meera Manraj a poursuivi le recrutement de nouvelles familles de diabétiques, afin de disposer du maximum de choix et pour la réplication de nos premiers résultats.

La détermination des phénotypes, une deuxième clé pour une étude génétique

La parfaite caractérisation phénotypique des individus testés est cruciale pour les analyses statistiques utilisant des variables qualitatives (affecté/non affecté). La distribution de la glycémie est unimodale et continue dans la population générale et les critères de diagnostic du diabète recommandés par l'OMS sont basés sur le risque futur de développer des complications

spécifiques de l'hyperglycémie chronique. Ces seuils arbitraires ont été récemment redéfinis afin de détecter les anomalies précoces de glycémie chez les membres à risque dans une famille. Ainsi, sont distingués trois degrés distincts de maladie selon l'importance de l'hyperglycémie de manière à rendre possible une analyse de liaison différenciée : d'une part, un travail avait suggéré une origine génétique différente du diabète entre intolérants au glucose et diabétiques dans une grande famille Américaine (Bell GI, PNAS, 1991) ; d'autre part, il existe une grande variabilité individuelle de la tolérance au glucose, probablement due à l'imperfection des méthodes de mesure (Balkau B, Diabetologia, 1991), ce qui impose de nombreuses vérifications pour les sujets ayant des glycémies limites. En tant que phénotype "qualitatif", le diagnostic de diabète ne doit pas être seulement considéré à partir d'une glycémie élevée à un moment donné, mais est la résultante d'une longue histoire : sont donc pris en compte les circonstances et âge de découverte de l'hyperglycémie, l'évolution des glycémies, l'histoire pondérale, la prise de traitements. Une autre alternative serait d'étudier un phénotype intermédiaire comme l'ont fait les groupes recherchant les déterminants génétiques des maladies cardio-vasculaires, en utilisant par exemple les taux de cholestérol ou de facteurs hémostatiques comme le PAI-1 et le fibrinogène. La liaison entre le génotype et le trait intermédiaire est forcément plus forte qu'entre le génotype et la maladie clinique. De plus, les méthodes d'analyses non paramétriques sont particulièrement adaptées à l'étude de traits quantitatifs. Mais quels seraient les traits phénotypiques intermédiaires dans l'insulino-résistance et le diabète type 2 ? : la capacité insulino-sécrétoire de la cellule bêta-pancréatique, le nombre de cellules bêta, la sensibilité tissulaire au glucose... Hélas, la détermination de certains de ces phénotypes fait appel à des techniques telles que les clamps euglycémiques hyperinsuliniques ou les perfusions de glucose qui sont extrêmement longues et difficiles à réaliser à grande échelle et dans une population disséminée sur tout le territoire. Quant au phénotype CHD ou IM, en tant que phénotype "qualitatif", le diagnostic a été établi le plus rigoureusement possible afin d'éviter de déclarer non atteint un individu CHD

asymptomatique. Compte tenu du caractère multifactoriel de la maladie coronarienne dans le cluster de facteurs de risque du syndrome X, ont été également pris en compte les autres facteurs de risque coronarien comme l'hypertension, l'obésité et de variables quantitativement mesurables comme les lipides plasmatiques. Il serait judicieux et, plus facilement, concevable par la suite de considérer également le mode de vie de l'individu, incluant les habitudes alimentaires et les activités physiques, le contexte socio-culturel de l'individu et la réponse aux traitements, le dosage de facteurs hémostatiques, des acides gras et des apolipoprotéines.

L'approche gène candidat, étape nécessaire mais non suffisante

L'approche gène candidat s'est avérée fructueuse dans le cas de GCK ou SUR pour l'étude du diabète type 2 et dans le cas d'ACE ou d'ApoE pour les complications vasculaires. Elle permet d'incriminer directement un gène de susceptibilité à une maladie. Cependant, la liste des gènes candidats au développement des anomalies glucidiques et cardio-vasculaires, est longue et aucun, à l'heure actuelle, ne paraît s'imposer. A la limite, il suffit de "penser" à un gène pour le déclarer candidat ! Notre stratégie a donc consisté, dans premier temps, à étudier de façon exhaustive tout polymorphisme de gène candidat décrit dans la littérature ou détecté par nous mêmes. Compte tenu des immenses progrès faits en quelques années dans le développement des outils de la génétique humaine, il est devenu plus facile d'étudier le rôle éventuel du gène codant pour une protéine candidate que d'étudier le rôle de la protéine elle-même dans la pathogénie d'une maladie : la PCR a été automatisée en 1988 et, actuellement, le progrès des techniques permet de réaliser des génotypages à grande échelle de façon relativement rapide et fiable. Une des techniques les moins coûteuses sur des petites populations se réalise grâce à l'utilisation de marqueurs bi-alléliques (RFLPs, polymorphismes non RFLP détectés par simple PCR allèle-spécifique ou PCR/ARMS). Nous avons employé cette technique dans le cadre d'étude d'association Cas/Témoins pour les gènes vWF et PPAR α . En raison des limitations majeures dûes au caractère complexe de l'héritabilité des maladies multifactorielles, les études

d'association représentent une alternative intéressante à la recherche d'un déséquilibre de liaison ou d'une association entre un marqueur génétique particulier et une maladie. Elles sont particulièrement intéressantes lorsqu'il existe plusieurs loci impliqués et que l'effet quantitatif de chaque allèle délétère est trop faible pour être facilement analysé par une étude de liaison familiale. Utilisant cette approche, des déséquilibres de liaison ont été retrouvés dans plusieurs maladies à déterminisme génétique comme l'hypercholestérolémie avec les gènes des Apo, le diabète type 2 avec les gènes GLUT ou du récepteur à l'insuline, l'infarctus du myocarde avec le gène ACE. Il est également possible de tester l'association entre un marqueur et une variable quantitative, telle une variable clinique comme la pression artérielle ou une variable biologique comme une concentration plasmatique enzymatique. De telles associations ont été montrées pour l'angiotensinogène et ACE. Pour notre part, nos études suggèrent le rôle des gènes vWF et PPAR α dans le développement de la maladie coronarienne à travers la variabilité inter-individuelle de vWF ou de lipides chez les diabétiques. Cependant, l'interprétation des études d'association constitue un des problèmes majeurs de la génétique épidémiologique. Les résultats positifs sont complexes à analyser. Il faut se méfier tout particulièrement de faux positifs générés par un choix inapproprié des cas et des témoins, différant par l'âge, la répartition d'hommes et de femmes, la répartition entre différents groupes ethniques ou la présence d'une autre pathologie associée au critère de choix, tout paramètre pouvant entraîner des différences de fréquences génotypiques non attribuables à la pathologie. En l'absence de ces biais méthodologiques de sélection, un résultat positif peut être le témoin du rôle du marqueur lui-même, du rôle d'une mutation en déséquilibre de liaison avec le marqueur analysé, d'une interaction entre le marqueur et un gène de susceptibilité à la pathologie (épistasie). Concernant l'étude des gènes vWF et PPAR α dans nos populations de diabétiques, nous suspectons que les mutations étudiées ne sont pas les variants réels impliqués dans le développement de CHD, mais qu'elles seraient en déséquilibre de liaison avec le vrai variant situé dans la région promotrice des gènes. L'un de nos

projets en cours est de poursuivre l'étude du gène PPAR α au niveau du promoteur développer. De plus, nos résultats nécessitent d'être répliqués dans des études familiales afin d'écartier le problème de génération de résultats positifs dus à un simple biais de sélection des différents groupes de population. Une alternative serait la méthode d'études d'Association-Liaison. Celles-ci permettent d'étudier l'association entre le marqueur et la pathologie à l'intérieur de familles comportant au moins un sujet atteint. Un projet d'étude du gène vWF pourrait être envisagé dans les familles Indo-Mauritiennes utilisées pour l'étude systématique du génome. En effet, le génome scan réalisé dans ces familles a révélé, d'une part, des indications de liaison avec l'âge de diagnostic de CHD et d'IM et, d'autre part, des résultats peu significatifs de liaison sur le chromosome 12 avec CHD et l'infarctus du myocarde. Le but principal dans un génome scan est de mettre en évidence des gènes dits "majeurs" (p-value très significative). Cependant, l'obtention d'une p-value comprise entre 0.007 et 0.02 au niveau du chromosome 12 pourrait refléter la présence d'un effet génétique "mineur". Or, la cartographie physique localise le gène vWF dans cette région (D12S99–D12S358, 13.9-27.2 cM). En perspective, un autre projet serait donc d'étudier le gène vWF dans ces familles Indo-Mauritiennes avec, notamment, un Test de Déséquilibre de Transmission, qui teste la co-ségrégation familiale du variant génétique avec la pathologie étudiée.

Le choix de la méthode d'analyse, une troisième clé pour une étude génétique

Les études familiales sont très utiles pour localiser le ou les gènes majeurs d'une maladie, à condition d'utiliser de façon appropriée les méthodes d'analyse génétique. Si les analyses paramétriques sont l'outil idéal pour l'étude du MODY, forme monogénique du diabète type 2, il est indispensable d'adapter les modèles aux conditions particulières d'une maladie complexe comme le syndrome X métabolique. Nous avons préféré privilégier les analyses non paramétriques et confronter les résultats obtenus par différentes méthodes qui ont fait la preuve de leur efficacité dans la localisation de gènes de susceptibilité dans des maladies complexes

(DID, Alzheimer, cancer du sein, hypertension artérielle...). En effet, autant il est clair qu'un lod score >3 correspond à un risque d'erreur α de type 1 de 5%, autant le seuil de significativité des méthodes non paramétriques est assez controversé. Une valeur de $p \leq 0.001$ ou plus faible (4×10^{-5}) est recommandée par certains généticiens (Lander ES, Science, 1994 ; Nat Genet, 1995), bien qu'une indication de liaison puisse être suggérée avec une valeur de $p \leq 0.05$. On peut considérer les analyses de sib-pairs avec la méthode des lod-score (Mls) comme une bonne méthode de débrouillage, mais il est important, en cas d'indication de liaison, d'effectuer d'autres tests. En effet, cette méthode prend en compte l'ensemble des paires possibles dans les fratries et peut ainsi donner plus de poids aux grandes fratries. Ceci peut générer des faux positifs, surtout lors de l'analyse de sous-groupes comportant un petit nombre de paires. L'analyse des paires indépendantes est un moyen de pondérer les résultats, mais il est utile également d'utiliser d'autres programmes d'analyses non paramétriques comme la méthode de vraisemblance binomiale (Mlb) qui tient compte des différentes tailles de famille et qui recherche un excès de concordance dans l'ensemble des paires de membres affectés d'une famille. Il est toujours possible d'analyser un marqueur proche pour examiner la part due au hasard. Ceci implique de multiplier les génotypes. L'idéal est de disposer d'une seconde population, ayant les mêmes caractéristiques cliniques, afin de répliquer les résultats, mais ceci nécessite un échantillon de plus grande taille. Nous avons donc défini, au départ, un groupe non négligeable de familles homogènes en première analyse. Le recrutement d'un pool de familles identiques servira à confirmer un résultat positif. C'est cette stratégie qui a été utilisée par Hashimoto et al (Nature, 1994), pour localiser les gènes de susceptibilité au diabète insulino-dépendant. C'est, en tout cas, une des raisons pour lesquelles la collecte de nouvelles familles a continué à l'île Maurice (actuellement plus de 200 familles). En attendant, a été mis en place il y a moins de 3 ans un consortium nous faisant collaborer avec d'autres groupes susceptibles de reproduire nos résultats dans leur population. Enfin, un dernier moyen d'évaluer la réalité d'un résultat positif est

d'effectuer des simulations statistiques. Le principe est d'attribuer de façon aléatoire, à tous les sujets de l'étude, les allèles d'un marqueur ayant les mêmes caractéristiques que celui pour lequel une indication de liaison a été retrouvée et d'analyser les données à l'aide du même programme. En répétant cette procédure un millier de fois, il est possible d'estimer la probabilité de trouver un résultat identique par hasard.

Les approches "au hasard" et "régions candidates", fastidieuses mais incontournables

L'approche gène candidat, bien qu'elle soit judicieuse et parfois fructueuse, a, on l'a vu, de nombreuses limitations. De plus, le ou les gènes impliqués dans le développement du diabète codent peut-être pour des protéines de fonction inconnue ou dont la fonction ne paraît pas de façon évidente concerner le métabolisme du glucose. Il est donc nécessaire de mener en parallèle d'autres stratégies. C'est pourquoi nous avons décidé d'entreprendre l'étude systématique du génome et de prendre en considération les modèles animaux.

L'étude génétique de modèles animaux permet de rechercher de nouvelles régions candidates. Les résultats récents concernant le modèle de souris DID Non Obèse Diabétique (Todd JA, Nature, 1991), et les rats spontanément hypertendus SHRSP (Hilbert P, Nature, 1991), confirment l'intérêt de tels modèles pour l'étude des maladies multifactorielles. D'une part, la caractérisation physiologique de ces modèles, conduisant à la définition de nombreux traits phénotypiques qualitatifs mais surtout quantitatifs, peut utiliser des techniques plus invasives que celles employées chez l'Homme. En particulier, les anomalies d'insulinosécrétion et de sensibilité tissulaire aux effets de l'insuline, caractéristiques du diabète, ainsi que les complications vasculaires du diabète peuvent être analysées de façon précise dans des tissus inaccessibles chez l'Homme. D'autre part, les stratégies d'étude au hasard ou par gène candidat classiquement employées pour la localisation des gènes responsables des maladies génétiques sont simplifiées chez l'animal par la possibilité de sélectionner les croisements entre individus de souches génétiquement homogènes et par l'obtention de grandes familles d'animaux hybrides. Les

modèles animaux de KO invalidant un gène d'intérêt ou les modèles transgéniques étudiant l'effet d'un variant génétique peuvent également orienter nos choix de gènes candidats.

L'exploration systématique du génome à l'aide de marqueurs anonymes régulièrement répartis le long des chromosomes est indispensable si l'on espère mettre en évidence tous les gènes de susceptibilité. Les nouveaux procédés de génotypage, utilisant le marquage fluorescent des produits PCR et leur séparation sur séquenceur automatique se développent dans de nombreux laboratoires et permettent de réaliser un grand nombre de génotypes d'une façon plus rapide et plus sûre (Ziegle JS, Genomics, 1992; Schwengel DA, Genomics, 1994). Il est techniquement possible, à l'heure actuelle, de lire simultanément et indépendamment 4 fluorochromes différents, dont un qui est utilisé comme marqueur de taille. Ceci permet, en choisissant les marqueurs en fonction de leur taille, de déposer dans chaque puits les produits d'amplification d'environ 20 marqueurs pour un même individu. Le laser du séquenceur automatique ABI (modèle 377) permet une lecture automatique de la taille des fragments et à l'aide des logiciels Genescan et Genotyper, il est possible d'attribuer les allèles correspondants. La saisie des données dans la base génétique est alors automatique. C'est en utilisant cette technique que Davies et al ont pu réaliser une étude systématique du génome dans des familles de diabétiques insulino-dépendants (Nature, 1994). C'est cette technique que nous avons appliquée dans notre population de familles Indo-Mauritiennes avec 400 microsatellites à raison de 3 personnes et sur une durée d'environ 1 an et demi. La localisation génétique est la première étape vers l'identification du gène en cause (clonage positionnel). Il sera alors nécessaire (et nous l'avons débuté) de génotyper d'autres marqueurs distants de 1 à 3 cM dans la région d'intérêt afin de délimiter le plus précisément possible l'intervalle génétique dans lequel se trouve le gène de susceptibilité au diabète. La carte physique de la région, si elle n'est pas déjà établie, sera générée au moyen de contigs de BACs et son intégration à la carte génétique permettra d'en marquer les limites. Nous pourrons ensuite combiner plusieurs stratégies pour cloner le gène d'intérêt : étude

de gènes candidats de la région, recherche de SNPs pour des études de déséquilibre de liaison, criblage de banques d'ADNc, séquençage partiel, exon-trapping, isolement d'îlots CpG....

Le génome scan dans notre population de familles Indo-Mauritiennes avec les 400 marqueurs s'est terminé en mars 2000. En raison des nombreux marqueurs et phénotypes considérés, l'interprétation de ces analyses statistiques s'avère être longue et fastidieuse et, donc, encore d'actualité à ce jour. Le choix d'une région chromosomique intéressante à étudier repose en partie sur la réplique dans d'autres populations. En effet, le but principal est de rechercher un gène « majeur », c'est à dire un gène en cause chez un grand nombre de patients et/ou expliquant une grande part de la variance de la glycémie comme dans le cas du diabète type 2. Or, notre population de familles Indo-Mauritiennes est caractérisée par le syndrome X plurimétabolique reliant des anomalies de la glycémie, de la pression sanguine et des lipides. Le gène « majeur » serait donc un gène d'insulino-résistance reliant, à la fois, l'intolérance au glucose ou le diabète type 2 et la maladie coronarienne. Ceci dit, les associations ou interactions de gènes à effet mineur rendent compte également de l'état d'insulino-résistance et de CHD déclarés sur le plan individuel. Quant aux résultats de notre étude, présentés plus haut, il nous est actuellement difficile de distinguer les gènes majeurs des gènes mineurs. En effet, il est nécessaire d'affiner l'analyse de ces résultats, d'une part, en déterminant le nombre de familles liées pour chaque région. D'autre part, il s'agira de voir dans une région chromosomique donnée si ce sont les mêmes familles qui sont liées à plusieurs phénotypes cliniques et/ou intermédiaires. Par la suite et dans un premier temps, il conviendra pour une région chromosomique d'intérêt de rechercher un gène, déjà localisé et identifié, dont le produit d'expression pourrait être impliqué dans un mécanisme d'insulino-résistance et contribuer au risque de CHD. De plus, les études de modèles animaux pourront éventuellement nous conforter dans le choix d'un gène candidat. L'ensemble de ces démarches nous ont amené à l'étude prioritaire de la région 3q27. Cette région est particulièrement intéressante en raison de résultats concordants détectés dans d'autres

populations. Ainsi, pour la région chromosomique 3q27 liée au développement de CHD dans nos familles Indo-Mauritiennes, une indication de liaison de cette même région a été retrouvée avec le diabète type 2 lors de génome scans de familles Caucasiennes et de familles Japonaises, effectués durant la même période dans notre laboratoire. Le résultat dans les familles Japonaises reste cependant à confirmer avec le « Fine Mapping » qui est en cours. Sur l'ensemble de nos 99 familles, 31 d'entre elles sont liées au développement de CHD et d'IM. Dans le diabète type 2, sont liées 40 familles Françaises. Dans la région 3q27, est situé le gène ACRP30 codant l'adiponectine, une protéine essentiellement exprimée dans le tissu adipeux et présente à des taux élevés dans le plasma. Cette protéine module le processus inflammatoire de l'endothélium en inhibant l'expression des molécules d'adhésion VCAM-1, E-selectin et ICAM-1 (Ouchi N, Circulation, 1999). L'adiponectine exerce également une activité inhibitrice sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Matsuzawa Y, Ann N Y Acad Sci, 1999). Des taux bas d'adiponectine plasmatique ont été observés chez la souris obèse ob/ob (Scherer PE, J Biol Chem, 1995) mais aussi chez des patients obèses ou diabétiques type 2 compliqués de CHD (Ouchi N, Circulation, 1999 ; Hotta K, Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000). D'autre part, Fruebis et al ont récemment démontré chez la souris que l'adiponectine induisait l'oxydation des acides gras libres dans le muscle et une réduction de poids (résultats sous presse). Or, les acides gras libres représentent à la fois un facteur causal de développement de l'insulino-résistance et un facteur d'aggravation de l'hyperglycémie par inhibition de la prise de glucose par le muscle squelettique. L'ensemble de ces observations nous confère donc dans l'hypothèse que des anomalies de l'adiponectine ou de ses taux pourraient contribuer au risque d'obésité, de diabète type 2 et de CHD. L'étude de son gène ACRP30 vient de débiter dans nos populations.

D'autres gènes candidats, codant le kininogène (KNG), l'enzyme bifonctionnelle peroxisomale (PBFE), la glycoprotéine riche en histidine (HRG), sont présents dans la région 3q27 et pourraient faire l'objet d'une étude génétique dans nos familles. Le KNG, présent dans le

plasma à des taux élevés, est un précurseur de la bradykinine (BK). Cette molécule exerce de nombreux effets physiologiques. La BK est impliquée, notamment, dans les processus d'inflammation, dans la régulation de la pression sanguine par induction de l'hypotension, dans l'homéostasie rénale (natriurèse et diurèse) et le métabolisme glucidique en favorisant l'entrée du glucose dans le muscle squelettique via son récepteur (B2R). Enfin, la bradykinine a un effet cardio-protecteur, soit directement à travers son activité, soit indirectement à travers l'activité de facteurs relaxants dérivés de l'endothélium. Chez des rats diabétiques et hypertendus, les taux de KNG plasmatiques sont significativement réduits, suggérant une déficience en génération de kinines (Sharma JN, Immunopharmacology, 1999). Il a été observé dans le plasma de patients diabétiques des taux augmentés de kininogène qui sont corrigés par l'administration d'insuline (Rothschild AM, Horm Metab Res, 1999). L'insuline agirait comme un facteur modulant la formation des molécules de bradykinine. La réduction des taux de bradykinine dans le diabète pourrait expliquer les taux élevés de kininogène observés dans cette condition. L'étude d'un modèle de rat déficient en kininogène a suggéré que la bradykinine est impliquée dans la clairance de l'insuline et de glucose par les tissus et qu'elle peut affecter le relargage d'insuline (Damas J, Exp Physiol, 1999). L'enzyme bifonctionnelle peroxisomale (PBFE), exprimée essentiellement dans le foie et le rein, joue un rôle clé dans la β -oxydation des acides gras. L'expression de cette enzyme ne semble pas être régulée par le facteur de transcription PPAR α . En effet, des taux normaux de PBFE ont été observés chez des souris n'exprimant pas PPAR α (Aoyama T, J Biol Chem, 1998). La glycoprotéine riche en histidine (HRG) est une protéine non enzymatique présente dans le plasma et les plaquettes. Bien que son rôle physiologique ne soit pas bien déterminé, plusieurs propriétés biologiques ont, cependant, été identifiées. Cette glycoprotéine pourrait jouer un rôle pro-thrombotique par inhibition non seulement, de la fibrinolyse en se liant au plasminogène mais aussi, de la coagulation par liaison à l'héparine. Dans des familles caractérisées par une agrégation familiale d'évènements thromboemboliques

récurrents, des taux élevés d'HRG ont été observés chez certains membres de ces familles (Falkon L, Thromb Res, 1992 ; Angles-Cano E, J Lab Clin Med, 1993). Cependant, les auteurs ont suggéré que ces concentrations élevées d'HRG en association avec un autre défaut pourraient représenter un facteur de risque thrombotique.

Dans la région 8q23, nous n'avons détecté aucun gène candidat dont le produit d'expression pourrait de façon évidente jouer sur le risque de diabète type 2. Quant à la région 16pter-p13 liée au développement de CHD, est localisé le gène ADCY9 (adénylate cyclase type 9). L'ADCY9 appartient à la famille des adénylyl cyclases, des protéines membranaires d'expression ubiquitaire. L'ADCY9 est, cependant, exprimée à des taux plus élevés notamment dans le muscle squelettique et le cœur. Ces enzymes sont impliquées dans les mécanismes cellulaires de transduction du signal. Elles catalysent la formation de cAMP et sont régulées par les récepteurs couplés à la protéine G, des protéines kinases et par le calcium. L'adénylate cyclase de type 9 est stimulée par l'activation de récepteurs β -adrénergiques (Hacker BM, Genomics, 1998).

CONCLUSION

La recherche des déterminants génétiques de l'insulino-résistance et de ses complications métaboliques associées n'en est qu'à ses débuts. Cependant, en l'espace de dix ans, trois gènes responsables de diabète type 2 ont été identifiés et pour deux d'entre eux des tests de dépistage existent déjà en routine. De nombreuses banques d'ADN de familles diabétiques type 2 sont collectées dans le monde, de nouveaux gènes du métabolisme du glucose sont clonés chaque jour, des banques de gènes candidats potentiels (EST's) sont disponibles, les cartes génétique et physique du génome humain sont de plus en plus précises et intégrées, les méthodes d'analyses statistiques s'améliorent, les techniques deviennent de plus en plus performantes. De plus, la connaissance des déterminants génétiques de la maladie coronarienne précoce associée à

l'insulino-résistance dans la population Mauricienne d'origine indienne permettra de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques de l'athérosclérose prématurée, et ses relations avec des facteurs favorisants comme l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie. A cet égard, la maladie coronarienne à Maurice pourrait servir de modèle d'étude de l'athérosclérose humaine en général, et de ses relations avec le diabète et le syndrome métabolique d'insulino-résistance.

Il sera alors possible d'étudier les caractéristiques cliniques et métaboliques des patients pour lesquels on aura identifié un variant génétique responsable du diabète et/ou de la maladie coronarienne. Ceci permettra de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques de ce désordre métabolique fréquent, de réaliser un dépistage précoce des sujets porteurs de la susceptibilité génétique afin de mettre en route les mesures hygiéno-diététiques appropriées et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques plus étiologiques.

4 Références bibliographiques

Abbott C, Piaggio G, Ammendola R, Solomon E, Povey S, Gounari F, De Simone V, Cortese R. Mapping of the gene TCF2 for the transcription factor LFB3 to human chromosome 17 by polymerase chain reaction. *Genomics*, 1990, 8, 165-167

Abe H, Yamada N, Kamata K, Kuwaki T, Shimada M, Osuga J, Shionoiri F, Yahagi N, Kadowaki T, Tamemoto H, Ishibashi S, Yazaki Y, Makuuchi M. Hypertension, hypertriglyceridemia, and impaired endothelium-dependent vascular relaxation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *J Clin Invest*, 1998, 101, 1784-1788

Abel L, Muller-Myhsok B. Robustness and power of the maximum-likelihood-binomial and maximum-likelihood-score methods, in multipoint linkage analysis of affected-sibship data. *Am J Hum Genet*, 1998, 63, 638-647

Accili D, Drago J, Lee EJ, Johnson MD, Cool MH, Salvatore P, Asico LD, Jose PA, Taylor SI, Westphal H. Early neonatal death in mice homozygous for a null allele of the insulin receptor gene. *Nat Genet*, 1996, 12, 106-109

Accili D, Frapier C, Mosthaf L, McKeon C, Elbein SC, Permutt MA, Ramos E, Lander E, Ullrich A, Taylor SI. A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-resistant diabetes. *EMBO J*, 1989, 8, 2509-2517

Ahlgren U, Jonsson J, Jonsson L, Simu K, Edlund H. Beta-cell-specific inactivation of the mouse *Ipf1/Pdx1* gene results in loss of the beta-cell phenotype and maturity onset diabetes. *Genes Dev*, 1998, 12, 1763-1768

Alberti KGMM. Lipids and diabetes : a fatal combination ? *Diabetic Med*, 1998, 15 : 359

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

Allayee H, Aouizerat BE, Cantor RM, Dallinga-Thie GM, Krauss RM, Lanning CD, Rotter JJ, Lusi AJ, de Bruin TWA. Families with familial combined hyperlipidemia and families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for the atherogenic lipoprotein phenotype. *Am J Hum Genet*, 1998, 63, 577-585

Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, Echwald S, Pedersen O. Aminoacid polymorphisms of insulin receptor substrate-1 in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet*, 1997, 342, 828-832

Alpert S, Hanahan D, Teitelman G. Hybrid insulin genes reveal a developmental lineage for pancreatic endocrine cells and imply a relationship with neurons. *Cell*, 1988, 53, 295-308

Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabetic Med*, 1997, 14 suppl 5, S1-S85

Angles-Cano E, Gris JC, Loyau S, Schved JF. Familial association of high levels of histidine-rich glycoprotein and plasminogen activator inhibitor-1 with venous thromboembolism. *J Lab Clin Med*, 1993, 121, 646-653

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. *Nat Genet*, 1993, 3, 342-345

Aouizerat BE, Allayee H, Cantor RM, Davis RC, Lanning CD, Wen PZ, Dallinga-Thie GM, de Bruin TW, Rotter JI, Lusk AJ. A genome scan for familial combined hyperlipidemia reveals evidence of linkage with a locus on chromosome 11. *Am J Hum Genet*, 1999, 65, 397-412

Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem*, 1998, 273, 5678-5684

Aparicio SAJR. How to count...human genes. *Nature Genetics*, 2000, 25, 129-130

Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*, 1994, 372, 186-190

Arts J, Kockx M, Princen HMG, Kooistra T. Studies on the mechanism of fibrinogen-inhibited expression of plasminogen activator-1 in cultured hepatocytes from cynomolgus monkey. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17, 26-32

Ashford MLJ, Bond CT, Blair TA, Adelman JP. Cloning and functional expression of a rat heart KATP channel. *Nature*, 1994, 370, 456-459

Austin MA, Breslow JL, Hennekens CH, Buring JE, Willett WC, Krauss RM. Low-density lipoprotein subclass patterns and risk of myocardial infarction. *JAMA*, 1988, 260, 1917-1921

Awata T, Matsumoto T, Iwamoto Y, Matsuda A, Kuzuya T, Saito T. Japanese case of diabetes mellitus and deafness with mutation in mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Lancet*, 1993, 341, 1291-1292

Bach I, Galcheva-Gargova Z, Mattei MG, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Cereghini S, Yaniv M. Cloning of human hepatic nuclear factor 1 (HNF1) and chromosomal localization of its gene in man and mouse. *Genomics*, 1990, 8, 155-164

Bach I, Mattei MG, Cereghini S, Yaniv M. Two members of an HNF1 homeoprotein family are expressed in human liver. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19, 3553-3559

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*, 1993, 268, 8204-8212

Baima J, Nicolaou M, Schwartz F, DeStefano AL, Manolis A, Gavras I, Laffer C, Elijovich F, Farrer L, Baldwin CT, Gavras H. Evidence for linkage between essential hypertension and a putative locus on human chromosome 17. *Hypertension*, 1999, 34, 4-7

Balkau B, Shipley M, Jarrett RJ, Pyörälä K, Pyörälä M, Forhan A, Eschwege E. High blood glucose concentration is a risk factor for mortality in middle-aged non diabetic men. 20-year follow-up in the Whitehall Study, the Paris Prospective Study, and the Helsinki Policemen Study. *Diabetes Care*, 1998, 21 : 360-367

Balkau B, Eschwege E, Papoz L, Richard JL, Claude JR, Warnet JM, Ducimetiere P. Risk factors for early death in non-insulin-dependent diabetes and men with known glucose tolerance status. *BMJ*, 1993, 307, 295-299

Balkau B, Eschwege E. Repeatability of the oral glucose tolerance test for the diagnosis of impaired glucose tolerance and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1991, 34, 201-202

Barakat HA, Carpenter JW, McLendon VD, Khazanie P, Leggett N, Heath J, Marks R. Influence of obesity, impaired glucose tolerance and NIDDM on LDL structure and composition. *Diabetes*, 1990, 39, 1527-1533

Barnett AH. Diabetes, Race and Genes. *Diabetic Med*, 1989, 6, 78-83

Barnett AH, Eff C, Leslie RD, Pyke DA. Diabetes in identical twins: A study of 200 pairs. *Diabetologia*, 1981, 20, 87-93

Barrett-Connor EL, Cohn BA, Wingard DL, Edelstein SL. Why is diabetes mellitus a stronger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo Study. *JAMA*, 1991, 265, 627-631

Bauters C, Van Belle E, Mc Fadden E, Bertrand M. Données récentes sur la plaque d'athérome et son évolution. *Arch Mal Cœur*, 1998, 91 Special 5, 9-13

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* 1991, 312 (Série III), 141-148

Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Scarabin PY, Bara L, Green F, Cambien F. Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. *Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde*. *Circulation*, 1996, 93, 440-449

- Bell GI, Horita S, Karam JH. A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 1984, 33, 176-183
- Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, Wright LG, Fajans SS, Spielman RS, Cox NJ. Gene for non-insulin dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88, 1484-1488
- Bell G, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care*, 1990, 13, 198-208
- Bennett PH, Bogardus C, Tuomilehto J, Zimmet P. Epidemiology and natural history of NIDDM : non obese and obese. In : *International Textbook of diabetes mellitus*. Eds, Alberti KGMM, DeFronzo RA, Keen H, Zimmet P. John Wiley & Sons Ltd, 1992, 1, 147-176
- Bingham C, Ellard S, Allen L, Bulman M, Shepherd M, Frayling T, Berry PJ, Clark PM, Lindner T, Bell GI, Ryffel GU, Nicholls AJ, Hattersley AT. Abnormal nephron development associated with a frameshift mutation in the transcription factor hepatocyte nuclear factor-1-beta. *Kidney Int*, 2000, 57: 898-907
- Bishop DT, Williamson JA. The power of identity-by-state methods for linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 1990, 46, 254-265
- Blann A. Von Willebrand factor and the endothelium in vascular disease. *British J Biomed Sci*, 1993, 50, 125-134
- Blazy D, Nguyen M. La population diabétique en France. Résultats d'une étude portant sur un panel représentatif. *Diabetes & Metab*, 1993, 19, 483-490
- Boden G, Jadali F. Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. *Diabetes*, 1991, 40, 686-692
- 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*, 1987, 328, 614-616
- Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta in disease: the dark side of tissue repair. *J Clin Invest*, 1992, 90, 1-7
- Borsum T. Biochemical properties of vascular endothelial cells. *Virchows Archiv B Cell Pathol*, 1991, 60, 279-286
- Brissonnette LGG, Fareed DS. Cardiovascular diseases as a cause of death in the island of Mauritius, 1972-1980. *World Health Stat Q*, 1985, 38, 163-175
- Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K, van Dam M, Yu L, Brewer C, Collins JA, Molhuizen HO, Loubser O, Ouelette BF, Fichter K, Ashbourne-Excoffon KJ, Sensen CW, Scherer S, Mott S, Denis M, Martindale D, Frohlich J, Morgan K, Koop B, Pimstone S, Kastelein JJ, Hayden MR, et al. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat Genet*, 1999, 22, 336-345

Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 1992, 15, 1835-1843

Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M. Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes*, 1996, 45, 190-198

Brüning JC, Winnay J, Bonner-Weir S, Taylor SI, Accili D, Kahn CR. Development of a novel polygenic model of NIDDM in mice heterozygous for IR and IRS-1 null alleles. *Cell*, 1997, 88, 561-572

Byrne MM, Sturis J, Clement K, Vionnet N, Pueyo ME, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Cohen D, Bell GI, Velho G, Froguel P, Polonsky KS. Insulin secretory abnormalities in subjects with hyperglycemia due to glucokinase mutations. *J Clin Invest*, 1994, 93, 1120-1130

Byrne MM, Sturis J, Menzel S, Yamagata K, Fajans SS, Dronsfield MJ, Bain SC, Hattersley AT, Velho G, Froguel P, Bell GI, Polonsky KS. Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes*, 1996, 45, 1503-1510

Cagliero E, Roth T, Roy S, Lorenzi M. Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells. *Diabetes*, 1991, 40, 102-110

Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovao R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet*, 1988, 43, 774-780

Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, Evans A, Arveiler D, Cambou JP, Luc G, et al. Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation*, 1994, 90, 669-676

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature*, 1992, 359, 641-644

Cambien F, Ricard S, Troesch A, Mallet C, Generenaz L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Ruidavets JB, Poirier O. Polymorphisms of the transforming growth factor-beta 1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure. The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. *Hypertension*, 1996, 28, 881-887

Carten AM, Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Beta-fibrinogen gene-455 G/A polymorphism and fibrinogen levels. Risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM. *Diabetes Care*, 1996, 19, 1265-1268

Catalano C, Marshall SM. Epidemiology of end-stage renal disease in patients with diabetes mellitus : from the dark ages to the middle ages. *Nephrol Dial Transplant*, 1992, 7, 181-190

Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJL. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *New Eng J Med*, 1994, 330, 1629-1633

Cerasi E, Luft R. Insulin response to glucose infusion in diabetic and non-diabetic monozygotic twin pairs. Genetic control of insulin response? *Acta Endocrinol*, 1967, 55, 330-345

Charles MA, Balkau B, Vauzelle-Kervroedan F, Eschwege E. Revision of diagnostic criteria for diabetes. *Lancet*, 1996, 348, 1657

Charles MA, Fontbonne A, Thibault N, Warnet JM, Rosselin GE, Eschwege E. Risk factors for NIDDM in white population. Paris prospective study. *Diabetes*, 1991, 40, 796-799

Charles MA, Morange P, Eschwege E, André P, Vague P, Juhan Vague I on behalf of the BIGPRO Study Group. Effect of weight change and metformin on fibrinolysis and the von Willebrand factor in obese non diabetic subjects. *Diabetes Care*, 1998, 11, 1967-1972

Chartier FL, Bossu JP, Laudet V, Fruchart JC. Cloning and sequencing of cDNAs encoding the human hepatocyte nuclear factor 4 indicate the presence of two isoforms in human liver. *Gene*, 1994, 147, 269-272

Chaturvedi N, Mac Keigue PMM, Marmot MG. Relationship of glucose intolerance to coronary risk in Afro-Caribbeans compared with Europeans. *Diabetologia*, 1994, 37, 765-772

Chronic Complications of diabetes. Edited by JC Pickup and G Williams. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1994

Ciaraldi TP, Kolterman OG, Scarlett JA, Kao M, Olefsky JM. Role of glucose transport in the postreceptor defect of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes*, 1982, 31, 1016-1022

Colditz GA, Rimm EB, Giovannucci E, Stampfer MJ, Rosner B, Willett WC. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary artery disease in men. *Am J Cardiol*, 1991, 67, 933-938

Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of parental history of myocardial infarction and coronary heart disease in women. *Am J Epidemiol*, 1986, 123, 48-58

Collins FS. Positional cloning: let's not call it reverse anymore. *Nat Genet*, 1992, 1, 3-6

Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat Genet*, 1995, 9, 347-350

Conlan MG, Folsom AR, Finch A, Davis CE, Sorlie P, Marcucci G, Wu KK. Associations of FVIII and vWF with age, race, sex and risk factors for atherosclerosis. The ARIC Study. *Throm & Haem*, 1993, 70, 380-385

Courtois G, Morgan JG, Campbell LA, Fourel G, Crabtree GR. Interaction of a liver-specific nuclear factor with the fibrinogen and alpha-1-antitrypsin promoters. *Science*, 1987, 238, 688-692

Cox NJ, Bell GI. Disease associations: chance, artefact, or susceptibility genes? *Diabetes*, 1989, 38, 947-950

Cox NJ, Frigge M, Nicolae DL, Concannon P, Hanis CL, Bell GI, Kong A. Loci on chromosomes 2 (NIDDM1) and 15 interact to increase susceptibility to diabetes in Mexican Americans. *Nat Genet*, 1999, 21, 213-215

Dall'Aglio E, Chang H, Hollenbeck CB, Mondon CE, Sims C, Reaven GM. In vivo and in vitro resistance to maximal insulin-stimulated glucose disposal in insulin deficiency. *Am J Physiol*, 1985, 249, 312-316

Damas J, Bourdon V, Lefebvre PJ. Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Exp Physiol*, 1999, 84, 549-557

Darling S. Mice as models of human developmental disorders: natural and artificial mutants. *Curr Opin Genet Dev*, 1996, 6, 289-294

Davies JL, Kawaguchi Y, Bennett ST, Copeman JB, Cordell HJ, Pritchard LE, Reed PW, Balfour KM, Rowe BR, Farrall M, Barnett AH, Bain SC, Todd JA. A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*, 1994, 371, 130-135

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*, 1993, 10, 313-320

Davies MJ. Thrombosis and coronary atherosclerosis. In : *Thrombolysis in Cardiovascular disease*. Julian D, Kubler WS, Lorriss RM, eds. Marcel Dekker, New York, 1989, 25-44

Dawson SJ, Wiman B, Hamsten A, Green F, Humphries S, Henney AM. The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 1993, 268, 10739-10745

Deckert T, Yokoyama H, Mathiesen E, Ronn B, Jensen T, Feldt-Rasmussen B, Borch-Johnsen K, Jensen JS. Cohort study of predictive value of urinary albumin excretion for atherosclerotic vascular disease in patients with insulin dependent diabetes. *Br Med J*, 1996, 312, 871-874

Deeb SS, Fajas L, Nemoto M, Pihlajamaki J, Mykkanen L, Kuusisto J, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J. A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet*, 1998, 20, 284-287

De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. A balanced overview. *Diabetes Care*, 1992, 15, 318-368

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

De Fronzo RA, Gunnarson R, Bjorkman O, Ollsson M, Wahren J. Effect of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in non insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1985, 76, 149-155

DeFronzo RA. Insulin resistance : a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidaemia and atherosclerosis. *Neth J Med*, 1997, 50, 191-197

DeFronzo RA. Pathogenesis of type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus: a balanced overview. *Diabetologia*, 1992, 35, 389-397

DeFronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism. *Diabetologia*, 1981, 21, 165-171

De Fronzo RA. The triumvirate: β -cell, muscle, liver: a collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*, 1988, 37, 667-687

de Knijff P, van den Maagdenberg AM, Frants RR, Havekes LM. Genetic heterogeneity of apolipoprotein E and its influence on plasma lipid and lipoprotein levels. *Hum Mutat*, 1994, 4, 178-194

Delcourt C, Villatte-Cathelineau B, Vauzelle-Kervroedan F, Papoz L. Clinical correlates of advanced retinopathy in type II diabetic patients: implications for screening. The CODIAB-INSERM-Zeneca Pharma Study Group. *J Clin Epidemiol*, 1996, 49, 679-685

De Simone V, De Magistris L, Lazzaro D, Gerstner J, Monaci P, Nicosia A, Cortese R. LFB3, a heterodimer-forming homeoprotein of the LFB1 family, is expressed in specialized epithelia. *EMBO J*, 1991, 10, 1435-1443

Despress JP. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*, 1993, 9, 452-459

Despress JP, Marette A. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary heart disease risk. *Curr Opin Lipidol*, 1994, 5, 274-289

Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A, Millasseau P, Marc S, Hazan J, Seboun E, Lathrop M, Gyapay G, Morissette J, Weissenbach J. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, 1996, 380, 152-154

Dickson K, Philip A, Warshawsky H, O'Connor-McCourt M, Bergeron JJ. Specific binding of endocrine transforming growth factor-beta 1 to vascular endothelium. *J Clin Invest*, 1995, 95, 2539-2554

Disse-Nicodeme S, Achard JM, Desitter I, Houot AM, Fournier A, Corvol P, Jeunemaitre X. A new locus on chromosome 12p13.3 for pseudohypoaldosteronism type II, an autosomal dominant form of hypertension. *Am J Hum Genet*, 2000, 67, 302-310

Djouadi F, Weinheimer CJ, Saffitz JE, Pitchford C, Bastin J, Gonzalez FJ, Kelly DP. A gender-related defect in lipid metabolism and glucose homeostasis in peroxisome proliferator-activated receptor-deficient mice. *J Clin Invest*, 1998, 102, 1083-1091

Dinneen SF, Gerstein HC. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A systemic overview of the literature. *Arch Intern Med*, 1997, 157, 1413-1418

Dohm GL, Tapscott EB, Pories WJ, Dabbs DJ, Flickinger EG, Meelheim D, Fushiki T, Atkinson SM, Elton CW, Caro JF. An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J Clin Invest*, 1988, 82, 486-494

Dorman JS, Laporte RE, Kuller LH, Cruickshanks KJ, Orchard TJ, Wagener DK, Becker DJ, Cavender DE, Drash AL. The Pittsburg insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) morbidity and mortality study. Mortality results. *Diabetes*, 1984, 33, 271-276

Dowse GK, Gareeboo H, Zimmet PZ, Alberti KGMM, Tuomilehto J, Fareed D, Brissonnette G, Finch CF for the Mauritius Noncommunicable Disease Study Group. High prevalence of NIDDM and impaired glucose tolerance in Indian, Creole, and Chinese Mauritians. *Diabetes*, 1990, 39, 390-396

Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Dyer TD, Williams KL, Leach RJ, O'Connell P, Stern MP. A major susceptibility locus influencing plasma triglyceride concentrations is located on chromosome 15q in Mexican Americans. *Am J Hum Genet*, 2000, 66, 1237-1245

Edgington SM. Amyloid plaque and diabetes. *Biotechnology*, 1994, 12, 591-594

Editorial : Factor VIII-related antigen and vasculitis. *Lancet*, 1988, 1, 1203-1204

Elsas LJ, Longo N. Glucose Transporters. *Annu Rev Med*, 1992, 43, 377-393

Emmerich J. Anomalies lipidiques : facteur favorisant ou agent étiologique de l'athérosclérose. *Arch Mal Cœur*, 1998, 91 Special 5, 13-21

Eriksson J, Franssila-Kallunki A, Ekstrand A, Saloranta C, Widen E, Schalin C, Groop L. Early metabolic defects in persons at increased risk for non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1989, 321, 337-343

Eriksson P, Kallin B, van t'Hooft FM, Bavhenolm P, Hamsten A. Allelic-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction. *Proc Nat Acad Sci*, 1995, 92, 1851-1855

Eschwege E, Simon D, Balkau B. Le diabète de type 2 vu par l'épidémiologiste. *Dis Manage Health Outcomes*, 1998, 4 suppl, 1-12

Falkon L, Gari M, Montserrat I, Borrell M, Fontcuberta J. Familial elevation of plasma histidine-rich glycoprotein. A case associated with recurrent venous thrombosis and high PAI-1 levels. *Thromb Res*, 1992, 66, 265-270

- Feingold J. Le déséquilibre de liaison. *Médecine/Sciences*, 1991, 7, 161-168
- Felig P, Bergman M. The endocrine pancreas: diabetes mellitus. In *Endocrinology and metabolism*, Ed McGraw-Hill, 3ème édition, 1995, 1107-1251
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M, Graziadei L, Pedrinelli R, Brandi L, Bevilacqua S. Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med*, 1987, 317, 350-357
- Ferranini E, Natali A, Cerri M, Santoro D, Palombo C. Hypertension : a metabolic disorder ? *Diabete Metab*, 1989, 15, 284-291
- Firth RG, Bell PM, Marsh HM, Hansen I, Rizza RA. Postprandial hyperglycemia in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. Role of hepatic and extrahepatic tissues. *J Clin Invest*, 1986, 77, 1525-1532
- Frayling TM, Bulman MP, Ellard S, Appleton M, Dronsfield MJ, Mackie ADR, Baird JD, Kaisaki PJ, Yamagata K, Bell GI, Bain SC, Hattersley AT. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1-alpha gene are a common cause of maturity-onset diabetes of the young in the U.K. *Diabetes*, 1997, 46, 720-725
- Froguel P, Vaxillaire M, Sun F, Velho G, Zouali H, Butel MO, Lesage S, Vionnet N, Clément K, Fougerousse F, Tanizawa Y, Weissenbach J, Beckmann JS, Lathrop GM, Passa P, Permutt MA, Cohen D. Close linkage of glucokinase locus on chromosome 7p to early-onset non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 1992, 356, 162-164
- Fujimoto WY. Overview of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in different population groups. *Diabet Med*, 1996, 13, S7-S10
- Fujisawa T, Ikegami H, Shen GQ, Yamato E, Takekawa K, Nakagawa Y, Hamada Y, Ueda H, Rakugi H, Higaki J, Ohishi M, Fujii K, Fukoda M, Ogihara T. Angiotensin I-converting enzyme gene polymorphism is associated with myocardial infarction, but not with retinopathy or nephropathy, in NIDDM. *Diabetes Care*, 1995, 18, 983-985
- Fujita Y, Chacra AR, Herron AL Jr, Seltzer HS. Influence of antecedent carbohydrate intake on the biphasic insulin response to intravenous glucose. *Diabetes*, 1975, 24, 1072-1080
- Fuller JH. European Community Concerted Action Programme in Diabetes (EURODIAB). *Diabetic Med*, 1989, 6, 278
- Gabbay KH. The insulinopathies. *N Engl J Med*, 1980, 302, 165-167
- Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA. Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol*, 1993, 150, 4494-4503
- Gehring WJ. Homeo boxes in the study of development. *Science*, 1987, 236, 1245-1252
- Genest JJ Jr, Martin-Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J, Myers RH, Silberman SR, Wilson PW, Salem DN, Schaefer EJ. Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation*, 1992, 85, 2025-2033

Gerdes LU, Klausen IC, Sihm I, Faergeman O. Apolipoprotein E polymorphism in a Danish population compared to findings in 45 other study populations around the world. *Genet Epidemiol*, 1992, 9, 155-167

German MS, Wang J, Fernald AA, Espinosa III R, Le Beau MM, Bell GI. Localization of the genes encoding two transcription factors, LMX1 and CDX3, regulating insulin gene expression to human chromosomes 1 and 13. *Genomics*, 1994, 24, 403-404

Ghafoor IM, Allan D, Foulds WS. Common causes of blindness and visual handicap in the west of Scotland. *Br J Ophthalmol*, 1983, 67, 203-213

Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D, Patel P, Lo YMD, Hattersley AT, Luthman H, Wedell A, St Charles R, Harrison RW, Weber IT, Bell GI, Pilkis SJ. Glucokinase mutations associated with non-insulin-dependent (type 2) diabetes mellitus have decreased enzymatic activity : implications for structure/function relationships. *Proc Nat Acad Sci*, 1993, 90, 1932-1936

Ginsberg HN. Lipoprotein physiology in nondiabetic and diabetic states. Relationship to atherogenesis. *Diabetes Care*, 1991, 14, 839-855

Ghosh S, Watanabe RM, Hauser ER, Valle T, Magnuson VL, Erdos MR, Langefeld CD, Balow JJr, Ally DS, Kohtamaki K, Chines P, Birznieks G. Type 2 diabetes : evidence for linkage on chromosome 20 in 716 Finnish affected sib pairs. *Proc Nat Acad Sci*, 1999, 96, 2198-2203

Granner D, Pilkis S. The genes of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem*, 1990, 265, 10173-10176

Green A, Gale EAM, Patterson CC for the EURODIAB ACE Study Group. Incidence of childhood-onset insulin-dependent diabetes mellitus : the EURODIAB ACE Study. *Lancet*, 1992, 339, 905-909

Grunfeld C, Feingold KR. The metabolic effects of tumor necrosis factor and other cytokines. *Biotherapy*, 1991, 3, 143-158

Guerre-Millo M, Hainault I, Lavau M. Données récentes sur la régulation du transport et des transporteurs de glucose dans les tissus insulino-sensibles. *Diabetes & Metab*, 1989, 15, 211-223

Gusella J, Wexler N, Conneally P. A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 1983, 306, 234-238

Hacker BM, Tomlinson JE, Wayman GA, Sultana R, Chan G, Villacres E, Disteche C, Storm DR. Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9). *Genomics*, 1998, 50, 97-104

Haffner SM. Epidemiology of hypertension and insulin resistance syndrome. *J Hypertens*, 1997, 15, S25-30

Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörala K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in non diabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1998, 339, 229-234

Haffner SM, Stern MP, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Cardiovascular risk factors in confirmed prediabetic individuals. Does the clock for coronary heart disease start ticking before the onset of clinical deterioration ? *JAMA*, 1990, 263, 2893-2898

Haffner SM, Stern MP, Kozlowski Gruber MK, Hazuda HP, Mitchell BD, Patterson JK. Microalbuminuria. Potential marker for increased cardiovascular risk factors in nondiabetic subjects ? *Arteriosclerosis*, 1990, 10, 727-731

Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes*, 1992, 41, 715-722

Hager J, Hansen L, Vaisse C, Vionnet N, Philippi A, Poller W, Cambien F, Lathrop GM, Passa P, Julier C, Velho G, Kindsvogel W, Demenais F, Froguel P. A missense mutation in the glucagon receptor gene is associated with familial non-insulin dependent diabetes mellitus. *Nature Genet*, 1995, 9, 299-304

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*, 1990, 250, 1684-1689

Haneda M, Kikkawa R, Horide N, Togawa M, Koya D, Kajiwara N, Ooshima A, Shigeta Y. Glucose enhances type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells. *Diabetologia*, 1991, 34, 198-200

Haneda M, Polonsky KS, Bergenstal RM, Jaspan JB, Shoelson SE, Blix PM, Chan SJ, Kwok SC, Wishner WB, Zeidler A, et al. Familial hyperinsulinemia due to a structurally abnormal insulin. Definition of an emerging new clinical syndrome. *N Engl J Med*, 1984, 310, 1288-1294

Hani EH, Clement K, Velho G, Hager J, Vionnet N, Permutt MA, Basdevant A, Guy-Grand B, Froguel Ph. Genetic studies of the sulfonylurea receptor gene locus in NIDDM and in morbid obesity among French Caucasians. *Diabetes*, 1997, 46, 688-694

Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shephard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzsch H, Schroder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Lindner T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nature Genet*, 1996, 13, 161-166

Hanson RL, Pettitt DJ, Bennett PH, Narayan KMV, Fernandes R, de Courten M, Knowler WC. Familial relationships between obesity and NIDDM. *Diabetes*, 1995, 44, 418-422

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

Harris MI, Klein R, Welborn TA, Knudman MW. Onset of NIDDM occurs at least 4-7 yr before clinical diagnosis. *Diabetes Care*, 1992, 15, 815-819

Hashimoto L, Habita C, Beressi JP, Delepine M, Besse C, Cambon-Thomsen A, Deschamps I, Rotter JJ, Djoulah S, James MR, Froguel P, Weissenbach J, Lathrop GM, Julier C. Genetic mapping of a susceptibility locus for insulin-dependent diabetes mellitus on chromosome 11q. *Nature*, 1994, 371, 161-164

Hegele RA, Cao H, Harris SB, Hanley AJG, Zinman B. The hepatic nuclear factor-1-alpha G319S variant is associated with early-onset type 2 diabetes in Canadian Oji-Cree. *J Clin Endocr Metab*, 1999, 84, 1077-1082

Henry RR. Glucose control and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Intern Med*, 1996, 124, 97-103

Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha gene, coronary heart disease and obesity. *Eur J Clin Invest*, 1998, 28, 59-66

Hilbert P, Lindpaintner K, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahashi S, Vincent M, Beckmann J, Ganten D, Georges M, Lathrop M. Chromosomal mapping of two genetic loci associated with hereditary hypertension in the rat. *Nature*, 1991, 353, 521-529

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. *Nature Genet*, 1997, 17, 384-385

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, Nishida M, Kihara S, Sakai N, Nakajima T, Hasegawa K, Muraguchi M, Ohmoto Y, Nakamura T, Yamashita S, Hanafusa T, Matsuzawa Y. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20, 1595-1599

Howard BV. Diabetes and plasma lipoproteins in native americans. Studies of the Pima Indians. *Diabetes Care*, 1993, 16, 284-291

Howard BV. Lipoprotein metabolism in diabetes mellitus. *J Lipid Res*, 1987, 28, 613-628

Howard WJ, Nugent Z, Manley SE, Mann J, Turner RC. UL Prospective Diabetes Study VI. Complications in newly diagnosed type 2 diabetic patients and their association with different clinical and biochemical risk factors. *Diabetes Res*, 1990, 13, 1-11

Humphries SE, Cook M, Dubowitz M, Stirling Y, Meade TW. Role of genetic variation at the fibrinogen locus in determination of plasma fibrinogen concentrations. *Lancet*, 1987, 1, 1452-1454

Humphries S, Temple A, Lane A, Green F, Cooper J, Miller G. Low plasma levels of factor VIIc and antigen are more strongly associated with the 10 base pair promoter (-323) insertion than the glutamine 353 variant. *Thromb Haemost*, 1996, 75, 567-572

Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 1990, 348, 555-557

Imperatore G, Hanson RL, Pettitt DJ, Kobes S, Bennett PH, Knowler WC, and the Pima Diabetes Genes Group. Sib-Pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. *Diabetes*, 1998, 47, 821-830

Inoue H, Ferrer J, Welling CM, Elbein SC, Hoffman M, Mayorga R, Warren-Perry M, Zhang Y, Millns H, Turner R, Province M, Bryan J, Permutt MA, Aguilar-Bryan L. Sequence variants in the sulfonylurea receptor (SUR) gene are associated with non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) in Caucasians. *Diabetes*, 1996, 45, 825-831

Issemann I, Green S. Green Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 1990, 347, 645-650

Janka HU, Warram JH, Rand LI, Krolewski AS. Risk factors for progression of background retinopathy in long-standing IDDM. *Diabetes*, 1989, 38, 460-464

Jansson JH, Nilsson TK, Johnson O. Von Willebrand factor in plasma : a novel risk factor for recurrent myocardial infarction and death. *Br Heart J*, 1991, 66, 351-355

Jarrett RJ. Epidemiology of macrovascular disease and hypertension in diabetes mellitus. In : *International textbook of diabetes mellitus*. Alberti KGMM, De Fronzo RA, Keen H, Zimmet P (eds), Wiley, New York, 1992, pp 1459-1470

Jeffreys A, Wilson V, Swee Lay Thein. Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA. *Nature*, 1985, 314, 67-73

Jemaa R, Fumeron F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou JP, Bard JM, Fruchart JC, et al. Lipoprotein lipase gene polymorphisms: associations with myocardial infarction and lipoprotein levels. The ECTIM study. *J Lipid Res*, 1995, 36, 2141-2146

Jensen T, Borch-Johnsen K, Kofoed-Enevoldsen A, Deckert T. Coronary heart disease in young type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without diabetic nephropathy : incidence and risk factors. *Diabetologia*, 1987, 30, 144-148

Jensen T. Increased plasma concentration of vWF in insulin dependant diabetics with incipient nephropathy. *Br Med J*, 1989, 298, 27-28

Jenssen T, Stender S, Deckert T. Abnormalities in plasma concentrations of lipoproteins and fibrinogen in type I (insulin dependent) diabetic patients with increased urinary albumin excretion. *Diabetologia*, 1988, 31, 142-145

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*, 1992, 71, 169-180

Jones SL, Close CF, Mattock MB, Keen H, Viberti GC. Plasma lipid and coagulation factor concentrations in insulin dependent diabetic with microalbuminuria. *Br Med J*, 1989, 298, 487-490

Jonsson J, Carlsson L, Edlund T, Edlund H. Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature*, 1994, 371, 606-609

Jorde LB, Williams RR. Relation between family history of coronary artery disease and coronary risk variables. *Am J Cardiol*, 1988, 62, 708-713

Juhan Vague I, Stephen DM, Pyke MSC, Alessi MC, Jespersion J, Haverkate F, Thompson SG on behalf of the ECAT Study Group. Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *Circulation*, 1996, 94, 2057-2063

Julier C, Delepine M, Keavney B, Terwilliger J, Davis S, Weeks DE, Bui T, Jeunemaitre X, Velho G, Froguel P, Ratcliffe P, Corvol P, Soubrier F, Lathrop GM. Genetic susceptibility for human familial essential hypertension in a region of homology with blood pressure linkage on rat chromosome 10. *Hum Molec Genet*, 1997, 6, 2077-2085

Julier C, Hyer RN, Davies J, Merlin F, Soularu P, Briant L, Cathelineau G, Deschamps I, Rotter JI, Froguel P, Boitard C, Bell J, Lathrop M. Insulin-IGF2 region on chromosome 11p encodes a gene implicated in HLA-DR4-dependent diabetes susceptibility. *Nature*, 1991, 354, 155-159

Kahn BB, Rossetti L. Type 2 diabetes-who is conducting the orchestra ? *Nat Genet*, 1998, 20, 223-225

Kahn CR. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*, 1994, 43, 1066-1084

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. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1-alpha gene in MODY and early-onset NIDDM: evidence for a mutational hotspot in exon 4. *Diabetes*, 1997, 46, 528-535

Kannel WB, Mac Gee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors : the Framingham study. *Circulation*, 1979, 59, 8-13

Kannel WB, Stampfer MJ, Castelli WP, Werter J. The prognostic significance of proteinuria : the Framingham study. *Am Heart J*, 1984, 102, 1347-1352

Kanwar YS. Biophysiology og glomerular filtration and proteinuria. *Lab Invest*, 1984, 51, 7-21

- Karam JH. Reversible insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, 1996, 28, 440-444
- Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, DePinho R, Charron MJ. Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4. *Nature*, 1995, 377, 151-155
- Kaufman D, Clare-Salzier M, Tian J, Forsthuber T, Ting G, Robinson P, Atkinson M, Sercarz E, Tobin A, Lehmann P. Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes. *Nature*, 1993, 366, 69-72
- Kida Y, Esposito-Del Puente A, Bogardus C, Mott DM. Insulin resistance is associated with reduced fasting and insulin-stimulated glycogen synthase phosphatase activity in human skeletal muscle. *J Clin Invest*, 1990, 85, 476-481
- King GL, Wakasaki H. Protein kinase C activation and the formation of diabetic vascular complications. In: *Insulin resistance, metabolic diseases and diabetic complications*, G Gaetano, A Tiengo and S Del Prato, eds, Elsevier Science B.V., 1999, 61-73
- King H, Aubert RE, Herman WH. Global Burden of Diabetes 1995-2025. *Diabetes Care*, 1998, 21, 1414-1431
- King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. *Diabetes Care*, 1993, 16, 157-177
- Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care*, 1995, 18, 258-268
- Knight TM, Smith Z, Whittles A, Sahota P, Lockton JA, Hogg G, Bedford A, Toop M, Kernohan EEM, Baker MR. Insulin resistance, diabetes, and risk markers for ischaemic heart disease in Asian men and non-Asian men in Bradford. *Br Heart J*, 1992, 67, 343-350
- Knowler WC, Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH. Diabetes mellitus in the Pima Indians: incidence, risk factors and pathogenesis. *Diabetes Metab Rev*, 1990, 6, 1-27
- Köbberling J, Tillil H. Empirical risk figures for first degree relatives of non insulin-dependent diabetics. In *The Genetics of Diabetes Mellitus*. Academic Press, 1982, 201-209
- Kort EN, Ballinger DG, Ding W, Hunt SC, Bowen BR, Abkevich V, Bulka K, Campbell B, Capener C, Gutin A, Harshman K, McDermott M, Thorne T, Wang H, Wardell B, Wong J, Hopkins PN, Skolnick M, Samuels M. Evidence of Linkage of Familial Hypoalphalipoproteinemia to a Novel Locus on Chromosome 11q23. *Am J Hum Genet*, 2000, 66, 1845-1856
- Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH, Leland S, Busick EJ, Asmal AC, Rand LI, Christlieb AR, Bradley RF, Kahn CR. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol*, 1987, 59, 750-755
- Krolewski AS, Warram JH, Freire MBS. Epidemiology of late diabetic complications : a basis for the development and evaluation of preventive programs. *Chronic complications of diabetes. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 1996, 25, 217-242

Krolewski AS, Warram JH, Rand LI, Khan CR. Epidemiologic approach to the etiology of type 1 diabetes mellitus and its complications. *N Engl J Med*, 1987, 317, 1390-1398

Kruglyak L, Lander ES. Complete multipoint sib-pair analysis of qualitative and quantitative traits. *Am J Hum Genet*, 1995, 57, 439-454

Kubo Y, Baldwin TJ, Jan YN, J LY. Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature*, 1993, 362, 127-133

Kuivenhoven JA, Jukema JW, Zwinderman AH, de Knijff P, McPherson R, Bruschke AVG, Lie KI, Kastelein JJP. The role of a common variant of the cholesteryl ester transfer protein gene in the progression of coronary atherosclerosis. *N Engl J Med*, 1998, 338, 86-93

Kuusisto J, Mykkänen L, Pyörälä K, Laakso M. NIDDM and its metabolic control predict coronary heart disease in elderly subjects. *Diabetes*, 1994, 43, 960-967

Kwiterovich PO Jr, Fredrickson DS, Levy RI. Familial hypercholesterolemia (one form of familial type II hyperlipoproteinemia). A study of its biochemical, genetic and clinical presentation in childhood. *J Clin Invest*, 1974, 53, 1237-1249

Laakso M, Edelman SV, Brechtel G, Baron AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood in patients with NIDDM. *Diabetes*, 1992, 41, 1076-1083

Laakso M, Lehto S. Epidemiology of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Reviews*, 1997, 5, 294-315

Laakso M, Rönnemaa T, Lehto S, Puukka P, Kallio V, Pyörälä K. Does NIDDM increase the risk for coronary heart disease similarly in both low- and high- risk populations? *Diabetologia*, 1995, 38, 487-493

Lai E, Darnell JE Jr. Transcriptional control in hepatocytes : a window on development. *Trends Biochem Sci*, 1996, 16, 427-430

Laight DW, Carrier MJ, Anggard EE. Endothelial cell dysfunction and the pathogenesis of diabetic macroangiopathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15, 274-282

Lambert JC, Brousseau T, Defosse V, Evans A, Arveiler D, Ruidavets JB, Haas B, Cambou JP, Luc G, Ducimetiere P, Cambien F, Chartier-Harlin MC, Amouyel P. Independent association of an APOE gene promoter polymorphism with increased risk of myocardial infarction and decreased APOE plasma concentrations. The ECTIM study. *Hum Molec Genet*, 2000, 9, 57-61

Lander ES, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 1995, 11, 241-247

Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits. *Science*, 1994, 265, 2037-2048

Lane A, Green F, Scarabin PY, Nicaud V, Bara L, Humphries S, Evans A, Luc G, Cambou JP, Arveiler D, Cambien F. Factor VII Arg/Gln353 polymorphism determines factor VII coagulant activity in patients with myocardial infarction (MI) and control subjects in Belfast

and in France but is not a strong indicator of MI risk in the ECTIM study. *Atherosclerosis*, 1996, 119, 119-127

Lathrop GM. The power of linkage studies of mendelian and multifactorial genetic disease in man. Elsevier Ed, supp. 3, Amsterdam, 1990

Leahy JL, Bonner-Weir S, Weir GC. β -cell dysfunction induced by chronic hyperglycemia. Current ideas on mechanism of impaired glucose-induced insulin secretion. *Diabetes care*, 1992, 15, 442-45

Leahy JL. Natural history of beta-cell dysfunction in NIDDM. *Diabetes Care*, 1990, 13, 992-1010

Leonard J, Peers B, Johnson T, Ferreri I, Lee K, Montminy MR. Characterization of somatostatin transactivating factor-1, a novel homeobox factor that stimulates somatostatin expression in pancreatic islet cells. *Molec Endocr*, 1993, 7, 1275-1283

Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science*, 1996, 272, 676-680

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*, 1993, 329, 1988-1992

Lindner TH, Njolstad PR, Horikawa Y, Bostad L, Bell GI, Sovik O. A novel syndrome of diabetes mellitus, renal dysfunction and genital malformation associated with a partial deletion of the pseudo-POU domain of hepatocyte nuclear factor-1-beta. *Hum Molec Genet*, 1999, 8, 2001-2008

Ling Z, Kiekens R, Mahler T, Schuit FC, Pipeleers-Marichal M, Sener A, Kloppel G, Malaisse WJ, Pipeleers DG. Effects of chronically elevated glucose levels on the functional properties of rat pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 1996, 45, 1774-1782

Lorenzi M, Cagliero E. Pathobiology of endothelial and other vascular cells in diabetes mellitus : call for data. *Diabetes*, 1991, 40, 653-659

Luc G, Bard JM, Arveiler D, Evans A, Cambou JP, Bingham A, Amouyel P, Schaffer P, Ruidavets JB, Cambien F, et al. Impact of apolipoprotein E polymorphism on lipoproteins and risk of myocardial infarction. The ECTIM Study. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14, 1412-1419

Lu M, Seufert J, Habener JF. Pancreatic beta-cell-specific repression of insulin gene transcription by CCAAT/enhancer-binding protein beta. Inhibitory interactions with basic helix-loop-helix transcription factor E47. *J Biol Chem*, 1997, 272, 28349-28359

Lyons TJ, Klein RL, Baynes JW, Stevenson HC, Lopez-Virella MF. Stimulation of cholesteryl ester synthesis in human monocyte-derived macrophages by low density lipoproteins from type I (insulin-dependent) diabetic patients : the influence of nonenzymatic glycosylation of low-density lipoproteins. *Diabetologia*, 1987, 30, 916-923

- Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett*, 1991, 286, 152-154
- Madej A, Okopien B, Kowalski J, Zielinski M, Wysocki J, Szygula B, Kalina Z, Herman ZS. Effects of fenofibrate on plasma cytokine concentrations in patients with atherosclerosis and hyperlipoproteinemia IIb. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1998, 36, 345-349
- Madsen OD, Jensen J, Petersen HV, Pedersen EE, Oster A, Andersen FG, Jorgensen MC, Jensen PB, Larsson LI, Serup P. Transcription factors contributing to the pancreatic beta-cell phenotype. *Horm Metab Res*, 1997, 29, 265-270
- Mahaney MC, Blangero J, Rainwater DL, Comuzzie AG, VandeBerg JL, Stern MP, MacCluer JW, Hixson JE. A major locus influencing plasma high-density lipoprotein cholesterol levels in the San Antonio Family Heart Study. Segregation and linkage analyses. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, 15, 1730-1739
- Mahley RW. Apolipoprotein E : cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*, 1988, 240, 622-630
- Mahtani MM, Widen E, Lehto M, Thomas J, McCarthy M, Brayer J, Bryant B, Chan G, Daly M, Forsblom C, Kanninen T, Kirby A, Kruglyak L, Munnely K, Parkkonen M, Reeve-Daly MP, Weaver A, Brettin T, Duyk G, Lander ES, Groop LC. Mapping of a gene for type 2 diabetes associated with an insulin secretion defect by a genome scan in Finnish families. *Nature Genet*, 1996, 14, 90-94
- Maillard LC. Action des acides aminés sur les sucres. Formation des mélanoides par voie méthodique. *CR Acad Sci (France)*, 1952, 154, 66-68
- Malaisse WJ. Physiologie de la synthèse et de la sécrétion de l'insuline. In *Traité de Diabétologie*, Ed Pradel, 1990, 22-32
- Malmberg K. For the Digami (Diabetes Mellitus Insulin Glucose Infusion in acute Myocardial Infarction) Study Group Prospective randomised study of intensive insulin treatment of long term survival after acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *Brit Med J*, 1997, 314, 1512-1515
- Malmstrom R, Packard CJ, Caslake M. Defective suppression of VLDL, apo B production by insulin is an inherent feature of dyslipidemia in NIDDM. *Diabetologia*, 1996, 39 suppl 1, A 65
- Mansfield TA, Simon DB, Farfel Z, Bia M, Tucci JR, Lebel M, Gutkin M, Vialettes B, Christofilis MA, Kauppinen-Makelin R, Mayan H, Risch N, Lifton RP. Multilocus linkage of familial hyperkalemia and hypertension, pseudohypoaldosteronism type II, to chromosomes 1q31-42 and 17p11-q21. *Nat Genet*, 1997, 16, 202-205
- Mansfield MW, Stickland MH, Grant PJ. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) promoter polymorphism and coronary heart disease in non-insulin-dependent diabetes. *Thrombosis & Haemostasis*, 1995, 74, 1032-1034

Manson JE, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC, Krolewski AS, Rosner B, Arky RA, Speizer FE, Hennekens CH. A prospective study of maturity-onset diabetes mellitus and risk of coronary heart disease and stroke in women. *Ach Intern Med*, 1991, 151, 1141-1147

Marenberg ME, Risch N, Berkman LF, Floderus B, de Faire U. Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins. *N Engl J Med*, 1994, 330, 1041-1046

Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Giuliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G. The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18, 152-156

Marquié G, Duhault J, Jacotot B. Diabetes mellitus in the sand rats. Metabolic pattern during development of the diabetes syndrome. *Diabetes*, 1984, 33, 438-443

Marre M, Bouhanick B, Berrut G. Microalbuminuria. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, B Brenner ed. 1994, 3, 558-556

Marre M, Jeunemaitre X, Gallois Y, Rodier M, Chatellier G, Sert C, Dusselier L, Kahal Z, Chaillous L, Halimi S, Muller A, Sackmann H, Bauduceau B, Bled F, Passa P, Alhenc-Gelas F. Contribution of genetic polymorphism in the renin-angiotensin system to the development of renal complications in insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*, 1997, 99, 1585-1895

Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cell and hepatocytes. *Diabetes*, 1990, 39, 647-652

Mattu RK, Needham EW, Morgan R, Rees A, Hackshaw AK, Stocks J, Elwood PC, Galton DJ. DNA variants at the LPL gene locus associate with angiographically defined severity of atherosclerosis and serum lipoprotein levels in a Welsh population. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14, 1090-1097

Matsuzawa Y, Funahashi T, Nakamura T. Molecular mechanism of metabolic syndrome X: contribution of adipocytokines adipocyte-derived bioactive substances. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 892, 146-154

Mauer S, Steffes MW, Sutherland DER, Najarian JS, Michael AF, Bround M. Studies of the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation. *Diabetes*, 1975, 24, 250-255

McCarthy M, Hitman GI. The genetic aspect of non-insulin-dependent diabetes mellitus; In *Causes of Diabetes, genetic and environmental factors*. Wiley Edts, 1993, 137-186

Mendel DB, Hansen LP, Graves MK, Conley PB, Crabtree GR. HNF-1-alpha and HNF-1-beta (vHNF-1) share dimerization and homeo domains, but not activation domains, and form heterodimers in vitro. *Genes Dev*, 1991, 5, 1042-1056

Miller CP, McGehee RE Jr, Habener JF. IDX-1: a new homeodomain transcription factor expressed in rat pancreatic islets and duodenum that transactivates the somatostatin gene. *EMBO J*, 1994, 13, 1145-115

- Misler S, Barnett DW, Gillis KD, Pressel DM. Electrophysiology of stimulus-secretion coupling in human β -cells. *Diabetes*, 1992, 41, 1221-1228
- Moczulski DK, Rogus JJ, Antonellis A, Warram JH, Krolewski AS. Major susceptibility locus for nephropathy in type 1 diabetes on chromosome 3q. Results of novel discordant sib-pair analysis. *Diabetes*, 1998, 47, 1164-1169
- Morgan R, Bishop A, Owens DR, Luzio SD, Peters JR, Rees A. Allelic variants at insulin-receptor and insulin gene loci and susceptibility to NIDDM in Welsh population. *Diabetes*, 1990, 39, 1479-1484
- Neel JV, Fajans SS, Conn JW. Diabetes mellitus. In: *Genetics and the epidemiology of chronic disease*. Public Health Service Publication No 1163, Washington, DC, 1965, 105
- Newman WP, Nelson R, Scheer K. Community screening for diabetes. Low detection rate in a low-risk population. *Diabetes Care*, 1994, 17, 363-365
- Nicolisi A, Marighi PE, Rizzardi P, Osella A, Miglior S. Prevalence and causes of visual impairment in Italy. *Int J Epidemiol*, 1994, 23, 359-364
- Nishina PM, Johnson JP, Naggert JK, Krauss RM. Linkage of atherogenic lipoprotein phenotype to the low density lipoprotein receptor locus on the short arm of chromosome 19. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89, 708-712
- Norhammar AM, Ryden L, Malmberg K. Admission plasma glucose. Independent risk factor for long-term prognosis after myocardial infarction even in nondiabetic patients. *Diabetes Care*, 1999, 22, 1827-1831
- O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 1998, 63, 259-266
- Odawara M, Tachi Y, Yamashita K. Paraoxonase polymorphism Gln192Arg is associated with coronary heart disease in Japanese non insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82, 2257-2260
- Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, Kojima Y, Furuyoshi N, Shichiri M. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract*, 1995, 28, 103-117
- Ohlsson H, Karlsson K, Edlund T. IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J*, 1993, 12, 4251-4259
- Ohno M, Cooke JP, Dzau VJ, Gibbons GH. Fluid shear stress induces endothelial transforming growth factor beta-1 transcription and production. Modulation by potassium channel blockade. *J Clin Invest*, 1995, 95, 1363-1369
- Olansky L, Welling C, Giddings S, Adler S, Bourey R, Dowse G, Serjeantson S, Zimmet P, Permutt MA. A variant insulin promoter in non- insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1992, 89, 1596-1602

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*, 1986, 2, 360-364

Orci L, Ravazzola M, Baetens D, Inman L, Amherdt M, Peterson RG, Newgard CB, Johnson JH, Unger RH. Evidence that down-regulation of B-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87, 9953-9957

Ordovas JM, Schaefer EJ. Genetic determinants of plasma lipid response to dietary intervention: the role of the APOA1/C3/A4 gene cluster and the APOE gene. *Br J Nutr*, 2000, 83, 127-136

Orkin SH. Reverse genetics and human disease. *Cell*, 1986, 47, 845-850

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 1999, 100, 2473-2476

Pajukanta P, Nuotio I, Terwilliger JD, Porkka KV, Ylitalo K, Pihlajamaki J, Suomalainen AJ, Syvanen AC, Lehtimaki T, Viikari JS, Laakso M, Taskinen MR, Ehnholm C, Peltonen L. Linkage of familial combined hyperlipidaemia to chromosome 1q21-q23. *Nat Genet*, 1998, 18, 369-373

Pajukanta P, Terwilliger JD, Perola M, Hiekkalinna T, Nuotio I, Ellonen P, Parkkonen M, Hartiala J, Ylitalo K, Pihlajamaki J, Porkka K, Laakso M, Viikari J, Ehnholm C, Taskinen MR, Peltonen L. Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in Finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet*, 1999, 64, 1453-1463

Papoz L, Eschwège E, Warnet JM, Richard JL, Claude JR. Incidence and risk factors of diabetes in the Paris prospective study (GREA). In Eschwège E, ed. *Advances in diabetes epidemiology*. Amsterdam, Elsevier, 1982, pp 113-122

Pei W, Baron H, Muller-Myhsok B, Knoblauch H, Al-Yahyaee SA, Hui R, Wu X, Liu L, Busjahn A, Luft FC, Schuster H. Support for linkage of familial combined hyperlipidemia to chromosome 1q21-q23 in Chinese and German families. *Clin Genet*, 2000, 57, 29-34

Permutt MA, Chiu KC, Tanizawa Y. Glucokinase and NIDDM : A candidate gene that paid off. *Diabetes*, 1992, 41, 1367-1372

Peyser AP. Genetic epidemiology of coronary artery disease. *Epidemiologic Reviews*, 1997, 19, 80-90

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

Parving HH, Gall MA, Skott P, Jorgensen HE, Lokkegaard H, Jorgensen F, Nielsen B, Larsen S. Prevalence and causes of albuminuria in non-insulin-dependent diabetic patients. *Kidney Int*, 1992, 41, 758-762

Pericak-Vance MA, Bebout JL, Gaskell PC Jr, Yamaoka LH, Hung WY, Alberts MJ, Walker AP, Barlett RJ, Haynes CA, Welsh KA, Earl NL, Heyman A, Clark CM, Roses AD. Linkage studies in familial Alzheimer disease: evidence for chromosome 19 linkage. *Am J Hum Genet*, 1993, 48, 1034-1050

Pirart J. Diabète et complications dégénératives. Présentation d'une étude prospective portant sur 4400 cas observés entre 1947 et 1973. *Diabetes & Metab*, 1977, 3, 97-107

Pirart J. Diabète et complications dégénératives. Présentation d'une étude prospective portant sur 4400 cas observés entre 1947 et 1973. *Diabetes & Metab*, 1977, 3, 173-182

Pirart J. Diabète et complications dégénératives. Présentation d'une étude prospective portant sur 4400 cas observés entre 1947 et 1973. *Diabetes & Metab*, 1977, 3, 245-256

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*, 1988, 318, 1231-1239

Pontoglio M, Barra J, Hadchouel M, Doyen A, Kress C, Bach JP, Babinet C, Yaniv M. Hepatocyte nuclear factor 1 inactivation results in hepatic dysfunction, phenylketonuria, and renal Fanconi syndrome. *Cell*, 1996, 84, 575-585

Portha B. *Traité de diabétologie: Les modèles animaux de diabète non insulino-dépendant*. Ed Lesobre, 1990, 317-328

Prentki M, Matschinsky FM. Ca²⁺, cAMP, and phospholipid-derived messengers in coupling mechanisms of insulin secretion. *Physiol Rev*, 1987, 67, 1185-1248

Pugliese A, Zeller M, Fernandez A Jr, Zalcborg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*, 1997, 15, 293-297

Pugliese G, Tilton RG, Speedy A, Chang K, Province MA, Kilo C, Williamson JR. Vascular filtration function in galactose-fed versus diabetic rats: the role of polyol pathway activity. *Metabolism*, 1990, 39, 690-697

Randle PJ. Glucokinase and candidate genes for type 2 (non insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1993, 36, 269-275

Rawe JW, Young JB, Minaker KL, Stevens AL, Pallota J, Landsberg L. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes*, 1981, 30, 219-225

Reaven GM. Diabetes mellitus abnormal lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Metabolism*, 1987, 36 suppl 1, 1-18

Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. *Annu Rev Med*, 1993, 44, 121-131

Reaven GM. The fourth musketeer...From Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia*, 1995, 38, 3-13

Rees A, Shoulders CC, Stocks J, Galton DJ, Baralle FE. DNA polymorphism adjacent to human apoprotein A-1 gene: relation to hypertriglyceridaemia. *Lancet*, 1983, 1, 444-446

Reicher P, Nilsson BY, Rosenqvist U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1993, 329, 304-309

Rey-Campos J, Chouard T, Yaniv M, Cereghini S. vHNF1 is a homeoprotein that activates transcription and forms heterodimers with HNF1. *EMBO J*, 1991, 10, 1445-1457

Rich SS. Mapping genes in diabetes. Genetic epidemiological perspective. *Diabetes*, 1990, 39, 1315-1319

Risch N. Linkage strategies for genetically complex traits. III. The effect of marker polymorphism on analysis of affected relative pairs. *Am J Hum Genet*, 1990, 46, 242-253

Rosselin G. Hormones et peptides neurodigestifs. In *Traité de Diabétologie*, Ed Pradel, 1990, 54-70

Rossing P, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving HH. Predictors of mortality in insulin dependent diabetes : 10 year observational follow up study. *Br Med J*, 1996, 313, 779-784

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, 362, 801-809

Rothschild AM, Reis ML, Melo VL, Foss MC, Gallo L Jr. Increased kininogen levels observed in plasma of diabetic patients are corrected by the administration of insulin. *Horm Metab Res*, 1999, 31, 326-328

Rotter JJ, Bu X, Cantor RM, Warden CH, Brown J, Gray RJ, Blanche PJ, Krauss RM, Lusis AJ. Multilocus genetic determinants of LDL particle size in coronary artery disease families. *Am J Hum Genet*, 1996, 58, 585-594

Rudenski AS, Hosker JP, Burnett MA, Matthews DR, Turner RC. The beta cell glucose stimulus-response curve in normal humans assessed by insulin and C-peptide secretion rates. *Metabolism*, 1988, 37, 526-534

Ruiz J, Blanché H, James RW, Blatter Garin MC, Vaisse C, Charpentier G, Cohen H, Morabia A, Passa P, Froguel P. Gln192Arg polymorphism of paraoxonase and coronary heart disease in type 2 diabetes. *Lancet*, 1995, 346, 869-872

Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Charles MA, Bennett PH. A two-step model for the development of non-insulin-dependent-diabetes. *Am J Med*, 1991, 90, 229-235

Saad MF, Knowler WC, Pettitt DJ, Nelson RG, Mott DM, Bennett PH. Sequential changes in serum insulin concentration during development of non-insulin-dependent diabetes. *Lancet*, 1989, 1, 1356-1359

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239, 487-491

Sander M, Neubuser A, Kalamaras J, Ee HC, Martin GR, German MS. Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. *Genes Dev*, 1997, 11, 1662-1673

Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboch MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17, 1067-1073

Schächter F, Faure-Delanef L, Guénot F, Rouger H, Froguel P, Lesueur-Ginot L, Cohen D. Genetic associations with human longevity at the ApoE and ACE loci. *Nature Genetics*, 1994, 6, 29-32

Schaid DJ, Sommer SS. Comparison of statistics for candidate-gene association studies using cases and parents. *Am J Hum Genet*, 1994, 55, 402-409

Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, 270, 26746-26749

Schmitz A, Ingerslev J. Haemostatic measures in type 2 diabetic patients with microalbuminuria. *Diabetic Med*, 1990, 7, 521-525

Schonfeld G. The effects of fibrates on lipoprotein and hemostatic coronary risk factors. *Atherosclerosis*, 1994, 111, 161-174

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lip Res*, 1996, 37, 907-925

Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol*, 1993, 71, 21-29

Schwengel DA, Jedlicka AE, Nanthakumar EJ, Weber JL, Levitt RC. Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. *Genomics*, 1994, 22, 46-54

Seaquist ER, Goetz FC, Rich S, Barbosa J. Familial clustering of diabetic kidney disease. Evidence for genetic susceptibility to diabetic nephropathy. *N Engl J Med*, 1989, 320, 116-125

Seufert J, Weir GC, Habener JF. Differential expression of the insulin gene transcriptional repressor CCAAT/enhancer-binding protein beta and transactivator islet duodenum homeobox-1 in rat pancreatic beta cells during the development of diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1998, 101, 2528-2539

Shaw JE, Hodge AM, DeCourten M, Chitson P, Zimmet PZ. Isolated post-challenge hyperglycaemia confirmed as a risk factor for mortality. *Diabetologia*, 1999, 42, 1050-1054

Sharma JN, Kesavarao U, Yusof AP. Altered cardiac tissue and plasma kininogen levels in hypertensive and diabetic rats. *Immunopharmacology*, 1999, 43, 129-132

Shih DM, Gu L, Hama S, Xia YR, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J Clin Invest*, 1996, 97, 1630-1639

Siitonen OI, Niskanen LK, Laakso M, Siitonen JT, Pyörälä K. Lower-extremity amputation in diabetic and nondiabetic patients. A population-based study in eastern Finland. *Diabetes Care*, 1993, 16, 16-20

Sing CF, Moll PP. Strategies for unraveling the genetic basis of coronary artery disease. In : Berg K, Retterstol N, Refsum S, eds. *From phenotype to gene in common disorders*. Copenhagen, Denmark, Munksgaard, 1990, 17-34

Skyler JS. Diabetic complications : the importance of glucose control. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. Chronic Complications of diabetes. Edit. Brownle M, King GL. Philadelphia, 1996, 25, 243-284

Soria LF, Ludwig EH, Clarke HR, Vega GL, Grundy SM, McCarthy BJ. Association between a specific apolipoprotein B mutation and familial defective apolipoprotein B-100. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86, 587-591

Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, 1975, 98, 503-517

Spielman RS, McGinnis RE, Ewens WJ. Transmission Test for linkage Disequilibrium: the insulin gene region and insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM). *Am J Hum Genet*, 1993, 52, 506-516

Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*, 1998, 98, 2088-2093

Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebrete M, Pineda Torra I, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Maclouf J, Tedgui A. Activation of human aortic smooth muscle cells is inhibited by PPAR α but not by PPAR γ activators. *Nature*, 1998, 393, 790-793

Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. For the Multiple Risk Factor Intervention Trial Research Group. Diabetes, other risk factors, and 12-Yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care*, 1993, 16, 434-444

Stehouwer CDA, Donker AJM. Urinary albumin excretion and cardiovascular disease risk in diabetes mellitus : is endothelial dysfunction the missing link ? *J Nephrol*, 1993, 6, 72-92

Stehouwer CDA, Lambert J, Donker AJM, Van Hinsberg VWM. endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res*, 1997, 34, 55-68

Stehouwer CDA, Schaper NC. The pathogenesis of vascular complications of diabetes mellitus : one voice or many ? *Eur J Clin Invest*, 1996, 26, 535-543

Stehouwer CDA. Von Willebrand factor, dysfunction of the vascular endothelium and the development of renal and vascular complications in diabetes. In : Mogensen CE Ed. *The Kidney and hypertension in Diabetes Mellitus*, 3rd edn. Boston : Kluwer, 1997, 155-163

Steiner G. Diabetes and atherosclerosis. *Diabetes*, 1981, 30, 1-7

Stern MP. Primary prevention of type II diabetes mellitus. Kelly West Lecture. *Diabetes Care*, 1991, 14, 399-410

Stoffel M, Duncan SA. The maturity-onset diabetes of the young (MODY1) transcription factor HNF4-alpha regulates expression of genes required for glucose transport and metabolism. *Proc Nat Acad Sci*, 1997, 94, 13209-13214

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

Stone LM, Kahn SE, Fujimoto WY, Deeb SS, Porte D Jr. A variant at position -30 of the b-cell glucokinase gene promoter is associated with reduced b-cell function in middle-aged Japanese-American men. *Diabetes*, 1996, 45, 422-428

Sussel L, Kalamaras J, Hartigan O'Connor DJ, Meneses JJ, Pedersen RA, Rubenstein JLR, German MS. Mice lacking the homeodomain transcription factor NKX2.2 have diabetes due to arrested differentiation of pancreatic b cells. *Development*, 1998, 125, 2213-2221

Takahashi N, Calderone A, Izzo NJ Jr, Maki TM, Marsh JD, Colucci WS. Hypertrophic stimuli induce transforming growth factor-beta 1 expression in rat ventricular myocytes. *J Clin Invest*, 1994, 94, 1470-1476

Takeda H, Kishikawa H, Shinohara M, Miyata T, Suzaki K, Fukushima H, Ichinose K, Shichiri M. Effect of alpha2 - adrenoceptor antagonist on platelet activation during insulin-induced hypoglycaemia in Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1988, 31, 657-663

Tanizawa Y, Ohta Y, Nomiya J, Matsuda K, Tanabe K, Inoue H, Matsutani A, Okuya S, Oka Y. Overexpression of dominant negative mutant hepatocyte nuclear factor (HNF)-1alpha inhibits arginine-induced insulin secretion in MIN6 cells. *Diabetologia*, 1999, 42, 887-891

Tarnow L, Cambien F, Rossing P, Nielsen FS, Hansen BV, Lecerf L, Poirier O, Danilov S, Boelskifte S, Borch-Johnsen K, Parving HH. Insertion/deletion polymorphism in the angiotensin-I-converting enzyme gene is associated with coronary heart disease in IDDM patients with diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 1995, 38, 798-803

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

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. Clustering of long-term complications in families with diabetes in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*, 1997, 46, 1829-1839

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications : the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*, 1996, 45, 1289-1298

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med*, 1993, 329, 977-986

The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*, 1995, 44, 968-983

The WHO MONICA project. A world wide monitoring system for cardiovascular disease. *Wld Hlth Statist Annu*, 1989, 27-149

Thompson SG, Kienast J, Pyke SDM, Haverkate F, van de Loo JCW. Haemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N Engl J Med* , 1995, 332, 635-641

Thorens B, Waeber G. Glucagon-like peptide-1 and the control of insulin secretion in the normal state and in NIDDM. *Diabetes*, 1993, 42, 1219-1225

Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F. Evidence, from combined segregation and linkage analysis that a variant of the angiotensin 1-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet*, 1992, 51 : 197-205

Tisch R, Yang XD, Singer SM, Liblau RS, Fugger L, McDevitt HO. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice. *Nature*, 1993, 366, 72-75

Todd JA, Aitman TJ, Cornall RJ, Ghosh S, Hall JRS, Hearne CM, Knight AM, Love JM, Mc Aleer MA, Prins JB, Rodrigues N, Lathrop M, Pressey A, De Larato NH, Peterson LB, Wicker LS. Genetic analysis of autoimmune type 1 diabetes mellitus in mice. *Nature*, 1991, 351, 542-447

Todd JA, Bell JI, Mc Devitt Ho. HLA-DQ gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature*, 1987; 329: 599-604

Tooke JE. Microvascular function in human diabetes. A physiological perspective. *Diabetes*, 1995, 44 : 721-726

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 Genet*, 1993, 3, 256-259

- Triomphe A, Flori YA, Hache C, Battais J. Les conséquences socio-économiques des maladies : l'exemple du diabète. *J Econ Med*, 1993, 11 :107-121
- Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Molarius A, Forsen T, Rastenyte D, Sarti C, Reunanen A. Incidence of cardiovascular disease in type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects with and without diabetic nephropathy in Finland. *Diabetologia*, 1998, 41 : 784-790
- Turner RC, Hattersley AT, Shaw JT, Levy JC. Type II diabetes: clinical aspects of molecular biological studies. *Diabetes*, 1995, 44, 1-10
- Turner RC, Millns H, Neil HAW, Stratton IM, Manley SE, Matthews DR, Holman RR for the United Kingdom Prospective Diabetes Study Group. Risk factors for coronary artery disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus : United Kingdom prospective diabetes study (UKPDS : 23). *Br Med J*, 1998, 316 : 823-828
- Tybjærg-Hansen A, Steffensen R, Meinertz H, Schnohr P, Nordestgaard BG. Association of mutations in the apolipoprotein B gene with hypercholesterolemia and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med*, 1998, 338, 1577-1584
- Ukkola O, Savolainen MJ, Salmela PI, Von Dickhoff K, Kesanlehti YA. Apolipoprotein B gene DNA polymorphisms are associated with macro and microangiopathy in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Clinical Genetic*, 1993, 44 : 177-184
- U.K. Prospective Diabetes Study Group. Ethnicity and cardio-vascular disease. The incidence of myocardial infarction in white, South Asian, and Afro-Caribbean patients with type 2 diabetes (U.K. Prospective Diabetes Study 32). *Diabetes Care*, 1998, 21 : 1271-1277
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet*, 1998, 352 : 837-853
- Underwood DA, Proudfoot WL, Lim J, MacMillan JP. Symptomatic coronary artery disease in patients aged 21 to 30 years. *Am J Cardiol*, 1985, 55, 631-634
- Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes*, 1995, 44, 863-870
- Ura S, Araki E, Kishikawa H, Shirotani T, Todaka M, Isami S, Shimoda S, Yoshimura R, Matsuda K, Motoyoshi S, Miyamura N, Kahn OR, Shichiri M. Molecular scanning of the insulin receptor substrate-1 (IRS-1) gene in Japanese patients with NIDDM : Identification of five novel polymorphisms. *Diabetologia*, 1996, 39, 600-608
- Vaisse C, Kim J, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Stoffel M. Pancreatic islet expression studies and polymorphic DNA markers in the genes encoding hepatocyte nuclear factor-3alpha, -3beta, -3gamma, -4gamma, and -6. *Diabetes*, 1997, 48, 1364-1367
- Van den Ouweland JM, Lemkes HH, Ruitenbeek W, Sandkuijl LA, de Vijlder MF, Struyvenberg PA, van de Kamp JJ, Maassen JA. Mutation in mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet*, 1992, 1, 368-371

Van d'Heim C, Rimoin DL, Rotter J, Emery AEH, Rimoin DL (eds). Principles and practice of medical genetics II. Churchill Livingstone, New York, 1990

Van Schaftingen E. A protein from rat liver confers to glucokinase the property of being antagonistically regulated by fructose-6-phosphate and fructose-1-phosphate. *Eur J Biochem*, 1989, 179, 179-184

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

Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu Rev Immunol*, 1992, 10, 411-452

Vaxillaire M, Boccio V, Philippi A, Vigouroux C, Terwilliger J, Passa P, Beckmann JS, Velho G, Lathrop GM, Froguel P. A gene for early-onset non insulin dependent diabetes mellitus (Maturity Onset Diabetes of the Young) maps to chromosome 12q. *Nature Genetics*, 1995, 9, 418-423

Velho G, Byrne MM, Clement K, Sturis J, Pueyo ME, Blanche H, Vionnet N, Fiet J, Passa P, Robert JJ, Polonsky KS, Froguel P. Clinical phenotypes, insulin secretion, and insulin sensitivity in kindreds with maternally inherited diabetes and deafness due to mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Diabetes*, 1996, 45, 478-487

Velho G, Froguel Ph. Maturity-onset diabetes of the young (MODY), MODY genes and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes & Metabolism*, 1997, 23, 34-37

Velho G, Froguel P, Clement K, Pueyo ME, Rakotoambinina B, Zouali H, Passa P, Cohen D, Robert JJ. Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet*, 1992, 340, 444-448

Velho G, Peterson KF, Perseghin G, Hwang JH, Rothman DL, Pueyo ME, Cline GW, Froguel Ph, Shulman GI. Impaired hepatic glycogen synthesis in glucokinase-deficient (MODY-2) subjects. *J Clin Invest*, 1996, 98, 1755-1761

Velho G, Vaxillaire M, Boccio V, Charpentier G, Froguel Ph. Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 locus on chromosome 12q. *Diabetes Care*, 1996, 19, 915-919

Verges B, Brun JM, Farnier M, Fambert PH, Vaillant G. The low high density lipoprotein subfraction 2 level in type 2 (non insulin dependent) diabetes and its relationship with hyperglycemia and obesity. *Diabetologia*, 1989, 32 : 552A

Veterans Affairs Cooperative Study on glycemic control and complications in type II diabetes. Cardiovascular events and correlates in the Veterans Affairs Diabetes Feasibility Trial. *Arch Intern Med*, 1997, 157 : 181-188

Vionnet N, Passa P, Froguel P. Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus. *Lancet*, 1993, 342, 1429-1430

Vogt B, Muhlbacher C, Carrascosa J, Obermaier-Kusser B, Seffer E, Mushack J, Pongratz D, Haring HU. Subcellular distribution of GLUT 4 in the skeletal muscle of lean type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients in the basal state. *Diabetologia*, 1992, 35, 456-463

Waeber G, Calandra T, Bonny C, Bucala R A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress. *Diabetes Metab Res Rev*, 1999, 15, 47-54

Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94, 4782-4787

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*, 1985, 318, 384-386

Wang H, Maechler P, Hagenfeldt KA, Wollheim CB. 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*, 1998, 17, 6701-6713

Watada H, Kajimoto Y, Kaneto H, Matsuoka T, Fujitani Y, Miyazaki J, Yamasaki Y. Involvement of the homeodomain-containing transcription factor PDX-1 in islet amyloid polypeptide gene transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229, 746-751

Watson AD, Berliner JA, Hama SY, La Du Bn, Faull KF, Fogelman AM, Navab M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase. Inhibition of the biological activity of minimally oxidised low density lipoprotein. *J Clin Invest*, 1995, 96 : 2882-2891

Wautier JL. [Advanced glycation end products or Maillard products]. *Rev Prat*, 1998, 48, 1865-1867

Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet*, 1989, 44, 388-396

Weeks DE, Lange K. The affected-Pedigree-Member method of linkage analysis. *Am J Hum Genet*, 1988, 42, 315-326

Weintraub MS, Eisenberg S, Breslow JL. Dietary fat clearance in normal subjects is regulated by genetic variation in apolipoprotein E. *J Clin Invest*, 1987, 80, 1571-1577

Weissenbach J. The Human Genome Project : from mapping to sequencing. *Clin Chem Lab Med*, 1998, 36, 511-514

Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura F, Nyengaard JR, van den Enden M, Kilo C, Tilton RG. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*, 1993, 42 : 801-813

WHO Expert Committee on diabetes mellitus. Secon report, Geneva, Switzerland, 1980 (WHO technical report series n°646)

Xu X, Rogus JJ, Terwedow HA, Yang J, Wang Z, Chen C, Niu T, Wang B, Xu H, Weiss S, Schork NJ, Fang Z. An extreme-sib-pair genome scan for genes regulating blood pressure. *Am J Hum Genet*, 1999, 64, 1694-1701

Yamada S, Nishigori H, Onda H, Utsugi T, Yanagawa T, Maruyama T, Onigata K, Nagashima K, Nagai R, Morikawa A, Takeuchi T, Takeda J. Identification of mutations in the hepatocyte nuclear factor (HNF)-1-alpha gene in Japanese subjects with IDDM. *Diabetes*, 1997, 46, 1643-1647

Yamagata K, Oda N, Kalsaki PJ, Menzel S, Furuta H, Vaxillaire M, Southam L, Cox RD, Lathrop GM, Borhaj 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, Turner RC, Velho G, Chevre JC, Froguel P, Bell GI. Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1-alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature*, 1996, 384, 455-457

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*, 1995, 270, 2729-2734

Ziegler JS, Su Y, Corcoran KP, Nie L, Mayrand E, Hoff LB, McBride LJ, Kronick MN, Diehl SR. Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics*, 1992, 14, 1026-1031

Ziegler O, Got I, Drouin P. Lipoprotéines et diabète. In : *Traité de diabétologie*, Pradel ed., 1990, 231-249

Zimmet P. Antibodies to glutamic acid decarboxylase in the prediction of insulin dependency. *Diabetes Res Clin Pract*, 1996, 34 Suppl, S125-S131

Zimmet PZ, Collins VR, Dowse GK, Alberti KGMM, Tuomilehto J, Knight LT, Gareeboo H, Chitson P, Fared D for the Mauritius Noncommunicable Disease Study Group. Is hyperinsulinaemia a central characteristic of a chronic cardiovascular risk factor clustering syndrome ? Mixed findings in Asian Indian, Creole and Chinese Mauritians. *Diabetic Med*, 1994, 11, 388-396

Zimmet P, Whitehouse S. Bimodality of fasting and two-hour glucose tolerance distributions in a Micronesian population. *Diabetes*, 1978, 27, 793-800

Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nat Med*, 2000, 6, 924-928

Zmirou D, Benhamou PY, Cordonier D, Borgel F, Balducci F, Papoz L, Halimi S. Diabetes mellitus prevalence among dialysed patients in France (UREMIDIAB Study). *Nephrol Dial Transplant*, 1992, 7 : 1092-1097

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 Molec Genet*, 1997, 6, 1401-1408

Zouali H, Vaxillaire M, Lesage S, Sun F, Velho G, Vionnet N, Chiu K, Passa Ph, Permutt A, Demenais F, Beckmann J, Cohen D, Froguel Ph. Linkage analysis and molecular scanning of the glucokinase gene in NIDDM families. *Diabetes*, 1993, 42, 1238-1245