

Génétique du diabète non insulino-dépendant

Philippe Froguel
Nathalie Vionnet
Dominique Gauguier
Martine Vaxillaire
Habib Zouali
Philippe Passa
Gilberto Velho

La prévalence du diabète non insulino-dépendant, qui représente la grande majorité des diabètes, est en constante augmentation. Il s'agit d'un désordre très hétérogène à forte composante génétique. La recherche de gènes de susceptibilité nécessite l'étude de très nombreuses familles. Deux anomalies génétiques ont déjà été trouvées, représentant 5 % des cas : des mutations de la glucokinase sont responsables du MODY (*maturity onset diabetes of the young*), diabète du sujet jeune à transmission dominante, et des mutations de l'ADN mitochondrial ont été repérées dans les familles, où le diabète, souvent accompagné de surdité, est transmis par la mère. Les gènes prédisposant à la grande majorité des diabètes non insulino-dépendants n'ont toujours pas été identifiés, malgré l'exploration de nombreuses pistes et l'existence de modèles animaux. La connaissance des gènes impliqués permettrait de déterminer les sujets à risque et pourrait conduire à la prévention du diabète par des mesures simples touchant à l'alimentation et au style de vie.

ADRESSES

P. Froguel : maître de conférence des universités, praticien hospitalier. N. Vionnet : interne des hôpitaux de Paris. D. Gauguier : docteur ès sciences. M. Vaxillaire : docteur en pharmacie. H. Zouali : étudiant en sciences. P. Passa : praticien universitaire-praticien hospitalier. G. Velho : chargé de recherche à l'Inserm. Centre d'étude du polymorphisme humain (CEPH), Inserm U. 358, 27, rue Juliette-Dodu, 75010 Paris, France et service d'endocrinologie, hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France.

Le diabète sucré, dont la prévalence est croissante dans le monde, touche actuellement près de 4 % de la population occidentale [1]. Le diabète de type 2 ou non insulino-dépendant (DNID) regroupe plus de 85 % des diabétiques des pays développés et est donc, de loin, la forme de diabète la plus répandue. Il s'agit d'une maladie dont la pathogénie et l'étiologie sont complexes et encore mal connues. L'hyperglycémie du DNID est la conséquence de l'association de deux anomalies interdépendantes : (1) une diminution de la sensibilité tissulaire aux effets de l'insuline (insulinorésistance) au niveau des muscles, du tissu adipeux et du foie,

et (2) une anomalie de la réponse insulinosécrétoire au glucose. Le DNID est donc à la fois une affection des principaux organes cibles de l'insuline et une maladie du pancréas endocrine, sans que l'on puisse actuellement affirmer avec certitude dans la plupart des cas quelle est l'anomalie primitive [2]. Cependant, quelle que soit l'anomalie primitive, l'hyperglycémie chronique qui en résulte va altérer l'autre composante de l'homéostasie glycémique par des mécanismes de glucotoxicité.

Le DNID, maladie multifactorielle

Le DNID est une maladie génétiquement transmise, comme en témoigne

RÉFÉRENCES

1. Hamman RF. Diabetes in affluent societies. In : Mann JI, Pyorala K, Teuscher A, eds. *Diabetes in epidemiological perspective*. Edinbourg, 1983 : 7-42.
2. Chanson P, Ferré P, Timsit J. Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 336-45.
3. Barnett AH, Eff C, Leslie RDG, Pyke DA. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia* 1981 ; 20 : 87-93.
4. Rushforth NB, Bennett PH, Steinberg AG, Burch TA, Miller M. Diabetes in the Pima Indians : evidence of bimodality in glucose tolerance distributions. *Diabetes* 1971 ; 20 : 756-65.
5. Fajans SS. Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care* 1990 ; 13 : 49-64.
6. 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 mellitus. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 977-86.
7. Steiner DF, Tager HS, Chan SJ, et al. Lessons learned from molecular biology of insulin-gene mutations. *Diabetes Care* 1990 ; 13 : 600-9.
8. Weissenbach J, Gyapay G, Dib C, Vignal A, Morissette J, Millasseau P, Vaysseix G, Lathrop M. A second generation linkage map of the human genome. *Nature* 1992 ; 359 : 794-801.
9. Bell GI, Xiang KS, Newman MV, Wu SH, et al. Gene for non insulin-dependent diabetes mellitus (maturity-onset diabetes of the young subtype) is linked to DNA polymorphism on human chromosome 20q. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991 ; 88 : 1484-8.

la concordance quasi absolue de son apparition chez des jumeaux monozygotes [3]. Cependant, si la prédisposition génétique est essentielle, elle n'est généralement pas suffisante pour que la maladie apparaisse. L'environnement, que ce soit par un mode de vie sédentaire ou une alimentation déséquilibrée associée à une surcharge pondérale, est souvent indispensable au développement de l'hyperglycémie chronique. Dans certaines populations où le diabète est très fréquent, la bimodalité de la distribution de la tolérance au glucose suggère un mode de transmission dominant avec peut-être une expressivité variable [4]. Il semble, cependant, que, dans la population générale, le DNID soit une maladie polygénique, c'est-à-dire qu'il est 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 au diabète dans des circonstances favorisantes. Étant donné son hétérogénéité, le DNID est aussi probablement multigénique, c'est-à-dire, peut-être, le résultat de différentes combinaisons de défauts génétiques (figure 1).

Une forme particulière de DNID, le diabète non insulino-dépendant du sujet jeune (MODY), présente une transmission mendélienne autosomique dominante [5], suggérant un caractère monogénique pour cette maladie. Cependant, la diversité de l'expression clinique et l'hétérogénéité importante des anomalies du métabolisme du glucose dans différentes familles et populations étudiées sont des arguments en faveur d'une hétérogénéité génétique du MODY [5].

La gravité du DNID vient de ses complications dégénératives micro- et macrovasculaires. S'il est définitivement établi que le mauvais équilibre glycémique est le premier responsable de la morbidité et de la mortalité liées au diabète [6], il est très probable que l'hérédité joue un rôle non négligeable dans la survenue ou la gravité de ses complications. Identifier les déterminants génétiques du DNID et de ses complications dégénératives permettrait, non seulement de mieux en comprendre

les causes, mais aussi de faciliter la prise en charge des diabétiques et la prévention des complications.

Stratégies d'étude génétique du DNID

Depuis que certains gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme glucidique ont été clonés et que des polymorphismes ont été identifiés dans leur proximité, il a été possible de rechercher des associations entre la présence de certains haplotypes et l'apparition de la maladie. Des études ont comparé la fréquence d'allèles de certains gènes – comme le gène de l'insuline par exemple [7] – dans des populations de DNID et de sujets sains. Leurs résultats ont été contradictoires, probablement en raison du faible nombre d'échantillons, de l'hétérogénéité du DNID, mais aussi de la méthode d'analyse elle-même. En effet, pour établir la responsabilité d'un gène dans une maladie, il est nécessaire, non seulement de montrer qu'il existe une corrélation entre la fréquence de certains allèles et l'apparition de l'affection (études d'association dans des populations atteintes comparées à des témoins sains), mais aussi de démontrer la transmission conjointe de la maladie et d'un allèle morbide au sein des familles porteuses de la maladie (études de liaison ou *linkage*).

L'enquête familiale, avec constitution de banques d'ADN et de données cliniques et biologiques à partir de familles de DNID, est donc un préalable indispensable à l'étude génétique du DNID. Le recueil du matériel génétique, qui peut être rendu inépuisable par l'établissement de lignées lymphoblastoïdes, permet une étude systématique par deux approches complémentaires. La première teste les gènes « candidats », c'est-à-dire les gènes connus dont les produits d'expression sont potentiellement en cause dans le DNID. La deuxième utilise des marqueurs polymorphes anonymes, sans rapport *a priori* avec le diabète, mais régulièrement répartis dans le génome humain et dont la localisation chromosomique exacte est connue [8]. Des *loci* reconnus par ces polymorphismes pourraient être situés à proximité des gènes inconnus asso-

ciés au DNID, et par un déséquilibre de liaison dû à cette proximité, leur servir de marqueur. Une telle approche, si elle était couronnée de succès, conduirait à l'identification de nouveaux gènes responsables de la maladie. Il serait alors possible de les cloner et de les séquencer (étape dite de clonage positionnel), de

connaître leur produit d'expression et ainsi de mieux comprendre la pathogénie de la maladie, ouvrant la voie à de nouveaux traitements.

Dans le cas du DNID, l'analyse génétique est compliquée par le caractère polygénique de l'affection et surtout par son hétérogénéité : les mécanismes conduisant à l'hypergly-

cémie chez un sujet obèse de 60 ans et chez un adulte jeune d'une famille à forte pénétration du diabète sont probablement différents et les gènes en cause partiellement ou totalement distincts. La parfaite caractérisation clinique et métabolique des familles et individus étudiés est donc indispensable pour mener à bien les analyses génétiques.

Pour simplifier la recherche des déterminants génétiques du DNID, une stratégie consiste à concentrer les efforts, dans un premier temps, sur les formes « monogéniques » de diabète, comme le MODY ou le diabète à transmission maternelle. L'identification de gènes associés à ces formes particulières de DNID permettrait d'étudier leur rôle dans le DNID commun et de mieux comprendre les mécanismes de maintien de l'homéostasie glucidique.

Le MODY : paradigme pour l'étude génétique du DNID

Au début des années 1960, Fajans *et al.* ont décrit une forme de DNID à progression lente, souvent asymptomatique, se développant chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte jeune [5]. Actuellement, la définition du diabète non insulino-dépendant du sujet jeune ou MODY (*maturity onset diabetes of the young*) repose sur trois critères diagnostiques : (1) il s'agit d'un DNID qui débute avant 25 ans ; (2) le diabète est familial, présent sur au moins trois générations ; et (3) il a un mode de transmission autosomique dominant [5]. Cette forme de diabète pourrait représenter 5 % des DNID.

Il est maintenant reconnu que le MODY, tel qu'il a été décrit, regroupe plusieurs entités de causes différentes : un diabète lié à un gène inconnu situé sur le chromosome 20q dans la région du gène de l'adénosine désaminase, décrit dans une seule famille aux États-Unis [9] ; un diabète causé par des mutations du gène de la glucokinase (GCK) sur le chromosome 7p [10] ; un ou des diabètes liés à d'autres gènes de localisation non encore précisés. Des études récentes ont permis d'exclure une contribution des

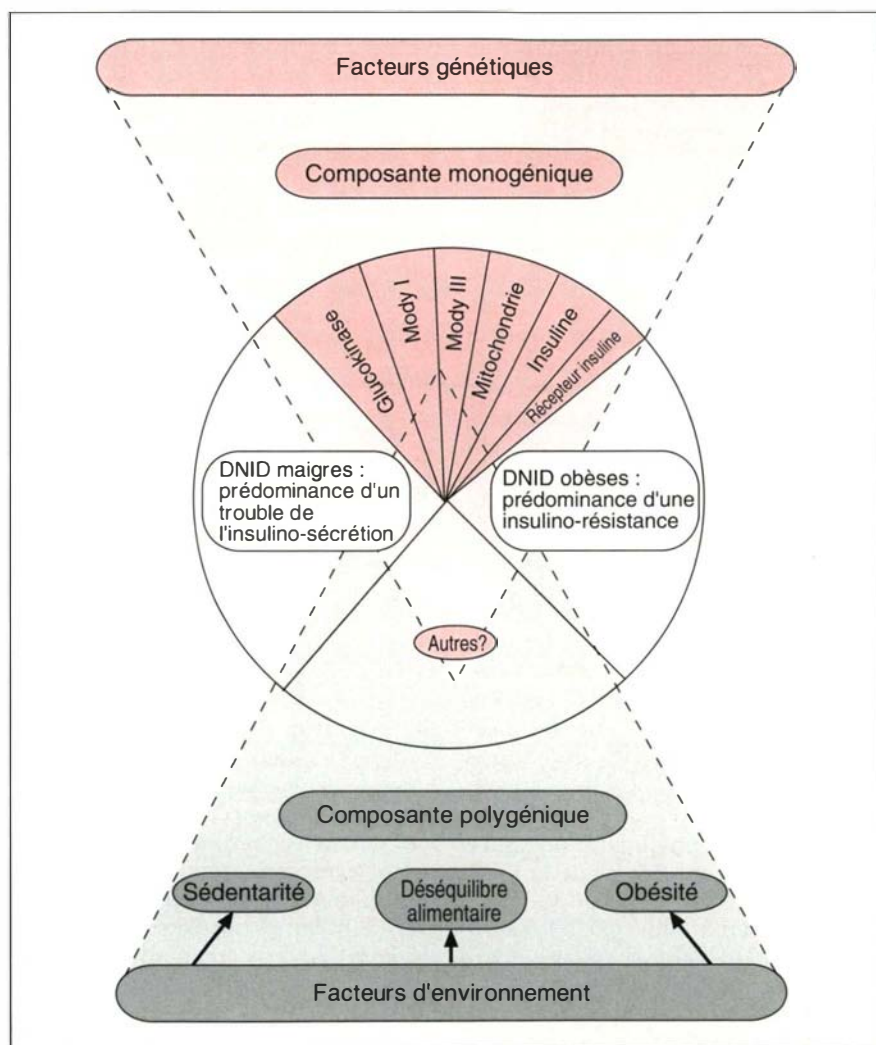


Figure 1. **Modélisation des facteurs étiologiques du DNID.** Le DNID est un syndrome hétérogène caractérisé par une hyperglycémie chronique qui regroupe plusieurs entités cliniques et étiologiques. Facteurs génétiques et facteurs d'environnement sont étroitement associés dans son développement. Certaines formes de diabète sont dues à l'altération d'un seul gène. Dans ces cas, l'intervention des facteurs environnementaux est moins déterminante pour leur expression clinique. En revanche, dans la forme classique du DNID, l'intervention de plusieurs gènes délétères à la fois est nécessaire. Les facteurs d'environnement tels que sédentarité, déséquilibre alimentaire et obésité jouent un rôle plus important dans la révélation de la maladie.

RÉFÉRENCES

10. Froguel P, Zouali H, Vionnet N, Velho G, Vaxillaire M, Sun F, Lesage S, Stoffel M, Takeda J, Passa P, Permutt A, Beckman JS, Bell GI, Cohen D. Familial hyperglycemia due to mutations in glucokinase: definition of a subtype of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328: 697-702.
11. Vaxillaire M, Vionnet N, Vigouroux C, Espinosa R, Lebeau M, Stoffel M, Lehto M, Passa P, Cohen D, Velho G, Bell GI, Froguel P. Search for a third susceptibility gene for maturity-onset diabetes of the young: linkage studies with eleven candidate genes. *Diabetes* 1994; 43: 389-95.
12. Gidh-Jain M, Takeda J, Xu LZ, Lange AJ, Vionnet N, Stoffel M, Froguel P, Velho G, Sun F, Cohen D, Patel P, Lo Y-MD, 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 Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1932-6.
13. Matschinsky FM. Glucokinase as glucose sensor and metabolic signal generator in pancreatic beta-cell and hepatocytes. *Diabetes* 1990; 39: 647-52.
14. Velho G, Froguel P, Clément K, Pueyo ME, Rakotoambinina B, Zouali H, Passa P, Cohen D, Robert JJ. Primary pancreatic beta-cell secretory defect caused by mutations in the glucokinase gene in kindreds of maturity onset diabetes of the young. *Lancet* 1992; 340: 444-8.
15. Byrne MM, Sturis J, Clément 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: 1120-30.
16. Zouali H, Vaxillaire M, Lesage S, Sun F, Velho G, Vionnet N, Chiu K, Passa P, Permutt A, Demenais F, Cohen D, Beckmann J, Froguel Ph. Linkage analysis and molecular screening of the glucokinase gene, in NIDDM families. *Diabetes* 1993; 42: 1238-45.
17. Katagiri H, Asano T, Ishihara H, Inukai K, Anai M, Miyazaki JI, Tsukuda K, Kikuchi M, Yazaki Y, Oka Y. Nonsense mutation of glucokinase gene in late-onset non insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1992; 340: 1316-7.
- gènes de l'insuline, de Glut-2, de la protéine régulatrice de la glucokinase (GCK-RP), de l'hexokinase II, de l'IRS-1 (*insulin receptor substrate*), du récepteur du GLIP-1 (*glucagon-like peptide 1*), de l'apoptotéine C-II, de la glycogène synthase et de la phosphoenolpyruvate carboxykinase [11].

La glucokinase : gène majeur du MODY

Des mutations de la GCK semblent être la cause la plus fréquente du MODY, du moins en France, retrouvées dans plus de 60 % des familles étudiées [10]. A ce jour, 32 mutations différentes ont été mises en évidence, ce qui semble exclure, dans cette forme de MODY, un effet génétique fondateur (figure 2).

La découverte de ces mutations délétères, leur coségrégation avec le diabète au sein des familles et la démonstration par modélisation, à partir de l'étude cristallographique de l'hexokinase de levure, de leur implication dans les sites essentiels de la protéine (site de fixation du glucose) démontrent l'implication de la glucokinase dans la pathogénie du diabète. De plus, l'activité phosphorylante de la GCK mutée, mesurée *in vitro* (après transfection dans des colibacilles des différents allèles mutés et purification), est diminuée dans tous les cas [12]. Il existe même une corrélation entre la gravité de l'intolérance au glucose dans les familles porteuses de mutations de la GCK et l'altération de l'activité phosphorylante [12].

Les mécanismes physiopathologiques par lesquels les mutations de la GCK conduisent à l'hyperglycémie chronique sont au moins partiellement connus. La glucokinase est une enzyme clé du métabolisme glucidique dans les cellules insulinosécrétoires du pancréas endocrine et dans les hépatocytes, les deux seuls tissus où l'enzyme est exprimée [13]. La phosphorylation, catalysée par la glucokinase dans ces tissus, est la première étape du métabolisme cellulaire du glucose. Dans les cellules β -pancréatiques, le métabolisme du glucose et l'insulinosécrétion sont fortement dépendants de l'activité de l'enzyme [13]. Nous avons pu démontrer, chez des sujets porteurs

de mutations de la GCK, que le seuil glycémique qui déclenche l'insulinosécrétion est augmenté, et que la courbe dose-réponse de l'insulinosécrétion en fonction de la glycémie est déplacée vers la droite [14, 15]. Cela confirme le rôle majeur de la glucokinase dans les mécanismes de contrôle de l'insulinosécrétion. Dans le foie, l'enzyme jouerait un rôle important dans le captage hépatique postprandial du glucose. L'anomalie liée à une mutation de la GCK pourrait s'exprimer doublement dans le foie : directement, par une diminution de l'activité de l'enzyme, et indirectement, car la synthèse de GCK dans le foie est sous la dépendance de l'insuline, dont la sécrétion est elle-même diminuée à la suite du déficit β -pancréatique en GCK. Ainsi, un défaut insulinosécrétoire primaire causé par la GCK mutée, probablement aggravé par un défaut hépatique de même nature, est à l'origine de cette forme de diabète.

Glucokinase et DNID à début tardif

L'implication du gène de la GCK dans la forme commune de DNID à début tardif est encore mal connue. Des associations positives entre le DNID et certains polymorphismes de la GCK ont été observées dans des populations de Noirs américains et de Mauriciens créoles. Cependant, l'étude de familles diabétiques, par analyse de liaison combinée au criblage des régions codantes et régulatrices à la recherche de mutations, paraît exclure le gène de la glucokinase comme gène majeur du DNID [16]. Quelques mutations du gène de la GCK viennent pourtant d'être décrites dans certaines familles DNID à début apparemment tardif [17] : dans la plupart des cas, on peut se demander s'il ne s'agit pas de patients MODY dont l'hyperglycémie a été longtemps méconnue. Par ailleurs, des variants des régions régulatrices du gène de la GCK (promoteur pancréatique en particulier) ont été découverts récemment [16]. Ces polymorphismes pourraient jouer un rôle dans l'expression du gène de la GCK, comme le suggèrent l'étude des régions régula-

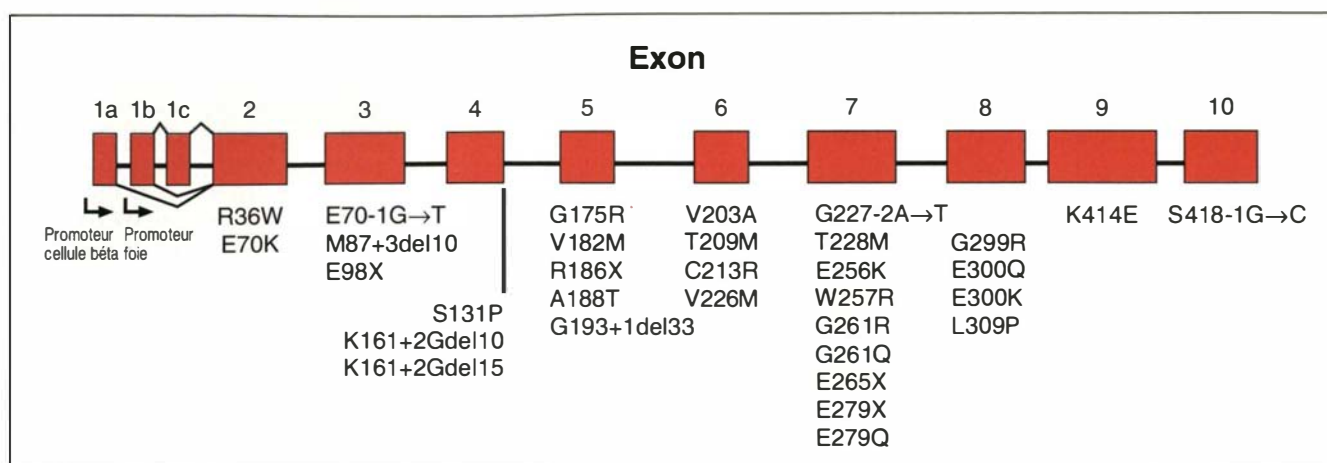


Figure 2. **Représentation schématique du gène de la glucokinase et description des mutations associées à une hyperglycémie.** Le gène de la glucokinase possède 12 exons. Les exons 2 à 10 sont communs aux formes pancréatique et hépatique. En revanche, les exons 1a et 1b/1c codent respectivement pour les parties N-terminales de la glucokinase pancréatique et hépatique et sont épissés alternativement grâce à l'existence d'un promoteur spécifique pour chacun des deux tissus. Au moins 32 mutations différentes responsables d'une hyperglycémie ont été identifiées à ce jour, dans des familles françaises, anglaises, suédoises, américaines et japonaises. Ces mutations intéressent 9 des 12 exons et il peut s'agir, soit de mutations non-sens, qui impliquent l'arrêt prématuré de la traduction, soit de mutations faux-sens, qui entraînent le remplacement d'un acide aminé par un autre, soit de mutations intéressant un site d'épissage, ce qui aboutit à la synthèse d'un ARN messenger anormal. Les acides aminés sont représentés par les lettres-codes : A : Ala ; C : Cys ; D : Asp ; E : Glu ; F : Phe ; G : Gly ; H : His ; I : Ile ; K : Lys ; L : Leu ; M : Met ; N : Asn ; P : Pro ; Q : Gln ; R : Arg ; S : Ser ; T : Thr ; V : Val ; W : Trp ; Y : Tyr.

trices de la GCK chez le rat [18], et la coségrégation d'un de ces polymorphismes avec le diabète dans une famille française de DNID à début tardif [16]. En fin de compte, la prévalence des mutations du gène de la GCK dans le diabète de type 2 peut être estimée de 1 % à 2 %. Environ 1 personne sur 2 000 pourrait avoir une mutation de la glucokinase, et présente un fort risque de développer un diabète.

Le DNID à transmission maternelle, maladie mitochondriale

La transmission plus importante du DNID par les mères diabétiques, et la présence de familles de diabétiques à hérédité purement maternelle ont conduit plusieurs équipes à étudier le rôle du génome mitochondrial, d'autant que certaines cytopathies mitochondriales s'accompagnent d'un diabète. Une délétion de plus de 10 kb de l'ADN mitochondrial a été décrite dans une famille qui présentait un diabète

insulinodépendant à transmission maternelle, associé à une surdité [19]. Ces patients avaient des altérations fonctionnelles de la chaîne respiratoire au niveau musculaire (dont les enzymes sont partiellement codées par le génome mitochondrial), et un déficit marqué de la sécrétion de l'insuline, probablement lié à une perturbation de l'oxydation du glucose. Une mutation ponctuelle de l'ADN mitochondrial, située au niveau de la séquence codant pour l'ARN de transfert de la leucine, a ensuite été découverte dans des familles européennes [20]. Cette mutation qui coségrégait avec un DNID et une hypoacousie neurosensorielle (appelée *maternally inherited diabetes and deafness*, MIDD) a été retrouvée dans 2 % des familles DNID d'une cohorte française [21]. Il est important de souligner que dans les formes de diabète à transmission maternelle prédominante, l'environnement hyperglycémique *in utero*, lié au diabète de la mère, pourrait également provoquer à

long terme des altérations pancréatiques du *conceptus*. Dans ces cas, on pourrait donc être en présence d'une transmission maternelle à la fois génétique et non génétique.

Étude de la composante polygénique du DNID

L'analyse de *linkage* est une technique paramétrique nécessitant de connaître le mode de transmission de la maladie, sa pénétrance et sa fréquence dans la population générale [22]. Ce type d'étude ne paraît pas adapté dans le cas d'une maladie multifactorielle comme le DNID, où il pourrait conduire à de fausses exclusions des *loci* étudiés. De plus, il est difficile de recruter de grandes familles comportant des sujets atteints sur plusieurs générations, compte tenu du début tardif de la maladie et de la mortalité précoce de nombreux diabétiques. Il existe cependant d'autres types d'études génétiques comportant des analyses non paramétriques [23]. Elles peuvent être familiales comme dans les

RÉFÉRENCES

18. Shelton KD, Franklin AJ, Khoor A, Beechem J, Magnuson MA. Multiple elements in the upstream glucokinase promoter contribute to transcription in insulinoma cells. *Mol Cell Biol* 1992 ; 12 : 4578-89.
19. Ballinger SW, Shoffner JM, Hedaya EV, Trounce I, Polak MA, Koontz DA, Wallace DC. Maternally transmitted diabetes and deafness associated with a 10.4 kb mitochondrial DNA deletion. *Nature Genet* 1992 ; 1 : 11-5.
20. Van den Ouweland JMW, Lemkes HHP, Ruitenbeck W, Sandkuijl LA, et al. Mutation in mitochondrial tRNA-leu (UUR) gene in a large pedigree with maternally transmitted type II diabetes and deafness. *Nature Genet* 1992 ; 1 : 368-71.
21. Vionnet N, Passa Ph, Froguel Ph. Prevalence of mitochondrial gene mutations in families with diabetes mellitus. *Lancet* 1993 ; 342 : 1429-30.
22. Risch N. Genetic linkage: interpreting lod scores. *Science* 1992 ; 255 : 803-4.
23. Rich SS. Mapping genes in diabetes: genetic epidemiological perspective. *Diabetes* 1990 ; 39 : 1315-9.
24. Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, et al. 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 : 1988-92.
25. Olansky L, Welling C, Giddings S, Adler S, Bourey R, Dowse G, Serjeantson S, Zimmet P, Permut MA. A variant insulin promoter in non insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1992 ; 89 : 1596-602.
26. Taylor SI, Cama A, Accili D, Barbetti F, Imanó E, Kadowaki H, Kadowaki T. Molecular genetics of insulin resistant diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1991 ; 73 : 1158-63.
27. Elbein SC, Sorenson LK, Taylor M. Linkage analysis of insulin-receptor gene in familial NIDDM. *Diabetes* 1992 ; 41 : 648-56.

études de germains affectés (*sib-pairs*) où l'on étudie la fréquence d'allèles partagés par plusieurs centaines de fratries de diabétiques, en recherchant une concordance supérieure à ce que voudrait le hasard. Il peut s'agir également d'études de population, ou d'association, qui comparent la fréquence d'un polymorphisme génétique dans un groupe cliniquement homogène (et de grande taille) de diabétiques à celle de témoins appariés de même origine ethnique. Ces études cas/témoins ne sont utilisées en général que pour tester des gènes candidats. Une différence significative de fréquence indique, soit un effet propre du variant, soit un déséquilibre de liaison entre une anomalie sur le gène candidat et le marqueur génétique qui pourra alors être utilisé comme marqueur de prédisposition à la maladie. Il est aussi possible de cribler directement les régions codantes et régulatrices d'un « gène candidat » à la recherche de mutations délétères, dans un groupe de patients diabétiques non apparentés. La découverte d'un variant conduira à étudier sa spécificité dans le DNID, par l'étude de témoins non diabétiques, à la recherche d'une co-ségrégation de la mutation avec le diabète dans des familles multiplex, et à l'examen des caractéristiques cliniques des malades porteurs de mutations. Dans la pratique, il est souvent nécessaire de combiner ces différentes approches complémentaires pour explorer au mieux le rôle d'un « gène candidat ».

Approche « gènes candidats » de la génétique du DNID

Un « gène candidat » du DNID est un gène codant pour une protéine connue intervenant d'une façon ou d'une autre dans le maintien de l'homéostasie glucidique. L'absence de marqueurs génétiques du DNID et le fait que l'on ne connaisse pas l'anomalie primitive du DNID oblige à explorer simultanément plusieurs pistes. Comme il existe un trouble de l'insulinosécrétion dans le DNID, il faut étudier, d'une part, les gènes impliqués dans la synthèse et la sécrétion de l'insuline en réponse au

glucose, ainsi que les gènes impliqués dans le contrôle de ces processus (*figure 3*). D'autre part, plusieurs études prospectives récentes suggèrent que la présence d'une insulino-résistance chez des descendants de diabétiques ou dans des populations à forte prévalence de DNID (comme les indiens Pima) serait le meilleur indice prédictif de survenue ultérieure d'un DNID [24]. Cela oriente vers des gènes impliqués dans le métabolisme glucidique des tissus insulinosensibles.

Le gène de l'insuline

Les anomalies de synthèse de l'insuline proprement dite semblent exceptionnelles : des mutations dans les régions codantes du gène de l'insuline ont été rapportées dans moins de dix familles [7]. Ces mutations sont associées à des insulino-pathies par non clivage du peptide C (et donc production de pro-insuline) ou par des anomalies du site de liaison avec le récepteur de l'insuline (et donc hyperinsulinisme).

Des mutations dans les régions promotrices du gène de l'insuline pourraient en modifier la régulation, conduire à une diminution du taux de transcription et aboutir à une hypo-insulinémie relative ou absolue. Ainsi, un nouvel allèle de la région promotrice hypervariable (VNTR), située à 375 paires de bases en amont du site d'initiation de la transcription, a été identifié chez 5 % des sujets DNID noirs américains. Une diminution de moitié du taux de transcription a été observée après son expression dans des cellules d'insulinome. Ainsi, du moins dans cette population, cet allèle pourrait contribuer à la défaillance insulinosécrétoire [25].

Le gène du récepteur de l'insuline

L'exploration des syndromes d'insulino-résistance majeure avec *acanthosis nigricans* (comme le léprechaunisme) a permis de montrer des anomalies fonctionnelles majeures du récepteur de l'insuline, et, dans certains cas, plusieurs mutations ont été décrites, notamment dans la région responsable de l'activité tyrosine kinase de la molécule [26]. L'expres-

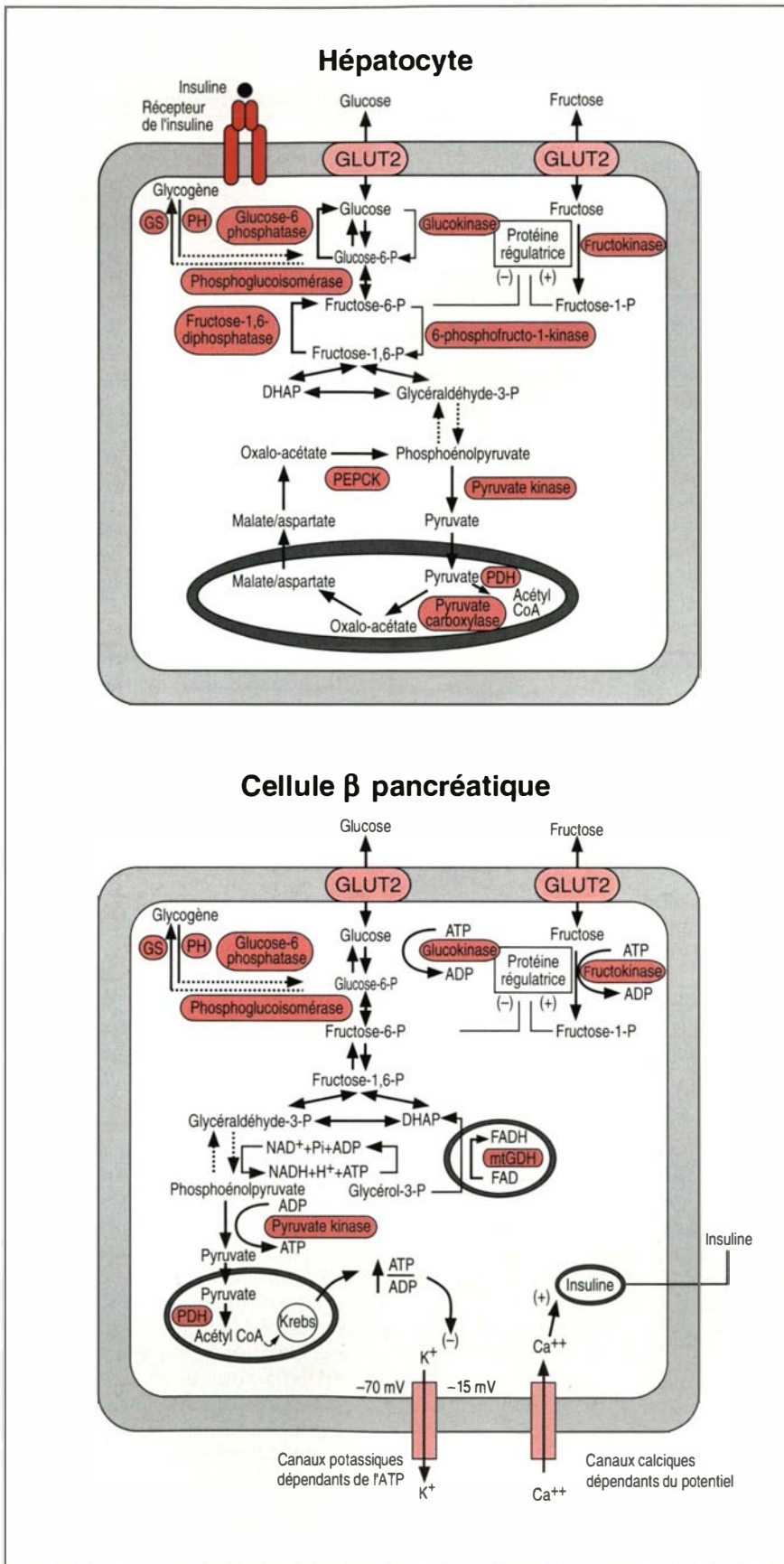


Figure 3. **Approche gène candidat, cellule β-pancréatique et foie.** Voies du métabolisme du glucose dans le foie et la cellule β-pancréatique importantes dans l'utilisation hépatique du glucose et la sécrétion d'insuline par l'îlot [46]. GLUT2, transporteur de glucose 2 ; PFK1, phosphofructo-1-kinase ; PK, pyruvate kinase ; PDH, complexe de la pyruvate déshydrogénase ; GS, glycogène synthase ; PH, phosphorylase ; mGDH, glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale ; PEPCK, phosphoénolcarboxykinase. La glucokinase règle la sécrétion d'insuline en réponse au glucose en contrôlant le flux glycolytique et intervient dans le captage hépatique du glucose. Contrôlée par le glucose dans la cellule β-pancréatique et par l'insuline dans l'hépatocyte, la glucokinase est au centre d'un système complexe permettant le maintien de l'homéostasie glucidique.

RÉFÉRENCES

28. Moller DE, Yokoda A, Flier J. Normal insulin-receptor cDNA sequence in Pima indians with NIDDM. *Diabetes* 1989 ; 38 : 1496-500
29. Prochazka M, Lillioja S, Tait JF, et al. Linkage of chromosomal markers on 4q with a putative gene determining maximal insulin action in Pima indians. *Diabetes* 1993 ; 42 : 514-9.
30. Almind K, Bjorbaek C, Vestergaard H, Hansen T, et al. Amino acid polymorphisms in the insulin receptor substrate IRS-1 in late onset non insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 1993 ; 342 : 828-32.
31. Hager J, Zouali H, Velho G, Froguel P. Insulin receptor substrate (IRS-1) gene polymorphisms in French NIDDM families. *Lancet* 1993 ; 342 : 1430.
32. Kida YA, 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 : 476-81.
33. Groop LC, Kankuri M, Schalin-Jäntti C, et al. Association between polymorphism of the glycogen synthase gene and non insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993 ; 328 : 10-4.
34. Zouali H, Velho G, Froguel P. Polymorphisms of the glycogen synthase gene and non insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993 ; 328 : 1568-9.
35. Thorens B, Charron MJ, Lodish HF. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 1990 ; 13 : 209-18.
36. Lesage S, Vionnet N, Froguel P, et al. Non-linkage of glucose transporters genes with type 2 diabetes mellitus in 86 multiplex diabetic families. *Diabetologia* 1991 ; 34 (suppl 2) : A99.
37. O'Rahilly S, Krook A, Morgan R, Rees A, Flier JS, Moller DE. Insulin receptor and insulin responsive glucose transporter (Glut-4) mutations and polymorphisms in a Welsh type 2 (non insulin-dependent) diabetic population. *Diabetologia* 1992 ; 35 : 186-9.
- sion de gènes mutés du récepteur de l'insuline dans des cellules eucaryotes a confirmé que les anomalies de ce gène entraînaient une altération sévère du transport du glucose ou de la synthèse de glycogène [26]. Ces résultats ne semblent cependant pas applicables aux formes communes du DNID, dans lesquelles les mutations du récepteur de l'insuline sont très rares. Aucune évidence d'association ou de liaison génétique entre le gène du récepteur de l'insuline et le DNID n'a été observée dans les études familiales et de populations [27]. De plus, aucune mutation n'a été mise en évidence par le séquençage des régions codantes de ce gène chez des diabétiques issus de l'ethnie Pima [28]. À cet égard, une forte liaison génétique entre la résistance à l'insuline et un polymorphisme situé sur le chromosome 4, près du gène de la *fatty acid binding protein 2* (Fabp 2), a été récemment retrouvée dans cette population [29].

Le gène du substrat 1 du récepteur de l'insuline (IRS-1)

IRS-1 est un messenger essentiel de l'action cellulaire de l'insuline. Première protéine à être phosphorylée après fixation de l'insuline sur son récepteur (qui possède une activité tyrosine kinase intrinsèque), IRS-1 serait le lien entre le récepteur de l'insuline et de nombreuses protéines intervenant dans les multiples fonctions cellulaires réglées par l'insuline. Deux mutations faux sens du gène *IRS-1*, situées à proximité de sites de phosphorylation, ont été décrites chez 18 % des patients DNID danois et retrouvées de manière significativement moins fréquente chez des sujets non diabétiques (6 %) de cette population [30]. Bien que présentes dans la population française, ces mêmes mutations ne présentent pas des fréquences différentes chez les sujets diabétiques et non diabétiques, et ne coségrègent pas avec le diabète dans des familles DNID. De plus, ces mutations ne sont associées à aucun profil clinique évoquant une insulinosensibilité diminuée [31]. Il est donc probable que ces polymorphismes d'*IRS-1* jouent, au mieux,

un rôle mineur dans le développement du DNID dans certaines populations.

Le gène de la glycogène synthase

Le muscle est le site principal de l'insulinorésistance dans le DNID. Cette résistance à l'insuline se traduit notamment par une diminution du stockage du glucose en glycogène [2]. Il a été démontré que la sensibilité de la glycogène-synthase à l'insuline était diminuée chez les sujets DNID [32], et une association entre ces anomalies métaboliques et un polymorphisme du gène de la glycogène synthase a été observée chez des diabétiques finlandais [33]. Cependant, aucune liaison génétique entre ce gène et le diabète n'ont été observées chez des familles diabétiques françaises [34]. Il est possible que les anomalies d'expression de la glycogène synthase soient secondaires au DNID. Le défaut de synthèse du glycogène, rencontré chez des enfants de patients DNID, pourrait être en rapport avec un déficit du transport ou de la phosphorylation du glucose dans les cellules musculaires.

Les gènes des transporteurs de glucose

Les transporteurs de glucose appartiennent à une famille de glycoprotéines transmembranaires, permettant le transport facilité du glucose dans les cellules [35]. Glut-1 est ubiquitaire et aurait un rôle dans l'apport basal de glucose dans les cellules. Glut-4 est exprimé dans les muscles et le tissu adipeux. Sa translocation à la surface cellulaire et son activité intrinsèque sont réglées par l'insuline, ce qui suggère que ce transporteur est impliqué dans les mécanismes d'action de l'insuline [35]. Cependant, dans la plupart des études, l'expression de Glut-4 dans les muscles des sujets DNID est normale. Les études d'association ou de liaison génétique entre le gène de Glut-4 (chromosome 17p) et le DNID sont négatives [36]. De plus, la seule mutation trouvée dans les régions codantes du gène de Glut-4, un remplacement de la valine en position 383 par une isoleucine, ne semble pas être associée au diabète [37]. Glut-2 est exprimé dans le foie et la cellule β -pancréatique, où il

pourrait former une unité fonctionnelle avec la glucokinase [35]. Il jouerait un rôle dans les mécanismes d'insulinosécrétion et de captation hépatique de glucose. Cependant, la démonstration, chez la souris transgénique, que la diminution presque totale de l'expression de Glut-2 n'est pas associée à une modification de la tolérance au glucose, semble écarter un rôle primaire de ce transporteur dans les mécanismes d'hyperglycémie [38]. Aucune liaison génétique entre Glut-2 et la maladie n'a été trouvée dans des études familiales [36]. Ainsi, bien que des anomalies de l'expression des gènes des transporteurs de glucose soient associées au DNID, elles semblent présenter un caractère secondaire à la maladie.

Gènes *ras* et insulino-résistance musculaire

Un moyen pour identifier les gènes associés à l'insulino-résistance du DNID consiste à préparer des banques de soustraction des gènes exprimés dans le muscle de patient diabétique et criblés à l'aide de sondes issues du muscle normal. Cette stratégie a permis récemment l'isolement d'un gène, parmi les 4 000 clonés, qui synthétise une protéine de 29 kDa, membre de la superfamille des protéines Ras. Le messenger de ce gène (appelé *ras associated with diabetes, rad*), est exprimé presque neuf fois plus dans le muscle de sujet DNID que dans le muscle de sujet normal ou DID [39]. Les protéines Ras semblent jouer un rôle important dans la transmission du message de l'insuline dans le muscle (en particulier dans le transport du glucose, en intervenant dans la mobilisation des transporteurs de glucose Glut-4 à partir de leur *pool* intracellulaire). Il reste à déterminer l'importance exacte de *rad*, et son implication éventuelle comme facteur causal de l'insulino-résistance.

« Gènes candidats » potentiels du DNID

Le gène de toute protéine impliquée directement ou indirectement dans les mécanismes ou dans la régulation de l'insulinosécrétion ou de l'action de l'insuline est un gène

candidat potentiel du DNID. Parmi les gènes qui pourraient être associés aux anomalies de l'insulinosécrétion du DNID, citons le gène de la protéine régulatrice de la glucokinase ; le gène du canal potassique dépendant de l'ATP ; le gène de la glycérol-phosphate déshydrogénase mitochondriale, du récepteur du *glucagon-like-peptide-1*, du récepteur du glucagon...

Parmi les gènes potentiels de l'insulino-résistance, on peut citer le gène de l'hexokinase 2, le gène de la glucose-6-phosphatase et celui de la protéine-phosphatase 1. De plus, lorsque l'on connaît les interactions très importantes existant entre l'utilisation de glucose et l'oxydation des lipides (cycle de Randle), et les troubles très fréquents du métabolisme lipidique chez les sujets DNID, il est possible qu'un certain nombre de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique (synthèse et/ou mobilisation accrue de lipides) puissent participer à la susceptibilité génétique du DNID.

Exploration systématique du génome de fratries DNID

Il est possible que certains gènes de susceptibilité au DNID correspondent à des protéines encore inconnues, impliquées, par exemple, dans la régulation du métabolisme glucidique. C'est pourquoi l'étude portant sur des marqueurs anonymes régulièrement répartis sur le génome, quoique fastidieuse, sera probablement indispensable, en complément de la stratégie des gènes candidats. Dans la mesure où l'analyse de liaison entre un marqueur polymorphe et le DNID, réalisée dans un groupe de fratries, ne permet pas l'exclusion d'une large portion du génome (comme c'est le cas dans des familles multigénérationnelles), un grand nombre de marqueurs sera nécessaire pour couvrir tout le génome (> 350).

Apport de l'étude génétique des modèles animaux de DNID

La complexité des études génétiques des maladies humaines multifactorielles a rendu indispensable l'emploi de modèles animaux repro-

duisant spontanément ces maladies. L'homogénéité génétique de ces souches et le contrôle strict de l'environnement permettent de simplifier les recherches de localisation chromosomique et d'identification des anomalies impliquées dans le développement de ces maladies.

La caractérisation physiologique de ces modèles, qui conduit à la définition de nombreux traits phénotypiques, 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.

Les stratégies d'étude au hasard ou de 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.

Le rat de la lignée Goto-Kakizaki (rat GK) reproduit spontanément, sans obésité manifeste, les caractéristiques physiologiques principales du DNID [40]. L'étude d'animaux F1 (issus du croisement entre des rats GK et des rats Wistar non diabétiques) a permis de préciser le caractère polygénique de la maladie et de souligner l'importance des effets maternels dans sa transmission [41]. Les études de localisation et d'identification des gènes impliqués dans le développement de ce diabète utilisent deux types d'approches complémentaires : (1) la recherche chez les individus de populations hybrides (F1xF1 ; F1xGK ; F1xWistar) de la transmission conjointe de certains génotypes et de traits phénotypiques (études de liaison); (2) l'identification, par une approche au hasard, de gènes dont l'expression est modifiée chez le rat GK par rapport au rat non diabétique. Ce modèle expérimental devrait permettre d'orienter les recherches chez l'homme vers de nouveaux gènes candidats du DNID.

Approche génétique des complications dégénératives du diabète

Le DNID est souvent présenté comme un syndrome qui associe non seulement des troubles de l'équilibre glycémique, mais aussi une hypertension, une obésité androïde, des anomalies lipidiques (élévation des VLDL, des LDL et des triglycérides, diminution du HDL cholestérol) et de la fibrinolyse [42]. Ces affections seraient reliées par la présence d'une insulino-résistance commune. Ce syndrome X associerait donc plusieurs facteurs de risque vasculaire (notamment coronarien), mais son expression clinique serait variable d'un sujet à l'autre. Certains déterminants génétiques pourraient être communs aux diverses composantes du syndrome X.

Il est aussi possible que d'autres *loci* puissent coségrégier indépendamment du DNID, mais conduisent à des phénotypes prédisposant aux complications macroangiopathiques, spécifiquement chez les diabétiques présentant certaines formes alléliques : ce pourrait être le cas des gènes de l'apoprotéine A, de la lipoprotéine lipase, de l'apoprotéine E, de l'apoprotéine B, mais surtout du polymorphisme d'insertion/délétion du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine [43].

La survenue d'une néphropathie est fortement liée à la durée du diabète et au mauvais équilibre glycémique chronique [6]. Cependant, la présence d'antécédents familiaux d'hypertension artérielle ou de maladie coronarienne semble être un facteur de risque de néphropathie, du moins chez les diabétiques insulino-dépendants [44]. Le déterminisme de la glomérulopathie diabétique dans le DNID est encore inconnu.

Les travaux génétiques récents ont montré que des progrès majeurs étaient possibles dans une maladie aussi complexe que le DNID. Cela 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 ■

Summary

Genetics of non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)

Non insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) is a genetic disorder with an epidemic development in the westernized civilisations. The knowledge of genetic factors would help in screening those individuals susceptible to develop diabetes, to prevent overfeeding, overweight and sedentarity ; these environmental factors can reveal or worsen diabetes. NIDDM is a clinically and genetically heterogeneous disorder, probably due to the alteration of several genes. The collection of numerous and large families with several diabetic subjects and the sorting in clinically homogeneous subgroups are necessary to identify the susceptibility genes. It has been recently shown that glucokinase (enzyme that phosphorylates glucose in pancreatic β -cell and liver) was the cause of MODY (maturity onset diabetes of the young), a NIDDM subtype characterized by an autosomic dominant mode of inheritance and an early age of onset. Glucokinase mutations are responsible for a mild hyperglycemia with onset during childhood or during pregnancy ; in addition, diabetes can be due to mutations in mitochondrial DNA in families where the disease is maternally transmitted and often associated with hearing loss. These two genetic defects can account for about 2 % to 5 % of NIDDM patients each. Screening for these mutations is feasible.

RÉFÉRENCES

38. Tal M, Wu YJ, Leiser M, Surana M, Lodish H, Fleischer N, Weir G, Efrat S. (Vall2)HRAS downregulates Glut2 in beta cells of transgenic mice without affecting glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 5744-8.

39. Reynet C, Kahn CR. Rad : a member of the Ras family overexpressed in muscle of type II diabetic humans. *Science* 1993 ; 262 : 1441-4.

40. Portha B, Serradas P, Bailbe D, Suzuki KI, Goto Y, Giroix MH. Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous non-obese model for type 2 (non insulin-dependent) diabetes. *Diabetes* 1991 ; 40 : 486-91.

41. Gauguier D, Nelson I, Bernard C, Parent V, Marsac C, Cohen D, Froguel P. Higher maternal than paternal inheritance of diabetes in the GK rat. *Diabetes* 1994 ; 43 : 220-4.

42. Reaven GM. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* 1988 ; 37 : 1595-607

43. Ruiz R, Blanché H, Velho G, Cohen D, Cohen N, Passa P, Froguel P. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism is an independent risk factor for coronary heart disease in non insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994 ; 91 : 3662-5

44. Groop L, Ekstrand A, Forsblom C, et al. Insulin-resistance, hypertension and microproteinuria in patients with type 2 (non insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993 ; 36 : 642-7.

45. Earle K, Walker J, Hill C, Viberti GC. Familial clustering of cardiovascular disease in patients with insulin-dependent diabetes and nephropathy. *N Engl J Med* 1992 ; 326 : 673-7.

46. Portha B. Physiologie de la cellule β des îlots de Langerhans. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 212-25.

TIRÉS À PART

P. Froguel.