

Cartographie de gènes de prédisposition au diabète non insulino-dépendant dans un modèle de diabète spontané chez le rat

Le diabète sucré touche actuellement près de 4 % de la population occidentale. Le diabète non insulino-dépendant (DNID) en est la forme la plus largement répandue (85 % à 90 % des diabétiques) et son incidence est en perpétuelle augmentation [1].

Le DNID est considéré comme l'exemple type d'une maladie multifactorielle résultant de l'interaction de facteurs génétiques et de facteurs liés à l'environnement. Le caractère polygénique et peut-être multigénique de la maladie ressort à présent clairement des études familiales. Mais si dans certains sous-groupes très restreints et très particuliers de patients diabétiques, on a pu imputer la détérioration de l'homéostasie glucidique à l'altération de certains gènes précis, dans l'immense majorité des cas, les gènes impliqués dans les formes courantes de DNID sont inconnus à ce jour [2, 3].

La difficulté majeure provient non seulement du caractère multifactoriel, déjà évoqué, de la maladie, mais aussi de l'interférence d'autres affections, telles que l'obésité ou l'hypertension artérielle. Une autre source de difficultés réside dans la caractérisation phénotypique des patients DNID. La glycémie fait l'objet d'une régulation très fine qui inclut des corrélations métaboliques et hormonales nombreuses mettant probablement en jeu de nombreux gènes différents. Une étude génétique du DNID doit donc comporter la possibilité de définir des sous-phénotypes

précis fondés, notamment, sur l'intolérance au glucose et sur le déficit insulinaire, anomalies majeures du diabète. Pour des raisons éthiques et pratiques évidentes, il est très difficile d'effectuer de telles études phénotypiques sur une grande population de sujets sains et de sujets diabétiques non traités.

Pour toutes ces raisons, les modèles animaux reproduisant spontanément les caractéristiques principales du DNID apparaissent aujourd'hui comme essentiels à l'étude des anomalies génétiques responsables de la maladie. L'homogénéité génétique de ces souches, le contrôle strict de l'environnement et la sélection des croisements les plus informatifs permettent de simplifier les recherches de localisation chromosomique et d'identification des gènes candidats. Deux études récentes permettent de mieux évaluer l'apport des modèles animaux de DNID [6, 7]. Ces deux études portent sur la génétique du rat de la lignée Goto-Kakizaki (rat GK) qui reproduit spontanément les principaux troubles métaboliques et hormonaux caractéristiques du DNID : hyperglycémie basale modérée, altération très nette de la tolérance glucidique et de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et enfin résistance périphérique et hépatique à l'insuline [4]. Cette lignée a été obtenue par Goto et Kakizaki après croisements répétés de rats issus de la souche Wistar (souche de rats non diabétiques) qui présentaient spontanément une légère intolérance au

glucose. Ces croisements ont été poursuivis jusqu'à la dixième génération en sélectionnant, à chaque génération, les rats reproducteurs parmi les plus intolérants au glucose. A la dixième génération, l'hyperglycémie devenant manifeste, des croisements entre frères et sœurs ont été effectués pour obtenir une souche génétiquement pure (*inbreeding*). A partir de la 35^e génération, les troubles se sont stabilisés et tous les rats GK sont diabétiques [5].

La stratégie que nous avons utilisée est fondée sur l'analyse de la liaison génétique qui permet de rechercher la cotransmission, d'une génération à une autre, de certains génotypes avec le phénotype représentant la maladie. Dans l'étude de Gauguier *et al.* [6] des rats GK et des rats Brown-Norway (BN) non diabétiques ont été croisés pour obtenir une population de première génération (F1) génétiquement homogène (tous les rats sont hétérozygotes). La même stratégie a été utilisée par Galli *et al.* [7], mais la souche non diabétique était, dans ce cas, la souche Fischer. Les rats F1 ayant tous développé un diabète de sévérité modérée par rapport au rat GK, ils ont été croisés entre eux pour produire une population hybride F2 montrant une hétérogénéité à la fois génotypique et phénotypique. Cette variabilité phénotypique en F2 est représentative du caractère polygénique du trait étudié.

Dans les deux études, une exploration systématique du génome des hy-

brides F2 a été conduite en utilisant des marqueurs génétiques microsattellites polymorphes [6, 7]. Le polymorphisme génétique produit par ces marqueurs est dû à la variabilité du nombre de répétitions d'un motif nucléotidique de 2 à 4 paires de bases. Dans notre propre étude [6], nous avons mesuré, chez chacun des individus hybrides F2, la glycémie et l'insulinémie à jeun et, à l'état post-absorptif, la tolérance au glucose et la dynamique de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Bien que le rat GK ne soit pas obèse, l'association fréquente entre DNID et obésité chez l'homme nous a conduits à mesurer chez chaque hybride F2 le poids du tissu adipeux rétropéritonéal. Le rapport du poids du tissu adipeux au poids corporel a été utilisé comme un index d'adiposité.

La combinaison de ces études génotypiques et phénotypique autorise l'emploi de la méthode des *quantitative trait locus* (QTL) pour le traitement statistique des résultats [8-10]. Cette méthode puissante est couramment utilisée dans les modèles polygéniques. En effet, au lieu de tenter de classer les hybrides en groupes atteints et non atteints, elle utilise directement la valeur quantitative du trait phénotypique. Elle repose sur l'analyse, dans une population hybride, des valeurs continues des variables phénotypiques et des génotypes individuels. Cette approche a rendu possible l'étude statistique in-

dépendante des différents sous-groupes phénotypiques mesurés chez les hybrides F2 (BNxGK).

L'analyse de liaison des traits phénotypiques et des génotypes a permis de situer sur 6 chromosomes différents des gènes de contrôle de la glycémie et de l'insulinémie à jeun, de la tolérance au glucose et de la réponse insulinosécrétoire au glucose. Ces différents *loci* ont été appelés *Nidd/gk* numérotés de 1 à 6 (*Nid* : *non insulin dependent diabetes*) (Tableau I). De plus, nous avons mis en évidence une liaison entre le poids corporel (*lod score* > 6) et le *locus Bw/gk1* du chromosome 7 (*Bw* pour *body weight*). Les effets cumulés de ces *loci* rendent compte de 27 % de la variance phénotypique de la tolérance au glucose et de 20 % de celle de la réponse insulinosécrétoire au glucose.

Nous avons identifié sur les chromosomes 2 et 17, deux *loci* liés, respectivement, à l'insulinémie à jeun (*Nidd/gk2*) et à la glycémie à jeun (*Nidd/gk6*). Des *loci* de contrôle de la réponse insulinosécrétoire au glucose ont été situés sur les chromosomes 4 (*Nidd/gk3*) et 8 (*Nidd/gk5*). Enfin, les *loci Nidd/gk1* (chromosome 1) et *Nidd/gk4* (chromosome 5) sont liés à la tolérance au glucose mais ni à la glycémie à jeun ni à aucun des paramètres de la sécrétion d'insuline. Le cas du *locus Nidd/gk1* est illustré sur la figure 1. Notons qu'une liaison très forte entre un locus situé sur le chro-

mosome 1 et la tolérance au glucose a également été retrouvée par l'équipe suédoise [7]. Une caractéristique importante de ce *locus* est l'effet très significatif observé seulement chez les femelles hybrides (figure 1). Dans cette même région du chromosome 1, un groupe de marqueurs est lié à l'adiposité et rend compte de 13 % de la variance de ce trait phénotypique dans notre croisement.

La cartographie de ces QTL sur des chromosomes différents démontre le contrôle génétique indépendant, d'une part, de la glycémie et de l'insulinémie en condition de jeûne et, d'autre part, de l'homéostasie glucidique et de la sécrétion d'insuline après une surcharge en glucose. Cette indépendance génétique correspond bien au fait que le contrôle de l'homéostasie glucidique et de la sécrétion d'insuline font appel à des mécanismes différents, au moins en partie, et influencés par l'état nutritionnel. Enfin, ces données font ressortir la nécessité d'étudier de nombreux sous-phénotypes du DNID chez les patients participant aux études génétiques pour former des sous-groupes de populations homogènes sur le plan phénotypique.

Nous avons pu mesurer l'effet du *locus* sur le trait phénotypique en calculant la moyenne des valeurs phénotypiques par génotype au *locus* pour le marqueur génétique le plus lié au trait. A chacun des *loci Nidd/gk 1, 2, 4, 6*, l'homozygotie GK/GK est

Tableau I

DESCRIPTION DES *LOCI* LIÉS GÉNÉTIQUEMENT
AUX SOUS-PHÉNOTYPES DU DNID ÉTUDIÉS
CHEZ LES HYBRIDES F2 (BNXGK)

<i>Locus</i>	Chromosome	Marqueur le plus proche	QTL	Valeur de P	% de la variance attribuée au <i>locus</i>
<i>Nidd/gk1</i>	1	RCA01.20 <i>My12</i>	Tolérance au glucose Adiposité	$P < 10^{-5}$ $P < 10^{-4}$	16 % 13 %
<i>Nidd/gk2</i>	2	<i>P9ka</i>	Insulinémie à jeun	$P < 10^{-4}$	12 %
<i>Nidd/gk3</i>	4	R181	Sécrétion d'insuline	$P < 10^{-4}$	10 %
<i>Nidd/gk4</i>	5	R182	Tolérance au glucose	$P < 10^{-3}$	11 %
<i>Bw/gk1</i>	7	<i>Cp450b</i>	Poids corporel	$P < 10^{-5}$	24 %
<i>Nidd/gk5</i>	8	<i>P-450d</i>	Sécrétion d'insuline	$P < 10^{-3}$	10 %
<i>Nidd/gk6</i>	17	RCA02.22	Glycémie à jeun	$P < 10^{-3}$	11 %

D'après [6]

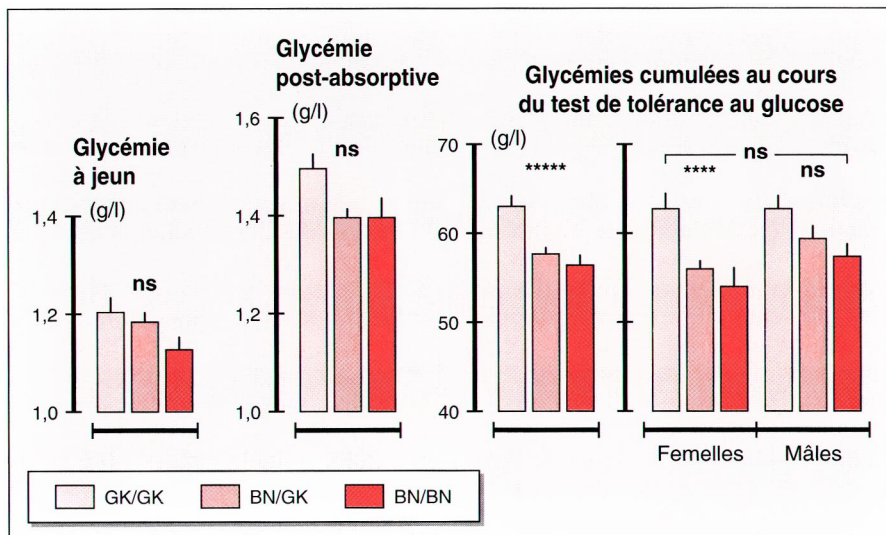


Figure 1. Paramètres de l'homéostasie glucidique chez les hybrides F2 (BNxGK) au locus *Nidd/gk1*. Pour chaque paramètre, on a représenté les moyennes accompagnées de l'écart à la moyenne correspondant, sur le plan génotypique, au marqueur RCA01. 20. **** $P < 0,0001$; ***** $P < 0,00001$.

fortement liée à une détérioration de l'homéostasie glucidique. En revanche, l'homozygotie GK/GK aux loci *Nidd/gk3* et *Nidd/gk5* est associée à une réponse insulinosécrétoire au glucose meilleure que celle calculée chez les hétérozygotes et les homozygotes BN/BN. Cet effet peut traduire l'expression, chez le rat BN, d'allèles de gènes de ces loci conduisant à une diminution de la réponse insulinosécrétoire au glucose. On peut également expliquer ce résultat par l'effet de gènes des loci *Nidd/gk3* et *Nidd/gk5* sélectionnés au cours des croisements ayant conduit à la lignée GK et qui ont permis d'empêcher une dégradation délétère de la tolérance au glucose. Il faut rappeler que les individus utilisés pour produire la lignée GK ont été choisis sur la seule base de l'intolérance au glucose [5]. Cette situation paradoxale a déjà été observée dans des populations hybrides utilisées pour l'étude génétique de modèles de diabète insulino-dépendant chez la souris NOD (*non obese diabetic*) et d'hypertension chez le rat SHRSP (*spontaneously hypertensive rat stroke prone*), où l'allèle de susceptibilité conduisant à un effet phénotypique délétère peut être porté par la souche témoin [5, 11]. Nous n'avons pas retrouvé de gènes candidats dans la plupart des loci identifiés. Seul le gène du neuropeptide Y (NPY) situé dans le locus *Nidd/gk3* est un gène candidat du contrôle de la sécrétion d'insuline. Le NPY est un neuromédiateur localisé non seule-

ment dans le système nerveux central, mais aussi dans les terminaisons nerveuses, en particulier au niveau du pancréas endocrine, où il joue un rôle important dans le contrôle de la sécrétion d'insuline [12]. Le faible nombre de gènes candidats et l'étendue des régions chromosomiques liées à un ou plusieurs (*Nidd/gk1*) traits phénotypiques chez les hybrides F2 rendent nécessaire l'utilisation de lignées recombinantes congéniques (LRC). Les LRC constituent une série de souches génétiquement pures qui sont établies pour l'étude de la dissection du contrôle génétique des traits polygéniques. Chaque lignée est sélectionnée pour contenir une petite fraction du génome du rat GK transposée sur le fond génétique de la lignée BN. L'établissement de ces lignées permettra dans l'avenir d'identifier et d'analyser: (1) de manière indépendante, les composants génétiques qui contribuent à l'expression du caractère polygénique du diabète chez le rat GK; (2) les interactions entre les différents loci. En particulier, l'étude des LRC du locus *Nidd/gk1* montrera si la tolérance au glucose est contrôlée à ce locus par un ou plusieurs gènes et si l'un de ces gènes intervient dans le contrôle de l'adiposité. Ces dernières années ont vu le développement de cartes génétiques extrêmement résolutive de nombreux mammifères. Ces cartes permettent d'établir une correspondance entre les génomes de Rat et d'Homme

[13]. Ainsi, le locus *Nidd/gk1* est syn-ténique du chromosome 11p chez l'Homme qui contient plusieurs gènes candidats du DNID, notamment les gènes de l'insuline, de l'IGF2 (*insulin growth factor 2*) et du récepteur des sulfonyles (SUR), récemment impliqué dans des cas d'hyperinsulinisme familial (*m/s n° 2, vol. 12, p.251*) [14]. Ainsi, l'étude menée dans un modèle animal de diabète spontané, dont le caractère polygénique de la maladie a déjà été démontré, devrait constituer un élément d'orientation de la recherche de gènes candidats chez l'homme en permettant de concentrer la recherche sur les régions syn-téniques humaines des loci liés au diabète chez le rat GK, et d'utiliser, pour les études de liaison chez l'homme, les phénotypes associés au diabète animal et spécifiquement liés aux loci étudiés chez le rat GK (approche QTL) ■

RÉFÉRENCES

1. Chanson P, Ferré P, Timsit J. Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. *médecine/sciences* 1991; 7: 336-45.
2. Froguel P, Vionnet N, Gauguier D, Vaxillaire M, Zouali H, Passa P, Vélho G. Génétique du diabète non insulino-dépendant. *médecine/sciences* 1994; 10: 795-804.
3. Froguel Ph, Passa Ph. Diabète et hérédité. *Rev Med Interne* 1991; 12: 123-7.
4. Portha B, Serradas P, Bailbe D, Suzuki KI, Goto Y, Giroix MH. B-cell insensitivity to

glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II (non insulin-dependent) diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 486-91.

5. Goto Y, Kakizaki M, Toyota T, Masaki N, Kitahara A, Yagihashi S, Kimura T. Spontaneous diabetes produced by repeated selective breeding of normal Wistar rat. In: Bajaj JS, ed. *Diabetes*. Amsterdam: Excerpta Medica, 1977: 703-10.

6. Gauguier D, Froguel P, Parent V, Bernard C, Bihoreau MT, Portha B, James MR, Pénicaud L, Lathrop M, Ktorza A. Chromosomal mapping of genetic loci associated with non insulin dependent diabetes in the GK rat. *Nature Genet* 1996; 12: 38-43.

7. Galli J, Shen S, Glaser A, Östenson CG, Jiao H, Fakhari-Rad H, Jacob HJ, Lander ES, Luthman H. Genetic analysis of non-insulin dependent diabetes mellitus in the GK rat. *Nature Genet* 1996; 12: 33-7.

8. Paterson AH, et al. Resolution of quantitative trait loci into mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 1988; 335: 721-6.

9. Hilbert P, Lindpainter K, Beckmann JS, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahashi S, Vincent M, Ganten D, Georges M, Lathrop GM. Chromosomal mapping of two

genetic loci associated with blood-pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 1991; 353: 521-9.

10. Anderson L, Haley CS, Ellegren H, Knot SA, Johansson M, Andersson K, Andersson-Eklund L, Edfors-Lilja M, Hansson I, Häkansson J, Lundström K. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. *Science* 1994; 263: 1771-4.

11. Ghosh S, Palmer SM, Rodrigues NR, Cordell HJ, Hearne CM, Cornall RJ, Prins JB, McShane P, Lathrop GM, Peterson LB, Wicks LS, Todd JA. Polygenic control of autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *Nature Genet* 1993; 4: 404-9.

12. Abe M, Saito M, Shimazu T. Neuropeptide Y and norepinephrine injected into the paraventricular nucleus of the hypothalamus activate endocrine pancreas. *Biochem Res* 1989; 10: 431-6.

13. Levan G, Szpirer J, Szpirer C, Klinga K, Hanson C, Quamrul Islam M. The gene map of the Norway rat (*Rattus norvegicus*) and comparative mapping with mouse and man. *Genomics* 1991; 10: 699-718.

14. Thomas PM, Cote GJ, Wohlk N, Haddad B, Mathew PM, Rabl W, Aguilar-Bryan L, Gagel RF, Bryan J. Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 1995; 268: 426-9.

Catherine Bernard

Alain Ktorza

Laboratoire de physiopathologie de la nutrition, Ura Cnrs 307, université Paris VII-Denis-Diderot, 2, place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05, France.

Dominique Gauguier

Mark Lathrop

The Wellcome Trust Center for Human Genetics, Windmill Road, Oxford OX3 7BN, Royaume-Uni.

Philippe Froguel

Cnrs EP10, Institut Pasteur de Lille, 1, rue du Professeur-Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

TIRÉS À PART

A. Ktorza.