



HAL
open science

Recherche de déterminants génétiques des phénotypes associés au syndrome métabolique en population

Vanessa Legry

► **To cite this version:**

Vanessa Legry. Recherche de déterminants génétiques des phénotypes associés au syndrome métabolique en population. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT: . tel-00426888

HAL Id: tel-00426888

<https://theses.hal.science/tel-00426888>

Submitted on 28 Oct 2009

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE LILLE 2

THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE
en Sciences de la Vie et de la Santé

**Recherche de déterminants génétiques
des phénotypes associés au
syndrome métabolique
en population**

Soutenue publiquement le 28 septembre 2009 par

Vanessa LEGRY

Devant le jury composé de :

Madame le Docteur Beverley Balkau

Monsieur le Docteur Sander Kersten

Madame le Docteur Giulia Chinetti

Monsieur le Docteur Patrick Borel

Madame le Docteur Aline Meirhaeghe

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Directeur du laboratoire

Unité INSERM U744 – Institut Pasteur de Lille

A ma grand-mère

Je tiens d'abord à exprimer mes sincères remerciements à :

Madame le Docteur Beverley Balkau, de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteur de cette thèse et d'avoir pris le temps de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Sander Kersten, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour l'intérêt que vous avez bien voulu porter à ce travail.

Madame le Docteur Giulia Chinetti, je suis très honorée que tu aies accepté d'examiner ce travail et t'en remercie très chaleureusement.

Monsieur le Docteur Patrick Borel, je vous remercie sincèrement d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et vous prie de croire en mon profond respect.

Monsieur le Professeur Philippe Amouyel, vous m'avez donné la chance de travailler au sein de votre laboratoire. Je vous suis infiniment reconnaissante des moyens que vous avez mis en œuvre afin de mener à bien ce travail. Merci de votre confiance et de votre soutien. Que ce travail soit le témoignage de ma sincère gratitude et de ma plus haute estime.

Madame le Docteur Aline Meirhaeghe, je te remercie très sincèrement pour les quatre années que nous avons passées à travailler ensemble. Tes compétences scientifiques ainsi que ton dynamisme, ta rigueur, ta disponibilité et ta gentillesse m'ont été d'une aide capitale dans la réalisation de ce travail. Merci de m'avoir poussée à donner le meilleur de moi-même et de m'avoir aidée à m'épanouir. Merci également de ta confiance et de ton soutien. J'espère sincèrement que nous aurons encore la chance de collaborer dans le futur. Que cette thèse soit le témoignage de toute ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Je tiens également à remercier :

Jean Dallongeville, pour tes nombreux conseils, tes encouragements et ta bonne humeur.

Jean-Charles Lambert, pour ton enthousiasme débordant, ta disponibilité et ta sympathie.

Nicole Helbecque, pour avoir accepté de relire ce manuscrit avec tant d'attention.

Florence Richard, pour ton aide en épidémiologie et ta sympathie.

Marie Pigeyre, pour tout ce que tu m'as appris, ta disponibilité, ton amitié et la relecture de ce manuscrit.

Dominique Cotel, Michèle Montaye, Nadine Marécaux, Nathalie Fievet, Béatrice Cousin, Marie-Pierre Dumont, Anne Cloez et Céline Dubeau pour l'immense travail que vous réalisez dans les enquêtes épidémiologiques et votre sympathie.

Chantal Steclebout, Marjorie Brillowski, Anne-Sophie Delbart et Valérie Codron pour votre aide précieuse et votre disponibilité.

Xavier Hermant, pour ton aide technique mais surtout pour ta gentillesse, tes fruits et légumes 100% bio et nos longues discussions. Merci de m'avoir soutenue dans les moments difficiles.

Mes remerciements s'adressent aussi à :

Anne-Marie Ayrat et David Dombrowicz pour votre bonne humeur, vos nombreux conseils et vos encouragements. Merci d'avoir été là dans les moments difficiles.

Mes compagnons de fortune Julie Dumont, Faïza Bensemmain, Julien Chapuis, Geoffroy Laumet, Emilie Dubois, Adelina Acosta, Anaïs Mounier et Sophie Lecompte pour votre soutien et tous les bons moments partagés. Je vous souhaite à tous beaucoup de réussite.

Aux étudiants étrangers qui sont venus apporter un peu d'exotisme à Lille, Alina Besliu, Graziana Bortone et plus particulièrement, Szilvia Bokor. Ta bonne humeur, ta gentillesse et ton amitié ont été d'un soutien inestimable durant cette dernière année.

Aux médecins Vincent Chouraki, Kankoe Amah-Tchoutchoui, Luc Dauchet, Elise Gruson, Emma Tilloy, Nicolas Lamblin, Anthony Foucault, Adeline Sillaire et Marie Fertin pour tout ce que vous m'avez appris et votre sympathie.

Franck Hansmannel, Louisa Goumidi et Caroline Cieniewski pour le partage de vos connaissances.

Sabine Szeremeta, pour tes recherches d'article et ta sympathie.

Aux étudiants qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail, Thomas Deroide, Nicolas Andrieux et Marlène Huyvaert. Un grand merci pour votre aide et votre sympathie.

Merci aussi à tous les autres membres du laboratoire.

J'en profite également pour remercier les équipes avec lesquelles j'ai collaboré :

L'unité INSERM U545 (Lille), notamment Amine Bouhlel, Rebecca Dievert, Lionel Helin et Bruno Derudas pour votre aide technique, mais aussi Benoit Pourcet et Roxane Mansouri pour tous vos conseils en culture cellulaire, et enfin Lucia Fuentes et Thérèse Mayi avec qui j'ai passé des moments inoubliables durant la Spetses Summer School.

Le Département de Nutrition de l'Université d'Oslo (Norvège), en particulier Karianne Solaas, Hilde Nebb et Borghild Arntsen pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir la Norvège et pour votre contribution à ce travail.

Un grand merci à tous les collaborateurs des projets CRESCENDO et HELENA pour votre contribution à ce travail.

J'aimerais également remercier l'Institut Pasteur de Lille sans le soutien duquel je n'aurais pu accomplir ce travail.

Enfin, je ne pourrais conclure ces remerciements sans une pensée émue pour ma famille. Je tiens à remercier très sincèrement :

Mes parents, pour vos encouragements, votre écoute, votre patience et tout votre amour.

Mon frère, pour ton soutien et tes soirées animées.

Colleen, pour tous les bons moments de musicalité passés ensemble.

Et pour finir, Hugues, pour ton amour, ton soutien, ta patience, tes conseils... Merci pour toute l'énergie que tu m'as insufflée pour mener à bien ce travail.

Liste des publications

Ce travail de thèse a donné lieu aux publications suivantes :

***Legry V**, Goumidi L, Huyvaert M, Cotel D, Ferrières J, Arveiler D, Bingham A, Wagner A, Ruidavets JB, Ducimetière P, Amouyel P, Meirhaeghe A (2009) Association study between angiotensin-like 6 (ANGPTL6) gene polymorphisms and Metabolic Syndrome-related phenotypes in the French MONICA Study. **Diabetes & Metabolism** 35(4):287-292.

***Legry V**, Cotel D, Ferrières J, Arveiler D, Andrieux N, Bingham A, Wagner A, Ruidavets JB, Ducimetière P, Amouyel P, Meirhaeghe A (2009) Effect of an FTO polymorphism on fat mass, obesity and type 2 diabetes in the French MONICA Study. **Metabolism: clinical and experimental** 58(7):971-975.

Goumidi L, Spengler D, Cotel D, Wagner A, Ducimetière P, Ruidavets JB, **Legry V**, Arveiler D, Bingham A, Ferrières J, Amouyel P, Meirhaeghe A (2009) Study of the genetic variability of ZAC1 (PLAGL1) in French population-based samples. **Journal of Hypertension** 27(2):314-321.

***Legry V**, Cotel D, Ferrières J, Deroide T, Amouyel P, Meirhaeghe A (2008) Association between liver X receptor alpha gene polymorphisms and metabolic syndrome in French populations. **International Journal of Obesity (Lond)** 32(3):421-428.

***Legry V**, Bokor S, Cotel D, Beghin L, Catasta G, Nagy E, Gonzalez-Gross M, Spinneker A, Stehle P, Molnar D, Moreno L, Amouyel P, Dallongeville J, Meirhaeghe A. Associations between common genetic polymorphisms in angiotensin-like proteins 3 and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** *Sous presse*.

Bokor S, **Legry V**, Meirhaeghe A, Ruiz JR, Mauro B, Widhalm K, Manios Y, Amouyel P, Moreno LA, Molnár D, Dallongeville J on behalf of the HELENA Study group. Single nucleotide polymorphism of CD36 locus and obesity in European adolescents. **Obesity** *Sous presse*.

*Solaas K[#], **Legry V[#]**, Retterstol K, Holven KB, Ferrières J, Amouyel P, Rootwelt H, Berg P, Lien S, Tonstad S, Halvorsen BL, Nenseter MS, Valtueña J, Romeo J, Widhalm K, Ruiz JR, Birkeland KI, Thorsby P, Meirhaeghe A, Nebb HI. Liver X receptor β polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and obesity – a three cohort study; the Norwegian HUNT 2, the French MONICA and the European HELENA-CSS. *Soumis à Human Molecular Genetics*.

[#]Ces auteurs ont contribué à part égale au travail.

*Publications présentées dans la thèse.

Liste des communications

Ce travail de thèse a donné lieu aux communications (posters) suivantes :

Legry V, Bokor S, Cotel D, Beghin L, Catasta G, Molnar D, Moreno L, Amouyel P, Dallongeville J, Meirhaeghe A on behalf of the HELENA Study Group. Impact of Angiotensin-like proteins 3 and 4 genetic polymorphisms on adiposity and lipid metabolism in European adult and adolescent samples. **Obesity Facts**, 2009, 2: suppl 2, p 183. 17th European Congress on Obesity, 6-9 May 2009, Amsterdam, The Netherlands.

Legry V, Goumidi L, Huyvaert M, Cotel D, Ferrières J, Arveiler D, Bingham A, Wagner A, Ruidavets J-B, Ducimetière P, Amouyel P, Meirhaeghe A. Impact of polymorphisms within the angiotensin-like 6 (ANGPTL6) gene in the French MONICA Study. **Journal of Diabetes**, 2009, 1 : suppl 1, p A270. 3rd International Congress on Prediabetes and the Metabolic Syndrome, 1-4 April 2009, Nice, France.

Legry V, Cotel D, Ferrières J, Andrieux N, Ruidavets JB, Ducimetière P, Amouyel P, Meirhaeghe A. Association study between FTO and obesity-related phenotypes in French population-based samples. **International Journal of Obesity**, 2008, 32: suppl 2, p S208. 16th European Congress on Obesity, 14-17 May 2008, Geneva, Switzerland.

Legry V, Cotel D, Ferrières J, Deroide T, Amouyel P, Meirhaeghe A. Association between liver X receptor alpha gene polymorphisms and metabolic syndrome in French populations. **International Journal of Obesity**, 2007, 31: suppl 1, p S48. 15th European Congress on Obesity, 22-25 April 2007, Budapest, Hungary.

Table des matières

Table des matières	1
Liste des abréviations	5
Introduction	10
Avant-propos	10
I. Définition et diagnostic du syndrome métabolique	11
I.1. Définitions	11
I.2. Historique du concept	11
I.3. Les critères de diagnostic du syndrome métabolique	12
I.3.a. Définition de l'OMS (1998-1999)	13
I.3.b. Définition de l'EGIR (1999)	13
I.3.c. Définition du NCEP (2001)	14
I.3.d. Définition de l'ACE (2003)	14
I.3.e. Définition de l'AHA (2005)	14
I.3.f. Définition de l'IDF (2005)	14
II. Epidémiologie du syndrome métabolique	16
II.1. Prévalence	16
II.1.a. Prévalence des phénotypes du syndrome métabolique	16
II.1.b. Prévalence du syndrome métabolique en fonction de sa définition	17
II.1.c. Prévalence du syndrome métabolique en fonction du genre	18
II.1.d. Prévalence du syndrome métabolique en fonction de l'âge	18
II.2. Morbidité et mortalité associées au syndrome métabolique	19
II.2.a. Risque cardiovasculaire	19
II.2.b. Risque de diabète de type 2 (DT2)	20
II.2.c. Autres maladies ou conditions associées	21
II.3. Le syndrome métabolique chez les enfants et les adolescents	22
III. Les principaux phénotypes du syndrome métabolique et leurs voies métaboliques	24
III.1. L'obésité abdominale	24
III.1.a. Définition et mesure	24
III.1.b. La différenciation adipocytaire	25
III.1.c. Fonctions endocriniennes du tissu adipeux	26
III.1.d. Lipolyse du tissu adipeux	28
III.1.e. Régulation de la balance énergétique	29
III.1.f. Conséquences de la localisation de la graisse	30
III.2. L'homéostasie glucidique	31

III.2.a. Mesures du désordre glucidique	31
III.2.b. La signalisation de l'insuline	33
III.2.c. Mécanismes de l'insulinorésistance	34
III.3. Métabolisme des lipides et lipoprotéines	35
III.3.a. Généralités sur le métabolisme des lipides	35
III.3.b. Transport inverse du cholestérol	35
III.3.c. Altération du profil lipidique et risque cardiovasculaire	37
III.4. L'hypertension artérielle.....	38
III.5. Différentes hypothèses sur l'origine du syndrome métabolique	39
III.5.a. Rôles de l'obésité abdominale et de l'insulinorésistance dans la genèse du syndrome métabolique.....	40
III.5.b. Insulinorésistance ou obésité abdominale ?.....	41
III.5.c. Hypothèses alternatives	42
IV. Facteurs de prédisposition.....	44
IV.1. Facteurs environnementaux.....	44
IV.2. Facteurs génétiques.....	45
IV.2.a. Les études d'épidémiologie génétique.....	45
IV.2.b. Facteurs génétiques de l'obésité et des phénotypes associés.....	47
IV.2.c. Facteurs génétiques de l'homéostasie glucidique	48
IV.2.d. Facteurs génétiques des lipides plasmatiques.....	50
IV.2.e. Facteurs génétiques de l'hypertension artérielle	51
IV.2.f. Facteurs génétiques du syndrome métabolique.....	52
V. Gènes candidats.....	56
V.1. <i>FTO</i>	56
V.2. Les <i>liver X receptors</i>	57
V.2.a. Fonctions décrites des LXR α	58
V.2.b. Différences entre LXR α et LXR β	63
V.2.c. Etudes génétiques de LXR α	65
V.2.d. Etudes génétiques de LXR β	66
V.3. Les <i>angiopoietin-like proteins</i>	66
V.3.a. ANGPTL3.....	67
V.3.b. ANGPTL4.....	69
V.3.c. ANGPTL6.....	72
Matériels et Méthodes	75
I. Analyse de la variabilité génétique.....	75
I.1. Les polymorphismes génétiques	75
I.2. Le déséquilibre de liaison	76

I.3. Notion d'haplotype.....	77
I.4. Les Tag-SNPs.....	77
II. Génotypage.....	79
II.1. <i>Restriction fragment length polymorphism</i>	79
II.2. Technologie TaqMan.....	79
II.3. Technologie Golden Gate.....	79
III. Populations étudiées.....	80
III.1. L'étude MONICA.....	80
III.2. L'étude MONEUR.....	81
III.2.a. Le projet EUROASPIRE.....	81
III.2.b. L'étude MONEUR.....	81
III.3. L'étude HELENA.....	82
III.4. L'étude cas-témoins pour le DT2 nichée dans HUNT 2.....	83
IV. Analyses statistiques.....	85
IV.1. L'équilibre d'Hardy Weinberg.....	85
IV.2. Analyses statistiques utilisées dans les études d'association.....	85
IV.3. Facteurs de confusion et interactions.....	87
Résultats.....	89
Introduction.....	89
I. Etude du gène <i>FTO</i>	90
I.1. Contexte de l'étude.....	90
I.2. Synthèse des résultats.....	91
I.3. Discussion.....	91
II. Etude du gène <i>NR1H3</i> codant $LXR\alpha$	93
II.1. Contexte de l'étude.....	93
II.2. Synthèse des résultats de l'article.....	94
II.3. Etudes fonctionnelles complémentaires non publiées.....	95
II.3.a. Dans les cultures primaires de macrophages humains.....	95
II.3.b. Etude de l'activité du promoteur de <i>NR1H3</i> dans un vecteur rapporteur.....	95
II.4. Etudes d'association complémentaires non publiées.....	97
II.4.a. Etude d'association des SNPs rs12221497 et rs11039155 dans l'étude HELENA.....	97
II.4.b. Etude d'association des SNPs rs12221497 et rs11039155 dans l'étude MONEUR.....	97
II.5. Discussion.....	98
III. Etude du gène <i>NR1H2</i> codant $LXR\beta$	103
III.1. Contexte de l'étude.....	103

III.2. Synthèse des résultats	104
III.3. Discussion.....	104
IV. Etude des gènes <i>ANGPTL3</i> et <i>ANGPTL4</i>	107
IV.1. Contexte de l'étude	107
IV.2. Synthèse des résultats	108
IV.3. Discussion.....	108
IV. Etude du gène <i>ANGPTL6</i>	111
IV.1. Contexte de l'étude	111
IV.2. Synthèse des résultats	112
IV.3. Discussion.....	112
Discussion générale	115
I. Difficultés des études sur le syndrome métabolique.....	115
II. Synthèse des travaux personnels, critiques et perspectives	117
III. Les études génétiques des maladies métaboliques	120
Conclusion.....	123
Références.....	124

Liste des abréviations

11-β-HSD	11-β-hydroxystéroïde déshydrogénase
ABC	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
AACE	<i>American Association of Clinical Endocrinologists</i>
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ACE	enzyme de conversion de l'angiotensine
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ADRB3	récepteur adrénergique β-3
AF	<i>activation function</i>
AG	acides gras
AGF	<i>angiopoietin-related growth factor</i>
AGL	acides gras libres
AGRP	<i>agouti-related protein</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
AMP	adénosine monophosphate
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP kinase
α-MSH	<i>α-melanocyte stimulating hormone</i>
ANCOVA	<i>analysis of covariance</i>
ANGPTL	<i>angiopoietin-like protein</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Apo	apolipoprotéine
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATGL	lipase des TG adipeux
AVC	accident vasculaire cérébral
BET	bromure d'éthidium
CART	<i>cocaine and amphetamine related transcript</i>
CEBP	<i>CAAT-enhancer binding proteins</i>
CETP	protéine de transfert d'esters de cholestérol
ChREBP	<i>carbohydrate responsive element binding protein</i>

CNRE	<i>cAMP-negative response element</i>
CNV	<i>copy number variation</i>
COX-2	<i>cyclo-oxygénase 2</i>
CRP	<i>protéine C-réactive</i>
CYP7A1	<i>cytochrome P450 7 A1</i>
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
ddl	<i>degré de liberté</i>
DESIR	<i>Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance</i>
DG	<i>diglycérides</i>
DL	<i>déséquilibre de liaison</i>
DR	<i>direct repeat</i>
DT2	<i>diabète de type 2</i>
EDTA	<i>acide éthylène diamine tétra acétique</i>
EGIR	<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>
EL	<i>lipase endothéliale</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ENPP1/PC-1	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 / plasma cell antigen 1</i>
EUROASPIRE	<i>EUROpean Action on Secondary Prevention and Intervention to Reduce Event</i>
FABP	<i>fatty acid-binding protein</i>
FAS	<i>fatty acid synthase</i>
FBPase	<i>fructose-1,6-biphosphatase</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FIAF	<i>fasting-induced adipose factor</i>
FTO	<i>fat mass and obesity-associated</i>
G6Pase	<i>glucose-6-phosphatase</i>
GIANT	<i>Genetic Investigation of ANthropometric Traits</i>
GLUT4	<i>transporteur du glucose</i>
GWAS	<i>genome wide association study</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HELENA	<i>HEalthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence</i>
HIF-1α	<i>hypoxia inducible factor 1α</i>
HL	<i>lipase hépatique</i>
HMG-CoA	<i>3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A</i>
HNF4α	<i>hepatic nuclear factor 4 alpha</i>
HO-1	<i>hème oxygénase 1</i>

HOMA-B	<i>homeostasis model assessment of β cell function</i>
HOMA-IR	<i>homeostasis model assessment of insulin resistance</i>
HPO	hyperglycémie provoquée par voie orale
HSL	lipase hormono-sensible
HUNT	<i>HelseUndersøkelsen Nord-Trøndelag</i>
IDF	<i>International Diabetes Federation</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>
Idol	<i>inducible degrader of the LDLR</i>
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporelle
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
KO	<i>Knock-out</i>
LBD	<i>ligand-binding domain</i>
LCAT	lécithine cholestérol acyltransférase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LPL	lipoprotéine lipase
LXR	<i>liver X receptor</i>
LXRE	<i>LXR response element</i>
MAF	<i>minor allele frequency</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MC4R	récepteur 4 à la mélanocortine
MCV	maladie cardiovasculaire
MG	monoglycérides
MGL	lipase des MG
MONEUR	MONICA-EUROASPIRE
MONICA	<i>Multinational mONItoring of trends and determinants of CArdiovascular diseases</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCEP	<i>National Cholesterol Education Program</i>
NERF	<i>new Ets-related factor</i>
NF1	<i>nuclear factor 1</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NHANES	<i>National Health And Nutrition Examination Survey</i>
NPC	Niemann Pick C

NPC1L1	<i>Niemann Pick C-1 like 1</i>
NR1H2	<i>nuclear receptor subfamily 1, group H, member 2</i>
NR1H3	<i>nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OR	odds ratio
PAD	pression artérielle diastolique
PAI-1	<i>plasminogen activator inhibitor 1</i>
PAS	pression artérielle systolique
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PGAR	<i>PPARγ angiopoietin-related</i>
PGC1α	<i>PPARγ coactivator 1α</i>
PI-3	phosphatidylinositol -3
PI3K	phosphatidylinositol -3 kinase
PKA	protéine kinase A
PLTP	protéine de transfert des phospholipides
POMC	proopiomélanocortine
PPARγ	récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes gamma
PPRE	<i>PPAR response element</i>
PRIME	<i>Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction</i>
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RAS ou RAAS	<i>renin-angiotensin-aldosterone system</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RR	risque relatif
RTH	rapport du tour de taille sur le tour de hanches
RXR	récepteur de l'acide 9-cis rétinolique
SCD	stéaryl-coA désaturase
sdLDL	<i>small dense low density lipoprotein</i>
SLC2A4	<i>solute carrier family 2 member 4</i>
SNC	système nerveux central
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SR	<i>scavenger receptor</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element-binding protein</i>
TA	tissu adipeux
TG	triglycérides

TNFα	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRβ	récepteur beta à l'hormone thyroïdienne
TZDs	thiazolidinediones
UTR	<i>untranslating region</i>
UV	ultra violet
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
XBP	<i>X-box-binding protein</i>

Introduction

Avant-propos

Le concept de syndrome métabolique correspond à une association non fortuite chez un individu d'une obésité abdominale, d'une hyperglycémie, d'une dyslipidémie et d'une pression artérielle élevée. Ce syndrome est associé à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires. Le syndrome métabolique est un désordre complexe, dont la physiopathologie est encore mal connue. Aujourd'hui, on estime qu'un européen sur cinq présente un syndrome métabolique et au vu des tendances outre-Atlantique, ce chiffre pourrait encore augmenter. Bien que l'environnement « obésogène » dans lequel nous vivons aujourd'hui soit à l'origine de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique, il existe des différences entre les individus et l'on observe ainsi des familles plus touchées que d'autres. Ainsi, l'origine du syndrome métabolique est multifactorielle, résultant de l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux. L'identification des facteurs de susceptibilité génétique au syndrome métabolique et aux phénotypes associés et la compréhension de leurs mécanismes d'action fournit des informations précieuses pour comprendre les voies physiopathologiques impliquées dans l'apparition de ces désordres métaboliques et potentiellement pour mieux les prévenir.

Le but de mes travaux a été d'identifier de nouveaux déterminants génétiques du syndrome métabolique et des phénotypes associés. Pour cela, nous avons choisi plusieurs gènes candidats impliqués dans différentes voies métaboliques dont l'altération peut participer au développement du syndrome métabolique. Nous nous sommes ainsi intéressés au gène *FTO* (*fat mass and obesity-associated*), identifié par les études d'association génome entier comme déterminant génétique de l'obésité, aux gènes codant *LXR α* et *LXR β* (*liver X receptor*), récepteurs nucléaires régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique, et aux gènes *ANGPTL3*, *ANGPTL4* et *ANGPTL6* (*angiopoietin-like proteins*), protéines plasmatiques impliquées dans le métabolisme lipidique. Nous avons alors caractérisé la variabilité génétique commune de ces gènes, recherché des associations entre les polymorphismes sélectionnés et les phénotypes métaboliques dans différentes études de population (adultes et adolescents) et enfin, tenté de comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant les associations observées en population.

I. Définition et diagnostic du syndrome métabolique

I.1. Définitions

Le syndrome métabolique correspond à l'association, chez un individu, d'une obésité, d'une insulino-résistance, d'une hyperglycémie, d'une dyslipidémie et d'une pression artérielle élevée (Figure 1). Par définition, le terme syndrome (du grec *sundromê* qui signifie « concours ») désigne un ensemble de signes cliniques ou de symptômes qu'un individu est susceptible de présenter lors de certaines maladies ou dans des circonstances cliniques d'écart à la norme pas nécessairement pathologique. De plus, le syndrome se distingue traditionnellement de la maladie par l'absence de cause spécifique. Le métabolisme (du grec *meta* qui signifie "changement, participation" et *ballêin* qui signifie "lancer") définit l'ensemble des réactions biochimiques comprises dans la fonction de nutrition, grâce auxquelles un organisme est maintenu en vie. Les métabolismes des glucides et des lipides constituent les principales voies du métabolisme énergétique. Leur régulation est complexe et permet le maintien de l'homéostasie, en équilibrant la balance énergétique entre apports nutritionnels et dépenses énergétiques.

Même si ces termes « syndrome » et « métabolique » le définissent assez bien, il existe beaucoup de synonymes utilisés pour nommer ce concept, tels que syndrome X, syndrome d'insulino-résistance, syndrome dysmétabolique ou encore syndrome cardiométabolique, selon si les auteurs s'intéressent aux causes (comme l'insulino-résistance) ou aux conséquences (maladies cardiovasculaires) de la présence d'un tel syndrome chez un individu. L'origine de ce syndrome est encore mal connue. Différentes hypothèses sont avancées : insulino-résistance, obésité viscérale, inflammation ou d'autres facteurs encore inconnus. Dans tous les cas, la présence de ce syndrome chez un individu favorise le développement de plaques d'athérome (accumulation de lipides et de cellules dans les artères) et augmente ainsi fortement le risque cardiovasculaire.

I.2. Historique du concept

Dès 1923, Kylin observa une association entre hyperglycémie, hypertension et la maladie de la goutte (maladie chronique liée au métabolisme de l'acide urique) [Kylin 1923]. En 1956, Vague fit le lien entre ce syndrome et l'obésité androïde (répartition de la masse grasse au niveau de l'abdomen) et l'athérosclérose [Vague 1956]. La relation entre le syndrome métabolique et l'hyperinsulinémie a été ensuite mise en évidence par Modan [Modan *et al.* 1985], mais c'est Reaven, en 1988, qui mit l'insulino-résistance au cœur du

syndrome métabolique et qui lui donna le nom de syndrome X [Reaven 1988]. Enfin, Kaplan désigna « *deadly quartet* » l'association entre obésité abdominale, intolérance au glucose, hypertriglycéridémie et hypertension artérielle [Kaplan 1989]. Ce bref historique permet d'illustrer l'évolution du concept de syndrome métabolique, où sont mises en avant, suivant les époques et les auteurs, tantôt l'obésité abdominale, tantôt l'insulinorésistance.

Dans les années 1990, le concept de syndrome métabolique, en tant que regroupement des principaux facteurs de risque cardiovasculaire, connut un intérêt croissant notamment en santé publique. En effet, la forte mortalité causée par les maladies cardiovasculaires (MCV) connaissait jusque là une nette diminution. Mais avec l'augmentation mondiale de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 (DT2), la recherche de l'existence du syndrome métabolique permit alors d'identifier et de prendre en charge précocement des individus à risque, alors qu'ils ne présentaient aucun signe pathologique de MCV. Le syndrome métabolique est alors considéré comme une association non fortuite de petites anomalies du métabolisme, qui ne présentent pas ou peu de risque individuellement, mais qui, lorsqu'elles sont combinées, augmentent fortement le risque de MCV et de DT2.

I.3. Les critères de diagnostic du syndrome métabolique

Le syndrome métabolique regroupe 5 principaux phénotypes : une obésité abdominale, un désordre glucidique, une hypertriglycéridémie, un taux de cholestérol associé aux lipoprotéines de haute densité (HDL-cholestérol) anormalement faible, et une pression artérielle élevée. L'obésité abdominale peut être estimée par différents paramètres, tels que le tour de taille ou le rapport tour de taille sur tour de hanches (RTH). De même, le désordre glucidique, résultant d'une mauvaise régulation de la glycémie, peut être caractérisé par une glycémie à jeun anormalement élevée ou une mauvaise réponse de l'organisme à une prise de glucose (intolérance au glucose). Ce désordre glucidique est souvent lié à une résistance à l'insuline (insensibilisation des récepteurs à l'insuline dans les tissus périphériques ne permettant plus de réguler normalement la glycémie et conduisant à une hypersécrétion d'insuline par le pancréas) qui peut être elle-même estimée par le taux d'insuline circulant.

Tous les groupes d'étude qui ont tenté de définir les critères de diagnostic du syndrome métabolique se sont heurtés aux questions suivantes : quel paramètre utiliser pour définir chaque phénotype, quelle méthode utiliser pour les mesurer, quelle valeur seuil appliquer pour définir l'anormalité, et enfin quel poids donner à chaque phénotype dans le développement du syndrome métabolique. Les définitions du syndrome métabolique les plus connues sont celles de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), du *European Group for*

the Study of Insulin Resistance (EGIR), du National Cholesterol Education Program – Adult Treatment Panel III (NCEP-ATPIII), de l’American Association of Clinical Endocrinologists (AACE), de l’American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institutut (AHA/NHLBI) et de l’International Diabetes Federation (IDF).

1.3.a. Définition de l’OMS (1998-1999)

En 1998, l’OMS fut la première organisation à tenter de définir le syndrome métabolique, le but n’étant guère de donner une définition arrêtée, mais plutôt d’offrir un outil de travail pour de futures études. Convaincus que l’insulinorésistance est à l’origine du développement du syndrome métabolique, les auteurs mirent l’accent sur la présence d’un désordre insulinémique/glucidique dans le diagnostic du syndrome métabolique. Selon l’OMS, ce désordre se caractérise par :

- une insulinorésistance, évaluée lors d’un clamp hyperinsulinémique euglycémique : captation du glucose inférieure au quartile le plus bas
- et/ou une mauvaise régulation de la glycémie, caractérisée par une hyperglycémie modérée à jeun (6,1 - 7,0 mmol/L) ou une intolérance au glucose (hyperglycémie provoquée par voie orale (HPO) à 2 heures entre 7,8 et 11,1 mmol/L)
- et/ou un diabète (glycémie à jeun \geq 7,0 mmol/L ou HPO à 2 heures \geq 11,1 mmol/L).

L’OMS définit alors un individu porteur du syndrome métabolique lorsqu’il présente un des désordres glucidiques définis ci-dessus associé à au moins 2 des anomalies suivantes : obésité abdominale (évaluée par l’indice de masse corporel (IMC) ou le RTH), hypertension artérielle, dyslipidémie ou microalbuminurie (marqueur précoce du risque cardiovasculaire) [World Health Organization 1999] (Tableau 1). Les inconvénients majeurs de cette définition résident en l’utilisation du clamp hyperinsulinémique euglycémique et du dosage de l’albuminurie, inapplicables aux grandes études épidémiologiques.

1.3.b. Définition de l’EGIR (1999)

Comme l’OMS, l’EGIR place l’insulinorésistance au centre du syndrome métabolique, mais l’EGIR considère le DT2 comme une conséquence plutôt qu’un composant du syndrome métabolique. Les individus diabétiques sont alors exclus de la définition. L’insulinorésistance est évaluée par l’insulinémie à jeun. Le diagnostic du syndrome métabolique correspond alors à une hyperinsulinémie plus au moins 2 des autres critères [Balkau *et al.* 1999]. De plus, l’adiposité n’est pas évaluée par l’IMC ou le RTH, mais par le

tour de taille, considéré ici comme un meilleur marqueur de l'obésité abdominale (Tableau 1).

1.3.c. Définition du NCEP (2001)

Le NCEP-ATPIII proposa en 2001 une nouvelle définition du syndrome métabolique, essentiellement à visée clinique [2001] (Tableau 1). Contrairement aux deux précédentes, cette définition n'inclut pas d'estimation de l'insulinorésistance, et le désordre glucidique n'est plus un critère obligatoire. De plus, le facteur lipidique compte ici double puisque l'hypertriglycémie et l'hypercholestérolémie sont des critères séparés. Le principal avantage de cette définition est d'être basée sur des paramètres facilement mesurables, et c'est pourquoi elle est la définition la plus utilisée dans le monde. Elle présente tout de même un inconvénient car elle prend peu en compte le paramètre de l'insulinorésistance.

1.3.d. Définition de l'AACE (2003)

En 2003, l'AACE fournit une nouvelle définition du syndrome métabolique plutôt envisagé par les auteurs comme le syndrome d'insulinorésistance [Einhorn *et al.* 2003]. Les seuils des concentrations de TG, HDL-cholestérol, glucose et de la pression artérielle sont les mêmes que ceux du NCEP. Néanmoins, selon l'AACE, il n'existe pas de preuve expérimentale suffisante pour définir un seuil d'insulinorésistance. C'est pourquoi ces auteurs ne donnent pas de définition précise et pensent qu'il appartient au clinicien de décider si un individu présente ou non ce syndrome. Ils considèrent que plus un individu présente des désordres métaboliques, plus il a de risque d'être atteint du syndrome d'insulinorésistance. Le manque de précision dans cette définition la rend inapplicable aux études épidémiologiques.

1.3.e. Définition de l'AHA (2005)

En 2005, l'AHA/NHLBI reconnaît l'utilité et la validité des critères du NCEP mais y apporte quelques modifications [Grundy *et al.* 2005] (Tableau 1). Le seuil d'hyperglycémie à jeun a été abaissé à 5,6 mmol/L suivant les recommandations de l'ADA (*American Diabetes Association*). De plus, la prise de traitements hypolipémiants ou hypotenseurs est désormais prise en compte. Ces critères sont alors un peu plus inclusifs que ceux du NCEP de 2001. Notons que cette définition est souvent nommée « updated NCEP » ou « NCEP modifié en 2005 » dans la littérature.

1.3.f. Définition de l'IDF (2005)

En 2005, un groupe d'experts regroupant de nombreuses spécialités touchant au risque cardiovasculaire, sous l'égide de l'IDF, proposa une nouvelle définition du syndrome

métabolique à visée mondiale [Alberti *et al.* 2005]. Cette définition place l'obésité abdominale au centre du syndrome métabolique en faisant d'un excès du tour de taille, un critère indispensable au diagnostic. L'IDF propose également d'ajuster la valeur seuil du tour de taille en fonction du groupe ethnique. Ainsi, pour la population européenne, ce seuil est à 94 cm pour les hommes et 80 cm pour les femmes (Tableau 1).

Au vu des débats actuels, il est fort probable que les critères de diagnostic du syndrome métabolique évolueront encore. Ainsi de nouveaux paramètres, tels que les taux de certains marqueurs de l'inflammation, d'adipokines ou encore d'hormones, pourraient être pris en compte. Mais si les critères de diagnostic du syndrome métabolique font toujours débat, il y a cependant consensus sur le fait que la détection d'un syndrome métabolique chez une personne correspond à un risque accru de MCV.

II. Epidémiologie du syndrome métabolique

II.1. Prévalence

Le syndrome métabolique fait partie des syndromes émergents. En effet, l'apparition de ce syndrome est récente et semble être causée par l'évolution de notre environnement : nous vivons aujourd'hui dans un environnement « obésogène » où l'accès à la nourriture est devenu facile et illimité et où l'activité physique n'est plus nécessaire. Ainsi, la prévalence de l'obésité a beaucoup augmenté au cours de ces 3 dernières décennies, et celle du syndrome métabolique risque d'augmenter en parallèle. Même si l'estimation de sa prévalence est rendue difficile par la diversité des définitions utilisées, de plus en plus de pays, industrialisés ou en voie de développement, sont concernés par le syndrome métabolique (Figure 2) [Cameron *et al.* 2004].

Aux Etats-Unis, alors que 30% des adultes sont en surpoids (IMC compris entre 25 et 30 kg/m²) et 32% sont obèses (IMC \geq 30kg/m²), le syndrome métabolique toucherait environ un quart de la population [Ford *et al.* 2002] (Tableau 2). Sa prévalence varie selon l'origine ethnique des individus, allant de 21,6% chez les Américains d'origine africaine, jusqu'à 31,9 % chez les Américains d'origine mexicaine [Ford *et al.* 2002]. De manière intéressante, il a été montré que sa prévalence avait augmenté entre les 2 études NHANES (*National Health And Nutrition Examination Survey*) de 1988-1994 et 1999-2000 [Ford *et al.* 2004]. Ainsi Ford *et al* estimèrent que le syndrome métabolique touchait environ 50 millions d'Américains en 1990, et près de 64 millions en 2000. Cette augmentation peut s'expliquer à la fois par l'augmentation de la prévalence de l'obésité ainsi que par le vieillissement de la population. En Europe, le syndrome métabolique toucherait déjà un adulte sur quatre [Grundy 2008a].

Etant donné la complexité des études sur le syndrome métabolique due au manque de définition consensuelle de ce syndrome, je me suis concentrée sur les données épidémiologiques des populations d'origine caucasienne (Europe, Etats-Unis).

II.1.a. Prévalence des phénotypes du syndrome métabolique

Les cinq phénotypes caractéristiques du syndrome métabolique ont une prévalence qui varie principalement en fonction de la région et du genre (Tableau 2). Une pression artérielle élevée semble être l'une des composantes les plus fréquentes (environ 40%), tandis que le désordre glucidique apparaît le moins fréquent (environ 10%). La prévalence de l'obésité abdominale varie énormément selon le pays, passant du simple au double entre l'Europe (étude DECODE regroupant 11 cohortes européennes [Hu *et al.* 2004]) et les Etats-Unis (étude NHANES III [Ford *et al.* 2002]). Celle des dyslipidémies est plus homogène entre

pays mais diffère entre genre, les hommes étant presque 2 fois plus touchés que les femmes. Ainsi, la prévalence du syndrome métabolique présente une grande variabilité en fonction de la définition utilisée ainsi que des caractéristiques de la population étudiée, tels que le genre, l'âge et la localisation géographique.

II.1.b. Prévalence du syndrome métabolique en fonction de sa définition

Les différences de paramètres et de seuils utilisés entre les définitions entraînent des classifications différentes des individus. Les définitions de l'OMS et de l'EGIR, dont le pré-requis est un désordre insulino-glucidique, sont moins inclusives (incluant moins d'individus) que celles du NCEP, de l'AHA ou de l>IDF, et sélectionnent ainsi des individus plus insulino-résistants. Dans la définition de l'EGIR, l'exclusion des individus diabétiques rend cette définition encore moins inclusive. D'autre part, la définition de l'AHA est plus inclusive que celle du NCEP du fait de l'abaissement du seuil d'hyperglycémie à 5,6 mmol/L, de la prise en compte des traitements et de l'inclusion des individus ayant un tour de taille égal à 102/88 cm (homme/femme). Enfin, les critères de l>IDF, dont l'obésité abdominale est le pré-requis, seraient encore plus inclusifs que ceux du NCEP ou de l'AHA.

De nombreuses études ont comparé la prévalence du syndrome métabolique entre les différentes définitions (Tableaux 3 et 4). Ainsi, on peut constater que la prévalence du syndrome métabolique défini par l'EGIR est bien inférieure à celle des autres définitions (10 à 15%) (Tableau 4) [Mattsson *et al.* 2007; Nilsson *et al.* 2007; Balkau *et al.* 2002]. De plus, il apparaît clairement que la prévalence du syndrome métabolique selon l>IDF est plus élevée que les autres définitions (jusqu'à 40%), et ce dans les études américaines et européennes (Tableaux 3 et 4) [Ford 2005; Lorenzo *et al.* 2007; Bataille *et al.* 2006; Assmann *et al.* 2007; Csaszar *et al.* 2006; Athyros *et al.* 2005; Lorenzo *et al.* 2006]. Par ailleurs, les études semblent se contredire sur la différence de prévalence entre les définitions de l'OMS et du NCEP. Selon l'étude américaine NHANES 1988-1994 [Ford *et al.* 2003] la prévalence du syndrome métabolique est similaire entre ces 2 définitions, tandis que dans l'étude franco-irlandaise PRIME (*Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction*), la prévalence du syndrome métabolique selon la définition de l'OMS est plus élevée que celle du NCEP [Bataille *et al.* 2006]. Il semble que le genre interagisse fortement avec le type de définitions utilisé comme le suggèrent les différences de prévalence observées entre les définitions de l'OMS et du NCEP et entre hommes et femmes dans l'étude finlandaise [Dekker *et al.* 2005]. Enfin, les modifications des critères du NCEP par l'AHA suffisent à provoquer une nette augmentation de la prévalence du syndrome métabolique selon les données des Centres d'Examens de Santé Français, passant ainsi de 10 à 18 % chez les hommes et de 9 à 14% chez les femmes, âgés de 20 à 74 ans [Balkau *et al.* 2007; Ford *et al.* 2004].

II.1.c. Prévalence du syndrome métabolique en fonction du genre

Comme de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la physiopathologie du syndrome métabolique sont soumises à des régulations hormonales, il apparaît important de distinguer les hommes des femmes. Mais encore une fois, la différence de prévalence du syndrome métabolique entre hommes et femmes n'apparaît pas clairement et est rendue difficile par la diversité des définitions utilisées. Si l'on s'intéresse aux critères de l'OMS, la prévalence du syndrome métabolique semble plus élevée chez les hommes que chez les femmes dans plusieurs études américaines et européennes (Tableaux 3 et 4) [Ford *et al.* 2003; Lorenzo *et al.* 2007; Tillin *et al.* 2005; Boronat *et al.* 2005; Balkau *et al.* 2002; Hu *et al.* 2004]. Cette même tendance est également observée avec la définition de l'IDF [Lorenzo *et al.* 2007; Assmann *et al.* 2007; Csaszar *et al.* 2006], ainsi que dans la méta-analyse réalisée par l'EGIR en 2002 (n=17561) [Balkau *et al.* 2002]. Cependant, lorsque l'on regarde les études ayant utilisé les critères du NCEP ou de l'AHA, cette tendance semble s'inverser [Dekker *et al.* 2005; Csaszar *et al.* 2006; Miccoli *et al.* 2005; Lorenzo *et al.* 2006; Santos *et al.* 2003; Ford 2005].

La différence de prévalence du syndrome métabolique entre genre et les contradictions observées entre définitions peuvent s'expliquer par la différence de prévalence de chaque phénotype du syndrome métabolique entre genre. En effet, une pression artérielle élevée, une dyslipidémie et un désordre glucidique sont plus fréquents chez les hommes, tandis que l'obésité semble plus fréquente chez les femmes [Hu *et al.* 2004; Ford *et al.* 2002]. De plus, les différents phénotypes du syndrome métabolique peuvent avoir un impact différent sur l'apparition du syndrome entre hommes et femmes [Dallongeville *et al.* 2004]. Ainsi, une augmentation du poids et du tour de taille ainsi qu'un taux plasmatique de HDL-cholestérol bas contribuent plus au syndrome chez les femmes que chez les hommes. Au contraire, une pression artérielle élevée contribue plus chez les hommes que chez les femmes à l'apparition du syndrome [Dallongeville *et al.* 2004].

II.1.d. Prévalence du syndrome métabolique en fonction de l'âge

Toutes les études et toutes les définitions s'accordent pour dire que la prévalence du syndrome métabolique augmente avec l'âge, parallèlement à celle de l'obésité. Dans l'étude NHANES III, la prévalence du syndrome métabolique ne cesse d'augmenter jusqu'à 60 ans : de 6,7% chez les 20-29 ans jusqu'à 43,5% chez les sexagénaires [Ford *et al.* 2002]. Cependant, après 70 ans, cette prévalence se stabilise et tend même à diminuer, certainement à cause du fait que les individus les plus exposés au risque de mortalité associée à l'obésité sont plus susceptibles de mourir avant cet âge [Ford *et al.* 2002]. Dans la méta-analyse de l'EGIR, la prévalence du syndrome métabolique augmente également graduellement avec l'âge. Par exemple, si la définition de l'OMS est utilisée, la prévalence

est de 14% ou 4% (hommes ou femmes) pour les adultes de moins de 40 ans, 23% ou 13% pour les 40-55 ans, jusque 41% ou 26% pour les plus de 55 ans [Balkau *et al.* 2002]. Cette augmentation reflète l'augmentation physiologique de la pression artérielle et de la glycémie avec l'âge. De manière intéressante, les auteurs de la méta-analyse de l'EGIR ont remarqué que la fréquence de l'hyperinsulinémie augmentait très peu avec l'âge : chez les hommes non diabétiques elle passe de 27% chez les moins de 40 ans à 33% chez les plus de 55 ans, alors que la fréquence du syndrome métabolique double entre ces 2 classes d'âge [Balkau *et al.* 2002], ce qui illustre l'importance des autres composantes du syndrome métabolique à prendre en compte dans la définition.

II.2. Morbidité et mortalité associées au syndrome métabolique

II.2.a. Risque cardiovasculaire

De nombreuses études ont montré que le syndrome métabolique est associé à un risque accru de MCV ainsi que de décès par MCV. La méta-analyse de Gami *et al.*, qui regroupe 43 cohortes réparties sur les 5 continents (n=172573), permet une vue globale de ce risque [Gami *et al.* 2007]. Les individus de cette étude porteurs du syndrome métabolique ont une augmentation du risque (estimé par l'odds ratio ou OR) de MCV (OR=2,18) et de maladie coronaire (OR=1,65) (Figure 3). Notons également que le syndrome métabolique est associé à une augmentation du risque de mortalité globale (OR=1,60). De plus, le risque cardio-vasculaire (fatal ou non) semble être plus marqué chez les femmes que chez les hommes (OR=2,63 chez les femmes contre 1,98 chez les hommes). Par ailleurs, dans l'étude américaine NHANES III (n=10357), le syndrome métabolique est associé à un risque accru d'infarctus du myocarde (OR=2,01) et d'accident vasculaire cérébral (AVC) (OR=2,16) [Ninomiya *et al.* 2004]. Dans l'étude française DESIR (Données Epidémiologiques sur le Syndrome d'Insulino-Résistance), le syndrome métabolique (défini par le NCEP) est associé à une augmentation du risque de MCV chez les hommes (OR=1,4) et les femmes (OR=1,7) (n=3910) [Hillier *et al.* 2006].

De façon prévisible, l'estimation du risque de MCV varie en fonction des critères du syndrome métabolique utilisés : ainsi, dans la méta-analyse de Gami, le syndrome métabolique estimé par les critères de l'OMS est associé à un risque de MCV et de décès plus important par rapport aux critères du NCEP (OR=2,06 contre 1,67). Le risque de MCV (fatale ou non) associé au syndrome métabolique a été comparé entre les définitions de l'EGIR, de l'AHA et de l'IDF dans une cohorte suédoise de 1991-1996 (n=5047, 46-68 ans) d'individus non diabétiques [Nilsson *et al.* 2007]. Le risque relatif (RR) est assez faible si la définition de l'IDF est prise en compte (RR=1,37 contre 1,95 pour l'AHA et 1,55 pour l'EGIR), remettant en question la valeur des critères de l'IDF quant à la prédiction du risque de MCV.

L'accumulation de facteurs de risque chez un même individu confère une augmentation du risque par rapport à la présence d'un seul facteur. C'est pourquoi le syndrome métabolique, qui regroupe les 5 principaux facteurs de risque de MCV, est associé à un risque plus important que chacun des composants seuls. Par exemple, dans l'étude NHANES III, il a été montré que ce syndrome est associé à un risque d'infarctus du myocarde ou d'AVC plus important (OR=2,05) que ne l'est l'insulinorésistance (OR=1,30), le taux de HDL-cholestérol bas (OR=1,35), la pression artérielle élevée (OR=1,44) ou l'hypertriglycéridémie (OR=1,66) [Ninomiya *et al.* 2004]. Mais la question de savoir si le risque cardiovasculaire associé au syndrome métabolique est plus important que la simple somme des risques associés à chaque composante fait toujours débat [Kahn *et al.* 2005; Grundy 2006b].

Notons qu'il a été observé que les individus ne présentant qu'une ou deux composantes du syndrome métabolique présentent également un risque relatif élevé de décès par MCV (RR=1,73) par rapport aux individus ne présentant aucun facteur de risque [Malik *et al.* 2004]. De plus, le risque de décès par MCV reste élevé chez les individus porteurs du syndrome métabolique même s'ils ne présentent pas de DT2 (RR=1,56) [Malik *et al.* 2004].

II.2.b. Risque de diabète de type 2 (DT2)

La prévalence du DT2 a triplé au cours de ces 30 dernières années, atteignant 8,2% des individus de l'étude NHANES en 2000 [Gregg *et al.* 2004]. Le DT2 est caractérisé par un taux élevé de glucose dans le sang, entraînant une altération de la production d'insuline et de son action. L'insulinorésistance est la principale caractéristique du pré-diabète, mais c'est la déficience en sécrétion d'insuline qui est en fait la cause physiopathologique du DT2. La plupart des patients diabétiques ont présenté une insulinorésistance et un syndrome métabolique avant l'apparition du DT2 [Reaven 2005a]. En effet, une insulinorésistance, une hyperinsulinémie, une dyslipidémie et une obésité précèdent l'apparition du DT2 dans 75 à 85% des cas [Meigs *et al.* 2007]. Dans la cohorte de Framingham (n=3323, 22-81 ans) [Wilson *et al.* 2005], environ la moitié des nouveaux cas de DT2 étaient porteurs du syndrome métabolique (selon le NCEP). On a estimé que les individus porteurs d'un syndrome métabolique ont un risque de DT2 multiplié par 5 [Grundy 2006b; Ford *et al.* 2008b]. Dans l'étude française DESIR (n=3774), le syndrome métabolique (défini par le NCEP) est associé à une augmentation du risque de DT2 chez les hommes (OR=2,4) et les femmes (OR=3,4) [Hillier *et al.* 2006].

De nombreuses études ont évalué la capacité du syndrome métabolique à prédire l'apparition du DT2. Cette capacité à prédire l'apparition d'un DT2, estimée par la sensibilité (taux de faux négatifs) et la spécificité (taux de faux positifs), dépend des critères utilisés

pour définir le syndrome métabolique. En effet, la présence d'un désordre glucidique n'est pas un critère obligatoire dans les définitions du NCEP, de l'AHA et de l'IDF, contrairement aux définitions de l'OMS et de l'EGIR. Or, même si toutes les composantes du syndrome métabolique sont associées à une augmentation du risque de DT2, l'hyperglycémie à jeun ainsi que l'intolérance au glucose, même modérées, sont bien sûr associées à un risque de DT2 plus important que les autres phénotypes [Bonora *et al.* 2004; Eckel 2007]. On peut alors s'attendre à ce que les définitions de l'OMS et de l'EGIR aient une meilleure capacité de prédiction du DT2. Ainsi, dans l'étude finlandaise Kuopio (1005 hommes), la définition de l'OMS est plus sensible que celle du NCEP car elle permet de détecter 83% des cas prévalent et 67% des cas incidents (contre 61% et 41% pour le NCEP, respectivement), avec une bonne spécificité (0,78-0,80), mais, étant donné que l'OMS prend en compte les individus diabétiques, sa capacité de prédiction semble alors plutôt décevante [Laaksonen *et al.* 2002a]. De plus, il a été montré, dans la *San Antonio Heart Study* (n=1734), que si le critère de l'intolérance au glucose n'est pas pris en compte dans la définition de l'OMS, alors celle du NCEP a une meilleure sensibilité (53% contre 43%), suggérant que les critères autres que celui du désordre glucidique sont mieux définis par le NCEP que par l'OMS [Lorenzo *et al.* 2003].

II.2.c. Autres maladies ou conditions associées

Le syndrome métabolique serait également associé à une augmentation du risque de déclin cognitif (OR=1,21) [Yaffe 2007] et de démence d'origine vasculaire (RR=2,42) [Raffaitin *et al.* 2009]. Le syndrome métabolique entraînerait aussi une augmentation du risque de cancer, notamment du cancer colorectal chez les hommes (RR=1,7-3,0 selon les études) [Covey *et al.* 2006].

Il existe aussi de nombreuses maladies liées à la physiopathologie du syndrome métabolique. C'est le cas de la stéatose hépatique non alcoolique : en effet, la masse grasse tend à s'accumuler dans le foie chez les individus ayant un syndrome métabolique [Kotronen *et al.* 2007]. Ainsi, l'incidence de la stéatose hépatique non alcoolique est multipliée par 4 chez les hommes et par 11 chez les femmes présentant un syndrome métabolique [Hamaguchi *et al.* 2005]. Chez les hommes, la prévalence de l'hypogonadisme semble plus élevée chez les porteurs du syndrome métabolique [Corona *et al.* 2007], et inversement, l'hypogonadisme est un facteur de risque du syndrome [Kalyani *et al.* 2007]. Chez les femmes, la prévalence du syndrome métabolique augmente après la ménopause, mais on ne sait pas si cela est dû à l'âge ou au déficit hormonal [Carr 2003]. Le syndrome des ovaires polykystiques, caractérisé par une anovulation, un excès d'androgènes et une insulino-résistance, est aussi fortement lié au syndrome métabolique : en effet, un tiers des femmes présentant ce syndrome ont aussi un syndrome métabolique [Ehrmann *et al.* 2006].

L'apnée du sommeil, qui est une conséquence de l'obésité, est aussi associée à l'insulinorésistance et au syndrome métabolique : les individus souffrant d'apnée du sommeil présentent plus souvent un syndrome métabolique par rapport aux autres individus, même si l'on ajuste sur l'obésité [Parish *et al.* 2007]. Les lipodystrophies, caractérisées par une répartition anormale de la graisse (diminution du tissu adipeux, augmentation des dépôts ectopiques de graisse) et une insulinorésistance sévère, ont une physiopathologie liée à celle du syndrome métabolique. Ainsi, les patients souffrant de lipodystrophie présentent les mêmes caractéristiques que ceux présentant un syndrome métabolique [Monajemi *et al.* 2007]. Enfin, le syndrome métabolique semble être associé à des maladies microvasculaires : environ 10% des individus non diabétiques présentant une hyperglycémie modérée à jeun ou une intolérance au glucose et un syndrome métabolique sont atteints d'une rétinopathie [Tyrberg *et al.* 2008; 2007c].

II.3. Le syndrome métabolique chez les enfants et les adolescents

De récentes études soutiennent l'idée que la présence d'un syndrome métabolique dès l'enfance serait un important facteur prédictif d'un futur DT2 et de MCV [Zimmet *et al.* 2007]. L'identification du syndrome métabolique chez les jeunes rencontre le même problème que chez les adultes, à savoir la diversité des définitions utilisées. Une récente revue révéla l'existence de 27 publications utilisant 40 critères différents [Ford *et al.* 2008a]. Les effets de la croissance et des changements hormonaux opérant au cours de la puberté sur la sensibilité à l'insuline et le profil lipidique rendent l'établissement des critères encore plus difficile. La prévalence du syndrome métabolique chez les jeunes varie ainsi en fonction de l'âge de la population étudiée et de la définition utilisée.

Dans l'étude américaine NHANES 1986-1994 (n=2430, 12-19 ans), la prévalence du syndrome métabolique selon la définition de Cook *et al.* [Cook *et al.* 2003] est de 4,2% (6,1% chez les garçons et 2,1% chez les filles), alors qu'elle est de 9,2% selon les critères de De Ferranti *et al.* dans ce même échantillon [de Ferranti *et al.* 2004] (Tableau 5). De même, dans une étude allemande de 1999-2005 (n=1205, 4-16 ans), la prévalence du syndrome métabolique double entre la définition de Cook *et al.* (21%) et celle de De Ferranti *et al.* (39%) [Reinehr *et al.* 2007]. Cette différence est en fait due au seuil du tour de taille qui est beaucoup plus bas dans la définition de De Ferranti *et al.*, rendant ainsi ces critères beaucoup trop inclusifs. Dans ce même échantillon, la prévalence du syndrome métabolique est de 18% selon la définition de Viner *et al.* [Viner *et al.* 2005], et de 29% selon celle de Weiss *et al.* [Weiss *et al.* 2004]. Cette différence semble s'expliquer par le critère de la dyslipidémie plus restrictif dans la définition de Viner *et al.* Remarquons que seuls 9% des

enfants de cet échantillon sont en commun entre ces 4 définitions. Ce faible recoupement suggère fortement qu'aucune de ces définitions n'est en réalité satisfaisante.

De nombreuses études ont évalué la prévalence du syndrome métabolique chez les jeunes en surpoids ou obèses. Dans l'étude NHANES 1986-1994, 6,8% des jeunes en surpoids et 28,7% (de 12,4 à 44,2% selon la définition utilisée) des jeunes obèses présentent un syndrome métabolique [Cook *et al.* 2008; Cook *et al.* 2003]. En Europe, la prévalence du syndrome métabolique chez les jeunes en surpoids ou obèses varie de 16,4 à 35,7% selon les critères utilisés [Bokor *et al.* 2008; Invitti *et al.* 2006; Viner *et al.* 2005; Lopez-Capape *et al.* 2006; Druet *et al.* 2006]. De plus, il a été montré que les enfants ayant un IMC ou un tour de taille élevé ont un risque accru de développer un syndrome métabolique à l'âge adulte [Sun *et al.* 2008].

Il existe également une forte corrélation entre DT2 et syndrome métabolique chez les jeunes : chez des adolescents en surpoids ayant des antécédents familiaux de DT2, la prévalence du syndrome métabolique est comprise entre 26 et 39% selon les définitions [Shaibi *et al.* 2008]. De plus, il a été estimé que 92% des adolescents atteints d'un DT2 présentent un syndrome métabolique [Rodriguez *et al.* 2006; Duncan 2006]. Enfin, l'incidence du syndrome métabolique à l'âge adulte est multipliée par 3 chez les individus ayant présenté ce syndrome dès l'enfance [Morrison *et al.* 2008].

Etant donné l'augmentation de la prévalence du surpoids et de l'obésité chez les jeunes [Ogden *et al.* 2002] et la corrélation entre le syndrome métabolique et l'obésité, il n'est pas surprenant que la prévalence du syndrome métabolique ait augmenté chez les jeunes au cours de ces dernières années. Ainsi, cette prévalence est passée de 4,2 à 6,2% entre l'étude NHANES de 1986-1994 et celle de 1999-2000, et ce de manière similaire entre garçons et filles [Duncan *et al.* 2004].

III. Les principaux phénotypes du syndrome métabolique et leurs voies métaboliques

L'apparition d'un syndrome métabolique chez un individu est le résultat d'un long processus mettant en jeu de nombreuses voies physiopathologiques, et commençant très tôt dans la vie [Ozanne *et al.* 2004]. Ce chapitre détaille les principales composantes du syndrome métabolique, c'est-à-dire le métabolisme du tissu adipeux, l'homéostasie glucidique, le métabolisme des lipides et l'hypertension artérielle.

III.1. L'obésité abdominale

III.1.a. Définition et mesure

L'obésité se définit par un excès de masse grasse. Il existe deux principaux types d'obésité : le type gynoïde (rencontré principalement chez les femmes) où l'excès de gras se dépose principalement autour des hanches, et le type androïde (plutôt rencontré chez les hommes) où l'excès de gras est localisé au niveau du tronc et de l'abdomen. L'obésité abdominale (ou centrale) est donc plutôt associée au type androïde. De plus, on distingue deux formes de localisation de la graisse : le tissu adipeux (TA) sous-cutané et le TA viscéral. Le TA sous-cutané se situe entre la peau et le muscle, tandis que le TA viscéral est situé dans les cavités du corps, essentiellement dans la cavité abdominale.

L'obésité est classiquement mesurée par l'indice de masse corporel (IMC), défini par le rapport de la masse sur la taille élevée au carré. L'obésité abdominale peut être estimée par le rapport tour de taille sur tour de hanches (RTH), marqueur d'une obésité androïde ou la mesure du périmètre abdominal (ou tour de taille). On peut également évaluer la quantité de masse grasse en mesurant les plis cutanés (situés au niveau des biceps, triceps, du mollet, les plis sous-scapulaire et supra-iliaque). En plus de ces méthodes anthropométriques, il existe des techniques plus sensibles pour quantifier la masse grasse, telles que la bioimpédancemétrie, la DXA (*dual-energy X-ray absorptiometry*), la tomodensitométrie ou la résonance magnétique. Parmi ces techniques, seules les deux dernières permettent de distinguer le TA abdominal viscéral du TA abdominal sous-cutané mais elles sont trop coûteuses et complexes pour la pratique clinique ou les grandes études épidémiologiques. Le tour de taille semble être l'une des meilleures mesures corrélées à la graisse viscérale et aux complications métaboliques et est très souvent utilisé [Pouliot *et al.* 1994; Han *et al.* 1995]. Les résultats d'une récente méta-analyse suggèrent que le rapport tour de taille sur la taille serait le meilleur facteur de prédiction du risque cardiovasculaire [Lee *et al.* 2008].

III.1.b. La différenciation adipocytaire

Le plus grand réservoir d'énergie de l'organisme est le TA, composé d'adipocytes (les plus nombreux) et de cellules stroma-vasculaires. Les adipocytes sont les cellules de stockage et de relargage de l'énergie : en période d'abondance nutritionnelle, ces cellules stockent l'énergie sous forme de triglycérides (TG) et la libèrent sous forme d'acides gras libres (AGL) et de glycérol en période de privation [Kahn *et al.* 2000]. Les adipocytes peuvent accroître leur volume jusqu'à 10 fois pour stocker l'excès de TG (de 20 à 200 µm de diamètre) conférant ainsi au TA une capacité de croissance quasi illimitée [Fruhbeck *et al.* 2001; Rajala *et al.* 2003]. Les cellules stroma-vasculaires comprennent les pré-adipocytes et des cellules immunitaires telles que les macrophages [Fantuzzi 2005; Kershaw *et al.* 2004]. Les macrophages ont tendance à s'accumuler en grande quantité en cas d'excès de dépôt adipeux [Fantuzzi 2005]. Ces 3 types cellulaires, adipocytes, pré-adipocytes et macrophages, peuvent subir des changements aboutissant à un processus inflammatoire et un dysfonctionnement métabolique.

Une dérégulation du métabolisme du TA conduit aux désordres métaboliques observés dans le syndrome métabolique. La différenciation adipocytaire est un processus complexe dont une mauvaise régulation peut entraîner des complications métaboliques. Les pré-adipocytes se différencient en adipocytes qui vont se développer, se répliquer et mourir sous le contrôle de facteurs de transcription en interaction avec des signaux cellulaires. Ces facteurs de transcription comprennent des membres de la famille CEBP (*CAAT-enhancer binding proteins*), le facteur SREBP1 (*sterol regulatory element binding protein 1*) et PPAR γ (récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes) [MacDougald *et al.* 1995; Rosen *et al.* 2000]. PPAR γ est considéré comme le chef d'orchestre de la différenciation adipocytaire. Ce récepteur nucléaire est activé par les AGL ainsi que par les thiazolidinediones (TZDs), médicaments antidiabétiques [Lehmann *et al.* 1995], et induit l'expression de nombreux gènes spécifiques des adipocytes [Tontonoz *et al.* 1994]. Des hormones et des cytokines, telles que l'insuline, le glucagon, les glucocorticoïdes, les rétinoïdes, la prostacycline et le TNF α (*tumor necrosis factor alpha*) coordonnent une cascade de signalisation aboutissant à des facteurs de transcription régulant l'expression de gènes impliqués dans la différenciation et le maintien du phénotype adipocytaire. Ainsi, en réponse à l'insuline, l'expression des gènes codant le transporteur de glucose GLUT4 (gène *SLC2A4*), l'AG synthase (*FAS*), la stéaryl-coA désaturase (*SCD*), la leptine et la *fatty acid-binding protein (FABP4)* est caractéristique des adipocytes différenciés et matures. Une dérégulation du métabolisme du TA est caractéristique des individus obèses, mais peut aussi être observée chez des individus de poids normal. Cette dérégulation peut entraîner une insulino-résistance, une

augmentation de la lipolyse, un dysfonctionnement endothélial et la sécrétion d'adipokines pro-inflammatoires.

Chez les mammifères, il existe un second type de TA, le tissu adipeux brun. Tandis que le TA blanc est considéré comme le premier site de stockage de l'énergie et de régulation de l'ensemble du métabolisme corporel, le TA brun a longtemps été considéré comme inexistant ou métaboliquement inactif chez l'adulte [Cannon *et al.* 2004]. Le TA brun est le site de la thermogénèse et joue un rôle important chez les nouveau-nés car il aide au maintien de la température corporelle. Le TA brun se distingue du TA blanc par les caractéristiques de ses adipocytes : ils contiennent de nombreuses petites gouttelettes lipidiques (contrairement à une seule grande gouttelette lipidique dans les adipocytes du TA blanc) et un grand nombre de mitochondries. De plus, le TA brun contient plus de capillaires sanguins. De récentes études ont montré qu'il existait des dépôts de TA brun chez les adultes, métaboliquement actifs et localisés au niveau du cou jusqu'au thorax [Virtanen *et al.* 2009; Cypess *et al.* 2009]. Ces dépôts seraient plus fréquents chez les femmes que chez les hommes. De manière intéressante, la quantité de TA brun serait inversement corrélée à l'IMC, suggérant un rôle dans le métabolisme énergétique chez l'adulte [Cypess *et al.* 2009].

III.1.c. Fonctions endocriniennes du tissu adipeux

Les fonctions endocriniennes du TA blanc sont maintenant reconnues. En effet, les adipocytes sécrètent de nombreuses protéines, appelées adipokines ou adipocytokines, ce qui leur confère la capacité d'interagir entre eux, ainsi qu'avec d'autres organes, tels que le foie, le cerveau et les muscles [Kershaw *et al.* 2004; Ailhaud 2006; Havel 2002; Mohamed-Ali *et al.* 1998; Shimomura *et al.* 1996; Hotamisligil *et al.* 1995; Trayhurn *et al.* 2005]. Ces adipokines ont non seulement des fonctions de régulation du métabolisme énergétique mais aussi des propriétés inflammatoires.

La leptine est sûrement l'adipokine la plus connue : une mutation du gène de la leptine ou de son récepteur entraîne une obésité massive chez la souris (*ob/ob* et *db/db*) et l'homme. La leptine est synthétisée par le TA et le taux circulant de leptine est directement corrélé et proportionnel à la quantité de ce TA [Maffei *et al.* 1995]. Son principal rôle est de contrôler l'appétit : par sa fixation à son récepteur au niveau de l'hypothalamus, elle exerce un rôle anorexigène (elle diminue l'appétit) [Otero *et al.* 2005; Otero *et al.* 2006], et elle favorise la consommation d'énergie au niveau du TA (thermogénèse et lipolyse). De plus, elle diminue la sécrétion d'insuline ainsi que la néoglucogénèse. Aujourd'hui, la leptine est considérée comme l'un des liens fonctionnels entre homéostasie énergétique et système immunitaire. En effet, outre ses propriétés anorexigènes, elle exerce un rôle pro-inflammatoire, en stimulant la prolifération et l'activation des lymphocytes T, ainsi que

l'activation des monocytes, la phagocytose et la production de cytokines [Fantuzzi *et al.* 2000; Sanchez-Margalet *et al.* 2003; La Cava *et al.* 2004]. Au niveau des cellules endothéliales, elle induit un stress oxydant et la production de molécules d'adhésion, favorisant ainsi le développement de plaques athéromateuses [Fantuzzi *et al.* 2000; Sanchez-Margalet *et al.* 2003; La Cava *et al.* 2004]. D'autres cytokines sécrétées par le tissu adipeux, telles que l'interleukine 6 (IL-6), le TNF- α et le *plasminogen activator inhibitor-1* (PAI-1), participent également à l'inflammation chronique du système vasculaire (locale et systémique) [Fantuzzi 2005; Trayhurn *et al.* 2005; Lyon *et al.* 2003].

L'adiponectine est l'adipokine la plus abondamment sécrétée par les adipocytes. Contrairement à la leptine, le taux d'adiponectine circulant diminue chez les individus obèses [Arita *et al.* 1999]. Son rôle dans la sensibilité à l'insuline est bien connu : sa concentration est inversement corrélée à celles de l'insuline et du glucose (à jeun) [Hotta *et al.* 2000], et diminue chez les patients diabétiques [Arita *et al.* 1999]. En effet, l'adiponectine active l'adénosine monophosphate kinase (AMPK) d'une part, dans les muscles, induisant ainsi la translocation du transporteur de glucose GLUT4 et la captation du glucose, et d'autre part, dans le foie, inhibant ainsi la néoglucogenèse [Kadowaki *et al.* 2005]. Par ailleurs, l'adiponectine possède également des propriétés vasoprotective, angiogénique, anti-inflammatoire et anti-athérogénique [Ouchi *et al.* 2006; Gable *et al.* 2006]. En effet, l'adiponectine diminue la production d'IL-6 et de TNF- α , induit la production de cytokines anti-inflammatoires [Kumada *et al.* 2004; Wolf *et al.* 2004; Wulster-Radcliffe *et al.* 2004] et inhibe la production de molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales [Ouchi *et al.* 1999; Kawanami *et al.* 2004]. L'adiponectine exerce donc des effets opposés à ceux de la leptine.

La résistine est une autre adipokine sécrétée par les adipocytes, mais aussi et surtout par les macrophages [Gerstmayr *et al.* 2003]. Le traitement des souris par de la résistine recombinante induit une insulino-résistance [Steppan *et al.* 2001]. Son expression augmente lors d'une inflammation [Lehrke *et al.* 2004] et stimule la production de molécules d'adhésion dans les cellules endothéliales [Kawanami *et al.* 2004].

Le TA libère aussi des cytokines, telles que IL-6 et TNF α , dont la production augmente chez les individus obèses [Cottam *et al.* 2004]. IL-6 est une cytokine inflammatoire induite par le stress, directement impliquée dans l'athérogenèse [Lyon *et al.* 2003]. Il a été montré que le TA viscéral produit plus d'IL-6 que le TA sous-cutané [Fain *et al.* 2004; Fried *et al.* 1998]. La concentration sérique d'IL-6 est un facteur prédictif du risque cardiovasculaire [Ruan *et al.* 2003]. TNF α , quant à elle, est une cytokine aux nombreuses fonctions, impliquée dans l'inflammation chronique contribuant à l'athérosclérose et à la production d'autres cytokines pro-inflammatoires [Ruan *et al.* 2003; Lyon *et al.* 2003]. TNF α

inhibe aussi directement la signalisation de l'insuline en induisant la phosphorylation d'un résidu sérine du récepteur à l'insuline [Hotamisligil *et al.* 1994]. TNF α active NF κ B (*nuclear receptor kappa B*), facteur de transcription induisant une inflammation dans le tissu vasculaire, menant à une dysfonction endothéliale [Lyon *et al.* 2003; Park *et al.* 2005]. Enfin, TNF α inhibe l'expression de l'adiponectine dans le TA viscéral, contrant ainsi ses effets [Matsuzawa 2006].

III.1.d. Lipolyse du tissu adipeux

Lors du jeûne, la lipolyse du TA blanc, consistant en l'hydrolyse des stocks de TG et au relargage d'AGL et de glycérol dans le sang, permet l'apport en substrats énergétiques aux autres organes. La libération d'AGL est également importante pour la synthèse hépatique des VLDL (*very low density lipoprotein*) [Duncan *et al.* 2007]. Une altération de la régulation de la lipolyse est associée à l'obésité et à l'insulinorésistance [Large *et al.* 1999].

Jusque récemment, l'initiation de l'hydrolyse des TG était attribuée à la lipase hormono-sensible (HSL) [Barroso *et al.* 1999]. L'HSL est une protéine cytoplasmique hydrolysant différents substrats dont les TG et les diglycérides (DG) [Holm 2003]. En 2004, plusieurs équipes ont identifié la desnutrine, ou lipase des TG adipeux (ATGL), et ont révélé son rôle majeur dans l'hydrolyse des TG en DG, étape limitante de la lipolyse [Villena *et al.* 2004; Zimmermann *et al.* 2004] (Figure 4). L'ATGL est localisée à la fois dans le cytoplasme mais aussi fixée à la gouttelette lipidique [Villena *et al.* 2004; Zimmermann *et al.* 2004]. C'est une lipase spécifique des TG [Zimmermann *et al.* 2003] et son expression est induite lors du jeûne et inhibée après l'ingestion d'un repas [Villena *et al.* 2004]. En fait, les deux enzymes HSL et ATGL agissent en synergie sur la lipolyse [Zimmermann *et al.* 2003]. La 2^{ème} étape de la lipolyse, consistant en l'hydrolyse des DG en monoglycérides (MG), est catalysée par la HSL [Giudicelli *et al.* 1974]. Enfin, l'hydrolyse de MG en glycérol, l'ultime étape de la lipolyse, est catalysée par la monoglycéride lipase (MGL) [Fredrikson *et al.* 1986].

La gouttelette lipidique des adipocytes compte de nombreuses protéines fixées à sa surface et intervenant dans la synthèse, le stockage et l'utilisation des lipides [Liu *et al.* 2004]. La périlipine est la protéine majoritaire associée aux gouttelettes lipidiques [Greenberg *et al.* 1991]. Elle agit comme une barrière protectrice limitant le taux de lipolyse de base [Brasaemle *et al.* 2000]. Sa phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) entraîne une augmentation de la lipolyse [Tansey *et al.* 2003; Sztalryd *et al.* 2003]. Sa présence semble être nécessaire pour l'activation de la translocation de la HSL vers la gouttelette lipidique [Sztalryd *et al.* 2003; Miyoshi *et al.* 2006] (Figure 4).

Par ailleurs, la FABP est une protéine chaperonne qui permet le transport des AG dans le cytosol [Matarese *et al.* 1988] et joue un rôle non négligeable dans la lipolyse

puisqu'elle permet une efficacité maximale en aidant au relargage des AG des adipocytes, empêchant ainsi un rétrocontrôle négatif (Figure 4) [Coe *et al.* 1999].

L'induction de la lipolyse lors du jeûne passe principalement par les catécholamines [Fain *et al.* 1983]. L'activation du récepteur β -adrénergique à la surface de l'adipocyte entraîne une augmentation de l'activité de la PKA (Figure 4) [Kim *et al.* 2005]. La PKA catalyse la phosphorylation de la HSL, provoquant sa translocation vers la gouttelette lipidique [Holm 2003], et la phosphorylation de la périlipine entraînant le remodelage de la gouttelette lipidique favorisant l'accès aux enzymes de la lipolyse [Maeda *et al.* 2004]. En revanche, après l'ingestion d'un repas, l'augmentation de la sécrétion d'insuline inhibe la lipolyse (Figure 4). L'action de l'insuline sur la lipolyse passe par une inhibition de la PKA et de la HSL et une inhibition de l'ATGL [Ragolia *et al.* 1998; Kershaw *et al.* 2006]. Notons que chez les individus obèses, le taux de base de la lipolyse est souvent augmenté et que $\text{TNF}\alpha$ et la leptine semblent contribuer à cette augmentation [Reynisdottir *et al.* 1995; Lonqvist *et al.* 1995; Ryden *et al.* 2002].

III.1.e. Régulation de la balance énergétique

La balance entre apports énergétiques (alimentation) et dépenses énergétiques (taux métabolique de base, activité physique, thermogénèse) est soumise à une fine régulation faisant intervenir un réseau complexe d'interactions entre les centres de régulation de la satiété dans le système nerveux central (SNC), en particulier dans l'hypothalamus, et les centres de régulation du stockage et de la mobilisation des réserves d'énergies [Cone 2005; Friedman 2000; Flier 2004; Sainsbury *et al.* 2002; Spiegelman *et al.* 2001]. La régulation de l'appétit et du comportement alimentaire se fait par des signaux à court terme et à long terme. Lors d'un repas, l'arrivée des aliments dans le tube digestif entraîne la sécrétion d'un certain nombre d'hormones telles que la cholécystokinine, ou de peptides intestinaux comme le peptide YY, qui sont transmis au SNC et conduisent à la fin du repas (effet satiétogène ou anorexigène). A l'inverse, la ghréline, seule hormone orexigène connue, est sécrétée par l'estomac en période de jeûne et transmise au SNC pour initier la prise alimentaire [Moran 2000; Badman *et al.* 2005]. Les signaux à long terme, comme la leptine, transmettent au SNC l'état des réserves d'énergie. L'activation du récepteur à la leptine dans l'hypothalamus inhibe la prise alimentaire et stimule les dépenses énergétiques [Friedman 2002; Porte, Jr. *et al.* 2002]. De même, l'insuline a un effet inhibiteur à long terme sur la prise alimentaire. De plus, des neuropeptides comme la mélanocortine et le neuropeptide Y, ainsi que des neurotransmetteurs tels que la sérotonine, la dopamine et la noradrénaline, interagissent dans l'hypothalamus pour coordonner les réponses métaboliques, physiologiques et comportementales [Cone 2005; Porte, Jr. *et al.* 2002; Sainsbury *et al.* 2002].

La voie leptine-mélanocortine joue un rôle critique dans l'homéostasie énergétique [Coll *et al.* 2004]. La leptine est sécrétée par le TA et va activer son récepteur situé à la surface de neurones du noyau arqué (Figure 5), entraînant d'une part, la suppression de l'expression de 2 peptides orexigènes – le neuropeptide Y et l'AGRP (*agouti-related protein*) – et d'autre part, l'induction de l'expression de 2 peptides anorexigènes – le CART (*cocaine and amphetamine related transcript*) et l' α -MSH (*α -melanocyte stimulating hormone*) dérivé de POMC (proopiomélanocortine) [Elias *et al.* 1999; Elmquist *et al.* 1999; Schwartz *et al.* 2000]. L' α -MSH et l'AGRP sont des ligands antagonistes pour un même récepteur, MC4R (récepteur 4 à la mélanocortine) [Cone 1999]. L'activation de MC4R par l' α -MSH réduit la prise alimentaire, tandis que l'inhibition de MC4R par l'AGRP fait augmenter l'appétit [Fan *et al.* 1997].

III.1.f. Conséquences de la localisation de la graisse

L'excès de masse grasse résulte en des désordres métaboliques. L'augmentation de la taille des adipocytes entraîne généralement une élévation de la synthèse de TG, de la lipolyse et du flux transmembranaire d'AG, et est associé à l'insulinorésistance et au développement du DT2 [Paolisso *et al.* 1995; Weyer *et al.* 2001]. L'augmentation de la taille du TA affecte les concentrations systémiques de cytokines et de polypeptides qu'il sécrète, tels que la leptine, l'adiponectine, la résistine, l'angiotensine, IL-6, TNF α , la protéine C-réactive (CRP) et le PAI-1 [Teran-Garcia *et al.* 2007].

De nombreuses données de la littérature soutiennent l'hypothèse qu'une masse accrue de TA abdominal est associée à l'insulinorésistance, à l'intolérance au glucose et au risque cardiovasculaire. Les adipocytes situés à l'intérieur de la cavité viscérale (au niveau de l'épiploon) présentent une activité lipolytique accrue, et les AGL qu'ils libèrent rejoignent directement le système veine-porte hépatique, altérant ainsi les fonctions hépatiques, notamment dans la clairance de l'insuline et la production de VLDL et de glucose [Bjorntorp 1990]. Cependant, d'autres études ont montré que le TA sous-cutané contribue également fortement aux désordres métaboliques [Kelley *et al.* 2000; Miles *et al.* 2005; Smith *et al.* 2001]. Ainsi, la contribution du TA viscéral au relargage d'AGL vers le foie, serait beaucoup moins importante que ce que l'on pensait à l'origine, représentant seulement 5 à 20% de l'ensemble des AGL transmis au système porte [Nielsen *et al.* 2004]. Cela veut dire que la majorité des AGL arrivant au foie sont des dérivés de la lipolyse de la graisse sous-cutanée. Néanmoins, les AGL libérés par les dépôts de graisse non viscéraux vont plus souvent rejoindre les tissus périphériques, en particulier les muscles, que ceux dérivant de la graisse viscérale. La production d'IL-6, d'IL-8, de la 11- β -hydroxystéroïde déshydrogénase (11- β -HSD), de la résistine, de PPAR γ , du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) et de PAI-1

est relativement plus élevée dans le TA viscéral, tandis que la production de la protéine de transfert d'esters de cholestérol (CETP), l'adipsine, la leptine et l'adiponectine est plus élevée dans le TA sous-cutané [Schaffler *et al.* 2005]. L'expression de récepteurs spécifiques diffère également entre les 2 types de TA : le récepteur 1 à l'angiotensine, le récepteur adrénergique β -3 (ADRB3), le récepteur aux glucocorticoïdes et le récepteur aux androgènes sont plus exprimés dans le TA viscéral que dans le TA sous-cutané [Fain *et al.* 2004]. Les TA viscéral et sous-cutané abdominal contribuent donc tous deux au développement de désordres métaboliques mais par des mécanismes différents qui restent à éclaircir.

Le TA représente le plus grand lieu de stockage de la graisse, mais celle-ci peut également se déposer dans d'autres tissus. Ces dépôts ectopiques de gras jouent un grand rôle dans l'apparition de troubles du métabolisme [Unger 1995]. A un niveau donné de stock de lipides, niveau variant entre individus, l'adipocyte devient insulino-résistant et son activité lipolytique augmente, libérant ainsi des AG dans la circulation, tandis que l'incorporation cellulaire et l'utilisation du glucose et des AG diminue. L'excédent d'AG va alors se déposer dans le foie, le muscle squelettique, le pancréas ou encore le cœur [Krssak *et al.* 1999; Seppala-Lindroos *et al.* 2002; Lee *et al.* 1994] et affecter le bon fonctionnement de ces organes. C'est ce qu'on appelle l'effet lipotoxique. Ainsi, le contenu lipidique des cellules musculaires et du foie est corrélé à l'insulino-résistance, et ce, indépendamment de l'obésité [Krssak *et al.* 1999; Seppala-Lindroos *et al.* 2002].

III.2. L'homéostasie glucidique

III.2.a. Mesures du désordre glucidique

La glycémie correspond à la concentration de glucose dans le plasma sanguin. Sa régulation est très fine et fait intervenir le système hormonal. L'insuline est une hormone peptidique dont le rôle est de maintenir l'homéostasie glucidique et de promouvoir une utilisation du glucose adaptée [Accili 2004]. Elle est produite par les cellules β du pancréas à un niveau basal et une augmentation de la glycémie provoque un pic biphasique de sécrétion d'insuline. Les incrétines, hormones gastro-intestinales, sont sécrétées en réponse à une augmentation de la glycémie et stimulent la sécrétion de l'insuline. L'insuline favorise l'approvisionnement du muscle squelettique et du TA en glucose et inhibe la gluconéogenèse dans le foie. Son action est dépendante de sa concentration et est saturable. La réponse à l'insuline représente son effet maximal, alors que la sensibilité à l'insuline est définie par la concentration en insuline requise pour avoir la moitié de cette réponse maximale [Muniyappa *et al.* 2008]. L'insulino-résistance correspond à la diminution

de la sensibilité ou de la réponse à l'insuline en terme de mise à disposition du glucose dans les tissus périphériques et d'inhibition de la gluconéogenèse hépatique. L'insulinorésistance joue un rôle majeur dans la physiopathologie du DT2.

Il existe différentes mesures de la sensibilité à l'insuline. L'une des mesures directes de ce paramètre est le clamp euglycémique hyperinsulinémique [DeFronzo *et al.* 1979]. Après un jeûne d'une nuit, l'insuline est injectée par voie intraveineuse à un taux constant (5-120 mU par surface corporelle par minute). Cette injection constante d'insuline entraîne un nouveau taux d'insuline stable qui est supérieur à l'insulinémie à jeun (« hyperinsulinémique »). Par conséquent, l'approvisionnement en glucose des muscles et du TA augmente, tandis que la gluconéogenèse hépatique est supprimée. Dans ces conditions, la glycémie est mesurée toutes les 5 ou 10 minutes et du glucose (dextrose 20%) est injecté de manière à fixer la glycémie à un niveau normal (« euglycémique »). Après quelques heures, l'équilibre entre insulinémie, glycémie et taux de glucose injecté est atteint. Etant donné que la gluconéogenèse hépatique est supprimée, le taux de glucose injecté est égal au taux de glucose disponible. L'indice de sensibilité à l'insuline est alors égal au rapport du taux de glucose injecté sur la glycémie à l'équilibre multipliée par la différence entre insulinémie à jeun et à l'équilibre [DeFronzo *et al.* 1979]. L'avantage de cette méthode est de pouvoir mesurer directement le taux de glucose disponible dans tout l'organisme pour un niveau d'insulinémie donné. En revanche, c'est une méthode coûteuse en temps et en argent qui requiert du personnel expérimenté. C'est pourquoi elle n'est pas appropriée pour les études épidémiologiques, les grandes études cliniques ou pour les applications cliniques en routine.

L'hyperglycémie provoquée par voie orale (HPO) est une méthode plus souvent utilisée pour déterminer une intolérance au glucose ou un diabète [2007a]. Après un jeûne d'une nuit, une dose standard de glucose (75g) est administrée à l'individu *per os* et la glycémie et l'insulinémie sont mesurées à 0, 30, 60 et 120 minutes. Ce test reflète l'efficacité de l'organisme à utiliser le glucose, ainsi que la dynamique de l'insuline dans des conditions physiologiques, contrairement au clamp hyperinsulinémique euglycémique. Mais la tolérance au glucose et la résistance à l'insuline sont des notions différentes : la tolérance au glucose résulte non seulement de la sensibilité à l'insuline, mais aussi de la sécrétion d'insuline, des effets des incrétines et d'autres facteurs. Cette méthode fournit donc de précieuses informations sur la tolérance au glucose mais pas sur la sensibilité ou la résistance à l'insuline.

Le dosage de la glycémie et de l'insulinémie à jeun est une méthode très souvent utilisée. Chez les individus sains, les conditions à jeun représentent un état stable dans lequel le glucose est maintenu à un taux normal, et l'insulinémie et la gluconéogenèse hépatique sont constantes. La sécrétion d'insuline de base détermine un taux constant

d'insuline qui reflète la sensibilité à l'insuline. En effet, il a été montré que l'insulinémie à jeun est un bon marqueur de l'insulinorésistance [Haffner *et al.* 1996]. De plus, c'est une méthode simple et non invasive contrairement aux 2 autres méthodes. A partir de ces dosages, on peut calculer l'indice HOMA-IR (*homeostasis model assessment of insulin resistance*) égal au produit de la glycémie (en mmol/L) et de l'insulinémie (en $\mu\text{U/mL}$) divisé par 22,5 [Matthews *et al.* 1985]. Le dénominateur 22,5 est un facteur correspondant à une glycémie normale (4,5 mmol/L) multiplié par une insulinémie normale (5 $\mu\text{U/mL}$). Ainsi, un individu ayant une sensibilité à l'insuline normale a un HOMA-IR égal à 1. Il a été montré dans diverses études que le HOMA-IR est assez bien corrélé à la sensibilité à l'insuline estimée par clamp ou d'autres méthodes [Radziuk 2000; Wallace *et al.* 2004]. Cette méthode est efficace pour évaluer l'insulinorésistance chez des individus ayant une intolérance au glucose ou un diabète modéré. En revanche, elle est inappropriée pour les individus présentant un dysfonctionnement du pancréas. Le HOMA-B (*homeostasis model assessment of β cell function*) peut être alors utilisé pour estimer la production d'insuline des cellules β du pancréas [Matthews *et al.* 1985]. Il est également calculé à partir des concentrations plasmatiques de glucose (mmol/L) et d'insuline ($\mu\text{U/mL}$) à jeun ($(20 \times \text{insuline})/(\text{glucose}-3,5)$) et est exprimé en pourcentage. Un HOMA-B égal à 100% correspond à un parfait fonctionnement des cellules β .

III.2.b. La signalisation de l'insuline

L'insuline exerce de nombreux rôles métaboliques. En plus de stimuler l'incorporation du glucose au niveau des muscles, du TA et du foie, et d'inhiber la gluconéogenèse hépatique, elle inhibe la lipolyse dans le tissu adipeux, elle régule la synthèse de protéines et de lipides dans le foie et les muscles, ainsi que la synthèse de divers composés comme des facteurs de coagulation, hormones sexuelles et apolipoprotéines. L'insuline coordonne certaines réponses globales de l'organisme, telles que les ressources en lipoprotéines après ou entre les repas, la fonction endothéliale et la croissance des tissus [Aguilar-Salinas *et al.* 2005]. De plus, l'insuline exerce ses effets également au sein du SNC, dans l'hypothalamus, où elle interagit avec d'autres neurotransmetteurs et exerce ainsi un rôle anorexigène.

La première étape dans la signalisation de l'insuline est la fixation de l'insuline à son récepteur, localisé à la surface des tissus cibles. Le récepteur à l'insuline est une grande protéine transmembranaire hétérotétramérique ($\alpha_2\beta_2$) contenant 2 sous-unités α extracellulaires et 2 sous-unités β principalement intracellulaires [White *et al.* 1994]. La fixation de l'insuline aux sous-unités α entraîne une activation de la tyrosine kinase intrinsèque, une autophosphorylation du récepteur et la phosphorylation des substrats du

récepteur à l'insuline (IRS), notamment de IRS-1 (Figure 6) [Virkamaki *et al.* 1999; Hunter *et al.* 1998]. Il s'ensuit l'activation de 2 voies de signalisation principales :

- la voie phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase – AKT/protein kinase B (PKB) aboutissant entre autres à la translocation du transporteur de glucose GLUT4 (des vésicules intracellulaires vers la membrane plasmatique) permettant l'entrée de glucose dans les cellules,
- la voie Ras-*mitogen activated protein kinase* (MAPK) régulant l'expression de gènes et contrôlant la croissance cellulaire et la différenciation en collaboration avec la voie PI-3 [Avruch 1998].

Ainsi, la signalisation de l'insuline passe par une cascade de phosphorylation intégrée dans un réseau complexe dans lequel s'entremêlent différentes voies de signalisation (Figure 6).

III.2.c. Mécanismes de l'insulinorésistance

Les facteurs de risque classiques du DT2 sont l'inactivité physique, le surpoids et une alimentation riche en graisses, notamment en graisses saturées [Mayer-Davis *et al.* 1998; Vessby *et al.* 2001; Carey *et al.* 1996; St Onge *et al.* 2004]. Ces facteurs environnementaux augmentent en effet la glycémie à long terme. Afin de maintenir l'équilibre glucidique, les cellules β du pancréas produisent plus d'insuline. Mais cette hyperinsulinémie à long terme entraîne une altération de la signalisation de l'insuline ainsi qu'une altération du profil lipidique [Reaven 1988]. Lorsque l'hyperinsulinémie n'est plus suffisante pour compenser l'insulinorésistance ou lorsque le pancréas s'épuise, alors apparaissent une intolérance au glucose voire un DT2 [Warram *et al.* 1990; Lillioja *et al.* 1993]. Cependant, de nombreux individus insulinorésistants arrivent à maintenir une tolérance au glucose normale ou presque, tant que le pancréas peut compenser ce défaut d'action de l'insuline en en produisant davantage.

Du point de vue moléculaire, la résistance à l'insuline serait le résultat de différentes anomalies affectant les cascades de phosphorylation induites par l'activation du récepteur à l'insuline. Ces anomalies peuvent toucher le récepteur à l'insuline lui-même, mais aussi les voies de signalisation en aval du récepteur, comme une inactivation de l'IRS par exemple [Taniguchi *et al.* 2006; Youngren 2007; Leng *et al.* 2004; Sesti *et al.* 2001; Draznin 2006; Gual *et al.* 2005]. L'inactivation du récepteur à l'insuline peut être due à des modifications post-traductionnelles comprenant une phosphorylation de résidus sériques, mais aussi à la fixation de protéines inhibitrices telles que ENPP1/PC-1 (*ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 / plasma cell antigen 1*) [Goldfine *et al.* 2008] ou des membres des familles de protéines SOCS et Grb [Youngren 2007].

III.3. Métabolisme des lipides et lipoprotéines

III.3.a. Généralités sur le métabolisme des lipides

Les lipides plasmatiques les plus importants d'un point de vue clinique sont le cholestérol et les TG [Brown *et al.* 1986]. Le cholestérol joue de nombreux rôles : c'est un composant des membranes cellulaires, le précurseur des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D, et il est nécessaire dans l'activation de molécules de signalisation neuronale [Brown *et al.* 1986; Incardona *et al.* 2000]. Une faible partie seulement du cholestérol circulant est issue de l'alimentation. En effet, environ 80% est issu de la synthèse endogène, dont l'étape limitante est catalysée par l'HMG-CoA (*3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A*) réductase. La majeure partie du cholestérol circulant est estérifiée, tandis que le cholestérol libre constitue une fraction mineure. Les TG représentent une source importante d'énergie. Ils sont fabriqués à partir d'AGL et de glycérol liés par une liaison ester. Les TG sont synthétisés dans les cellules de l'intestin et du foie et sont transportés dans le plasma. Après lipolyse auprès d'une surface endothéliale, les TG délivrent des AGL aux cellules pour être β -oxydés ou stockés.

Les TG et le cholestérol sont insolubles dans le plasma, c'est pourquoi leur transport dans le plasma requiert un système de macromolécules sphéroïdales appelées lipoprotéines (Tableau 6). Elles sont composées d'un noyau hydrophobe contenant des phospholipides, des vitamines et antioxydants liposolubles et du cholestérol estérifié, et d'une enveloppe hydrophile contenant du cholestérol libre, des phospholipides et des apolipoprotéines. Les principales lipoprotéines charriant les TG sont les chylomicrons et les VLDL, tandis que celles qui transportent le cholestérol sont les LDL (*low density lipoprotein*) et les HDL (*high density lipoprotein*).

Une vue d'ensemble du métabolisme des TG et du cholestérol est présentée en Figure 7. Brièvement, les TG et stérols absorbés par les cellules intestinales sont intégrés dans des chylomicrons permettant leur transport jusqu'au TA et le foie [Hegele 2009]. Le foie synthétise ou recycle les TG et le cholestérol et les incorpore dans les VLDL. Dans le sang, les VLDL sont hydrolysés en LDL dont le rôle est de transporter les lipides vers les tissus périphériques. Les HDL sont en revanche chargés du transport inverse du cholestérol qui permet l'élimination du cholestérol.

III.3.b. Transport inverse du cholestérol

Les HDL naissantes sont sécrétées par le foie et l'intestin avec l'ApoA1 (apolipoprotéine A1), la principale apolipoprotéine des HDL, sous forme de particules pré- β -HDL, riches en phospholipides et pauvres en cholestérol. Dans le sang, ces particules

s'enrichissent de lipides provenant de l'efflux cellulaire ou de l'hydrolyse de chylomicrons et de VLDL par la LPL (lipoprotéine lipase). La première étape du transport inverse du cholestérol consiste en l'efflux du cholestérol des cellules périphériques, en particulier des macrophages (Figure 8). ABCA1 (*ATP-binding cassette transporter A1*) est un important transporteur membranaire de cholestérol qui facilite l'efflux du cholestérol vers ces lipoprotéines réceptrices. Le niveau de transport inverse du cholestérol est ensuite déterminé par la coordination entre estérification du cholestérol, incorporation cellulaire sélective, transfert des esters de cholestérol et recyclage des particules pré- β -HDL [Lewis 2006]. La lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) joue un rôle important dans la maturation des HDL [Jonas 2000]. La CETP facilite la redistribution et l'équilibration des lipides entre HDL et les lipoprotéines contenant l'ApoB (chylomicrons, VLDL, IDL (*intermediate density lipoprotein*) et LDL) en subtilisant les esters de cholestérol contenus dans les HDL et en y incorporant des TG [Lewis *et al.* 2005]. Enfin, la PLTP transfère les phospholipides de surface des lipoprotéines riches en TG vers les HDL, et remodèle les HDL en fusionnant plusieurs particules, permettant ainsi le recyclage des pré- β -HDL [Nakamura *et al.* 2004; Huuskonen *et al.* 2001].

Le remodelage des HDL par les différentes lipases détermine leur sort métabolique. La LPL est sécrétée par de nombreux tissus, en particulier le TA et les muscles [Merkel *et al.* 2002]. En hydrolysant les particules riches en TG, la LPL contribue au transfert de cholestérol libre, de phospholipides et d'apolipoprotéines vers les HDL, augmentant ainsi les concentrations plasmatiques de HDL-cholestérol et d'ApoA1 [Lewis 2006]. A l'inverse, la lipase hépatique a une activité plus grande sur les HDL que sur les VLDL ou les chylomicrons, et convertit les HDL en particules plus petites et en pré- β -HDL [Guendouzi *et al.* 1998]. Enfin, la lipase endothéliale hydrolyse plus facilement les HDL que les autres lipoprotéines [McCoy *et al.* 2002] et semble jouer un rôle important dans le métabolisme des HDL mais ses effets chez l'homme restent à déterminer [Maugeais *et al.* 2003; Ishida *et al.* 2003; Jin *et al.* 2003].

La clairance des HDL peut se faire de 2 manières : par une incorporation cellulaire sélective du cholestérol (la plus fréquente) ou par une incorporation cellulaire de l'ensemble de la lipoprotéine HDL par endocytose. Le récepteur SR-B1 (*scavenger receptor B1*) joue un rôle primordial dans la captation sélective du HDL-cholestérol et permet ainsi l'entrée du cholestérol dans les hépatocytes [Trigatti *et al.* 2004; Trigatti *et al.* 2003]. La CETP jouerait aussi un rôle important dans l'incorporation sélective des esters de cholestérol dans le foie [Gauthier *et al.* 2005]. Une fois dans le foie, le cholestérol peut être métabolisé en acides biliaires et excrété dans les intestins où il sera éliminé par le transit.

III.3.c. Altération du profil lipidique et risque cardiovasculaire

L'excès chronique de LDL dans le sang perturbe la relaxation artérielle. En effet, une partie des LDL non pris en charge par le récepteur aux LDL (LDLR) sont reconnus par les récepteurs *scavenger* à la surface des macrophages, tels que SR-A et CD36 [Lusis 2000; Rader *et al.* 2008]. Les lipides incorporés par les macrophages subissent une oxydation générant des intermédiaires toxiques, qui induit la production de cytokines et provoque l'attraction de cellules inflammatoires. Les macrophages de la paroi artérielle remplis de lipides deviennent des cellules spumeuses, à l'origine du développement des plaques athérogéniques. La rupture d'une de ces plaques entraîne des complications cardiovasculaires, comme l'accident vasculaire cérébral [Lusis 2000; Rader *et al.* 2008].

L'augmentation du flux d'AGL, due à un excès de TA ou à une insulino-résistance, est à l'origine des perturbations du profil lipidique (Figure 9). Dans le foie, les AGL stimulent la synthèse des TG et d'ApoB100, et ainsi, l'assemblage et la sécrétion de VLDL. En cas d'insulino-résistance, la LPL n'est plus suffisamment stimulée par l'insuline, ce qui entraîne une accumulation des lipoprotéines riches en TG dans la circulation [Sprangers *et al.* 2001; Chen *et al.* 1999b]. Ainsi, la concentration plasmatique en VLDL augmente, mais aussi leur taille puisqu'elles accumulent des TG [Despres *et al.* 1989; Winocour *et al.* 1992]. De plus, les transferts de TG de ces lipoprotéines vers les LDL et les HDL augmentent, ainsi que le transfert réciproque d'esters de cholestérol. Les particules LDL qui sont alors enrichies en TG et appauvries en cholestérol estérifié sont de meilleurs substrats pour la lipase hépatique, menant ainsi à la formation de petites LDL denses (sdLDL). Ces sdLDL sont particulièrement athérogéniques puisqu'elles entrent dans la paroi artérielle plus aisément, elles sont oxydées plus facilement et sont ainsi incorporées par les macrophages plus rapidement [Grundey *et al.* 2005]. En outre, les particules HDL de grande taille ou HDL2, aux propriétés athéroprotectives, diminuent [Krauss *et al.* 1982].

Le profil lipidique varie selon l'âge et le genre : en général, les hommes âgés présentent un profil lipidique plus délétère que le reste de la population. Les concentrations plasmatiques en cholestérol total et en LDL-cholestérol sont corrélées au risque cardiovasculaire, tandis que celle du HDL-cholestérol est inversement corrélée au risque cardiovasculaire [Grundey 2008b; Lewis *et al.* 2005]. Un taux faible de HDL-cholestérol est le désordre lipidique le plus rencontré chez les patients de moins de 60 ans atteints de MCV [Genest, Jr. *et al.* 1992]. Les concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol et en ApoB sont positivement corrélées entre elles, de même pour le HDL-cholestérol et l'ApoA1 [Sniderman 2004; Barter *et al.* 2006]. Cependant, chez les individus ayant un métabolisme des lipoprotéines altéré, en particulier une augmentation des LDL petites et denses, les taux de LDL-cholestérol et d'ApoB ne sont plus corrélés. En effet, puisqu'il existe une molécule ApoB pour une particule LDL, l'augmentation de LDL petites et denses augmente le taux

d'ApoB, mais n'augmente pas le taux de LDL-cholestérol. Ainsi, le rapport ApoB sur LDL-cholestérol permet une estimation de la taille des particules LDL et représente un très bon marqueur du risque cardiovasculaire [Despres *et al.* 2001]. Récemment, il a été décrit que le ratio ApoB sur ApoA1 est le meilleur facteur lipidique prédictif du risque cardiovasculaire [McQueen *et al.* 2008], mais le ratio cholestérol total sur HDL-cholestérol semble être aussi un bon marqueur [van der Steeg *et al.* 2007]. Enfin, la relation entre TG plasmatiques et risque cardiovasculaire est difficile à établir étant donné qu'une augmentation du taux plasmatique de TG est associée à une diminution du taux de HDL-cholestérol. Néanmoins, un taux élevé de TG, de même que les hypertriglycéridémies familiales sont associés au risque cardiovasculaire indépendamment du HDL-cholestérol [Bansal *et al.* 2007; Austin *et al.* 2000; Nordestgaard *et al.* 2007].

Remarquons ici que, si une augmentation du LDL-cholestérol plasmatique est associée au risque cardiovasculaire, le taux de LDL-cholestérol n'est pas un bon marqueur de ce risque. En effet, en cas de résistance à l'insuline, la conversion des VLDL en IDL et LDL est limitée. Ainsi, même si le taux plasmatique de VLDL augmente, ce n'est pas toujours le cas pour celui du LDL-cholestérol. De plus, les particules LDL sont davantage transformées en sdLDL qui s'infiltrent dans la paroi artérielle et disparaissent ainsi de la circulation. C'est pourquoi des taux normaux de LDL-cholestérol peuvent être observés chez des individus présentant un syndrome métabolique. C'est la raison pour laquelle le taux de LDL-cholestérol n'est pas retenu dans les définitions du syndrome métabolique.

III.4. L'hypertension artérielle

Les causes d'une augmentation de la tension artérielle sont inconnues dans 95% des cas. Les 5% de cas d'hypertension artérielle expliqués correspondent à des patients dont la pathologie est responsable de cette hypertension, qui est alors appelée « hypertension artérielle secondaire ». Les 95% des cas pour qui la cause de l'hypertension est inconnue sont décrits comme présentant une « hypertension artérielle essentielle ». L'hypertension est un facteur de risque majeur de maladies cardiovasculaires et rénales [Kearney *et al.* 2005; Hajjar *et al.* 2003]. La tension artérielle est déterminée par divers facteurs tels que le volume sanguin, le débit cardiaque, la résistance vasculaire et la compliance (adaptation du volume sous l'influence d'une variation de pression). Ces différents éléments sont régulés par des facteurs neuronaux, endocriniens, et paracrines (Figure 10), mais le rôle du rein dans la régulation des fluides et de la balance des électrolytes est primordial pour le contrôle de la tension artérielle [Cowley, Jr. 1992; Guyton *et al.* 1972; Guyton 1991]. De nombreux facteurs déterminent l'efficacité du rein dans cette tâche, tels que le bon fonctionnement du système

nerveux sympathique, les taux d'hormones circulantes, des facteurs autocrines et paracrines intra-rénaux et la filtration glomérulaire.

Les formes les plus communes d'hypertension artérielle apparaissent à la cinquantaine et sont caractérisées par une vasoconstriction systémique et rénale. Comme l'hypertension s'aggrave avec l'âge, les vaisseaux sanguins subissent des changements structuraux leur permettant de supporter cette vasoconstriction, mais provoquant aussi des complications telles que le stress oxydant [Touyz 2004]. Ce stade de l'hypertension est souvent associé à une sensibilité accrue au sel [Campese 1994].

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) :

Le système rénine-angiotensine (RAS) ou rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS) est un système hormonal jouant un rôle important dans la régulation de la pression artérielle et l'équilibre des fluides. Une surexpression de la rénine et de ses produits métaboliques chez un individu le prédispose à l'hypertension. La rénine est une protéase sécrétée par le rein. Elle clive l'angiotensinogène, synthétisé principalement par le foie, en angiotensine I qui est biologiquement inactive (Figure 11) [Oparil *et al.* 1974; Goodfriend *et al.* 1996]. L'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) catalyse la conversion de l'angiotensine I en angiotensine II, biologiquement active. L'angiotensine II exerce ses effets en activant ses récepteurs membranaires, notamment le récepteur AT1, dont l'activation entraîne une vasoconstriction, la libération d'aldostérone du cortex surrénal, et d'autres mécanismes conduisant à l'augmentation de la pression artérielle [Bergsma *et al.* 1992]. L'aldostérone provoque la rétention de sodium et d'eau dans les tubules rénaux. L'angiotensine II stimule également la sécrétion de la vasopressine qui stimule la rétention d'eau dans le rein et exerce aussi un effet vasoconstricteur (Figure 11).

Ce système est la cible de plusieurs médicaments hypotenseurs agissant à différentes étapes. Il existe des inhibiteurs de la rénine [Gradman *et al.* 2005], des inhibiteurs de l'ACE et des antagonistes du récepteur AT1 [Finnegan *et al.* 2003; Zaman *et al.* 2002].

III.5. Différentes hypothèses sur l'origine du syndrome métabolique

La ou les causes à l'origine du développement du syndrome métabolique n'ont pas encore été clairement identifiées et représentent ainsi une source de débats et de questions qui remettent en cause l'existence même du syndrome métabolique. D'un côté, il y a des auteurs, tels que les Dr Reaven, Grundy, Eckel et Zimmet, persuadés que le syndrome métabolique est causé par l'insulinorésistance. De l'autre côté, il y a les Dr Lemieux, Bouchard, Alberti, Hattersley et bien d'autres, qui placent l'obésité abdominale au centre de la physiopathologie du syndrome métabolique. Au milieu, d'autres chercheurs proposent des

hypothèses alternatives, comme l'inflammation ou le déséquilibre hormonal, par exemple. Enfin, certains, comme le Dr Gale par exemple, pensent que l'étude du syndrome métabolique devrait être abandonnée car elle n'apporte rien de plus que les études sur le DT2 et les MCV.

III.5.a. Rôles de l'obésité abdominale et de l'insulinorésistance dans la genèse du syndrome métabolique.

La Figure 12 présente une vue d'ensemble des mécanismes physiopathologiques du syndrome métabolique connus à ce jour. Elle est tirée d'une revue de Eckel *et al* qui placent l'insulinorésistance au centre du syndrome métabolique [Eckel *et al.* 2005]. Une hypertrophie du TA, et en particulier du TA viscéral, entraîne une libération accrue d'AGL [Kahn *et al.* 2000; Bjorntorp 1990]. Dans des conditions physiologiques, l'insuline inhibe la lipolyse du TA ; mais en cas d'insulinorésistance, l'insuline n'est plus capable de supprimer correctement la lipolyse, ce qui entraîne une libération massive d'AGL dans le plasma [Eckel *et al.* 2005]. Non seulement l'insulinorésistance augmente la libération d'AGL, mais l'élévation d'AGL entraîne aussi une insulinorésistance [Despres 1993; Kissebah *et al.* 1982; Bjorntorp 1991; Kahn *et al.* 2001]. Le TA contribue également à la physiopathologie du syndrome métabolique en libérant des adipokines pro-inflammatoires comme IL-6 et TNF α . Ces cytokines altèrent l'action de l'insuline dans le foie, les muscles et le TA [Sopasakis *et al.* 2004; Hube *et al.* 1999].

Les AGL libérés par le TA abdominal rejoignent directement le système veine-porte hépatique [Bjorntorp 1990]. L'élévation du flux d'AGL dans le foie altère l'action de l'insuline et entraîne ainsi une augmentation de la production de glucose hépatique, la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et des changements majeurs dans le métabolisme des lipides et lipoprotéines [Bergman *et al.* 2007]. Dans des conditions physiologiques, l'insuline augmente l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de TG et réduit la sécrétion des VLDL en stimulant la dégradation de l'ApoB [Gonzalez-Baro *et al.* 2007; Lewis *et al.* 1993; Ginsberg *et al.* 2005]. En cas d'insulinorésistance, l'augmentation de la sécrétion des VLDL et la réduction de l'activité de la LPL induit une altération du profil lipidique (diminution du nombre et de la taille des HDL, augmentation des particules LDL denses de petite taille) [Lewis *et al.* 1996].

Dans les muscles, l'élévation du taux plasmatique d'AGL altère le cycle glucose-AG [Randle *et al.* 1963; Gibbons 2002; Schalch *et al.* 1965] et inhibe l'incorporation cellulaire du glucose induite par l'insuline [Boden *et al.* 1994; Dresner *et al.* 1999; Roden *et al.* 1999]. Cet effet est associé à une réduction de la compartimentation du glucose en glycogène et à une augmentation de l'accumulation de lipides. Il est possible que cette accumulation de TG au

sein du muscle squelettique intervienne directement dans l'étiologie de l'insulinorésistance [McGarry 2002].

Le lien entre insulinorésistance et hypertension artérielle a été établi [Ferrannini *et al.* 1987; Bonora *et al.* 2008; Laakso *et al.* 1989]. En effet, l'insuline a des propriétés vasodilatatrices et des effets sur la réabsorption du sodium dans le rein [Steinberg *et al.* 1994; DeFronzo *et al.* 1975]. En cas d'insulinorésistance, l'effet vasodilatateur peut être perdu tandis que l'effet sur la réabsorption du sodium est préservé [Tooke *et al.* 2000; Kuroda *et al.* 1999]. Les AGL peuvent également influencer la vasoconstriction [Tripathy *et al.* 2003] ainsi qu'augmenter la tension artérielle en stimulant le système nerveux sympathique [Grekin *et al.* 1995]. L'insuline accroît également l'activité du système nerveux sympathique, effet qui serait conservé en cas d'insulinorésistance [Anderson *et al.* 1991; Egan 2003]. Enfin, les adipokines résistine et leptine pourraient contribuer à l'élévation de la pression artérielle chez des patients insulinorésistants [Takata *et al.* 2008; Bernal-Mizrachi *et al.* 2002].

L'augmentation de la concentration de molécules inflammatoires, telles que la CRP, TNF α , IL-6, IL-18 et la résistine, témoigne de l'état inflammatoire associé au syndrome métabolique [Sutherland *et al.* 2004]. Ces cytokines contribuent au développement de l'insulinorésistance et à l'augmentation de la lipolyse, et pourraient aussi stimuler la production de glucose et de VLDL dans le foie [Deepa *et al.* 2006; Hotamisligil *et al.* 1995; Glund *et al.* 2008; Okamura *et al.* 1998]. De plus, les cytokines et les AGL stimulent la production de fibrinogène et du PAI-1, engendrant un état prothrombotique [Schneider 2005].

III.5.b. Insulinorésistance ou obésité abdominale ?

Suite à la définition du syndrome métabolique par le Dr Reaven en 1988, l'insulinorésistance a longtemps été considérée comme le cœur de la physiopathologie du syndrome métabolique [Reaven 1988]. L'effet pléiotropique de l'insuline et les nombreuses complications métaboliques engendrées par la résistance à l'insuline sont des arguments forts en faveur de cette théorie. Bien sûr, les auteurs qui défendent ce point de vue prennent également en considération l'obésité abdominale dans la physiopathologie du syndrome métabolique, mais seulement en tant que facteur de risque de l'insulinorésistance. Malgré tout, la quantification de l'action de l'insuline *in vivo* n'est pas toujours bien corrélée ni à la présence du syndrome métabolique en tant qu'entité, ni aux caractéristiques individuelles du syndrome [Hanley *et al.* 2003; Reaven 2005b], remettant ainsi en cause le rôle central de l'insulinorésistance dans la genèse du syndrome métabolique.

D'un autre côté, l'obésité semble jouer un rôle prépondérant dans l'apparition d'un syndrome métabolique. En effet, l'augmentation de la prévalence de l'obésité est fort probablement la cause de l'augmentation de la prévalence du syndrome métabolique

[Ginsberg 2000; Reaven 1988; Eckel *et al.* 2005; Grundy 2008a]. De plus, l'élévation du flux d'AGL engendrée par un TA en excès est à l'origine de nombreuses complications métaboliques, tout autant que l'insulinorésistance. Cependant, tous les individus obèses ne présentent pas de syndrome métabolique [Karelis *et al.* 2004; Karelis *et al.* 2005; Sims 2001]. Il existe même des patients souffrant d'une obésité morbide qui n'ont pas de syndrome métabolique, ce qui remet en question le rôle central de l'obésité dans la physiopathologie du syndrome métabolique.

Selon les Dr Teran-Garcia & Bouchard, c'est une mauvaise régulation du métabolisme du TA (dérégulation de la différenciation adipocytaire, apparition de dépôts ectopiques de graisse), pouvant être observée chez des individus obèses ou de poids normal, qui est à l'origine de la lipolyse accrue, de l'insulinorésistance, des dysfonctions endothéliales et de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi le syndrome métabolique [Teran-Garcia *et al.* 2007]. Cette hypothèse est confortée par l'observation des désordres métaboliques liés au syndrome métabolique chez les patients lipodystrophiques [Barroso *et al.* 1999]. Ce point de vue rejoint l'hypothèse de la capacité d'expansion du TA, selon laquelle c'est la capacité de chaque individu à agrandir son TA qui détermine l'apparition de complications métaboliques, plutôt que la quantité absolue de masse grasse qu'un individu possède [Virtue *et al.* 2008]. Lorsqu'un individu atteint le seuil de saturation de son tissu adipeux, les dépôts ectopiques de graisse apparaissent, et en parallèle, les désordres métaboliques, dus à la lipotoxicité.

III.5.c. Hypothèses alternatives

Le rôle de l'inflammation en tant que facteur causal est un concept émergent. En effet, de nombreuses études ont montré le rôle d'importants marqueurs de l'inflammation dans le syndrome métabolique. Ainsi, l'activité de la CRP, du TNF α , de IL-6 et du PAI-1 augmente avec le nombre de composantes du syndrome métabolique observées chez un individu [Bahia *et al.* 2006; Van Guilder *et al.* 2006; Gonzalez *et al.* 2006; Ridker *et al.* 2003; Mertens *et al.* 2006]. En particulier, TNF α et IL-6 ont été identifiés comme des éléments clés de l'insulinorésistance [Hotamisligil *et al.* 1995; Lo *et al.* 2007; Ruderman *et al.* 2006; Rieusset *et al.* 2004].

Récemment, le stress du réticulum endoplasmique a été proposé comme le lien entre obésité, insulinorésistance et inflammation [Aguirre *et al.* 2000; Ozcan *et al.* 2004]. Le stress du réticulum endoplasmique peut entraîner une hyper activation de la kinase c-Jun N-terminale (JNK) [Saiki *et al.* 2007], engendrant la phosphorylation de la sérine de l'IRS-1 et ainsi, une réduction de la signalisation de l'insuline [Aguirre *et al.* 2000]. De plus, JNK est une kinase intracellulaire impliquée dans la signalisation cellulaire, notamment dans

l'inflammation (*via* TNF α) [Ozcan *et al.* 2004], et représente ainsi un lien intéressant entre signalisation de l'insuline et inflammation. Enfin, des marqueurs du stress du réticulum endoplasmique, tels que XBP-1 (*X-box-binding protein-1*) sont associés à l'obésité chez des patients non diabétiques et ils diminuent en cas de perte de poids [Ozcan *et al.* 2004]. Le stress du réticulum endoplasmique représente donc une nouvelle voie potentiellement impliquée dans le syndrome métabolique.

Un concept alternatif pour expliquer le syndrome métabolique, proposé par Unger *et al.*, est la résistance à la leptine [Unger 2003]. En effet, une insuffisance ou une résistance à la leptine est associée à des dépôts ectopiques de graisse résultant probablement de l'absence d'inhibition de la SREBP1c ou de l'incapacité de la leptine à activer l'AMP kinase dans les muscles [Unger 2003; Kakuma *et al.* 2000; Minokoshi *et al.* 2003].

Enfin, un déséquilibre hormonal pourrait être à l'origine du syndrome métabolique. D'une part, le Dr Björntop suggéra qu'une hypercortisolémie et une insuffisance en hormones sexuelles stéroïdiennes sont importants dans la pathogenèse de l'insulinorésistance [Björntop 1992]. Ces défauts hormonaux combinés à une sécrétion d'hormone de croissance insuffisante, favoriseraient l'accumulation de TG dans le TA, et amplifieraient ainsi les manifestations du syndrome métabolique. D'autre part, les femmes présentant le syndrome des ovaires polykystiques ont un risque augmenté de syndrome métabolique [Coviello *et al.* 2006; Dunaif 2006]. L'hyperandrogénie observée chez ces femmes est associée à une augmentation de la production de glucose, une obésité abdominale ainsi qu'à une diminution des fonctions des cellules β du pancréas [Coviello *et al.* 2006]. Ainsi, le Dr Dunaif propose le concept de syndrome XX, ou syndrome métabolique féminin dans lequel le paramètre de l'hyperandrogénie serait pris en considération [Sam *et al.* 2003]. De son côté, le Dr Phillips propose le terme de « Glucose-Insulin-Lipid-Hypertension-Testosterone-Estrogen » (GILHT-E) syndrome [Phillips 2004] suite aux observations suivantes : i) le ratio oestradiol/testostérone est corrélé aux taux de glucose, d'insuline, de cholestérol et de TG chez les hommes, ii) les facteurs de risque cardiovasculaire sont associés aux niveaux d'hormones sexuelles et iii) un taux bas de testostérone chez les hommes est un facteur prédictif de l'accumulation de TA viscéral et du syndrome métabolique.

IV. Facteurs de prédisposition

Même s'il est évident que de nombreux facteurs environnementaux influencent le développement du syndrome métabolique chez un individu, sa composante génétique est loin d'être négligeable. En effet, l'incidence du syndrome métabolique est nettement plus élevée chez les individus ayant des antécédents familiaux [Liese *et al.* 1997; Chen *et al.* 1999a]. De plus, les principaux phénotypes du syndrome métabolique cohabitent souvent au sein d'une même famille [Hong *et al.* 1998; Meigs *et al.* 1997]. Enfin, chacun des phénotypes du syndrome métabolique présente une héritabilité relativement élevée [Teran-Garcia *et al.* 2007]. La composante génétique du syndrome métabolique ainsi que de l'obésité, du DT2, des dyslipidémies et de l'hypertension artérielle est complexe et varie depuis des formes monogéniques, souvent rares, aux formes polygéniques et multifactorielles, les plus communes, dans lesquelles leur développement est le résultat d'une prédisposition génétique à laquelle s'est ajouté un environnement délétère.

IV.1. Facteurs environnementaux

Quelques études ont évalué l'impact des facteurs environnementaux sur la prévalence du syndrome métabolique. Les habitudes alimentaires influencent significativement le développement du syndrome métabolique. Ainsi, une alimentation riche en glucides est associée à une augmentation du risque de syndrome métabolique [Park *et al.* 2003]. De plus, la composition et la nature lipidique de l'alimentation favoriseraient l'insulinorésistance. En effet, Laaksonen *et al.* ont mis en évidence une importante interaction entre le taux sérique en AG (biomarqueur de l'ingestion habituelle de graisses) et le développement d'un DT2 [Laaksonen *et al.* 2002b]. Les hommes normo-glycémiques qui développent une insulinorésistance présentent des taux d'AG saturés élevés et des taux d'AG polyinsaturés diminués [Laaksonen *et al.* 2002b]. Enfin, il a été montré que la substitution des AG saturés par des AG mono-insaturés dans l'alimentation (comme c'est le cas pour le régime méditerranéen, par exemple) améliore la sensibilité à l'insuline [Vessby *et al.* 2001].

Les facteurs de risque classiques des MCV, tels que la consommation de tabac ou d'alcool et le manque d'activité physique, augmentent également le risque de syndrome métabolique [Park *et al.* 2003; Dallongeville *et al.* 2005a; Wamala *et al.* 1999; Brunner *et al.* 1997]. De manière intéressante, il a également été mis en évidence un impact significatif du niveau socio-économique sur la prévalence du syndrome métabolique aux Etats-Unis et en Europe. Ainsi, il existe une corrélation inverse entre le niveau d'éducation et la catégorie

socioprofessionnelle et le syndrome métabolique [Wamala *et al.* 1999; Silventoinen *et al.* 2005; Brunner *et al.* 1997; Dallongeville *et al.* 2005a]. De même, les femmes ayant un revenu faible ont un risque augmenté de syndrome métabolique [Dallongeville *et al.* 2005a; Park *et al.* 2003]. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les personnes ayant des ressources limitées achètent les produits les moins chers, qui sont souvent les plus énergétiques, et pratiqueraient moins de sport [Drewnowski *et al.* 2004; Darmon *et al.* 2004]. Mais ces hypothèses n'expliquent pas la différence entre genres. Le fait que seules les femmes soient concernées pourrait être dû à leur taux de chômage plus élevé. En effet, les femmes aux revenus les plus modestes sont souvent sans emploi, entraînant ainsi un manque d'activité physique et le développement du syndrome métabolique [Dallongeville *et al.* 2005a; Sarlio-Lahteenkorva *et al.* 1999].

Pour finir, on a vu abondamment dans le chapitre II.1.d (page 18) que l'âge influence fortement l'apparition du syndrome métabolique.

IV.2. Facteurs génétiques

IV.2.a. Les études d'épidémiologie génétique

Les études d'épidémiologie génétique ont beaucoup évolué au cours de ces 2 dernières décennies. Les premières études génétiques des maladies communes ont consisté en l'étude de jumeaux : la composante génétique (l'héritabilité) d'un phénotype était estimée par comparaison de la fréquence de la pathologie entre les jumeaux monozygotes et les jumeaux dizygotes.

Dans les années 1990, les avancées technologiques du génotypage avec l'apparition de la PCR (*polymerase chain reaction*) ont fait place aux études d'association de gènes candidats, soit dans des échantillons de cas et de témoins soit dans des études en population. L'approche « gène candidat » est une approche *a priori* : on choisit un gène qui serait impliqué dans la physiopathologie de la maladie étudiée (grâce à des modèles animaux ou cellulaires) ou impliqués dans les formes monogéniques de la maladie. On teste alors l'association entre des variants génétiques (ou polymorphismes), des SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) dans la plupart des cas, ou des haplotypes (combinaisons d'allèles de plusieurs polymorphismes sur le chromosome), et le risque de maladie. Par cette approche, il est également possible d'analyser les interactions gène x gène ou gène x environnement. Le problème majeur de ces études réside en la faible puissance statistique de beaucoup d'études, due à des effectifs trop petits. En effet, dans des échantillons inférieurs à 1000 individus, le nombre de faux positifs (détection d'une association alors qu'il n'y en a pas) et de faux négatifs (non-détection d'une association alors qu'elle existe) est important. Plus l'effet du polymorphisme génétique ou sa fréquence sont petits, plus le

nombre d'individus requis est grand (Figure 13). La limite de cette approche est le faible taux de concordance des résultats entre les études. Les méta-analyses représentent un bon outil pour augmenter les effectifs et ainsi la puissance statistique, mais souffrent du biais de publication, les résultats négatifs étant beaucoup moins publiés que les résultats positifs.

En parallèle de ces études d'associations, les études de liaison permettent une approche sans *a priori* : dans une population d'individus apparentés, on examine la co-ségrégation de régions chromosomiques avec le phénotype d'intérêt. Par clonage positionnel, les QTLs (*quantitative trait loci*) impliqués dans la maladie sont identifiés. Bien que cette stratégie s'avère efficace dans l'étude de désordres à ségrégation mendélienne ou de rares maladies dont la composante génétique est très importante, son succès dans l'étude des maladies communes et des traits quantitatifs continus comme l'IMC, reste limité. De plus, elle ne permet pas, en général, de localiser avec précision le gène responsable du phénotype.

Depuis 2005, les GWAS (*genome wide association studies*) ont révolutionné les études d'épidémiologie génétique. Cette approche consiste en l'exploration de la variabilité du génome entier, sans *a priori*, chez des individus non apparentés. Deux avancées majeures ont permis ce type d'étude. D'une part, le génotypage à haut débit a été rendu possible grâce à la technologie des biopuces, qui permet de génotyper simultanément jusqu'à maintenant un million de SNPs. D'autre part, le projet international HapMap [McPherson *et al.* 2001] a considérablement accru nos connaissances sur les polymorphismes génétiques et leur déséquilibre de liaison (co-ségrégation des allèles de 2 *loci* différents). Ainsi, ces 2 avancées ont permis la conception de biopuces à SNPs qui captureraient 80% de l'ensemble des polymorphismes génétiques [Magi *et al.* 2007]. Les GWAS ont ainsi permis d'identifier de nouveaux gènes, parfois inattendus. Ces études sont en général construites en 2 étapes : une première étape consistant en la GWAS à proprement parler, puis une 2^{ème} étape de réplification, où seuls les *loci* les plus significatifs de la 1^{ère} étape sont testés dans des études à très grande échelle (souvent >10 000 individus pour les maladies communes) afin de les valider.

Les études d'épidémiologie génétique concernant l'obésité, le DT2, les dyslipidémies et l'hypertension artérielle pullulent, tandis que celles qui ont examiné le syndrome métabolique se font plus rares. En effet, les controverses concernant les critères à employer ainsi que les débats sur l'existence même du syndrome métabolique n'ont pas encouragé les études génétiques dans ce domaine, et ont donné naissance à de nombreuses études sur chacun des phénotypes du syndrome métabolique, considérés individuellement, plutôt que sur le syndrome métabolique en tant qu'entité.

IV.2.b. Facteurs génétiques de l'obésité et des phénotypes associés

La composante génétique de l'obésité est relativement élevée, de 25 à 60% pour l'IMC, selon les études. L'obésité abdominale présente aussi une héritabilité génétique élevée, de 40 à 55% suivant les études [Teran-Garcia *et al.* 2007]. Les nombreuses études d'association qui ont été réalisées ont révélé une multitude de gènes candidats. Selon la mise à jour du *Human Obesity Gene Map*, d'octobre 2005, 127 gènes candidats étaient associés aux phénotypes relatifs à l'obésité [Rankinen *et al.* 2006]. Cependant, ces résultats n'ont pu être répliqués que pour 12 gènes seulement dans au moins 10 études indépendantes. Ce sont les gènes *ADIPOQ*, *ADRB2*, *ADRB3*, *GNB3*, *HTR2C*, *NR3C1*, *LEP*, *LEPR*, *PPARG*, *UCP1*, *UCP2* et *UCP3* (Tableau 7). Etant donné l'hétérogénéité du développement de l'obésité, beaucoup d'autres variants génétiques communs doivent contribuer à la détermination de l'IMC, chacun exerçant un effet modeste.

La première étude de liaison sur génome entier concernant le pourcentage de masse grasse a été publiée en 1997 [Norman *et al.* 1997] et depuis, le nombre d'études et de QTLs ont augmenté exponentiellement [Li *et al.* 2008]. La *Human Obesity Gene Map* révéla l'existence de 250 QTLs possibles répartis sur l'ensemble des chromosomes, mais seuls 15 QTLs ont pu être répliqués dans au moins 3 études et aucun d'entre eux n'a pu être réduit à la localisation précise du gène ou du variant génétique responsable du phénotype [Rankinen *et al.* 2006]. Même une méta-analyse de 37 études de liaison sur génome entier (10 000 familles) n'a pas permis l'identification d'un gène sans équivoque [Saunders *et al.* 2007].

L'étude de Scuteri *et al.* est la première GWAS à grande échelle portant sur les phénotypes relatifs à l'obésité (masse corporelle, IMC et tour de hanches) [Scuteri *et al.* 2007]. Les GWAS ont connu leur premier succès avec la découverte du gène *FTO* (*fat mass and obesity-associated*) comme facteur de risque de l'obésité [Scuteri *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a]. L'allèle à risque de *FTO* est associé à une augmentation de l'IMC de 0,40-0,66 kg/m² et du risque de surpoids (OR=1,18) et d'obésité (OR=1,32). Les individus homozygotes pour l'allèle à risque (16% de la population) pèsent en moyenne 3 kg de plus et ont un risque d'obésité augmenté (OR=1,70) [Scuteri *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a]. Afin d'identifier de nouveaux polymorphismes génétiques associés aux phénotypes relatifs à l'obésité, une méta-analyse de GWAS fut entreprise (n=16876) [Loos *et al.* 2008]. Le 2^{ème} signal après *FTO* a été localisé près du gène *MC4R*, dont les mutations sont connues pour être responsables de formes monogéniques d'obésité sévère dès l'enfance [Farooqi *et al.* 2003]. Ce signal fut confirmé chez environ 60000 adultes et 6000 enfants : ce variant génétique est associé à une augmentation de l'IMC chez les adultes et les enfants (z-score 0,05) et à une augmentation du risque d'obésité sévère chez les enfants (OR=1,30) [Loos *et al.* 2008]. Grâce au consortium GIANT (*Genetic Investigation of ANthropometric Traits*), 6 nouveaux *loci* ont été identifiés dans une nouvelle méta-analyse

de 15 GWAS (n=32387) et confirmés dans 14 cohortes additionnelles (n>59000) [Willer *et al.* 2009]. Ces *loci* sont situés dans ou à proximité des gènes *TMEM18*, *KCTD15*, *SH2B1*, *MTCH2*, *GNPDA2* et *NEGR1* (Tableau 7). Malgré la robustesse des résultats concernant les 8 gènes associés dans ces GWAS, l'impact de chaque allèle à risque est généralement faible (0,06 à 0,33 kg/m²). Ainsi, l'ensemble de ces 8 *loci* expliquerait moins de 1% de la variation totale de l'IMC [Willer *et al.* 2009].

Récemment, des GWAS ont porté sur différents indices de l'adiposité et sur l'obésité abdominale. Thorleifsson *et al.* ont ainsi identifié le gène *BDNF* comme déterminant génétique de la masse corporelle et de l'IMC [Thorleifsson *et al.* 2009]. Les gènes *TFAP2B*, *MSRA*, *LYPLAL1* et *NRXN3* sont associés à l'obésité abdominale, estimée par le tour de taille ou le RTH (Tableau 7) [Lindgren *et al.* 2009; Heard-Costa *et al.* 2009]. Enfin, de récentes études GWA ont porté sur l'obésité sévère (IMC \geq 40kg/m²). L'étude de Meyre *et al.*, réalisée sur 1380 individus sévèrement obèses et 1416 témoins et validée chez 14186 individus, a permis l'identification, en plus des gènes *FTO* et *MC4R*, de 4 nouveaux *loci* situés dans ou à proximité des gènes *NPC1*, *MAF*, *PTER* et *PRL* (Tableau 7) [Meyre *et al.* 2009]. Cotsapas *et al.* suggèrent que la plupart des *loci* influençant l'IMC dans la population générale contribuent également au développement de l'obésité sévère et que les individus sévèrement obèses cumuleraient les allèles à risque de ces différents *loci* [Cotsapas *et al.* 2009].

Ces récentes découvertes offriront une meilleure compréhension de la physiopathologie de l'obésité dès que le rôle de ces protéines dans la régulation de la masse grasse sera compris. Déjà, l'identification des gènes *SH2B1*, *NEGR1*, *BDNF* et *NRXN3*, en plus de *MC4R*, soulignent l'importance du rôle du SNC dans le développement de l'obésité. Bientôt, des études à plus grande échelle (le consortium GIANT vise à regrouper 100 000 individus) et l'affinage des phénotypes devraient permettre la découverte de nouveaux variants génétiques impliqués dans la régulation de la masse grasse.

IV.2.c. Facteurs génétiques de l'homéostasie glucidique

Le DT2 et l'insulinorésistance ont une forte composante génétique (46-90% suivant les études) [Teran-Garcia *et al.* 2007]. Durant ces 10 dernières années, de nombreuses études de liaison et d'association ont été entreprises, et l'approche gène candidat a permis l'identification sans équivoque de variants génétiques communs associés au DT2. Ces variants sont situés dans les gènes *KCNJ11* (E23K), *PPARG* (P12A), *TCF2/HNF1B* et *WFS1* (Tableau 8) [Florez *et al.* 2004; Gloyn *et al.* 2003; Nielsen *et al.* 2003; Altshuler *et al.* 2000; Gudmundsson *et al.* 2007; Winckler *et al.* 2007; Sandhu *et al.* 2007]. Il est important de

souligner que des mutations rares dans ces 4 gènes provoquent des formes monogéniques de DT2 [Barroso *et al.* 1999; Gloyn *et al.* 2004; Inoue *et al.* 1998; Nishigori *et al.* 1998].

En 2006, l'affinage de la région du chromosome 10 précédemment associée au DT2 dans une étude de liaison, permet l'identification d'un nouveau variant situé dans le gène *TCF7L2* [Grant *et al.* 2006]. Cette découverte représente une grande avancée dans la génétique du DT2, puisque *TCF7L2* a été le premier gène identifié par une approche sans *a priori*. Parmi tous les polymorphismes associés au DT2 identifiés à ce jour, ceux de *TCF7L2* ont le plus grand impact sur le risque de DT2 : les 7% d'Européens homozygotes pour l'allèle à risque ont un risque de DT2 multiplié par 2 par rapport aux individus homozygotes pour l'allèle fréquent [Grant *et al.* 2006; Helgason *et al.* 2007].

Les GWAS ont confirmé l'association des gènes *TCF7L2*, *PPARG* et *KCNJ11* avec le risque de DT2 et ont permis l'identification de 6 nouveaux *loci* : *FTO*, *CDKAL1*, *CDKN2A-2B*, *IGF2BP2*, *SLC30A8* et *HHEX/IDE* (Tableau 8) [Saxena *et al.* 2007; Scott *et al.* 2007; 2007b; Zeggini *et al.* 2007; Steinthorsdottir *et al.* 2007; Sladek *et al.* 2007; Florez *et al.* 2007; Timpson *et al.* 2009]. Parmi ces associations, seule celle de *FTO* ne résiste pas à l'ajustement sur l'IMC, signifiant que, sauf pour *FTO*, ces associations avec le DT2 ne sont pas dues à une prise de poids [Zeggini *et al.* 2007]. La méta-analyse du consortium DIAGRAM (*Diabetes Genetics Replication And Meta-analysis*) (n=10128) a permis ensuite d'identifier 6 nouveaux *loci* associés au DT2 : *JAZF1*, *CDC123-CAMK1D*, *TSPAN8-LGR5*, *THADA*, *ADAMT59* et *NOTCH2* (Tableau 8). Ces 6 *loci* ne semblent pas être associés à l'IMC, et ont un effet très modeste sur le risque de DT2 (OR=1,1-1,2) [Zeggini *et al.* 2008].

Grâce à l'augmentation des effectifs, de récentes études ont pu affiner les phénotypes étudiés. Ainsi, un polymorphisme génétique situé à proximité du gène *G6PC2* (glucose-6-phosphatase C-2) est associé à la glycémie à jeun et explique 1% de la variation totale de la glycémie [Chen *et al.* 2008; Bouatia-Naji *et al.* 2008]. De plus, le rôle de polymorphismes génétiques du gène *GCK* (glucokinase) dans la tolérance au glucose a été confirmé [Prokopenko *et al.* 2009]. De même, plusieurs polymorphismes génétiques localisés dans le gène *MTNR1B* sont associés à la glycémie à jeun, au HOMA-B (*homeostasis model assessment of β cell function*) et au DT2 [Prokopenko *et al.* 2009; Bouatia-Naji *et al.* 2009; Sabatti *et al.* 2009]. Enfin, le gène *PANK1* est associé à la concentration plasmatique d'insuline [Sabatti *et al.* 2009].

Les résultats des GWAS fournissent de précieuses informations pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques du DT2. En effet, 8 *loci* (*TCF7L2*, *KCNJ11*, *IGF2BP2*, *CDKN2A-2B*, *CDKAL1*, *SLC30A8*, *HHEX/IDE*, *MTNR1B*) parmi les 18 identifiés sont associés à une altération des fonctions des cellules β du pancréas, entraînant une mauvaise sécrétion d'insuline [Perry *et al.* 2008; Prokopenko *et al.* 2009]. En revanche,

aucun lien évident n'a pu être établi entre ces 8 *loci* et une insulino-résistance, suggérant que l'insulino-résistance n'est peut-être pas la 1^{ère} cause du développement d'un DT2.

L'ensemble de ces résultats représente un grand pas en avant non seulement dans la compréhension des facteurs génétiques influençant le développement du DT2, mais aussi dans la compréhension de son étiologie, et offre ainsi de nouvelles perspectives de recherche et potentiellement de nouvelles cibles thérapeutiques.

IV.2.d. Facteurs génétiques des lipides plasmatiques

L'héritabilité du profil lipidique est estimée suivant les études entre 25 et 60% pour les TG, entre 50 et 60% pour le cholestérol total, entre 30 et 80% pour le HDL-cholestérol et entre 26 et 60% pour le LDL-cholestérol [Teran-Garcia *et al.* 2007]. La recherche de déterminants génétiques contribuant à la variation des taux lipidiques plasmatiques commença il y a plus de 25 ans. Aujourd'hui, de nombreux gènes responsables des dyslipidémies mendéliennes ont été identifiés [Dedoussis 2007; Rahalkar *et al.* 2008]. En revanche, l'identification des facteurs génétiques des désordres lipidiques moins sévères et plus fréquents s'est avérée fastidieuse. Une fois de plus, le faible taux de concordance des résultats entre les différentes études d'association et de liaison a rendu cette identification difficile. Néanmoins, de récentes méta-analyses confirment les associations entre les polymorphismes ϵ de l'*APOE* et le taux de LDL-cholestérol [Bennet *et al.* 2007], et 3 polymorphismes de la *CETP* avec le HDL-cholestérol [Thompson *et al.* 2008] (Tableau 9). De même, le *cluster* de gènes *APOA1-C3-A4-A5* a été associé au taux plasmatique de TG [Shoulders *et al.* 2004].

D'importants déterminants génétiques des taux de lipides ont été identifiés grâce à l'étude des désordres monogéniques. Ainsi, des mutations des gènes *PCSK9*, *APOB* et *MTTP* sont associés au taux plasmatique de LDL-cholestérol (Figure 14) [Tarugi *et al.* 2007]. De plus, des mutations dans les gènes *ABCA1*, *APOA1*, *LCAT*, *CETP* et *LIPC* sont associées au taux de HDL-cholestérol [Brooks-Wilson *et al.* 1999; Assmann *et al.* 1993; Hovingh *et al.* 2005]. Enfin, des mutations dans les gènes *LPL*, *APOC2*, *MTTP*, *APOB* et *SAR1B* sont associées aux concentrations de TG [Fojo *et al.* 1992; Peterfy *et al.* 2007; Young *et al.* 2007; Talmud 2007; Whitfield *et al.* 2004; Jones *et al.* 2003] (Tableau 9).

Le séquençage d'un grand nombre d'individus ayant des taux de lipoprotéines extrêmes s'avère être une bonne stratégie pour identifier des mutations dans des gènes candidats. Un excès de mutations chez les individus appartenant à une extrémité de la distribution par rapport aux individus de l'autre extrémité peut mettre en évidence une association génétique. Cette approche permet de confirmer l'impact de mutations des gènes *ABCA1*, *APOA1* et *LCAT* [Cohen *et al.* 2004] sur le HDL-cholestérol, de *PCSK9* sur le LDL-cholestérol [Cohen *et al.* 2005], et de *LPL*, *APOC2* et d'*APOA5* sur les TG [Wang *et al.*

2007a] (Tableau 9). De plus, des mutations dans le gène *LIPG* ont ainsi été identifiées et sont associées au HDL-cholestérol [deLemos *et al.* 2002], de même que pour *ANGPTL4* associé aux concentrations plasmatiques de TG [Romeo *et al.* 2007] (Figure 14).

Les récentes GWAS ont confirmé la plupart de ces gènes et en ont identifié de nouveaux [Kathiresan *et al.* 2007; Kooner *et al.* 2008; Sandhu *et al.* 2008; Wallace *et al.* 2008; Willer *et al.* 2008; Sabatti *et al.* 2009]. Ainsi, l'association des gènes *APOE*, *LDLR*, *APOB*, *PCSK9* et *HMGCR* avec le LDL-cholestérol a été confirmée, et de nouveaux *loci* ont pu être identifiés : *SORT1*, *CILP2*, *BCAM*, *TOMM40*, *ABCG8*, *MAFB*, *HNF1A*, *TIMD4*, *ABCG5*, *DNAH11* et *FADS2-3* [Kathiresan *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2009; Willer *et al.* 2008; Aulchenko *et al.* 2009] (Tableau 9). Concernant le HDL-cholestérol, les GWAS ont confirmé l'impact des gènes *CETP*, *LIPC*, *LPL*, *ABCA1*, *LIPG* et *LCAT*, et ont révélé de nouveaux *loci* : *GALNT2*, *MVK-MMAB*, *ANGPTL4*, *FADS1-FADS2-FADS3*, *HNF4A*, *PLTP*, *TTC39B*, *MADD-FOLH1* et *NR1H3* [Kathiresan *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2009; Willer *et al.* 2008; Aulchenko *et al.* 2009]. Enfin, pour les TG, des gènes déjà connus, comme *APOA5*, *LPL*, *LIPC* et *APOB* ont été confirmés, tandis que les gènes *CILP2*, *TRIB1*, *GCKR*, *CHREBP* (ou *MLXIPL*), *GALNT2*, *AMAC1L2*, *FADS1-FADS2-FADS3*, *ANGPTL3* et *PLTP* sont de nouveaux *loci* associés aux taux de TG [Kathiresan *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2009; Willer *et al.* 2008]. L'identification des gènes *GCKR*, *CHREBP* et *GALNT2* font apparaître un lien intéressant entre régulation du taux plasmatique de TG et métabolisme des glucides. Là encore, ces récentes découvertes offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

IV.2.e. Facteurs génétiques de l'hypertension artérielle

La composante génétique de l'hypertension artérielle essentielle est estimée à 50% [Teran-Garcia *et al.* 2007]. Les déterminants génétiques de la pression artérielle systolique (PAS) sont estimés à 20-70%, et ceux de la pression artérielle diastolique (PAD), à 10-50%, selon les études. Comme pour les autres désordres métaboliques, il existe des formes monogéniques de l'hypertension artérielle. Les gènes *HSD11B2*, *CYP11B1*, *CYP11B2*, *NR3C2*, *SCNN1B*, *SCNN1G*, *WNK1*, *WNK4*, *PPARG* et *MT-TI* (Tableau 10) sont responsables de ces formes mendéliennes de l'hypertension artérielle, mais ne sont pas tous associés à l'hypertension artérielle essentielle [Binder 2007]. De nombreuses études de liaison ont identifié des régions liées à la pression artérielle et/ou à l'hypertension artérielle. Ces régions sont localisées sur tous les chromosomes sauf le 14 et le 22 [Binder 2007]. Les études d'association ont beaucoup étudié les gènes appartenant au système rénine-angiotensine. Des polymorphismes non synonymes du gène codant l'angiotensinogène (*AGT*) sont associés à l'hypertension artérielle essentielle dans plusieurs populations [Jeunemaitre *et al.* 1992; Caulfield *et al.* 1994; Gu *et al.* 2005]. En revanche, des résultats contradictoires ont été publiés sur l'association entre le gène codant l'enzyme de conversion

de l'angiotensine (*ACE*) et l'hypertension artérielle [Binder 2007]. Les gènes du système adrénergique, notamment *ADRA2A*, *ADRA2C* (récepteur adrénergique $\alpha 2$) et *ADRB2* (récepteur adrénergique $\beta 2$), ont également été largement étudiés mais de nombreux résultats contradictoires ne permettent pas de conclure clairement sur leurs impacts. Concernant le système endothélial, de nombreuses études ont analysé l'association entre des SNPs du gène *NOS3* et ont trouvé des résultats encore une fois incohérents. Néanmoins une méta-analyse de 35 études d'association montra une association entre un polymorphisme de *NOS3* et l'hypertension artérielle [Zintzaras *et al.* 2006]. Le recoupement des données des études de liaison et d'association mit en évidence une association entre le gène *MEX3C* (ou *RKHD2*) et l'hypertension artérielle essentielle [Guzman *et al.* 2006], mais aucune étude fonctionnelle de ce gène ne permet à ce jour de comprendre son impact dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle.

De récentes GWAS ont permis l'identification de polymorphismes associés à la pression artérielle et/ou à l'hypertension artérielle, localisés à proximité de 16 *loci*: *CYP17A1*, *CYP1A2*, *FGF5*, *SH2B3*, *MTHFR*, *c10orf107*, *ZNF652*, *PLCD3*, *ATP2B1*, *CACNB2*, *PLEKHA7*, *CSK/ULK3*, *TBX3-TBX5*, *ULK4*, *CDH13* et *STK39* (Tableau 10) [Newton-Cheh *et al.* 2009; Levy *et al.* 2009; Org *et al.* 2009; Wang *et al.* 2009]. La découverte de ces gènes offre de nouvelles perspectives dans les mécanismes de régulation de la pression artérielle et de nouvelles cibles thérapeutiques.

IV.2.f. Facteurs génétiques du syndrome métabolique

L'héritabilité du syndrome métabolique selon les critères du NCEP a été estimée à 30% [Teran-Garcia *et al.* 2007]. Dans une étude de jumeaux (2508 paires), la concordance entre jumeaux souffrant à la fois d'une obésité, d'un DT2 et d'une hypertension artérielle était de 31,6% pour les jumeaux monozygotes, contre 6,3% pour les jumeaux dizygotes [Carmelli *et al.* 1994].

L'identification génétique du syndrome métabolique est rendue difficile par la complexité de ce syndrome. Cette complexité se situe à deux niveaux. D'une part, chacune des voies métaboliques impliquées dans le développement du syndrome est complexe et met en jeu de nombreux gènes. D'autre part, l'étiologie du syndrome reste encore inconnue aujourd'hui. Le choix des gènes candidats repose alors sur 2 hypothèses : soit le gène a un effet pléiotropique, et joue sur différentes voies métaboliques du syndrome métabolique, soit il joue sur un seul phénotype pouvant suffire à lui seul au développement du syndrome.

De nombreuses études ont recherché si des gènes déjà associés à un phénotype du syndrome métabolique pouvaient être également associés à d'autres phénotypes ou au risque de syndrome métabolique lui-même. Parmi les gènes associés à l'obésité, le gène de la leptine est aussi associé à l'hypertension et au DT2, indépendamment de son association

avec l'obésité [Shintani *et al.* 2002; Lakka *et al.* 2000]. Le gène *ADRB3* est également associé à l'insulinorésistance et au taux de TG [Kawamura *et al.* 1999; Kim-Motoyama *et al.* 1997; Thomas *et al.* 2000]. Cependant, bien que ces gènes soient associés à plusieurs phénotypes du syndrome, ils ne semblent pas être associés au risque de syndrome métabolique [Meirhaeghe *et al.* 2005b; Dunajska *et al.* 2008]. Le gène *NR3C1*, récepteur aux glucocorticoïdes, est associé à la sensibilité à l'insuline et à l'hypertension en plus d'être associé à l'obésité [Rosmond 2002; van Rossum *et al.* 2004], mais son impact sur le risque de syndrome métabolique n'a pas encore été montré. En revanche, les gènes *ADRB2* (associé au risque d'obésité et d'hypertension artérielle) et *FTO* (associé au risque d'obésité et de DT2) sont associés au risque de syndrome métabolique [Dallongeville *et al.* 2003; Sjogren *et al.* 2008] (Tableau 11). De même, *PPARG*, qui est un gène candidat « idéal » puisque, en plus d'être associé à l'obésité, au DT2 et à l'hypertension artérielle, il est responsable de lipodystrophie de forme familiale [Hegele 2001; Hegele *et al.* 2005], est également associé au risque de syndrome métabolique [Meirhaeghe *et al.* 2005a].

Parmi les gènes associés au DT2, les gènes *TCF7L2*, *WFS1* et *IGF2BP2* sont également associés au risque de syndrome métabolique [Sjogren *et al.* 2008]. Néanmoins, ces associations sont très modestes ($OR=1,07-1,10$) et ces polymorphismes ne sont associés qu'à un seul phénotype du syndrome métabolique, le désordre glucidique. Les associations avec le syndrome métabolique seraient donc entièrement dues à l'impact important de ces gènes sur la glycémie.

Parmi les gènes associés aux lipoprotéines, les gènes *APOA1*, *LIPC*, *LPL*, *GALNT2*, *ANGPTL4*, *FADS* et *PLTP* sont associés aux concentrations plasmatiques à la fois de HDL-cholestérol, et de TG, ce qui leur confère une grande chance d'être associés au risque de syndrome métabolique puisque les taux de HDL-cholestérol et de TG sont 2 composantes individuelles du syndrome métabolique (du moins selon les critères du NCEP, de l'AHA et de l'IDF). Ainsi, le gène *LIPC* est effectivement associé au risque de syndrome métabolique [McCarthy *et al.* 2003] (Tableau 11). De même, le gène codant la LPL est associé au risque de syndrome métabolique [Komurcu-Bayrak *et al.* 2007]. Notons que dans cette étude, le gène codant la LPL est également associé à la glycémie. Aucune étude d'association sur le risque de syndrome métabolique n'a été décrite pour les gènes *APOA1*, *GALNT2*, *ANGPTL4*, *FADS* et *PLTP* à ce jour. Par ailleurs, le gène *APOA5*, connu pour être associé aux TG, est également associé au risque de syndrome métabolique [Grallert *et al.* 2007; Dallongeville *et al.* 2008]. Notons que dans l'étude de Grallert *et al.* [Grallert *et al.* 2007], le polymorphisme étudié est également associé au taux de HDL-cholestérol. Enfin, plusieurs études ont rapporté une association entre *APOC3* et syndrome métabolique, mais il semble que ce ne soit pas le cas chez les individus de type Caucasiens [Pollex *et al.* 2007].

Parmi les gènes associés à l'hypertension, *NOS3* est également associé au DT2 [Monti *et al.* 2003], ainsi qu'au syndrome métabolique dans plusieurs études [Gonzalez-Sanchez *et al.* 2007; Piccoli *et al.* 2008; Fernandez *et al.* 2004] (Tableau 11). En effet, *NOS3* est non seulement associé à la pression artérielle, mais aussi à l'insulinorésistance, au taux de HDL-cholestérol et au RTH [Monti *et al.* 2003; Gonzalez-Sanchez *et al.* 2007]. De même, le gène *CYP11B2* est également associé au risque de syndrome métabolique et à une hyperglycémie [Russo *et al.* 2007].

D'autres gènes semblent être robustement associés à plusieurs des phénotypes du syndrome métabolique. C'est le cas du gène *HSD11B1* (*hydroxysteroid 11-beta dehydrogenase 1*) associé à la tension artérielle et aux concentrations plasmatiques en LDL-cholestérol et en ApoB [Agarwal *et al.* 2000; White *et al.* 2000; Robitaille *et al.* 2004; Gambineri *et al.* 2006], du gène *ADIPOR2* (*adiponectin receptor 2*) associé au DT2 et aux taux plasmatiques de TG, VLDL-TG et VLDL-cholestérol [Damcott *et al.* 2005; Broedl *et al.* 2006], du gène *RETN* (résistine) associé à l'insulinorésistance, le DT2 et l'obésité [Savage *et al.* 2001; Sentinelli *et al.* 2002; Pizzuti *et al.* 2002; Ma *et al.* 2002], du gène *PARL* (*presenilin associated, rhomboid-like*) localisé dans une région chromosomique liée à l'obésité et au DT2 [Vionnet *et al.* 2000] et associé à l'insulinémie [Walder *et al.* 2005] et du gène codant $TNF\alpha$ associé à l'obésité, l'insulinorésistance et à la pression artérielle [Fernandez-Real *et al.* 1997; Brand *et al.* 2001; Dalziel *et al.* 2002; Sookoian *et al.* 2005]. Cependant, aucun de ces gènes n'a été directement associé au risque de syndrome métabolique. En effet, les études sur *HSD11B1*, *ADIPOR2* et *RETN* sont basées sur les phénotypes (ou facteur d'analyse) et n'ont pas analysé le syndrome métabolique en tant qu'entité. Concernant *PARL* et $TNF\alpha$, l'association avec le risque de syndrome métabolique a été recherchée mais n'a pu être détectée [Powell *et al.* 2008; Meirhaeghe *et al.* 2005b].

En revanche, le gène *ENPP1*, associé à l'insulinorésistance et l'obésité chez les adultes et les enfants, et à la pression artérielle chez les adultes [Santoro *et al.* 2009; Meyre *et al.* 2005; Pizzuti *et al.* 1999] est également associé au risque de syndrome métabolique [Santoro *et al.* 2009; Tasic *et al.* 2007] (Tableau 11). De même, le gène *CAPN10* est associé à l'insulinorésistance, au taux de cholestérol et à la pression artérielle, ainsi qu'au risque de syndrome métabolique [Saez *et al.* 2008]. Enfin, le gène *IL6*, associé à l'insulinorésistance, à l'obésité et à une dyslipidémie, est également associé au risque de syndrome métabolique [Hamid *et al.* 2005; Stephens *et al.* 2007].

De nombreuses études de liaison ont également été entreprises afin d'identifier des gènes associés au syndrome métabolique ou aux phénotypes apparentés [DeWan *et al.* 2001; Arya *et al.* 2002; Duggirala *et al.* 2001; Kissebah *et al.* 2000; Kraja *et al.* 2005; Lehman

et al. 2005; Loos *et al.* 2003; Edwards *et al.* 2008]. Trente-huit QTLs ont été ainsi identifiés et retenus selon Teran-Garcia & Bouchard [Teran-Garcia *et al.* 2007] (Figure 15). On peut remarquer la faible concordance entre les gènes identifiés par cette approche et les gènes identifiés par les études d'association (Tableau 11), ce qui n'est pas surprenant étant donné l'hétérogénéité des phénotypes analysés dans les études de liaison et d'association. Les GWAS sur le syndrome métabolique pourraient permettre une grande avancée dans l'identification des déterminants génétiques de ce syndrome.

Les 11 gènes associés au syndrome métabolique présentés dans le Tableau 11, ont des effets très variés et interviennent dans des voies métaboliques diverses. Les gènes *ADRB2*, *PPARG* et *NOS3* codent des protéines aux effets pléiotropiques. En effet, *ADRB2* code le récepteur aux catécholamines, impliquées dans la régulation de la lipolyse du TA, la distribution des AGL, le métabolisme des lipoprotéines, l'homéostasie glucidique, le tonus vasculaire et la pression artérielle [Insel 1996]. *PPAR γ* contrôle la différenciation adipocytaire et améliore aussi la sensibilité à l'insuline en contrôlant la répartition des graisses et en régulant l'expression d'adipokines. De plus, *PPAR γ* est également impliqué dans la prolifération cellulaire, l'athérosclérose et le système immunitaire [Tontonoz *et al.* 2008]. Le gène *NOS3* code la synthase endothéliale d'oxyde nitrique (eNOS), impliquée dans la production d'oxyde nitrique, une molécule ubiquitaire responsable du maintien des fonctions endothéliales. Mais l'oxyde nitrique est également impliqué dans le métabolisme du glucose en facilitant l'utilisation de celui-ci par les muscles squelettiques [Balon *et al.* 1997; Higaki *et al.* 2001]. Le gène *CYP11B2*, codant l'aldostérone synthase (composante du système rénine-angiotensine) impliquée dans la régulation de la pression artérielle, pourrait aussi jouer un rôle dans l'homéostasie glucidique [Ranade *et al.* 2001; Russo *et al.* 2007]. Pareillement, IL-6 semble être impliqué à la fois dans le développement de l'obésité et de l'insulinorésistance, mais ses mécanismes d'action sont encore mal compris. Ces gènes représentent donc de bons exemples de gènes impliqués dans le développement du syndrome métabolique en touchant plusieurs voies métaboliques simultanément. Au contraire, les autres gènes du Tableau 11 (excepté *FTO* dont les fonctions ne sont pas encore bien connues) ne semblent pas avoir d'effets pléiotropiques. L'association des gènes *LIPC*, *LPL* et *APOA5* avec le syndrome métabolique met en évidence l'importance du métabolisme des lipoprotéines dans la physiopathologie du syndrome. De même, les gènes *ENPP1* et *CAPN10* mettent en exergue le rôle de la signalisation de l'insuline dans le développement de désordres métaboliques. Ainsi, l'altération d'une seule voie métabolique semble pouvoir affecter les autres voies métaboliques et ainsi conduire au développement du syndrome métabolique.

V. Gènes candidats

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs de susceptibilité génétique au syndrome métabolique et des phénotypes associés, nous nous sommes intéressés au gène *FTO* (identifié par les GWAS comme déterminant génétique de l'obésité), aux gènes codant *LXR α* et *LXR β* (*liver X receptor*, récepteurs nucléaires régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique) et *ANGPTL3*, *ANGPTL4* et *ANGPTL6* (*angiopoietin-like proteins*, protéines plasmatiques impliquées dans le métabolisme lipidique).

V.1. *FTO*

L'identification du gène *FTO* (*fused toe*, depuis renommé *fat mass and obesity-associated*) représente une avancée majeure dans l'étude des facteurs de susceptibilité génétique aux maladies métaboliques et a été le premier véritable succès des GWAS. A l'origine, *Fto* a été identifié chez la souris comme un gène faisant partie d'un segment de chromosome (comprenant les gènes *Fto*, *Ftm*, *Fts* et d'autres) dont la délétion est responsable de la fusion des doigts (*Ft*, *fused toe*) [Peters *et al.* 1999]. Les souris hétérozygotes pour cette délétion (*Ft^{t/-}*) présentent, en plus de la fusion des doigts, une hyperplasie du thymus suggérant une altération du programme apoptotique des cellules. Les embryons de souris homozygotes *Ft^{t/-}* meurent à mi-gestation et présentent de graves malformations, notamment au niveau du cerveau, du cœur et des structures cranio-faciales, ainsi qu'un défaut de fermeture du tube neural [Peters *et al.* 1999].

En 2007, deux GWAS ont identifié le gène *FTO* comme facteur de prédisposition au DT2 [Scott *et al.* 2007; 2007b]. En effet, plusieurs SNPs situés dans le 1^{er} intron du gène *FTO*, en particulier le rs9939609, sont associés à une augmentation du risque de DT2 de 25 à 50% dans ces études. Cependant, ces associations ne résistaient pas à l'ajustement sur l'IMC, signifiant que cette prédisposition pour le DT2 était en fait due à l'association avec l'IMC [Frayling *et al.* 2007]. Par la suite, l'association des variants génétiques de *FTO* avec l'IMC a été répliquée dans plusieurs GWAS [Scuteri *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a]. Dans ces études, l'allèle à risque de *FTO* est associé à une augmentation de l'IMC de 0,40-0,66 kg/m² et du risque de surpoids (OR=1,18) et d'obésité (OR=1,32), et ce dès l'enfance. Les individus homozygotes pour l'allèle à risque pèsent en moyenne 3 kg de plus que les individus homozygotes pour l'allèle fréquent [Scuteri *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a]. Étant donné la fréquence élevée de ce SNP (63% des européens

portent l'allèle à risque et 16% sont homozygotes), la part attribuable à ce SNP dans le risque d'obésité est estimée à 20%.

Depuis, plusieurs équipes cherchent à identifier les fonctions de la protéine FTO. Cette protéine a été identifiée comme membre de la famille des dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate [Gerken *et al.* 2007]. Elle catalyse ainsi la déméthylation des acides nucléiques et permettrait la réparation d'ADN et d'ARN alkylés [Duncan *et al.* 2002]. En cohérence avec ces fonctions, la protéine FTO est localisée dans le noyau des cellules [Gerken *et al.* 2007]. L'expression de FTO semble être ubiquitaire, avec une expression plus marquée dans le cerveau et le foie, mais il est aussi exprimé dans le TA, le cœur, les cellules β du pancréas et le muscle squelettique [Scuteri *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a].

Les mécanismes par lesquels FTO régule la balance énergétique sont encore méconnus. Cependant, des études fonctionnelles ont confirmé son rôle dans la physiopathologie de l'obésité chez la souris. D'abord, son expression dans le cerveau, en particulier dans l'hypothalamus, est régulée par la prise alimentaire et le jeûne [Gerken *et al.* 2007]. De plus, les souris knock-out (KO) *Fto*^{-/-}, récemment créées, présentent une réduction du TA et de la masse maigre, attribuable à une augmentation de la dépense énergétique [Fischer *et al.* 2009]. Des études complémentaires sont nécessaires pour établir le lien entre ses fonctions de déméthylation des acides nucléiques et la régulation de la balance énergétique.

V.2. Les liver X receptors

Les *liver X receptors* (LXRs) sont des facteurs de transcription activés par un ligand, appartenant à la famille des récepteurs nucléaires. Ils ont été identifiés en 1994 par les équipes de Apfel *et al* [Apfel *et al.* 1994] et de Song *et al* [Song *et al.* 1994]. Ils sont composés de 4 domaines :

- un domaine AF-1 (*activation function-1*) en N-terminal, dont la fonction d'activation de la transcription est indépendante du ligand,
- un domaine de liaison à l'ADN (DBD) contenant 2 doigts de zinc,
- un domaine hydrophobe de liaison au ligand (LBD) requis pour la dimérisation du récepteur,
- une séquence AF-2 en C-terminal de transactivation dépendante du ligand qui induit la transcription en réponse au ligand.

Deux isoformes ont été décrites : LXR α , codé par le gène *NR1H3* (*nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3*), et LXR β , codé par le gène *NR1H2*. Les LXRs régulent

l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme lipidique et glucidique, l'inflammation et l'immunité.

V.2.a. Fonctions décrites des LXRs

1) Mode d'action

Les LXRs régulent la transcription de certains gènes en se fixant sous la forme d'un hétérodimère avec le récepteur de l'acide 9-cis rétinolique (RXR) sur une séquence spécifique appelée *LXR response element* (LXRE), consistant en un DR-4 (*direct repeat* séparé de 4 nucléotides) et localisée dans le promoteur du gène cible (Figure 16) [Willy *et al.* 1995]. A l'état basal et en l'absence de ligand, l'hétérodimère LXR/RXR réprime activement la transcription du gène en recrutant des complexes co-répresseurs [Repa *et al.* 2000c; Wagner *et al.* 2003]. LXR/RXR est un hétérodimère permissif car il peut être activé soit par un ligand de LXR soit par le ligand de RXR [Willy *et al.* 1995]. La fixation d'un des ligands induit un changement conformationnel de l'hétérodimère entraînant le remplacement des co-répresseurs par des co-activateurs (Figure 16), activant ainsi la transcription du gène cible [Glass *et al.* 2000]. Par ailleurs, il a été décrit un mécanisme alternatif par lequel les LXRs stimulent l'expression génique en se fixant à une séquence CNRE (*cAMP-negative response element*) sous forme de monomères [Tamura *et al.* 2000; Tamura *et al.* 2004; Anderson *et al.* 2003; Morello *et al.* 2005]. Dans cette voie de régulation, encore peu connue, les LXRs serviraient d'intermédiaires transcriptionnels dans la signalisation de l'AMPc.

Les ligands naturels des LXRs sont des dérivés oxydés du cholestérol appelés oxystérols parmi lesquels les activateurs les plus puissants sont le 22(R)-hydroxycholestérol et le 20(S)-hydroxycholestérol (intermédiaires de la synthèse des hormones stéroïdiennes), le 24(S)-hydroxycholestérol (l'oxystérol le plus abondant dans le plasma, produit dans le cerveau), le 24(S),25-époxycholestérol (abondant dans le foie) et le 27-hydroxycholestérol (intermédiaire de la synthèse des acides biliaires) [Lehmann *et al.* 1997; Janowski *et al.* 1996; Forman *et al.* 1997]. Ces ligands se fixent au LBD et stimulent l'activité transcriptionnelle des LXRs à des concentrations physiologiques. La plupart des ligands endogènes qui ont été identifiés jusqu'à maintenant, activent à la fois LXR α et LXR β . Cependant, le 5,6-24(S),25-diépoxycholestérol, les acides biliaires 6 α -hydroxy, et l'acide cholesténoïque sont des ligands relativement sélectifs pour LXR α [Janowski *et al.* 1999; Song *et al.* 2000a; Song *et al.* 2000b]. Par ailleurs, il a été décrit que le D-glucose et la D-glucose-6-phosphatase induisent l'activité transcriptionnelle des LXRs, avec une efficacité comparable à celle des oxystérols [Mitro *et al.* 2007], mais ces observations n'ont pu être confirmées dans une étude récente [Denechaud *et al.* 2008].

En plus de ces ligands endogènes, des ligands synthétiques ont été développés, dont les plus utilisés sont le TO901317 [Schultz *et al.* 2000] et le GW396 [Collins *et al.* 2002], activant tous deux LXR α et LXR β . Il a été décrit un activateur synthétique spécifique de LXR α (Compound A) [Lund *et al.* 2006] et une classe d'activateurs spécifiques de LXR β , les N-acylthiadiazolines [Molteni *et al.* 2007], mais ces derniers ne semblent pas être efficaces *in vivo* [Baranowski 2008]. Ainsi, des activateurs spécifiques de chaque isoforme font encore défaut, ce qui ralentit les recherches sur la détermination des fonctions spécifiques de LXR α et LXR β . Notons enfin qu'il existe également des antagonistes naturels des LXRs, à savoir le géranylgeranylpyrophosphate (intermédiaire de la biosynthèse du cholestérol), les AG insaturés et les 3-sulfates de cholestérol oxydé [Forman *et al.* 1997] [Ou *et al.* 2001; Yoshikawa *et al.* 2002; Song *et al.* 2001].

2) LXRs et métabolisme du cholestérol

Les LXRs jouent un rôle important dans le métabolisme du cholestérol en régulant l'expression de nombreux gènes impliqués à différentes étapes. Tout d'abord, il a été montré que l'activation des LXRs **inhibe l'absorption du cholestérol intestinal** chez la souris [Repa *et al.* 2000c]. Cet effet pourrait être médié par l'activation de l'expression des gènes codant les transporteurs ABCG5 et ABCG8 [Repa *et al.* 2002], mais surtout par l'inhibition de l'expression du gène de Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1), transporteur exprimé dans les entérocytes et nécessaire à l'absorption du cholestérol du bol alimentaire [Altmann *et al.* 2004; Duval *et al.* 2006]. De plus, les LXRs **inhibent la synthèse de cholestérol hépatique**. En effet, il a été décrit chez les souris KO LXR $\alpha^{-/-}$ ou LXR $\beta^{-/-}$ une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la synthèse du cholestérol dans le foie, tels que SREBP2, l'HMG-CoA synthase et réductase, la farnésyl diphosphate synthase et la squalène synthétase [Peet *et al.* 1998; Alberti *et al.* 2001]. Les LXRs **favorisent également l'excrétion du cholestérol du foie** en stimulant l'expression des transporteurs ABCG5 et ABCG8 qui permettent l'élimination du cholestérol par les fèces (soit sous forme libre, soit sous forme d'acides biliaires) [Yu *et al.* 2003; Repa *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002]. LXR α active l'expression de CYP7A1 (cytochrome P450 7 A1), enzyme clé de la conversion du cholestérol en acides biliaires, mais uniquement chez la souris [Lehmann *et al.* 1997; Chiang *et al.* 2001].

Le rôle des LXRs dans **le transport inverse du cholestérol** a beaucoup été étudié. Dans les macrophages, l'activation des LXRs augmente la captation sélective du cholestérol des HDLs, *via* l'induction de l'expression des gènes ApoE, LPL et de la Cavéoline-1 [Bultel *et al.* 2008]. De plus, les LXRs stimulent la mobilisation du cholestérol intracellulaire en activant l'expression des gènes Niemann Pick C (*NPC1* et *NPC2*) permettant le transfert de

cholestérol des pools intracellulaires vers la membrane plasmique (Figure 17) [Rigamonti *et al.* 2005]. Les LXRs stimulent l'expression des transporteurs ABCA1 et ABCG1 permettant l'efflux du cholestérol vers les HDLs [Repa *et al.* 2000c; Costet *et al.* 2000; Fayos *et al.* 1994]. Ils activent également l'expression du cluster de gènes ApoE/C-I/C-IV/C-II et apoA-IV pouvant servir d'accepteurs extracellulaires de cholestérol [Laffitte *et al.* 2001b; Mak *et al.* 2002; Liang *et al.* 2004a]. De plus, les LXRs participent au remodelage des particules lipoprotéiques en induisant l'expression de la PLTP [Cao *et al.* 2002; Laffitte *et al.* 2003b], de la CETP [Luo *et al.* 2000], et de la LPL [Zhang *et al.* 2001]. En cohérence avec ces effets des LXRs sur le transport inverse du cholestérol, il a été observé à maintes reprises que l'activation des LXRs par leurs agonistes synthétiques augmente la concentration plasmatique de HDL-cholestérol chez la souris et le rat [Collins *et al.* 2002; Miao *et al.* 2004; Beyer *et al.* 2004; Sato *et al.* 2008].

Enfin, il a récemment été décrit que l'activation des LXRs inhibe la captation des LDL par le LDLR dans différents types cellulaires (macrophages, hépatocytes, rein, intestin) [Zelcer *et al.* 2009]. L'activation des LXRs induit l'expression du gène *Idol* (*inducible degrader of the LDLR*, aussi appelé *Mir* ou *MyIip*) codant une ubiquitine ligase qui provoque la dégradation du LDLR par ubiquitinylation de son domaine cytoplasmique.

3) LXRs, inflammation et athérosclérose

L'activation des LXRs par leurs ligands synthétiques empêche la production de médiateurs de l'inflammation, tels que l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS), la cyclo-oxygénase 2 (COX-2), et l'IL-6, dans des macrophages soumis à une infection bactérienne ou à du lipopolysaccharide [Joseph *et al.* 2003]. Cet effet est en fait médié par la suppression de la voie de signalisation de NFκB. Cet effet anti-inflammatoire ainsi que leur rôle dans le transport inverse du cholestérol confèrent aux LXRs des **propriétés anti-athérosclérotiques**. De plus, l'activation des LXRs entraîne une inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses [Blaschke *et al.* 2004] et une réduction de la production de métalloprotéase-9 [Castrillo *et al.* 2003], limitant ainsi le développement de la plaque d'athérome et augmentant sa stabilité. Il a été ainsi observé dans plusieurs modèles animaux d'athérosclérose que l'activation des LXRs réduit la taille des plaques d'athérome [Joseph *et al.* 2002b; Terasaka *et al.* 2003; Levin *et al.* 2005].

4) LXRs et lipogenèse hépatique

L'activation des LXRs dans le foie augmente l'expression de gènes impliqués dans la **biosynthèse des AG** ainsi que la concentration de TG plasmatique [Schultz *et al.* 2000] [Grefhorst *et al.* 2002]. Cet effet a été attribué à LXRα car, contrairement aux souris KO LXRα^{-/-} ou les double KO LXRα^{-/-}β^{-/-}, les souris KO LXRβ^{-/-} ne présentent pas d'altération de

l'expression des gènes lipogéniques [Peet *et al.* 1998; Schultz *et al.* 2000; Schuster *et al.* 2002; Alberti *et al.* 2001]. LXR α induit l'expression du maître d'orchestre de la lipogenèse, SREBP1c [Eberle *et al.* 2004], facteur de transcription régulant l'expression des gènes lipogéniques, à savoir, l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), FAS et SCD (Figure 18) [Repa *et al.* 2000a; Peet *et al.* 1998]. L'expression de ces 3 gènes lipogéniques est activée non seulement par SREBP1c mais aussi directement par LXR α [Chu *et al.* 2006; Joseph *et al.* 2002a; Talukdar *et al.* 2006]. De plus, les LXRs activent l'expression de ChREBP (*carbohydrate responsive element binding protein*), facteur de transcription sensible au glucose stimulant l'expression des gènes lipogéniques et qui favorise ainsi la conversion de carbohydrates en lipides [Cha *et al.* 2007]. Par ailleurs, les LXRs augmentent la sécrétion de VLDL hépatique certainement *via* l'augmentation de l'expression de la PLTP [Grefhorst *et al.* 2002; Cao *et al.* 2002] et d'ANGPTL3 [Inaba *et al.* 2003]. LXR α active également l'expression de CD36 permettant l'entrée d'AG dans le foie [Zhou *et al.* 2008]. De manière intéressante, il a été décrit que l'insuline stimule l'expression de LXR α dans des hépatocytes de rat [Eberle *et al.* 2004], et que LXR α pourrait être impliqué dans l'induction de l'expression de SREBP1c par l'insuline [Chen *et al.* 2004]. Notons que l'activation des LXRs provoque aussi l'accumulation de lipides dans d'autres tissus que le foie, à savoir dans les cellules musculaires lisses [Cozzone *et al.* 2006] et les cellules β du pancréas [Choe *et al.* 2007].

5) LXRs et métabolisme du tissu adipeux

Le rôle des LXRs dans la régulation de la différenciation adipocytaire et le stockage des TG est controversé. Il semblerait que l'activation des LXRs favorise l'accumulation de lipides dans les adipocytes, peut-être en stimulant la captation des AG grâce à l'induction de l'expression de CD36 et FABP [Juvet *et al.* 2003], ou peut-être en stimulant la synthèse d'AG *de novo* [Darimont *et al.* 2006]. LXR α est un gène cible de PPAR γ , le chef d'orchestre de la différenciation adipocytaire [Chawla *et al.* 2001]. Seo *et al.* ont montré que les LXRs, et notamment LXR α , stimulent la différenciation adipocytaire dans les adipocytes de souris 3T3-L1 [Seo *et al.* 2004]. Au contraire, Hummasti *et al.* n'ont pas détecté d'effet de l'activation des LXRs sur la différenciation adipocytaire dans ces cellules [Hummasti *et al.* 2004]. Le rôle des LXRs dans la différenciation adipocytaire reste donc à éclaircir. Notons cependant que les souris double KO LXR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$ présentent une réduction de la masse de TA [Laffitte *et al.* 2003a] et sont résistantes à l'obésité induite par un régime hyperlipidique [Kalaany *et al.* 2005].

6) LXR α et métabolisme du glucose

Plusieurs études témoignent de l'implication des LXR α dans l'homéostasie glucidique. En effet, l'administration des agonistes synthétiques de LXR **diminue la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline** dans plusieurs modèles de rongeurs diabétiques ou insulino-résistants [Cao *et al.* 2003; Laffitte *et al.* 2003a; Commerford *et al.* 2007]. En fait, les LXR α inhibent indirectement l'expression des gènes codant les enzymes clés de la gluconéogenèse, à savoir la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase) [Stulnig *et al.* 2002b; Grempler *et al.* 2005] (Figure 19). Cet effet pourrait être médié par une inhibition de PPAR γ coactivator 1 α (PGC1 α), régulateur clé de la production de glucose hépatique [Laffitte *et al.* 2003a; Commerford *et al.* 2007], ou par SREBP1c, qui inhiberait l'expression de la PEPCK [Chakravarty *et al.*], ou par la voie de signalisation des glucocorticoïdes, dont l'expression du récepteur aux glucocorticoïdes et de la 11 β -HSD1 (enzyme de conversion de la cortisone en forme active) est réduite après addition de TO901317 [Liu *et al.* 2006; Stulnig *et al.* 2002b; Stulnig *et al.* 2002a]. Cependant, le rôle des LXR α dans le métabolisme du glucose fait débat puisque, chez des animaux non diabétiques, l'activation des LXR α n'affecte pas la glycémie [Cao *et al.* 2003; Laffitte *et al.* 2003a]. De plus, les souris KO LXR α ^{-/-} ou LXR β ^{-/-} présentent une sensibilité normale à l'insuline [Gerin *et al.* 2005]. Enfin, Grefhorst *et al.* ont décrit une absence d'effet du GW3965 sur la sensibilité à l'insuline et la production de glucose chez les souris *ob/ob* [Grefhorst *et al.* 2005].

Dans les tissus périphériques, il a été montré que les LXR α activent directement l'expression de GLUT4 dans les adipocytes et les cellules musculaires lisses, **facilitant ainsi la captation de glucose** [Grefhorst *et al.* 2005; Laffitte *et al.* 2003a; Commerford *et al.* 2007; Dalen *et al.* 2003; Kase *et al.* 2007; Kase *et al.* 2005] (Figure 19). De plus, les LXR α , et en particulier LXR β , pourraient stimuler la sécrétion d'insuline *in vitro*, en stimulant l'expression de GLUT2, la glucokinase et la pyruvate carboxylase [Efanov *et al.* 2004; Zitzer *et al.* 2006], mais cet effet reste controversé *in vivo* [Grefhorst *et al.* 2005; Loffler *et al.* 2006; Cao *et al.* 2003; Liu *et al.* 2006; Commerford *et al.* 2007]. Notons qu'à long terme, l'activation des LXR α dans le pancréas conduit à une surcharge lipidique induisant un effet lipotoxique et pourrait même contribuer aux dysfonctions pancréatiques observées dans le DT2 [Choe *et al.* 2007]. Le bénéfice des agonistes synthétiques des LXR α sur l'homéostasie glucidique serait donc limité.

7) Autres fonctions des LXR α

Chez la souris, il a été montré que les LXR α , et en particulier LXR α , activent directement l'expression du gène de la rénine dans le rein, entraînant une augmentation de

l'activité de la rénine dans le plasma, et que LXR α est requis dans le **contrôle adrénérgique du RAAS** [Tamura *et al.* 2000; Tamura *et al.* 2004; Morello *et al.* 2005]. En revanche, chez le rat, l'activation des LXRs par le GW3965 n'a pas d'impact sur l'activité de la rénine [Leik *et al.* 2007].

Les LXRs stimulent également directement l'expression du VEGF, suggérant un rôle des LXRs dans la **biologie vasculaire** [Walczak *et al.* 2004].

Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'activation des LXRs dans le cerveau augmente l'expression de ses gènes cibles classiques (ABCA1, ABCG1 et ApoE) suggérant que les LXRs seraient essentiels pour maintenir **l'homéostasie du cholestérol dans le cerveau** [Fujiyoshi *et al.* 2007; Liang *et al.* 2004b; Whitney *et al.* 2002]. De plus, des études *in vitro* ont révélé un **effet anti-amyloïdogénique** des LXRs [Koldamova *et al.* 2003; Koldamova *et al.* 2005; Brown, III *et al.* 2004; Sun *et al.* 2003]. Les LXRs pourraient donc être impliqués dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Enfin, les LXRs seraient impliqués dans d'autres fonctions, telles que la fonction de reproduction, la stéroïdogenèse, la prolifération et la différenciation des kératinocytes et l'inhibition de tumeurs cancéreuses [Jamroz-Wisniewska *et al.* 2007].

V.2.b. Différences entre LXR α et LXR β

Les deux isoformes LXR α et LXR β sont hautement apparentées : elles partagent 63% d'identité au niveau de leur ADNc et 78% d'identité au niveau de leurs domaines de liaison à l'ADN et au ligand [Alberti *et al.* 2000]. Cependant, leurs fonctions ne sont pas entièrement redondantes et ceci semble s'expliquer d'abord par la différence entre leur profil d'expression. En effet, l'expression de LXR α est limitée au foie, tissu adipeux, rein, intestin, rate, poumons et macrophages où elle est exprimée de façon abondante, tandis que LXR β semble avoir une expression ubiquitaire et plus modérée [Apfel *et al.* 1994; Song *et al.* 1994; Auboeuf *et al.* 1997; Willy *et al.* 1995; Repa *et al.* 2000b]. Cette différence d'expression peut s'expliquer en partie par l'intervention de facteurs de transcription différents. Plusieurs études ont montré que LXR α , et non LXR β , est un gène cible des PPARs [Tobin *et al.* 2000; Chinetti *et al.* 2001]. En effet, les promoteurs des gènes codant LXR α chez la souris et l'homme contiennent un élément de réponse aux PPAR (un PPRE) [Tobin *et al.* 2000; Laffitte *et al.* 2001a]. Ainsi, l'activation de PPAR α ou de PPAR γ dans le foie stimule l'expression de LXR α , et non LXR β [Tobin *et al.* 2000]. Il en est de même dans les macrophages chez l'homme et la souris [Chinetti *et al.* 2001]. PPAR γ active aussi l'expression de LXR α dans le tissu adipeux et le rein [Juvet *et al.* 2003; Hammarstedt *et al.* 2005; Wu *et al.* 2004]. De plus, l'expression de LXR α est soumise à une boucle d'auto-régulation : le promoteur du gène humain LXR α contient 3 LXRE fonctionnels pouvant

être reconnu par LXR α et LXR β [Li *et al.* 2002]. Ainsi, il a été montré que l'activation des LXRs augmente l'expression de LXR α , et non de LXR β , dans les macrophages, les adipocytes et les hépatocytes [Whitney *et al.* 2001].

De plus, LXR α et LXR β semblent activer l'expression de gènes différents. Une analyse transcriptomique a comparé les profils d'expression génique dans le TA entre souris KO LXR $\alpha^{-/-}$ et LXR $\beta^{-/-}$ [Steffensen *et al.* 2003]. Parmi les gènes régulés par les LXRs, les auteurs ont identifié des gènes communs régulés dans la même direction, des gènes régulés par une isoforme mais pas par l'autre, et des gènes régulés par les 2 isoformes mais dans des sens opposés [Steffensen *et al.* 2003]. Ces résultats suggèrent que les LXRs sont impliqués dans des voies de régulation communes et dans des voies spécifiques de chaque isoforme.

L'étude des souris KO LXR $\alpha^{-/-}$, LXR $\beta^{-/-}$ et double KO LXR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$ permet de distinguer les fonctions spécifiques de chaque isoforme. Quand les souris ont une alimentation standard, les souris LXR $\alpha^{-/-}$ présentent une légère réduction de la masse grasse autour des gonades, avec une réduction de la taille des adipocytes [Gerin *et al.* 2005], ainsi qu'une altération du profil lipidique par rapport aux souris sauvages : la concentration plasmatique du LDL-cholestérol augmente tandis que celle du HDL-cholestérol diminue et le taux de TG dans le foie est légèrement diminué [Schuster *et al.* 2002]. Ces souris présentent une tolérance au glucose similaire à celle des souris sauvages [Schuster *et al.* 2002]. Par contre, quand ces souris sont sous régime hypercholestérolémique, elles présentent une accumulation marquée de cholestérol estérifié dans le foie, et ce, dès 8 jours de régime [Peet *et al.* 1998; Alberti *et al.* 2001]. En fait, en l'absence de LXR α , les souris perdent leur capacité à convertir l'excès de cholestérol en acide biliaire, réaction catalysée par l'enzyme CYP7A1 (gène cible de LXR α , uniquement chez la souris) [Peet *et al.* 1998]. Ces souris présentent également des taux plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol augmentés, et de HDL-cholestérol diminués, ainsi qu'une augmentation des transaminases, marqueurs d'une stéatose hépatique [Peet *et al.* 1998]. Les souris KO LXR $\beta^{-/-}$ quant à elles, sous alimentation standard, présentent une réduction de la masse grasse entourant les gonades et une diminution des taux plasmatiques et hépatiques des TG, comme les souris LXR $\alpha^{-/-}$, mais également une intolérance au glucose due à une altération de la sécrétion de l'insuline [Gerin *et al.* 2005; Schuster *et al.* 2002]. Sous régime hypercholestérolémique, ces souris conservent leur capacité à éliminer l'excès de cholestérol par conversion en acide biliaire et ne développent donc pas de stéatose hépatique, contrairement aux souris LXR $\alpha^{-/-}$ [Gerin *et al.* 2005; Alberti *et al.* 2001]. Par ailleurs, sous régime hyperlipidique, les souris LXR $\beta^{-/-}$ présentent une réduction de la masse grasse par rapport aux souris sauvages soumises aussi à ce régime [Gerin *et al.* 2005]. Enfin, les souris double KO LXR $\alpha^{-/-}\beta^{-/-}$

présentent, sous alimentation standard, une réduction de la masse grasse entourant les gonades et de la taille des adipocytes, des taux de TG diminués dans le foie et le sérum (comme $LXR\beta^{-/-}$), ainsi que des concentrations plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol augmentées et de HDL-cholestérol diminuées (comme $LXR\alpha^{-/-}$) par rapport aux souris sauvages [Gerin *et al.* 2005; Juvet *et al.* 2003; Kalaany *et al.* 2005]. Ces souris sont résistantes à l'obésité sous régime hypercholestérolémique, mais pas sous régime hyperlipidique [Gerin *et al.* 2005].

En résumé, si l'on essaie d'attribuer les fonctions des LXRs à chaque isoforme, de nombreuses études s'accordent pour affirmer **que la lipogenèse hépatique est stimulée par $LXR\alpha$ mais pas par $LXR\beta$** [Alberti *et al.* 2001; Quinet *et al.* 2006]. Ensuite, **le transport inverse du cholestérol semble impliquer les 2 isoformes** [Lund *et al.* 2006; Quinet *et al.* 2006]. Même s'il a été montré que $LXR\alpha$ et non $LXR\beta$, est requise pour l'induction de l'expression de la LPL, permettant ainsi l'incorporation du cholestérol dans le foie [Zhang *et al.* 2001], il a été aussi décrit que l'activation de $LXR\beta$ chez les souris double KO $LXR\alpha^{-/-}ApoE^{-/-}$ induit le transport inverse du cholestérol et améliore le phénotype de ces souris en réduisant le développement de l'athérosclérose [Bradley *et al.* 2007]. Concernant le métabolisme du TA, il a été décrit que $LXR\beta$ est requis dans le processus d'augmentation de la taille des adipocytes se produisant avec l'âge ou par gavage [Gerin *et al.* 2005]. Cependant, le fait que l'expression de $LXR\alpha$ dans les adipocytes augmente sous l'action de $PPAR\gamma$ et que $LXR\alpha$ régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme des AG (FAS, FABP, CD36) suggère un rôle non négligeable de cette isoforme dans le métabolisme du TA [Juvet *et al.* 2003]. Enfin, **les 2 isoformes semblent être impliquées dans l'homéostasie glucidique** à différents niveaux : $LXR\alpha$ mais pas $LXR\beta$ est nécessaire à l'induction de GLUT4 dans le TA [Dalen *et al.* 2003], tandis que $LXR\beta$ semble requis dans le pancréas pour assurer les fonctions des cellules β et la sécrétion d'insuline [Gerin *et al.* 2005].

V.2.c. Etudes génétiques de $LXR\alpha$

Depuis 2006, plusieurs études ont analysé l'impact de la variabilité génétique de $LXR\alpha$ (*NR1H3*) sur divers phénotypes. Il a été décrit que le SNP rs2279238 (Ser99Ser) est associé à une diminution de l'IMC chez 559 femmes [Dahlman *et al.* 2006]. Les SNPs rs12221497 (-115G>A par rapport à l'ATG), rs3758674 (-1830T>C) et -840C>A (non référencé) sont associés à une augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol total et des TG chez 732 hommes [Robitaille *et al.* 2007]. Notons que les auteurs de cette étude ont détecté une interaction entre ces SNPs et la contenance en cholestérol de l'alimentation des individus : la consommation de cholestérol n'est pas corrélée aux taux

plasmatiques de cholestérol total et de LDL-cholestérol, sauf chez les individus porteurs de l'allèle -115A pour lesquels les taux de cholestérol total et de LDL-cholestérol sont plus élevés si la consommation de cholestérol est élevée [Robitaille *et al.* 2007]. L'impact de la variabilité génétique du gène LXR α sur le profil lipidique a été confirmé dans une récente GWAS réalisée sur 4763 individus : les SNPs rs2167079 (situé 10 kpb en 5' du gène) et rs7120118 (intron 6) sont associés à une augmentation de la concentration plasmatique de HDL-cholestérol [Sabatti *et al.* 2009]. Enfin, il a été décrit qu'un haplotype de 4 SNPs contenant l'allèle muté du rs11039149 (-6G>A) est associé à une réduction de 22% du risque de mortalité, notamment par maladie infectieuse (-69%), chez 563 individus âgés de plus de 85 ans [Mooijaart *et al.* 2007].

V.2.d. Etudes génétiques de LXR β

Le gène *NR1H2* codant LXR β est situé dans un locus identifié par plusieurs études de liaison comme étant associé au risque de maladie d'Alzheimer [Blacker *et al.* 2003; Kehoe *et al.* 1999]. C'est pourquoi, plusieurs études d'association ont analysé l'impact de SNPs du gène LXR β sur le risque de maladie d'Alzheimer. Le SNP rs2695121 a ainsi été associé au risque de maladie d'Alzheimer dans un échantillon de 1327 individus apparentés [Adighibe *et al.* 2006], mais cette association n'a pas été retrouvée dans une autre étude cas-témoins comprenant 414 cas et 447 témoins [Rodriguez-Rodriguez *et al.* 2008a]. En fait, deux autres études ont montré que plusieurs SNPs de LXR β , dont le rs2695121, sont associés au risque de maladie d'Alzheimer seulement s'ils sont combinés à d'autres SNPs des gènes CD14 [Rodriguez-Rodriguez *et al.* 2008b] ou HO-1 (hème oxygénase 1) [Infante *et al.* 2008]. L'association des variants génétiques avec le risque de maladie d'Alzheimer semble donc dépendre du fond génétique des individus. Par ailleurs, le SNP rs2695121 a été associé à une augmentation de l'IMC et du risque d'obésité chez 559 femmes [Dahlman *et al.* 2006]. Egalement dans cette étude, le SNP rs35463555 est associé à une diminution du taux d'insuline plasmatique et à une diminution du risque d'obésité.

V.3. Les angiopoïétin-like proteins

Les angiopoïétines et les *angiopoïétin-like proteins* (ANGPTLs) constituent un ensemble d'une dizaine de protéines partageant des similitudes structurales : une séquence signal à l'extrémité N-terminale, un domaine « *coiled-coil* » et un domaine *fibrinogen-like*. Les ANGPTLs se distinguent des angiopoïétines par leur incapacité à se lier au récepteur TIE2 (récepteur à tyrosine kinase ayant des domaines homologues avec l'immunoglobuline et le facteur de croissance épithélial), récepteur impliqué dans l'angiogenèse, la maturation des

vaisseaux sanguins et l'intégrité de l'endothélium vasculaire [Davis *et al.* 1996; Maisonpierre *et al.* 1997]. Les ANGPTLs sont des protéines sécrétées dans le sang et agissent comme des signaux endocriniens sur leur tissu cible. Leur récepteur est encore inconnu à ce jour, et elles sont considérées comme des ligands orphelins. En fait, la famille des ANGPTLs a été découverte il y a 10 ans à peine [Kim *et al.* 1999], c'est pourquoi leurs fonctions et modes d'action ne sont pas encore bien connus. Aujourd'hui, 7 ANGPTLs (nommées ANGPTL1 à 7) ont été identifiées [Hato *et al.* 2008]. Contrairement à ce que suggère leur nom, le lien entre ANGPTLs et angiogenèse est loin d'être évident. En revanche, de plus en plus d'études mettent en évidence le rôle des ANGPTLs, et en particulier d'ANGPTL-3, -4 et -6 dans la régulation du métabolisme énergétique.

V.3.a. ANGPTL3

1) Expression

L'expression d'ANGPTL3 semble être limitée au foie chez la souris comme chez l'homme [Romeo *et al.* 2009; Conklin *et al.* 1999]. Son expression y est régulée par les LXRs : l'administration du TO901317 augmente nettement la quantité d'ARNm d'ANGPTL3 dans le foie de souris et dans les cellules d'hépatome humain HepG2 [Inaba *et al.* 2003; Kaplan *et al.* 2003]. En effet, *ANGPTL3* est un gène cible des LXRs, et est directement régulé par ceux-ci *via* un LXRE fonctionnel situé dans le promoteur d'*ANGPTL3* en -150/-135 par rapport au site d'initiation de la transcription (TSS) [Kaplan *et al.* 2003]. Chez la souris, l'administration du TO901317 (pendant 2 jours) entraîne une hypertriglycéridémie, effet qui n'est pas observé chez des souris KO *Angptl3*^{-/-}, malgré l'induction de nombreux gènes impliqués dans la lipogenèse [Inaba *et al.* 2003]. C'est pourquoi, il semble que l'effet hypertriglycéridémique des ligands des LXRs serait en fait médié par *Angptl3*. Par ailleurs, il a été décrit que l'expression d'*Angptl3* ainsi que son taux plasmatique sont augmentés dans un modèle de souris diabétique, et que son expression diminue en réponse à un traitement à la leptine ou à l'insuline, suggérant un rôle d'*Angptl3* dans le diabète [Inaba *et al.* 2003; Kaplan *et al.* 2003]. Enfin, l'expression d'*Angptl3* est négativement et indirectement régulée par le récepteur β à l'hormone thyroïdienne (TR β), après son activation par l'hormone thyroïdienne (T3) [Fugier *et al.* 2006]. *Angptl3* pourrait être alors le médiateur de l'effet hypotriglycéridémiant de TR β .

2) Fonctions décrites

Le premier lien entre ANGPTL3 et le **métabolisme lipidique** fut établi en 2002 par Koishi *et al.*, qui localisa la mutation génétique des souris KK/San dans le gène *Angptl3* [Koishi *et al.* 2002]. Cette lignée mutante de souris obèses KK présente des concentrations

plasmatiques en TG et AGL remarquablement faibles. De plus, la surexpression ou l'injection intraveineuse d'Angptl3 entraîne une augmentation des taux plasmatiques de TG, d'AGL et de cholestérol non seulement dans les souris KK/San mais aussi dans les souris sauvages C57/BL6. Cette augmentation du taux de TG a été attribuée à une suppression de la clairance des VLDL par une **inhibition de la LPL** (Figure 20) [Shimizugawa *et al.* 2002; Ando *et al.* 2003]. Il semble que la région en position N-terminale (acides aminés 17-165) contenant le domaine *coiled-coil*, région apparaissant après clivage protéolytique, soit responsable de l'inhibition de la LPL [Ono *et al.* 2003].

L'augmentation du taux plasmatique d'AGL induite par Angptl3 est inattendue car une inhibition de la LPL entraîne plutôt une diminution du taux d'AGL. En fait, Angptl3 **stimule la lipolyse du TA** en se fixant directement aux adipocytes (Figure 20) [Shimamura *et al.* 2003]. Le mécanisme cellulaire qui sous-tend cette stimulation est encore inconnu mais met certainement en œuvre un récepteur extracellulaire qui reste à identifier.

Il a également été montré que Angptl3 régule les concentrations plasmatiques de HDL-cholestérol en **inhibant la lipase endothéliale** grâce à un site potentiel de liaison à l'héparine situé en N-terminal (Figure 20) [Shimamura *et al.* 2007]. Le taux d'ANGPTL3 plasmatique est en effet corrélé à celui du HDL-cholestérol chez l'homme [Shimamura *et al.* 2007], suggérant qu'ANGPTL3 pourrait avoir un effet athéroprotecteur. Cependant, il a été décrit que des souris KO ApoE^{-/-} ayant une mutation additionnelle sur le gène *Angptl3* ne présentent pas d'hypertriglycémie et d'athérosclérose, contrairement aux souris KO ApoE^{-/-}, suggérant un rôle délétère d'Angptl3 sur l'athérosclérose [Ando *et al.* 2003]. Le fait que le taux d'ANGPTL3 soit corrélé à l'épaisseur des couches intima et media de l'artère carotidienne chez des individus sains confirme cet effet délétère [Hatsuda *et al.* 2007].

Enfin, ANGPTL3 exerce des fonctions **pro-angiogéniques** en induisant la formation de vaisseaux sanguins [Camenisch *et al.* 2002], et est capable d'accroître le pool de cellules souches hématopoïétiques dans des cultures *ex vivo* (Figure 20) [Zhang *et al.* 2006a].

3) Etudes génétiques

La première étude génétique d'ANGPTL3 parut en 2004. Après avoir identifié chez la souris un *locus* de susceptibilité à l'athérosclérose comprenant *Angptl3*, Korstanje *et al* ont détecté une association entre 2 SNPs (rs1748199 et rs2366636) et la largeur des plaques d'athérome chez des patients ayant eu un infarctus (n=229) [Korstanje *et al.* 2004]. De plus, chez les témoins (n=369), ces SNPs étaient associés à une augmentation des taux de TG et de VLDL. En 2008, les GWAS ont confirmé l'association de variants génétiques d'ANGPTL3 avec le taux de TG. Willer *et al* ont trouvé que le SNP rs1748195 est associé à une augmentation du taux de TG chez 18243 individus [Willer *et al.* 2008]. Kathiresan *et al* ont détecté une association entre une baisse du taux de TG et le SNP rs12130333 chez 8277

individus [Kathiresan *et al.* 2008] et le SNP rs10889353 chez 19834 individus [Kathiresan *et al.* 2009]. Wang *et al.* ont analysé l'impact du SNP rs12130333 sur le risque d'hypertriglycéridémie sévère mais n'ont pas trouvé d'association significative [Wang *et al.* 2008]. Enfin, Romeo *et al.* ont séquencé la région codante d'*ANGPTL3* chez 3516 individus et ont montré que les variants génétiques d'*ANGPTL3* étaient plus nombreux chez les individus appartenant au quartile le plus bas du taux plasmatique de TG, ainsi que chez les individus appartenant au quartile le plus bas de la glycémie [Romeo *et al.* 2009]. Les allèles mutés de ces variants rares associés au taux de TG semblent altérer la production ou la sécrétion d'*ANGPTL3* ou son activité inhibitrice de la LPL [Romeo *et al.* 2009].

V.3.b. *ANGPTL4*

1) Expression

ANGPTL4 est une protéine de 50 kDa exprimée dans de nombreux tissus. Chez l'homme, elle est exprimée majoritairement dans le foie mais aussi dans le tissu adipeux (c'est une adipokine), le cœur, le cerveau, la thyroïde, les reins, l'intestin et le placenta [Yoon *et al.* 2000; Romeo *et al.* 2009; Kersten *et al.* 2009]. L'expression d'*ANGPTL4* varie en fonction de l'état nutritionnel : en effet son expression est induite lors du jeûne – ce qui lui a valu le nom de *fasting-induced adipose factor* (FIAF) [Kersten *et al.* 2000]. De plus, *ANGPTL4* est un gène cible des PPARs : son expression est régulée par PPAR α dans le foie, par PPAR γ dans le TA – c'est pourquoi elle a aussi été nommée *PPAR γ angiopoietin-related* (PGAR) [Yoon *et al.* 2000] – et par PPAR β/δ dans le TA, le foie et les kératinocytes [Schmuth *et al.* 2004; Akiyama *et al.* 2004]. Enfin, l'expression d'*Angptl4* est fortement induite en cas d'hypoxie, effet médié par le facteur de transcription Hif-1 α (*hypoxia inducible factor 1 α*) [Le Jan *et al.* 2003; Fink *et al.* 2004; Ge *et al.* 2005].

ANGPTL4 subit un clivage protéolytique donnant naissance à une forme longue et une forme tronquée de la protéine [Mandard *et al.* 2006]. Ces 2 formes peuvent être détectées dans le plasma chez l'homme, et leur concentration présente une grande variabilité inter-individuelle. Chez un individu donné, la concentration plasmatique d'*ANGPTL4* est assez constante et reste stable durant la journée. Cependant, elle augmente significativement après un long jeûne, une restriction calorique sévère ou un exercice physique d'endurance [Kersten *et al.* 2009].

2) Fonctions décrites

ANGPTL3 et *ANGPTL4* partagent une identité de séquence, et ont ainsi des fonctions communes. Comme *Angptl3*, l'injection de la protéine *Angptl4* ou sa surexpression

chez la souris provoque une augmentation du taux plasmatique de TG (plus importante que celle due à ANGPTL3) [Yoshida *et al.* 2002; Ge *et al.* 2005]. ANGPTL4 **inhibe l'activité de la LPL** et réduit ainsi la clairance des VLDL (Figure 21) [Yoshida *et al.* 2002]. Plusieurs modèles de souris transgéniques surexprimant Angptl4 dans le cœur ou le foie, ou de souris KO *Angptl4*^{-/-}, ont confirmé cet effet inhibiteur sur la clairance des TG plasmatiques *via* la LPL [Koster *et al.* 2005; Yu *et al.* 2005]. Comme pour ANGPTL3, le domaine *coiled-coil* joue un rôle dans l'inhibition de la LPL car il convertit les dimères de LPL fixés aux cellules endothéliales en monomères circulant inactifs [Ge *et al.* 2004; Sukonina *et al.* 2006]. L'injection intraveineuse d'un anticorps neutralisant Angptl4 diminue la concentration plasmatique de TG dans différents modèles de souris obèses ou hypertriglycéridémiques, suggérant que Angptl4 pourrait être utilisée comme cible thérapeutique contre l'hypertriglycéridémie [Desai *et al.* 2007].

Comme Angptl3, Angptl4 **induit la lipolyse du TA** (Figure 21) [Yoshida *et al.* 2002]. De plus, des souris transgéniques surexprimant modérément Angptl4 dans certains tissus (TA, muscle squelettique, cœur) présentent une réduction de l'adiposité (diminution de leur poids, de la masse de TA blanc et de la taille des adipocytes) [Mandard *et al.* 2006]. En fait, sa surexpression dans le TA est associée à une augmentation de la lipolyse due à l'induction de l'expression de l'ATGL, ainsi qu'à une augmentation de l'oxydation des AG et une diminution de la synthèse des TG, suggérant que Angptl4 favorise l'utilisation des AG et empêche le stockage des TG.

Il a également été décrit chez ces souris une augmentation des taux plasmatiques de cholestérol total et de HDL-cholestérol [Mandard *et al.* 2006]. En fait, Angptl4 se fixe aux lipoprotéines HDL et LDL chez la souris, et aux HDL chez l'homme. Angptl4 influence aussi le métabolisme du cholestérol au niveau du foie en inhibant la LPL et la lipase hépatique, empêchant ainsi l'incorporation du cholestérol dans le foie et entraînant une **augmentation de la synthèse de cholestérol hépatique** (Figure 21) [Lichtenstein *et al.* 2007].

Angptl4 exerce également un rôle dans **l'absorption intestinale des TG** en interaction avec la flore intestinale (microbiote) (Figure 21). Les souris axéniques (sans germes) sont résistantes à l'obésité induite par un régime hypercalorique [Backhed *et al.* 2004]. L'introduction du microbiote chez ces souris entraîne une augmentation de la masse grasse et de l'insulinorésistance. Seulement, Backhed *et al.* ont observé que ces effets ne pouvaient avoir lieu qu'en l'absence d'Angptl4 [Backhed *et al.* 2004]. En effet, la suppression de l'expression d'Angptl4 dans l'épithélium intestinal (par le microbiote ou par une stratégie de ciblage de gène) induit une augmentation de l'activité de la LPL et subséquentement une augmentation des dépôts de TG dans les adipocytes et une obésité [Backhed *et al.* 2004]. En accord avec ces observations, des souris axéniques KO *Angptl4*^{-/-} perdent leur capacité de résistance à l'obésité, suggérant qu'Angptl4 exerce un rôle essentiel dans la résistance à

l'obésité chez les souris axéniques [Backhed *et al.* 2007]. Notons que chez les souris élevées de manière conventionnelle (avec microbiote), l'action d'Angptl4 dans l'intestin est inhibée par la flore intestinale [Backhed *et al.* 2004].

Outre son rôle dans le métabolisme lipidique, ANGPTL4 serait impliqué dans la **régulation du métabolisme glucidique** (Figure 21). Sa surexpression par adénovirus entraîne une importante chute de la glycémie et améliore la tolérance au glucose chez les souris *db/db* et C57/BL6 [Xu *et al.* 2005]. Cependant, la délétion du gène *Angptl4* chez les souris 129B6F2 ainsi que la surexpression de la protéine ANGPTL4 humaine dans le foie de ces souris n'ont aucun effet sur la glycémie [Koster *et al.* 2005]. Enfin, l'administration d'un régime hyperlipidique chez les souris FVB (connues pour être résistantes à l'obésité induite par un régime hyperlipidique) surexprimant modérément *Angptl4* dans des tissus périphériques entraîne une intolérance au glucose [Mandard *et al.* 2006]. Les différents fonds génétiques de ces souris pourraient expliquer les différences observées. L'identification des récepteurs et des mécanismes cellulaires impliqués dans la signalisation d'Angptl4 devrait aider à comprendre ces effets.

Une récente analyse protéomique comparant le profil d'expression global des protéines du foie entre souris *db/db* traitées ou non avec *Angptl4* et souris minces, a révélé que l'administration à long terme d'*Angptl4* chez les souris diabétiques rétablit le profil global des protéines au même niveau que les souris minces [Wang *et al.* 2007b]. Les auteurs proposent un effet d'*Angptl4* sur les fonctions mitochondriales, *via* la régulation de l'activité des complexes II, III, et IV de la chaîne respiratoire.

Enfin, le fait qu'ANGPTL4 soit induite en cas d'hypoxie suggère un rôle dans **l'angiogenèse**. Cependant, les études ayant examiné ce rôle ont présenté des résultats contradictoires, avec tantôt un effet anti-angiogénique [Ito *et al.* 2003], tantôt un effet pro-angiogénique [Le Jan *et al.* 2003]. Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des effets différents de la forme longue et de la forme tronquée de la protéine. En effet, seule la forme longue a la capacité de se fixer à la matrice extracellulaire et peut ainsi exercer un effet anti-angiogénique [Cazes *et al.* 2006]. Des études fonctionnelles des deux formes protéiques sont nécessaires afin d'éclaircir le rôle d'ANGPTL4 dans l'angiogenèse (Figure 21).

3) Etudes génétiques

Romeo *et al.* ont réalisé la première étude génétique d'ANGPTL4 en 2007 qui consista à séquencer des régions codantes du gène chez 3551 individus [Romeo *et al.* 2007]. Les auteurs ont montré qu'il existe des variants non synonymes plus fréquemment retrouvés chez les individus appartenant au quartile du taux de TG le plus bas que chez les individus appartenant au quartile du taux de TG le plus élevé. De plus, le polymorphisme

E40K (fréquence 0,03) est associé à une diminution du taux de TG et une augmentation du taux de HDL-cholestérol chez 17476 individus [Romeo *et al.* 2007]. L'impact de ce variant E40K sur les taux plasmatiques de TG et de HDL-cholestérol a été confirmé dans plusieurs études indépendantes [Folsom *et al.* 2008; Nettleton *et al.* 2009; Talmud *et al.* 2008]. Les allèles mutés de ces variants rares associés au taux de TG semblent altérer la production ou la sécrétion d'ANGPTL4 ou son activité inhibitrice de la LPL [Romeo *et al.* 2009].

Staiger *et al.* ont étudié l'impact de la variabilité génétique commune d'ANGPTL4 sur les phénotypes associés au syndrome métabolique chez 629 individus à risque de DT2 [Staiger *et al.* 2008]. Ils ont analysé 4 SNPs (rs4076317, rs2278236, rs1044250 et rs11672433) mais n'ont pas détecté d'association significative. Ces 4 polymorphismes ainsi que 2 autres SNPs (rs7252574 et rs1808536) et le variant rare E40K, ont été étudiés par Talmud *et al.* chez 2772 hommes [Talmud *et al.* 2008]. Ces auteurs ont détecté des associations entre le SNP rs1044250 (T266M) et les taux plasmatiques de TG et de HDL-cholestérol. Cependant, ces associations ne résistent pas à l'ajustement sur le variant E40K, signifiant qu'elles sont biaisées par l'effet du variant E40K seul sur ces variables. Enfin, une récente GWAS a mis en évidence une association entre le polymorphisme rs2967605 d'ANGPTL4 et la concentration plasmatique de HDL-cholestérol chez 35151 individus [Kathiresan *et al.* 2009].

V.3.c. ANGPTL6

1) Expression

Chez l'homme, ANGPTL6 est exprimée abondamment dans le foie, et à un faible niveau dans les glandes surrénales, le pancréas, la rate et l'intestin grêle [Romeo *et al.* 2009]. La protéine ANGPTL6 est détectable dans le sérum chez la souris et l'homme [Oike *et al.* 2004]. Chez la souris, il a été détecté une forme longue, exprimée uniquement dans le foie, et une forme tronquée, exprimée dans les autres tissus [Hato *et al.* 2008].

2) Fonctions décrites

Angptl6 a d'abord été nommée *angiopoietin-related growth factor* (AGF) par Oike *et al.* [Oike *et al.* 2003] car des souris surexprimant Angptl6 dans les kératinocytes présentent une prolifération accrue des cellules de l'épiderme et des cellules vasculaires et une cicatrisation rapide des plaies (Figure 22). De plus, ces souris présentent une hyper-vascularisation de la peau. En fait, Angptl6 favorise le chimiotactisme des cellules endothéliales vasculaires et **induit la néovascularisation** [Oike *et al.* 2004]. ANGPTL6 stimule l'adhésion, la propagation et la migration des kératinocytes, des fibroblastes et des cellules endothéliales en se liant aux intégrines [Zhang *et al.* 2006b]. Dans un modèle de

souris souffrant d'ischémie du membre inférieur, l'injection intramusculaire d'un adénovirus exprimant Angptl6 dans le membre ischémique augmente le flux sanguin et réduit la nécessité d'amputer grâce à l'induction de l'angiogenèse et de l'artériogenèse (Figure 22) [Urano *et al.* 2008]. Ces effets pourraient être médiés par l'activation de la voie NO synthase.

En 2005, Oike *et al* mirent en évidence le rôle d'Angptl6 dans le **métabolisme énergétique** en générant des souris KO *Angptl6*^{-/-} [Oike *et al.* 2005]. La plupart de ces souris (80%) meurent au 13^{ème} jour embryonnaire de graves défauts cardiovasculaires. Les souris survivantes développent une obésité marquée, caractérisée par une augmentation de la taille des adipocytes, des dépôts ectopiques de graisse (dans le muscle squelettique et le foie) ainsi que des désordres métaboliques incluant une hypercholestérolémie, une augmentation des taux plasmatiques d'AGL, une hyper-insulinémie et une intolérance au glucose [Oike *et al.* 2005]. L'augmentation de l'adiposité a été attribuée à une réduction de la dépense énergétique plus qu'à une augmentation de la prise alimentaire (Figure 22). De plus, des souris transgéniques surexprimant Angptl6 présentent une réduction significative de leur masse grasse, résultant d'une dépense énergétique accrue, ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline [Oike *et al.* 2005]. Ces souris résistent à l'obésité, l'insulinorésistance et la stéatose, induites par un régime hyperlipidique. De même, l'injection intraveineuse d'un adénovirus surexprimant Angptl6 chez des souris soumises à un régime hyperlipidique résulte en une perte de poids et en l'amélioration de la sensibilité à l'insuline [Oike *et al.* 2005].

En outre, il a été montré qu'Angptl6 **inhibe la production de glucose** dans des hépatocytes de rat en empêchant l'expression de la glucose-6-phosphatase (enzyme clé de la gluconéogenèse) (Figure 22) [Kitazawa *et al.* 2007]. L'administration d'Angptl6 à des souris obèses (par gavage) engendrerait une augmentation de l'activité de la kinase activée par l'AMP et une activation de la voie de signalisation de l'insuline [Hato *et al.* 2008]. De plus, l'ajout d'insuline dans des myoblastes de souris pré-traités avec Angptl6 renforcerait la signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation de l'IRS-1, l'activité de la PI3-K et la captation du glucose (Figure 22) [Hato *et al.* 2008].

3) Etudes génétiques

La seule étude génétique sur *ANGPTL6* est l'étude récente de Romeo *et al* qui séquença les régions codantes des gènes de plusieurs *ANGPTLs* chez plus de 3500 individus [Romeo *et al.* 2009]. Contrairement à *ANGPTL3* et *4*, les variants génétiques d'*ANGPTL6* ne sont pas associés au taux plasmatique de TG. En revanche, les variants génétiques d'*ANGPTL6* étaient plus nombreux chez les individus appartenant au quartile le plus bas du taux plasmatique de cholestérol total (mais pas des taux de LDL-cholestérol ni

de HDL-cholestérol). Cette étude ne montre donc pas d'impact majeur de variants génétiques rares d'*ANGPTL6* sur les phénotypes métaboliques.

En conclusion, l'ensemble des données de la littérature concernant les LXRs et les ANGPTLs suggèrent que ces deux familles de protéines sont impliquées dans plusieurs voies métaboliques dont l'altération peut participer au développement du syndrome métabolique. Les gènes codant FTO, les LXRs et les ANGPTLs constituent alors des gènes candidats intéressants pour l'étude des facteurs de susceptibilité génétique du syndrome métabolique et des phénotypes associés.

Matériels et Méthodes

I. Analyse de la variabilité génétique

I.1. Les polymorphismes génétiques

L'apparition d'une mutation à un locus génique donné détermine un polymorphisme génétique, c'est à dire l'existence, dans la population, d'au moins deux formes distinctes de ce gène nommées allèles. Le polymorphisme génétique est donc un caractère héréditaire transmis sur le mode mendélien. Par convention, on parle de polymorphisme pour une mutation dont la fréquence en population est d'au moins 1%, et de variant dans le cas contraire. Les polymorphismes génétiques peuvent être des mutations ponctuelles n'affectant qu'un seul nucléotide, des délétions ou des insertions de séquences de taille très variable, ou des variations alléliques du nombre de répétitions d'un motif unique (des triplets nucléotidiques par exemple). Les mutations ponctuelles, également appelées SNP (*single nucleotide polymorphism*), représentent environ 90% des variations génétiques recensées dans le génome humain. Selon les polymorphismes, le spectre des manifestations phénotypiques associées est très large, depuis les polymorphismes non fonctionnels sans aucune conséquence détectable jusqu'aux polymorphismes fonctionnels pouvant entraîner une diminution de la fonction de la protéine – souvent des polymorphismes non synonymes (changement de l'acide aminé codé) – ou de l'expression du gène – polymorphismes le plus souvent situés dans des régions régulatrices (promoteur, *untranslating region* (UTR), introns).

Il existe des bases de données qui recensent l'ensemble des SNPs identifiés à ce jour, telles que celle du NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), de CHIP *bioinformatics tools* (<http://snpper.chip.org>) et de HapMap (www.hapmap.org). Le choix des SNPs à étudier repose sur :

- le niveau de validation des SNPs sur le NCBI (on estime à environ 50 % le nombre de polymorphismes décrits résultant en réalité d'erreurs de séquençage)
- la localisation sur le gène (préférentiellement dans les régions codantes ou de régulation de l'expression du gène)
- la fréquence du SNP ; dans nos études, nous avons pris une fréquence supérieure à 5 %, si celle-ci était connue car une fréquence <5% engendre une puissance statistique trop faible pour pouvoir détecter un effet significatif.

Le choix des SNPs peut également être fait à partir des données de la littérature pour un gène déjà étudié, même si ce n'est pas dans le même contexte pathologique. Enfin, il est possible de séquencer entièrement le gène d'intérêt afin de détecter tous les variants génétiques présents dans un échantillon.

I.2. Le déséquilibre de liaison

Le déséquilibre de liaison (DL) est un concept traduisant l'indépendance ou de la non-indépendance physique de deux loci lors de leur transmission aux gamètes, au cours de la méiose. Considérons deux loci bi-alléliques, A et B, d'allèles respectifs (A1 fréquent, A2 rare) et (B1 fréquent, B2 rare). Appelons p_{A1} , p_{A2} , p_{B1} , p_{B2} les fréquences alléliques. La répartition des deux allèles sur un chromosome peut être (A1,B1), (A1,B2), (A2,B1) ou (A2,B2). Appelons p_{A1B1} , la fréquence à laquelle on observe, dans une population, le chromosome porteur des allèles A1 et B1, de même pour p_{A1B2} , p_{A2B1} et p_{A2B2} . Si l'on suppose que les allèles de chaque locus sont distribués au hasard, les fréquences théoriques des chromosomes doivent être :

$$p_{A1B1} = p_{A1} \times p_{B1}$$

$$p_{A1B2} = p_{A1} \times p_{B2}$$

$$p_{A2B1} = p_{A2} \times p_{B1}$$

$$p_{A2B2} = p_{A2} \times p_{B2}$$

Si les fréquences observées de ces chromosomes ne diffèrent pas significativement de ces fréquences théoriques, les loci sont dits en équilibre de liaison. Cependant, il peut exister une différence entre les fréquences chromosomiques observées et les fréquences à l'équilibre. On définit alors le déséquilibre de liaison D comme la différence entre les fréquences chromosomiques observées et les fréquences théoriques à l'équilibre.

- Si $D > 0$, les allèles rares (ou fréquents) des deux loci sont préférentiellement associés ensemble.

- Si $D < 0$, l'allèle rare de l'un des loci est préférentiellement associé à l'allèle fréquent de l'autre locus.

La valeur maximale, ou minimale de D peut être calculée à partir des fréquences alléliques des loci A et B. Ainsi, concernant la valeur maximale de D (D_{max}), qui est la plus fréquemment utilisée, désignons par A celui des deux loci pour lequel la fréquence de l'allèle rare est la plus faible (i.e. $p_{A2} < p_{B2}$) :

$$\text{- Si } D > 0, D_{max} = p_{A2} (1 - p_{B2}) = p_{A2} p_{B1}$$

$$\text{- Si } D < 0, D_{max} = p_{A2} (1 - p_{B1}) = p_{A2} p_{B2}$$

Le DL est plus communément exprimé sous la forme de deux coefficients :

(i) le coefficient D' de Lewontin (1964), qui est égal au rapport D/D_{max} . D' est compris entre -1 et +1. Plus la valeur absolue de ce rapport est proche de 1, plus le DL est fort ; la valeur absolue 1 correspond à un déséquilibre complet,

(ii) le coefficient de corrélation entre les allèles, r^2 , qui est égal au rapport $(D)^2 / (p_{A1} \times p_{A2} \times p_{B1} \times p_{B2})$. La valeur 1 correspond ici à un déséquilibre parfait, signifiant

non seulement que $D'=1$, mais aussi que les fréquences alléliques des deux *loci* sont strictement égales.

Dans le cas où $r^2=1$ entre 2 SNPs, l'information recueillie à partir de l'étude d'un des deux polymorphismes est strictement identique à celle qui serait fournie par l'étude du polymorphisme avec lequel il est en DL parfait. Dans nos études, nous avons considéré que le DL était parfait si $r^2>0,80$.

Le DL diminue au cours des générations successives à cause des recombinaisons génétiques (*crossing-over*), d'autant plus lentement que les deux loci sont très proches sur le même chromosome : la force du DL exprime, sous certaines conditions, la proximité physique des deux loci.

I.3. Notion d'haplotype

Un haplotype est une combinaison allélique d'au moins deux polymorphismes retrouvée sur un même chromosome. En fait, les fréquences haplotypiques ne peuvent être mesurées, au sens strict du terme, que dans le cadre d'études familiales. Néanmoins, des modèles statistiques de maximum de vraisemblance permettent d'estimer les fréquences haplotypiques dans des populations d'individus non apparentés, à partir des fréquences génotypiques mesurées [Furihata *et al.* 2006; Tregouet *et al.* 2004]. Il est alors possible d'évaluer l'impact, non plus d'un polymorphisme mais d'une combinaison particulière de polymorphismes sur un phénotype donné.

Lorsque ces polymorphismes présentent un DL, la transmission des séquences nucléotidiques constitutives d'un chromosome se fait en réalité par bloc haplotypique. Au sein d'un même bloc, la probabilité de recombinaison est très faible. En effet, ces haplotypes sont généralement séparés par des régions de faible DL représentant des hot spots (points chauds) de recombinaison méiotique. Chaque bloc haplotypique, de taille variable, est défini par la combinaison de plusieurs polymorphismes, et il peut contenir un nombre variable de gènes sur le même chromosome. Si un bloc haplotypique contient 5 SNPs et que ce bloc est associé à un phénotype, le SNP d'intérêt est potentiellement n'importe lequel de ces 5 SNPs.

I.4. Les Tag-SNPs

L'identification des blocs haplotypiques présente un intérêt certain. Du fait de la corrélation qui existe entre les polymorphismes d'un même bloc, une redondance allélique est présente au sein de chaque bloc. Il est alors possible de sélectionner le (ou les) SNP(s) le(s) plus informatif(s), appelés tag-SNP(s), c'est à dire représentant le mieux l'information

portée par le bloc haplotypique. Un choix judicieux des tag-SNPs permet ainsi de réduire le nombre de polymorphismes à étudier sans pour autant perdre de l'information génétique, réduisant ainsi les coûts de génotypage. Il a été entrepris de caractériser les blocs haplotypiques composant le génome humain dans le but de définir au mieux l'information génétique du génome. Des cartes de SNPs de haute résolution doivent alors être établies par l'analyse de plusieurs milliers de SNPs. Le consortium international HapMap a pour but de caractériser au mieux les profils de variation génétique et les blocs haplotypiques du génome humain. Pour cela, plusieurs milliers de SNPs ont été génotypés par séquençage de 30 trios (deux parents et un enfant) d'origine européenne, de 30 trios d'origine africaine, et de 90 individus asiatiques non apparentés. La fréquence des variations nucléotidiques ainsi que les valeurs de DL ont ensuite été calculées dans les différentes populations. Ce travail a également permis au consortium HapMap de déterminer qu'un échantillon de 45 individus est suffisant pour détecter 99% des haplotypes ayant une fréquence supérieure à 5% dans la population [2003]. Suite à l'analyse des blocs haplotypiques mis en évidence par le projet HapMap, on estime à 300 000 le nombre de tag-SNPs nécessaires pour couvrir les régions génomiques présentant un fort DL ($r^2 > 0,8$), et à 500 000 le nombre de SNPs supplémentaires pour couvrir les régions de plus faible DL [Wang *et al.* 2005]. Une couverture optimale du génome entier nécessiterait donc au moins 800 000 SNPs.

II. Génotypage

II.1. Restriction fragment length polymorphism

La technique de génotypage par RFLP, que j'ai le plus souvent utilisée, est basée sur la différence de taille de fragments générés après digestion par une enzyme de restriction. La première étape consiste en l'amplification par PCR (*polymerase chain reaction*) de la région d'ADN encadrant le SNP à partir de l'ADN génomique grâce à des amorces spécifiques. Pour chaque SNP, on choisit une enzyme de restriction qui permet de discriminer les allèles. Pour éviter les erreurs de génotypage dues à une digestion incomplète, l'enzyme a été ajoutée en excès et, si possible, a été choisie pour couper l'allèle fréquent du SNP ainsi qu'un autre site indépendant du SNP (Figure 23). Si le SNP ne modifie pas de site de restriction naturellement, il est possible de forcer l'existence d'un site de restriction en élaborant des amorces dégénérées (Figure 23). Les produits de digestion sont déposés sur gel d'agarose ou d'acrylamide (selon la taille des fragments) et soumis à électrophorèse. Les fragments d'ADN sont révélés par du BET (bromure d'éthidium) et observés sous lampe UV.

II.2. Technologie TaqMan

Certains SNPs étudiés au cours de mes travaux ont également été génotypés par TaqMan. Cette technique consiste en l'amplification de la région chromosomique d'intérêt et en l'hybridation simultanée de sondes spécifiques de chaque allèle. Ces sondes sont marquées avec le fluorophore VIC® pour l'allèle 1 et avec FAM™ pour l'allèle 2. Pendant l'amplification, le signal spécifique de chaque allèle est fluorescent uniquement si les sondes sont hybridées à leur séquence complémentaire (Figure 24). Ainsi, le signal fluorescent indique quel allèle est présent dans l'échantillon.

II.3. Technologie Golden Gate

Les individus de l'étude HELENA ont été génotypés par la technologie Illumina GoldenGate par la société Integragen (Evry, France). C'est une technique à haut débit car jusqu'à 1500 SNPs environ peuvent être génotypés simultanément. Dans cette technologie, l'hybridation des sondes spécifiques de chaque allèle se fait avant l'amplification par PCR (Figure 25).

III. Populations étudiées

III.1. L'étude MONICA

Les individus ont été recrutés dans le cadre de l'enquête de population MONICA (*Multinational mONItoring of trends and determinants of CArdiovascular diseases*) entre 1995 et 1997 dans 3 régions de France : la Communauté Urbaine de Lille (n=1195), le département du Bas-Rhin (Strasbourg, n=1131) et celui de la Haute-Garonne (Toulouse, n=1182). Notre laboratoire était responsable du recrutement de l'échantillon MONICA Lille. Ces 3 échantillons sont représentatifs de la population générale âgée de 35 à 64 ans et les individus ont été sélectionnés par tirage au sort à partir des listes électorales de manière à obtenir 200 individus de chaque genre par tranche d'âge de 10 ans (35-44, 45-54, 55-64 ans) [1994]. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de chaque centre.

Après consentement éclairé, les individus ont répondu à un questionnaire concernant, entre autres, le niveau socio-économique, l'activité physique, la consommation d'alcool et de tabac, les antécédents médicaux et familiaux, les traitements médicamenteux. L'activité physique a été définie par un minimum de 15 minutes de marche par jour ou par le port d'objets lourds au quotidien ou par la pratique d'un sport au moins 2 heures par semaine. Le statut de fumeur a été défini par un minimum d'une cigarette fumée par jour. La consommation d'alcool (vin, bière, cidre et apéritifs) a été calculée en ml d'alcool pur par semaine.

Des mesures anthropométriques, telles que le poids et le tour de taille (au milieu de la dernière côte et de la crête iliaque), ont été prises sur les individus en habits légers et sans chaussures. L'IMC a été calculé selon l'équation de Quetelet (poids (kg)/taille (m)²). Les individus ayant un IMC ≥ 30 kg/m² sont considérés obèses, ceux ayant un IMC entre 25-30 kg/m² sont en surpoids. La tension artérielle a été mesurée à l'aide d'un sphygmomanomètre standard à mercure, sur le bras droit de l'individu en position assise et après 5 minutes de repos. La moyenne de 2 mesures consécutives a été calculée.

Une prise de sang a été réalisée sur chaque individu afin de mesurer les constantes biologiques et d'en extraire l'ADN. Un total de 3402 échantillons d'ADN est disponible. Un échantillon de 20mL de sang a été prélevé chez les individus après un jeûne d'au moins 10 heures dans des tubes disodium EDTA. Les concentrations plasmatiques des lipides et lipoprotéines (TG, cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, VLDL, ApoA1 et ApoB), du glucose et de l'insuline ont été mesurées au laboratoire de biochimie de l'hôpital Purpan à Toulouse [Dallongeville *et al.* 2005b]. L'insulinorésistance a été évaluée par le HOMA-IR [Matthews *et al.* 1985]. Les individus diabétiques ont été identifiés par une

glycémie à jeun $\geq 7,0$ mmol/L ou la prise d'un traitement anti-diabétique [1997]. Les caractéristiques des individus des 3 échantillons MONICA Lille, Toulouse et Strasbourg sont présentées dans le Tableau 12.

III.2. L'étude MONEUR

III.2.a. Le projet EUROASPIRE

Dans le cadre du projet européen EUROASPIRE (*EUROpean Action on Secondary Prevention and Intervention to Reduce Event*), notre laboratoire a participé à la constitution de 3 séries indépendantes de cas de patients coronariens, successivement en 1994-1995, 1999-2000 et 2006-2007. Ce projet, coordonné par la Société Européenne de Cardiologie, visait à estimer la prévalence et le niveau de prise en charge des facteurs de risque cardiovasculaires en prévention secondaire, chez des patients coronariens, au moins 6 mois après la survenue d'un épisode aigu de coronaropathie ayant nécessité une hospitalisation.

Les échantillons de population EUROASPIRE I et EUROASPIRE II, composés respectivement de 546 individus (âgés de 25 à 75 ans) et 548 individus (âgés de 34 à 73 ans) ont été recrutés dans les unités cardiologiques de la métropole lilloise (Hôpital Cardiologique du CH et U de Lille, Hôpital Saint Philibert de Lomme et Centre Hospitalier Général de Roubaix). Chaque échantillon est composé de quatre groupes contrastés sur le plan des manifestations aiguës : (1) individus ayant subi un pontage coronaire, (2) individus ayant subi une angioplastie coronaire, (3) individus ayant présenté un infarctus du myocarde ou (4) individus ayant présenté une ischémie myocardique aiguë (angor instable). Pour les individus des groupes 1 et 2, la notion d'intervention en urgence est disponible ainsi que, pour tous les individus, la notion d'antécédent d'infarctus du myocarde. Outre l'information sur la maladie, l'IMC et des données sur la prévalence de facteurs de risques environnementaux (consommation de tabac, consommation d'alcool, prévalence de l'hypertension artérielle, de l'hypercholestérolémie, de diabète...) ont été mesurés ou recueillis. Enfin, l'extraction de l'ADN a pu être réalisée pour 380 individus participant à l'étude EUROASPIRE I, et pour 352 individus recrutés dans le cadre de l'enquête EUROASPIRE II.

III.2.b. L'étude MONEUR

A partir des individus des études EUROASPIRE I et II, a été constitué, par tirage au sort, un échantillon de 585 individus ayant présenté une coronaropathie aiguë (cas). Un échantillon aléatoire composé de 585 individus indemnes de maladie coronaire et participant à l'étude MONICA France a été constitué (témoins). Cet échantillon a été apparié sur le sexe

et la classe d'âge à l'échantillon de cas de coronaropathies. Parmi les 585 individus coronariens, 350 ont eu un infarctus du myocarde récent ou ont un antécédent personnel d'infarctus du myocarde. Le Tableau 13 résume l'essentiel des caractéristiques phénotypiques des individus de cette étude cas-témoins reconstituée.

III.3. L'étude HELENA

L'avantage de réaliser des études d'association chez les enfants ou les adolescents réside en le fait que les biais environnementaux sont plus restreints que chez les adultes, notamment les biais induits par la consommation de tabac, d'alcool, la prise de médicaments et la présence de maladies chroniques. En accord avec ceci, l'héritabilité génétique de l'IMC et du tour de taille semble plus élevée chez les enfants (77% [Wardle *et al.* 2008]) que chez les adultes (25-60% selon les études [Teran-Garcia *et al.* 2007]). De plus, il a été montré que l'effet des facteurs environnementaux était limité (15%) chez les enfants [Wardle *et al.* 2008]. L'impact de polymorphismes génétiques sur les phénotypes métaboliques semble alors plus facilement détectable chez les sujets jeunes.

Les participants de cette étude ont été recrutés dans le cadre du projet HELENA (*HEalthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence*, <http://www.helenastudy.com>) réalisée en 2006-2007 dans 10 centres de 9 pays européens (Athènes et Héraklion en Grèce, Dortmund en Allemagne, Gand en Belgique, Lille, Pécs en Hongrie, Rome en Italie, Västerås en Suède, Vienne en Autriche et Zaragoza en Espagne) [Moreno *et al.* 2008b]. Le protocole fut approuvé par le comité d'éthique de chaque centre. Un consentement éclairé et écrit fut obtenu de la part de chaque adolescent et de ses parents ou de ses représentants légaux [Beghin *et al.* 2008]. La participation à cette étude était sur la base du volontariat. L'échantillon inclut 3865 adolescents ($14,8 \pm 1,4$ ans, de 12 à 18 ans) recrutés dans leurs écoles, ces dernières étant sélectionnées au hasard selon une méthodologie d'échantillonnage proportionnel prenant en compte la répartition géographique au sein de chaque ville, le ratio écoles privées/publiques, et le nombre de classes par école [Moreno *et al.* 2008a]. Dans chaque centre, des mesures anthropométriques, telles que le poids, la taille, le tour de taille, le tour de hanches et 6 plis cutanés ont été recueillies par un médecin expérimenté sur les individus pieds nus et en sous-vêtements. Les tours de taille et de hanches ont été mesurés 3 fois consécutives avec un mètre non élastique (Seca 200). L'IMC a été calculé. Un adolescent est considéré obèse si son IMC est supérieur à la valeur définie par Cole *et al.* [Cole *et al.* 2000] correspondant à un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ à l'âge de 18 ans. De même, un adolescent est considéré en surpoids si son IMC correspond à un IMC compris entre 25 et 30 kg/m^2 à l'âge de 18 ans. Le pourcentage de masse grasse a été estimé à partir des mesures des plis cutanés, selon l'équation de Slaughter *et al.* [Slaughter *et al.*

1988]. L'activité physique a été mesurée pendant une semaine grâce à un accéléromètre (Actigraph MTI, model GT1M, Manufacturing technology Inc., Fort Walton Beach, FL, USA) [Hagstromer *et al.* 2008].

Dans le but d'étudier les constantes biologiques et de réaliser des analyses génétiques, un tiers des classes ont été sélectionnées au hasard pour recueillir des échantillons de sang (n=1155). Ces prélèvements ont été effectués à l'école selon un protocole standard de recueil, après une nuit de jeûne, et ont ensuite été centralisés au laboratoire d'analyses de l'université de Bonn ([IEL], Allemagne) pour les dosages biochimiques [Gonzalez-Gross *et al.* 2008]. Les concentrations plasmatiques de TG, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol, de glucose et d'insuline ont été mesurées par méthode enzymatique (*Dimension RxL clinical chemistry system, Dade Behring, Schwalbach, Allemagne*). Les concentrations plasmatiques en ApoA1 et ApoB ont été mesurées par réaction immunologique (*BN II analyser, Dade Behring, Schwalbach, Allemagne*). Les échantillons sanguins destinés à l'extraction d'ADN ont été collectés dans des tubes EDTA K3 et envoyés au Laboratoire d'Analyse Génomique à l'Institut Pasteur de Lille. L'ADN a été extrait des globules blancs avec le kit Puregene (QIAGEN, Courtaboeuf, France) et conservés à -20°C. Les caractéristiques des adolescents de l'étude HELENA sont présentées dans le Tableau 14.

III.4. L'étude cas-témoins pour le DT2 nichée dans HUNT 2

Grâce à une collaboration avec le Dr Karianne Solaas du Département de Nutrition (Faculté de Médecine, Université d'Oslo, Norvège) dirigé par le Pr Hilde Nebb, nous avons eu accès à l'étude cas-témoins pour le DT2 de l'échantillon HUNT 2. Les participants de l'étude HUNT 2 (*HelseUndersøkelsen Nord-Trøndelag, www.ntnu.no/hunt*) (n=65905) ont été recrutés entre 1995 et 1997 dans la région Nord-Trøndelag (Norvège) et constituent un échantillon représentatif de la population norvégienne rurale [Holmen *et al.* 1990]. Cette population est stable au niveau géographique et ethnique depuis plusieurs générations (seulement 3% des individus ne sont pas d'origine caucasienne). Tous les individus de 20 ans et plus avaient été invités à participer à cette étude et le taux de participation a été de 71%. Les participants ont répondu à un questionnaire concernant, entre autres, les traitements médicamenteux, leur hygiène de vie, la consommation d'alcool et de tabac, et ont eu un examen clinique au cours duquel des mesures anthropométriques (poids, taille, tours de taille et de hanches) ont été recueillies. L'IMC et le RTH ont été calculés. La tension artérielle a été mesurée à 3 reprises sur les individus en position assise et la moyenne des 2 dernières mesures a été calculée [Midthjell *et al.* 1999]. Une prise de sang a été réalisée sur chaque individu non à jeun afin de mesurer les constantes biologiques (glucose, cholestérol

total, HDL-cholestérol et triglycérides plasmatiques) et d'en extraire l'ADN. Ces analyses ont été réalisées à l'hôpital de Nord-Trøndelag à l'aide d'un Hitachi 911 Autoanalyzer (Hitachi, Mito, Japon) et des réactifs Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany). L'ADN a été extrait par précipitation aux sels [Miller *et al.* 1988]. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique régional norvégien de la recherche médicale, le centre norvégien des données sociales et la direction norvégienne pour la santé et les affaires sociales.

Afin de constituer une étude cas-témoins pour le DT2, ont été sélectionnés 1040 individus (cas) parmi les 1972 individus ayant déclaré être diabétique (n=942), auxquels ont été ajoutés 98 autres individus qui présentaient une glycémie non à jeun $\geq 11,1$ mmol/L, et 2080 individus ayant une glycémie non à jeun $\leq 5,5$ mmol/L (témoins), appariés sur l'âge et le genre des cas (2 témoins par cas). Les individus ayant commencé un traitement à l'insuline dès la première année suivant le diagnostic de leur diabète ou ayant un taux plasmatique d'anticorps anti-GAD (décarboxylase de l'acide glutamique) $\geq 0,08$ U/L ont été considérés comme présentant un diabète de type 1 et ont été exclus de la présente étude (n=171). Les caractéristiques des individus de cette étude cas-témoins nichée sont présentées dans le Tableau 15.

IV. Analyses statistiques

IV.1. L'équilibre d'Hardy Weinberg

Lors des études d'association, pour chaque polymorphisme testé, il est nécessaire de vérifier que celui-ci respecte l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population étudiée. La loi de l'équilibre d'Hardy-Weinberg stipule que, dans une très grande population dans laquelle les mariages entre individus se font au hasard (panmixie), et qui ne connaît ni migration, ni sélection naturelle, les fréquences alléliques et génotypiques restent stables au fil des générations. Dans cette hypothèse, la loi d'Hardy-Weinberg permet de calculer les fréquences alléliques à partir de la mesure des fréquences génotypiques et inversement. Selon cette loi, si A1 et A2 sont les allèles d'un locus autosomique bi-allélique, de fréquence respective p et q (avec $q=1-p$), les fréquences des trois génotypes possibles A1A1, A1A2 et A2A2, sont respectivement p^2 , $2pq$ et q^2 . Une population dans laquelle la distribution génotypique observée est statistiquement compatible avec cette distribution théorique est dite en équilibre d'Hardy-Weinberg pour le locus considéré.

Pour vérifier qu'un polymorphisme respecte l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans la population témoin, on utilise un test du χ^2 à 1 degré de liberté (ddl) qui permet de calculer l'écart entre les fréquences observées et les fréquences théoriques respectives des différents génotypes. Si cet écart est significatif, la distribution du polymorphisme dans la population n'est pas en équilibre d'Hardy-Weinberg. La raison la plus fréquente d'une déviation de l'équilibre d'Hardy Weinberg correspond à des erreurs de génotypage. Il peut également s'agir d'un biais de sélection de la population étudiée. En effet, la distribution d'un polymorphisme potentiellement impliqué dans des maladies modifiant la survie d'un individu peut ne pas respecter l'équilibre d'Hardy-Weinberg dans les populations les plus âgées.

IV.2. Analyses statistiques utilisées dans les études d'association

Les études d'association réalisées dans des échantillons de population composés d'individus non apparentés consistent à évaluer des associations statistiques entre les génotypes d'un SNP et un phénotype donné en comparant les fréquences des génotypes entre un échantillon d'individus présentant le phénotype étudié (par exemple, une maladie) et un échantillon d'individus ne présentant pas le phénotype. Ce type d'analyse se formalise, le plus souvent, sous la forme d'un tableau croisé 2x3. Un test du χ^2 permet de tester la différence entre les effectifs génotypiques observés dans les deux groupes et ceux attendus sous l'hypothèse d'une indépendance entre la maladie et le polymorphisme étudié. La sur-

représentation statistiquement significative d'un génotype particulier dans l'un des deux groupes comparés suggère l'association de cet allèle avec la maladie. La force de l'association est alors estimée par le calcul de l'odds ratio (OR) défini comme le rapport entre la proportion d'individus porteurs de l'allèle mineur chez les cas et la proportion d'individus porteurs de l'allèle mineur chez les témoins. Les calculs d'OR sont réalisés par un modèle de régression logistique ajusté sur les facteurs de risque conventionnels de la maladie. Cet OR illustre l'augmentation (si $OR > 1$) ou la diminution (si $OR < 1$) du risque de survenue de la maladie chez les individus porteurs de l'allèle mineur par rapport aux individus non porteurs.

Les études d'association consistent également en la comparaison de la moyenne d'un phénotype (par exemple, le dosage d'une constante biologique ou un paramètre anthropométrique) entre les individus présentant les différents génotypes. Pour cela, l'approche statistique la plus fréquente est celle d'une analyse de variance (ANOVA) comparant les moyennes du phénotype étudié entre groupes de génotypes ou d'une analyse de covariance (ANCOVA) si l'analyse est ajustée sur les facteurs de confusion.

En général, ces tests sont considérés comme statistiquement significatifs lorsque la valeur de p calculée est $\leq 0,05$. Cette valeur correspond à un risque α , ou risque de première espèce, de 5% qui représente la probabilité de conclure à tort à une association. Notons qu'il existe aussi un risque β , ou risque de deuxième espèce, qui représente la probabilité d'exclure à tort une association. Aujourd'hui, avec la multiplication des études d'association comportant un très grand nombre de SNPs, une correction pour tests multiples est souvent requise. En effet, le fait d'augmenter le nombre de SNPs étudiés augmente le nombre de tests effectués et ainsi la probabilité de mettre en évidence un résultat significatif par hasard. Concrètement, si on effectue 100 tests indépendants avec un seuil de significativité à 0,05, statistiquement 5 tests apparaîtront comme significatifs par le seul fait du hasard (faux positifs). Une correction pour tests multiples consiste alors à modifier (ou corriger) le seuil de significativité pour considérer l'association comme significative. La correction pour test multiple la plus souvent utilisée est celle de Bonferroni qui consiste à diviser le seuil de significativité généralement admis à 0,05 par le nombre de tests effectués [Bland *et al.* 1995]. Bien que cette correction soit connue pour être trop stricte et souvent inadaptée aux études de polymorphismes génétiques [Rice *et al.* 2008] (une correction trop stricte peut en effet entraîner le risque de rejeter une association alors qu'elle est réelle), elle est malgré tout souvent employée. La méthode de correction de Benjamini et Hochberg dite de FDR (*false discovery rate*) [Fernando *et al.* 2004] est également souvent utilisée dans les études d'association. Au lieu de contrôler le risque d'apparition de faux positifs dus au hasard (comme dans la correction de Bonferroni), cette correction contrôle la proportion de faux positifs à chaque seuil. Un seuil de FDR est déterminé par la distribution des valeurs de p observées. Cette correction est alors plus sensible et moins stricte que celle de Bonferroni.

IV.3. Facteurs de confusion et interactions

Dans une étude d'association, la relation statistique observée entre un polymorphisme et un phénotype peut, en réalité, être en tout ou partie, expliquée par un facteur confondant (consommation de tabac, hypertension...). Pour être potentiellement confondante, une variable doit être associée à l'exposition (mutation par exemple), être associée à la maladie indépendamment de l'exposition et, donc, ne pas être un relais (étape intermédiaire) dans le processus physiopathologique entre l'exposition et la maladie. Les analyses stratifiées constituent une méthode permettant de contrôler la confusion, en évaluant l'association entre le facteur d'exposition et la maladie dans les catégories ou classes de la variable potentiellement confondante. Malheureusement, en posant rapidement le problème de la puissance statistique, l'analyse stratifiée n'est pas une méthode pratique pour contrôler simultanément plusieurs facteurs confondants. Une solution alternative consiste à recourir à l'analyse multivariée.

L'interaction, ou modification d'effet, qui se distingue de la confusion, constitue une information très intéressante. Certains facteurs de risque génétiques peuvent n'avoir d'effets que dans des contextes physiologiques (âge, sexe...), environnementaux (consommation de tabac, consommation d'alcool...) ou pathologiques (hypertension artérielle, dyslipidémies...) qu'il est intéressant de caractériser par des recherches d'interactions statistiques. Ces analyses d'interaction permettent, ainsi, d'identifier des sous-groupes à plus haut risque, avec des implications potentielles en terme de santé publique.

Le terme d'interaction est souvent source d'ambiguïté, l'interaction statistique se différenciant de l'interaction biologique, ou causale [Clayton *et al.* 2001]. En terme statistique, il existe une interaction gène-environnement (ou gène-gène) lorsque l'effet de la mutation sur la maladie dépend de l'exposition à un facteur environnemental (ou de la présence d'une autre mutation génétique). Autrement dit, le taux d'incidence de la pathologie en présence des deux facteurs (gène/environnement ou gène/gène) diffère du taux d'incidence attendu résultant de leur effet individuel (Figure 26). Lorsque l'effet est supérieur à celui attendu, on parle d'interaction positive ou synergique tandis que lorsqu'il est plus faible on parle d'interaction négative ou antagoniste. Ce concept statistique de l'interaction a été critiqué parce qu'il est arbitraire, modèle-dépendant, et ne tient pas compte de la notion d'interaction biologique [Greenland 1993]. L'interaction au sens biologique suppose la participation coordonnée de deux facteurs de risque dans un mécanisme étiologique commun, responsable du développement de la maladie [Rothman *et al.* 1980]. En épidémiologie génétique, l'interprétation de l'existence d'une interaction s'appuie, le plus souvent, sur des considérations statistiques mais la validité du modèle doit idéalement reposer sur des connaissances biologiques [Clayton *et al.* 2001]. Ceci est d'autant plus

complexe que le même modèle statistique traduisant un risque de maladie peut refléter simultanément plusieurs mécanismes biologiques plus ou moins distincts. Enfin, l'une des limites à la recherche d'interaction réside à nouveau dans la puissance statistique nécessaire pour les détecter.

Résultats

Introduction

Mon travail de thèse a consisté en l'identification et la caractérisation de nouveaux déterminants génétiques du syndrome métabolique. Comme les études génétiques sur le syndrome métabolique sont rendues délicates du fait du manque de définition faisant l'unanimité et la méconnaissance de son étiologie, je me suis intéressée au syndrome métabolique en tant qu'entité, mais également aux phénotypes associés à ce syndrome pris individuellement. Pour cela, j'ai employé une approche de type gène candidat et réalisé des études d'association entre des polymorphismes génétiques (SNPs) de gènes ayant possiblement un lien avec la physiopathologie du syndrome métabolique et les phénotypes métaboliques dans des échantillons de population générale (adolescents et/ou adultes). Pour chaque gène étudié, ma démarche a été la suivante :

- j'ai caractérisé la variabilité génétique commune des gènes et identifié les SNPs les plus pertinents à étudier,
- j'ai réalisé les études d'association des SNPs sélectionnés dans des échantillons de population,
- j'ai caractérisé *in vitro* la fonctionnalité des polymorphismes trouvés associés à un phénotype métabolique, quand c'était possible.

Je me suis intéressée aux gènes codant FTO, LXR α et β , et les ANGPTL3, 4 et 6 car, au vu des données de la littérature, ils sont tous impliqués dans au moins une voie métabolique participant au développement du syndrome métabolique, et constituent ainsi des gènes candidats pertinents.

I. Etude du gène *FTO*

I.1. Contexte de l'étude

Comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre V.1. de l'Introduction (pages 56-57), en 2007, deux GWAS indépendantes identifièrent un nouveau gène, *FTO*, pour *fat mass and obesity-associated*, présentant des polymorphismes très significativement associés au risque de DT2 [Scott *et al.* 2007; 2007b]. En effet, l'allèle A du SNP rs9939609 (MAF 0,46) est associé à une augmentation du risque de DT2 de 25 à 50% dans ces études. Cette prédisposition au DT2 était en fait due à l'association de cet allèle avec une augmentation de l'IMC (+ 0,2 à 0,4 kg/m² par allèle) [Frayling *et al.* 2007]. Ainsi, les individus porteurs de cet allèle ont un risque accru de surpoids et d'obésité, et ce, dès l'enfance [Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a; Scuteri *et al.* 2007; Do *et al.* 2008; Peeters *et al.* 2008; Grant *et al.* 2008; Lopez-Bermejo *et al.* 2008]. Nous avons alors analysé l'impact de ce polymorphisme dans l'échantillon MONICA français (Lille, Toulouse et Strasbourg, n=3402) (voir les caractéristiques des populations étudiées dans le chapitre III.1. des Matériels et Méthodes page 80) afin de vérifier l'association de *FTO* et l'IMC dans cet échantillon et voir si nous pouvions détecter d'autres associations.

Effect of an *FTO* polymorphism on fat mass, obesity, and type 2 diabetes mellitus in the French MONICA Study

Vanessa Legry^a, Dominique Cottel^a, Jean Ferrières^b, Dominique Arveiler^c, Nicolas Andrieux^a, Annie Bingham^d, Aline Wagner^c, Jean-Bernard Ruidavets^b, Pierre Ducimetière^d, Philippe Amouyel^a, Aline Meirhaeghe^{a,*}

^aINSERM, U744, Lille; Institut Pasteur de Lille, Lille; Université de Lille 2, UMR-S744, 59019 Lille Cedex, France

^bINSERM, U558, Toulouse; Faculté de Médecine, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

^cLaboratoire d'Epidémiologie et Santé Publique, EA 1801, Faculté de Médecine, Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

^dINSERM, U909, Villejuif; Université Paris V, Faculté de Médecine, Villejuif, France

Received 27 September 2008; accepted 9 February 2009

Abstract

We investigated the association between the rs9939609 (T>A) polymorphism in the *FTO* (fat mass- and obesity-associated) gene and obesity- and type 2 diabetes mellitus-related phenotypes in the French Multinational MONITORing of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease (MONICA) Study (n = 3367). In the study, TA or AA subjects had higher body mass index (BMI) ($P = .017$), waist circumference ($P = .017$), and hip ($P = .01$) circumference in an A allele dose-dependent manner. The A allele was also significantly associated with higher plasma insulin levels ($P = .05$), higher insulin resistance index (homeostasis model assessment) ($P = .02$), and higher systolic blood pressure ($P = .003$); but these associations disappeared after adjustment for BMI. In the study, 598 subjects were obese (BMI ≥ 30 kg/m²); and 2769 subjects were not obese (BMI < 30 kg/m²). Subjects bearing the A allele of rs9939609 had a higher risk of obesity (adjusted odds ratio [95% confidence interval] = 1.29 [1.06–1.58], $P = .01$) compared with TT subjects. Moreover, the homozygous AA genotype of rs9939609 was associated with a higher risk of type 2 diabetes mellitus (odds ratio = 1.45 [1.05–1.99], $P = .02$, 283 subjects with and 2601 subjects without type 2 diabetes mellitus), independently of BMI. In conclusion, the role of the A allele of the *FTO* rs9939609 polymorphism on the risk of obesity and type 2 diabetes mellitus was confirmed in the French MONICA Study.

© 2009 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

For several decades, obesity and type 2 diabetes mellitus (T2D) have been worldwide issues because of their alarming increased prevalence and their associated morbidity (mainly essential hypertension, dyslipidemia, cardiovascular diseases, etc) and mortality. Today, more than 1.1 billion adults worldwide are overweight; and 312 million of them are obese [1]. In addition, at least 155 million children worldwide are overweight or obese, according to the International Obesity Task Force. The total number of people with diabetes is projected to rise from 171 million in 2000 to 366 million in 2030 [2]. Although the evidence of

the heritable character of these diseases has been established, only few reliable genetic determinants have been discovered. The difficulties in finding these determinants can be explained by the presence of complex and abundant interactions between genes and environment in the development of obesity or T2D and also because the genetic determinants of these diseases are multiple and that each confers modest risk.

Two genomewide association studies for T2D identified a highly significant association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and T2D [3,4]. The risk of T2D associated with the A allele of rs9939609 was increased by approximately 50% in a Finnish case-control study [3] and by approximately 25% in the Wellcome Trust Case-Control Consortium collection [4]. Interestingly, this predisposition to diabetes was in fact due to an effect on body mass index (BMI) [5]. The A allele of rs9939609 was indeed associated

* Corresponding author. Tel.: +33 3 20 87 73 91; fax: +33 3 20 87 78 94.

E-mail address: aline.meirhaeghe-hurez@pasteur-lille.fr

(A. Meirhaeghe).

with higher BMI (~ 0.2 – 0.4 kg/m² per A allele). Adults homozygous for the A allele at rs9939609 were at increased risk of being overweight (odds ratio [OR] = 1.38) and obese (OR = 1.67). Similar results were obtained in children cohorts by the age of 7 years [5,6]. Since then, several publications have confirmed the influence of *FTO* polymorphisms on fat mass in different population samples [7–11]. Lopez-Bermejo et al [12] showed that an *FTO* single nucleotide polymorphism (SNP) was associated with weight and ponderal index as early as 2 weeks of age. Jacobsson et al [13] showed that rs9939609 predisposed to obesity in girls but not in boys in a sample of 450 obese and 512 nonobese Swedish children. In contrast, in Chinese Han or in African American subjects, rs9939609 was not associated with T2D or obesity-related phenotypes despite sufficient power in the studies [7,14]. The minor allele frequency of this SNP being much lower in these ethnic population samples (0.20) than in white subjects (0.40), the absence of replication in these population samples could be due to an evolutionary divergence or genetic drift. It remains also possible that other common variants in the *FTO* gene, especially those with higher minor allele frequency, may contribute to the increased risk for obesity or T2D in Chinese or African Americans, similar to the *TCF7L2* gene [15].

All the described *FTO* polymorphisms associated with T2D or BMI are in tight linkage disequilibrium (HapMap release 23, March 2008), including rs9939609, rs1121980, rs17817449, rs3751812, and rs1421085 ($r^2 > 0.8$). Therefore, we investigated the association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and the risk of obesity and T2D as well as clinical and biochemical phenotypes in the French Multi-national MONItoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease (MONICA) population study.

2. Materials and methods

2.1. MONICA Study

Participants were recruited as part of the World Health Organization–MONICA population survey conducted from 1995 to 1997 in 3 different parts of France: the Lille urban community in northern France ($n = 1195$), the Bas-Rhin county in eastern France ($n = 1131$), and the Haute-Garonne county in southern France ($n = 1182$). The protocol was approved by the appropriate independent ethics committee in each center. Subjects (aged 35–64 years) were randomly selected from electoral rolls after stratification by town size, sex, and age to obtain 200 participants for each sex and each 10-year age group (World Health Organization–MONICA Project protocol) [16]. DNA samples were available for 3452 subjects. After providing written informed consent, participants filled out a standard questionnaire; and physical measurements were taken by a specially trained nurse. Details of the study have been described elsewhere [17]. *Physical activity* was defined as at least 15-minute walk a day, and/or lifting or carrying heavy objects at work daily, and/or

doing sport or physical exercise for more than 2 hours a week. In terms of smoking exposure, subjects were categorized as never smokers, former smokers, and current smokers (ie, subjects reporting at least 1 cigarette per day). Total alcohol intake was expressed as the sum of milliliters of alcohol per week from wine, beer, cider, and spirits. Anthropometric measurements included body weight (rounded to the nearest even decimal) and waist girth (at a level midway between the lower rib margin and the iliac crest, to the nearest 0.5 cm) and were performed on subjects in light clothing without shoes. Body mass index was calculated according to the Quetelet equation. Subjects having a BMI greater than or equal to 30 kg/m² were considered as obese. Blood pressure was measured on the right arm, with the subject in a sitting position and after a minimum 5-minute rest, using a standard mercury sphygmomanometer. The mean value of 2 consecutive blood pressure readings was taken into account. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated as the product of fasting plasma insulin (in microunits per milliliter) and fasting plasma glucose (in millimoles per liter), divided by 22.5 [18]. Diabetic subjects ($n = 283$) were identified by fasting glycemia of at least 7 mmol/L (1.26 g/L) or antidiabetic treatment [19]. Normoglycemic subjects ($n = 2601$) had fasting glycemia less than 6.1 mmol/L (1.10 g/L) and no specific treatment or diet for T2D, whereas individuals with raised fasting glycemia ($n = 261$) had fasting glycemia between 6.1 and 7 mmol/L. A total of 222 subjects had type 1 diabetes mellitus, nonfasting blood samples, or missing values and were not used in the T2D analyses.

2.2. Laboratory methods

A 20-mL blood sample was drawn into a disodium EDTA tube (after the subjects had fasted for at least 10 hours), stored at room temperature, and centrifuged within 4 hours. All measurements were performed at the Purpan Hospital Biochemical Laboratory (Toulouse). The quality of biological measures was assessed within the framework of the MONICA Project. Plasma total cholesterol and triglyceride levels were measured using enzyme assays (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Plasma high-density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured after sodium phosphotungstate/magnesium chloride precipitation (Boehringer Mannheim). Plasma low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated with the Friedewald equation. Plasma glucose was measured using the standard glucose hexokinase method (DuPont Dimension, Brussels, Belgium). Plasma insulin was measured by radioimmunoassay (Medgenix Diagnostics, Brussels, Belgium).

2.3. Genotyping

The *FTO* rs9939609 polymorphism was genotyped with a restriction fragment length polymorphism–based method. The 105–base pair polymerase chain reaction product was obtained using the following primers: 5′-GGT TCC TTG

CGA CTG CTG TGA AAT T-3' and 5'-GCT TTT ATG CTC TCC CAC TC-3'. The forward primer created a forced restriction site for *ApoI*. The T allele of rs399609 was cut by *ApoI* into 2 fragments of 85 and 20 base pairs, whereas the A allele was not cut. Genotyping success rate was 98.4%. Genotypes for rs9939609 were available for 1149, 1049, and 1169 subjects in MONICA Lille, Strasbourg, and Toulouse, respectively.

2.4. Statistical analyses

Analyses were performed with the SAS statistical software release 8 (SAS Institute, Cary, NC). The deviation from the Hardy-Weinberg equilibrium was tested using the χ^2 test (1 *df*). Pearson χ^2 tests were used to compare genotype and allele distributions between groups. Heterogeneity among centers was assessed with the Breslow-Day test. We calculated the association between *FTO* genotypes and risk of obesity or T2D (ORs and 95% confidence intervals) using unconditional logistical regression. Comparison of means among genotype groups was tested using an additive model. Confounding variables were age, sex, physical activity level, smoking habit, alcohol consumption, and center \pm BMI. Subjects treated with cholesterol-lowering drugs, oral antidiabetic drugs, insulin, or blood pressure-lowering therapy ($n = 801$) were excluded when considering quantitative biological variables.

3. Results

The frequencies of the TT, TA, and AA genotypes of rs9939609 were 0.33, 0.49, and 0.18 in MONICA Strasbourg; 0.31, 0.53, and 0.16 in MONICA Toulouse; and 0.33, 0.50, and 0.17 in MONICA Lille, respectively ($P =$

.32 for the comparison between centers). The genotypic distribution did not differ from the expected values of the Hardy-Weinberg equilibrium either in MONICA Lille ($P = .34$) or in MONICA Strasbourg ($P = .99$). The distribution of rs9939609 did not respect the Hardy-Weinberg equilibrium in MONICA Toulouse ($P = .009$), although the minor allele frequency of rs9939609 was similar in Toulouse as in the 2 other centers (0.43, 0.43, and 0.42 in MONICA Strasbourg, Toulouse, and Lille, respectively). The mean BMI was lower in subjects from the Toulouse center compared with the Strasbourg and Lille centers (25.5 ± 4.2 vs 27.0 ± 4.6 and 26.6 ± 5.0 kg/m², respectively, $P < .0001$), and the Hardy-Weinberg equilibrium was respected in the Toulouse center when considering the group of lean subjects ($P = .16$).

We evaluated the association between rs9939609 and anthropometric (BMI, body weight, waist circumference), biochemical, and clinical variables (plasma glucose, insulin, lipids, and blood pressure) in the MONICA Study (Table 1). The A allele of rs9939609 was significantly associated with higher body weight (P trend = .0009), waist circumference (P trend = .001), hip circumference (P trend = .02), waist-hip ratio (P trend = .02), and BMI (P trend = .005) in an A allele dose-dependent manner (eg, $+0.3$ kg/m² per A allele for BMI). These associations persisted for all parameters except waist-hip ratio after adjustment for age, sex, alcohol consumption, smoking habit, physical activity level, and center but became nonsignificant after further adjustment for BMI (Table 1). The associations between rs9939609 and the anthropometric measurements were similar whatever the level of insulin resistance of the subjects (assessed using tertiles of HOMA-IR) (data not shown). The A allele was also significantly associated with higher plasma insulin levels (P trend = .05), higher insulin resistance (HOMA index) (P trend = .03), and higher systolic blood pressure

Table 1

Association between the *FTO* rs9939609 SNP and anthropometric and biochemical variables in the French MONICA Study

	TT 1095	TA 1702	AA 570	Crude <i>P</i> trend	Adjusted ^a <i>P</i> trend	Adjusted ^a (including BMI) <i>P</i> trend
Weight, kg	72.9 \pm 14.4	73.8 \pm 15.4	75.5 \pm 14.9	.0009	.009	.71
Waist, cm	89.3 \pm 13.2	90.3 \pm 13.8	91.6 \pm 13.5	.001	.006	.83
Hip, cm	101.1 \pm 9.4	101.7 \pm 9.8	102.3 \pm 9.6	.02	.004	.45
Waist-hip ratio	0.88 \pm 0.10	0.89 \pm 0.09	0.89 \pm 0.09	.02	.28	.67
BMI, kg/m ²	26.1 \pm 4.5	26.4 \pm 4.7	26.8 \pm 4.7	.005	.005	–
	851	1276	439			
Insulin ^b , μ U/mL	10.49 \pm 6.58	10.58 \pm 9.70	11.31 \pm 10.09	.05	.055	.32
Glucose ^b , mmol/L	5.32 \pm 0.81	5.34 \pm 1.13	5.44 \pm 1.06	.06	.29	.56
HOMA-IR ^b	2.49 \pm 1.77	2.57 \pm 3.00	2.74 \pm 2.35	.03	.05	.30
Triglycerides ^b , mmol/L	1.24 \pm 0.98	1.23 \pm 1.07	1.37 \pm 2.11	.48	.90	.37
Cholesterol, mmol/L	5.85 \pm 1.00	5.86 \pm 1.08	5.82 \pm 1.02	.69	.51	.49
HDL cholesterol, mmol/L	1.50 \pm 0.43	1.51 \pm 0.47	1.47 \pm 0.44	.42	.70	.26
LDL cholesterol, mmol/L	3.82 \pm 0.96	3.83 \pm 1.02	3.81 \pm 0.98	.93	.48	.46
SBP, mm Hg	128.3 \pm 17.5	128.4 \pm 16.6	131.4 \pm 18.9	.007	.03	.08
DBP, mm Hg	80.8 \pm 11.4	80.9 \pm 10.8	82.1 \pm 11.5	.08	.15	.40

Data are means \pm SD. Subjects treated with cholesterol-lowering drugs, oral antidiabetic drugs, insulin, or blood pressure-lowering therapy were excluded when considering biological variables. SBP indicates systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure.

^a P adjusted for age, sex, alcohol consumption, smoking habit, physical activity level, and center.

^b P values were calculated on log-transformed variables to obtain normal distribution.

(P trend = .007); but these associations disappeared after adjustment for BMI. No significant association could be found between rs9939609 and fasting plasma glucose, total cholesterol, LDL and HDL cholesterol, or triglyceride levels.

We next evaluated the association between rs9939609 and obesity risk in the MONICA Study. There was no detectable heterogeneity among centers ($P = .48$). The overall genotype distribution of rs9939609 differed between lean, overweight, and obese subjects (P trend = .005) (Table 2). The crude OR [95% confidence interval] of obesity (BMI ≥ 30 kg/m²) for A allele carriers was 1.25 [1.03–1.52] ($P = .024$) and was 1.29 [1.06–1.58] ($P = .01$) after adjustment for confounders. The adjusted OR of obesity was 1.46 [1.12–1.90] ($P = .005$) in homozygous AA subjects compared with TT subjects. Physical activity level had no influence on the association, as the adjusted ORs of being obese for A allele carriers were 1.28 [0.92–1.81] or 1.30 [1.02–1.66] in subjects with or without physical activity, respectively. There was no significant interaction with sex ($P = .60$), and the association with the risk of obesity was similar in both men and women (OR = 1.32 [0.99–1.75] and OR = 1.25 [0.95–1.66] in men and women, respectively).

Finally, we evaluated the association between rs9939609 and the risk of T2D. We compared the genotype distribution of rs9939609 among subjects with normal fasting glycemia ($n = 2601$), raised fasting glycemia ($n = 261$), or T2D ($n = 283$) ($P = .97$ for the test of heterogeneity between centers) (Table 2). The genotype distribution was not significantly different between the 3 subject groups (P trend = .08). The adjusted OR of T2D for A allele carriers was 1.06 [0.81–1.39] ($P = .67$ compared with TT subjects). Only AA homozygous subjects had a significantly higher risk of T2D than T allele bearers (crude OR = 1.48 [1.10–1.99], $P = .01$ and OR = 1.45 [1.05–1.99], $P = .02$ after adjustment for age, sex, BMI, alcohol consumption, smoking habit, physical activity level, and center).

4. Discussion

In our study, we confirmed the association between the *FTO* rs9939609 polymorphism and a higher risk of obesity in the French MONICA Study. The frequency of the A allele

of rs9939609 was 0.42 in our sample, consistent with previous reports [3,5,6]. The A allele was associated with a 30% higher risk of obesity. This association was homogenous between sexes. Moreover, the A allele of rs9939609 was significantly associated with higher BMI, in an A allele dose-dependent manner (BMI ~ 0.3 kg/m² per A allele), in a magnitude similar as previously described studies (0.2–0.4 kg/m² per A allele) [5,6,11]. It was also associated with higher waist and hip circumferences but not with higher waist-hip ratio, suggesting that fat tended to accumulate in all depots in A allele carriers. Andreassen et al [11] showed that physical inactivity accentuated the deleterious effect of *FTO* on fat mass accumulation in Danes; but we could not replicate this finding in the French MONICA Study, although physical activity was self-reported in both studies. Other studies using direct measures of physical activity are needed to evaluate this particular point.

It has been shown that AA subjects had lower whole-body insulin sensitivity than T allele carriers and that a low insulin sensitivity index enhanced the deleterious genotype effect on BMI levels [11]. Like others [8,11,13], we detected significant associations between rs9939609 and insulin-related variables (plasma insulin levels and insulin resistance index) as well as systolic blood pressure values; but these associations were purely the reflection of the effect of *FTO* on BMI, as they became nonsignificant after adjustment for BMI. Moreover, the effect of the rs9939609 A allele on anthropometric phenotypes was similar whatever the tertile of insulin resistance.

FTO is located on chromosome 16q12.2 in humans. It is expressed in many tissues such as adipose tissue, brain, liver, skeletal, β -cells, and muscle [5,6]. *Fto* is expressed in hypothalamic nuclei governing energy balance and is regulated by fasting and feeding in mice [20]. It has a role in nucleic acid demethylation [20], but more studies are needed to understand the link between nucleic acid methylation status and fat mass regulation. In addition, it has been shown that the A allele of rs9939609 is associated with lower in vitro basal unstimulated adipocyte glycerol release and increased in vivo lipolytic activity in women, suggesting that *FTO* may participate, at least in part, in the regulation of body fat mass through lipolysis [21].

Finally, regarding T2D, only the *FTO* homozygous AA genotype was associated with a 48% higher risk of T2D in the French MONICA Study. The association with T2D was seen only under a recessive model, but the relatively small number of subjects with T2D in the sample ($n = 283$) might explain this outcome. This risk was in accordance with 2 previous studies (OR ~ 1.25 in the United Kingdom Wellcome Trust Case-Control Consortium collection and OR ~ 1.50 in Finns) [3,4]. However, unlike the data presented by Frayling et al [5] or others, the present association with T2D persisted after adjustment for BMI (risk still increased by 45%) or waist circumference (data not shown), meaning that the present association with T2D was not purely the reflection of the association with BMI in our

Table 2

Association between the *FTO* rs9939609 SNP and overweight, obesity, or T2D in the French MONICA Study

	TT	TA	AA	P trend
BMI <25 (1460)	491 (0.34)	746 (0.51)	223 (0.15)	.005
25 \leq BMI < 30 (1309)	433 (0.33)	649 (0.50)	227 (0.17)	
BMI ≥ 30 (598)	171 (0.29)	307 (0.51)	120 (0.20)	
NFG (2601)	844 (0.33)	1327 (0.51)	430 (0.16)	.08
RFG (261)	80 (0.31)	134 (0.51)	47 (0.18)	
T2D (283)	89 (0.31)	130 (0.46)	64 (0.23)	

Data are number (frequency). Crude P values are presented. NFG indicates normal fasting glycemia; RFG, raised fasting glycemia.

sample. One can assume that *FTO* polymorphisms could also be associated with diabetes-related phenotypes other than fat mass. Recently, Fisher and colleagues [22] showed that the A allele of rs9939609 was associated with higher plasma C-reactive protein levels in 2415 participants, independently of BMI or waist-hip ratio. This *FTO* polymorphism may enhance the inflammatory state of adipose tissue and may increase systemic inflammation, independently of the degree of adiposity. As C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of T2D [23] and cardiovascular diseases, *FTO* polymorphisms might contribute partly to the development of increased T2D and cardiovascular risk, independently of obesity.

In conclusion, our study confirmed the role of the genetic variability in *FTO* in the modulation of the risk of obesity and T2D in a large French population sample.

Acknowledgment

The MONICA population surveys were supported by unrestricted grants from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, ONIVINS, Parke-Davies Laboratory, the Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale, Groupe Fournier, the Réseau National de Santé Publique, the Direction Générale de la Santé, the Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale, the Institut Pasteur de Lille, the Unité d'Évaluation du Centre Hospitalier et Universitaire de Lille. V Legry is supported by the Institut Pasteur de Lille.

References

- [1] Hossain P, Kowar B, El Nahas M. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. *N Engl J Med* 2007;356:213-5.
- [2] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004;27:1047-53.
- [3] Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 2007;316:1341-5.
- [4] The Wellcome Trust Case-Control Consortium. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 2007;447:661-78.
- [5] Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007;316:889-94.
- [6] Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007;39:724-6.
- [7] Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007;3:e115.
- [8] Do R, Bailey SD, Desbiens K, et al. Genetic variants of *FTO* influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 2008;57:1147-50.
- [9] Peeters A, Beckers S, Verrijken A, et al. Variants in the *FTO* gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab* 2008;93:481-4.
- [10] Grant SF, Li M, Bradfield JP, et al. Association analysis of the *FTO* gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PLoS ONE* 2008;3:e1746.
- [11] Andreassen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, et al. Low physical activity accentuates the effect of the *FTO* rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 2008;57:95-101.
- [12] Lopez-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M, et al. The association between the *FTO* gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1501-5.
- [13] Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V, et al. Major gender difference in association of *FTO* gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:476-82.
- [14] Li H, Wu Y, Loos RJ, et al. Variants in the fat mass- and obesity-associated (*FTO*) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* 2008;57:264-8.
- [15] Chang YC, Chang TJ, Jiang YD, et al. Association study of the genetic polymorphisms of the transcription factor 7-like 2 (*TCF7L2*) gene and type 2 diabetes in the Chinese population. *Diabetes* 2007;56:2631-7.
- [16] Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of cardiovascular disease. The World Health Organization MONICA Project. *Int J Epidemiol* 1994;23:505-16.
- [17] Dallongeville J, Delcroix AG, Wagner A, et al. The APOA4 Thr347->Ser347 polymorphism is not a major risk factor of obesity. *Obes Res* 2005;13:2132-8.
- [18] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9.
- [19] Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183-97.
- [20] Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007;318:1469-72.
- [21] Wahlen K, Sjolín E, Hoffstedt J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene *FTO* is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* 2008;49:607-11.
- [22] Fisher E, Schulze MB, Stefan N, et al. Association of the *FTO* rs9939609 single nucleotide polymorphism with C-reactive protein levels. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:330-4.
- [23] Freeman DJ, Norrie J, Caslake MJ, et al. C-reactive protein is an independent predictor of risk for the development of diabetes in the West of Scotland Coronary Prevention Study. *Diabetes* 2002;51:1596-600.

I.2. Synthèse des résultats

Dans notre étude, les individus porteurs de l'allèle A du SNP rs9939609 (soit 67% de l'échantillon) présentent une masse corporelle plus élevée, des tours de taille et de hanches plus importants, un RTH et un IMC augmentés, de manière allèle-dose dépendante. Ces individus ont ainsi un risque accru d'obésité par rapport aux individus TT (OR ajusté=1,29). L'allèle A est également associé à une augmentation de la concentration plasmatique en insuline, de l'indice d'insulinorésistance (HOMA-IR) et de la PAS, mais ces effets sont dus entièrement à l'impact de cet allèle sur l'adiposité. Enfin, les individus homozygotes pour l'allèle A présentent un risque augmenté de DT2, indépendamment de l'effet sur l'IMC, par rapport aux individus TT et TA (OR ajusté=1,45).

I.3. Discussion

Nous avons donc analysé l'impact du polymorphisme rs9939609 dans l'étude MONICA française et avons confirmé l'association entre l'allèle A et l'augmentation de l'IMC et d'autres variables anthropométriques (tour de taille, RTH...) et le risque d'obésité. Notons que l'ampleur de l'effet que nous avons observé, notamment sur l'IMC (+~0,3 kg/m²) et sur le risque d'obésité (+29%), est similaire à celui décrit dans de précédentes études (0,2-0,4 kg/m² pour l'IMC et +30-50% pour le risque d'obésité) [Frayling *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007a]. De même, nous avons retrouvé l'association du SNP rs9939609 avec le risque de DT2 dans notre étude (+48%), avec un effet similaire aux études précédentes (+25-50% [Scott *et al.* 2007; 2007b]), mais à la différence de ces études, l'association avec le DT2 que nous avons observée résiste à l'ajustement sur l'IMC ou le tour de taille, suggérant que cette association ne serait pas purement et simplement le reflet de l'association avec l'adiposité. En effet, il semble que des polymorphismes de *FTO* puissent être associés à d'autres phénotypes liés au DT2 que l'adiposité. Une récente étude (n=2415) a décrit une association entre le SNP rs9939609 et des taux plasmatiques de protéine C-réactive plus élevés, indépendamment de l'IMC ou du tour de taille, suggérant que ce polymorphisme pourrait entraîner un état inflammatoire du TA indépendamment du niveau d'adiposité [Fisher *et al.* 2008].

Nous avons par ailleurs évalué l'impact de ce polymorphisme sur le risque de syndrome métabolique dans l'étude MONICA française. En considérant les définitions de l'AHA, de l'OMS, de l'EGIR ou de l>IDF, nous n'avons pas détecté d'association significative entre ce polymorphisme et le risque de syndrome métabolique, quelque soit le modèle génétique testé (données non présentées dans l'article). En fait, il a été décrit que le SNP rs9939609 est associé au risque de syndrome métabolique dans une étude de 16 143

participants, mais l'effet est trop faible (OR=1,08 [1,02-1,14], $p=0,0065$) pour être détectable dans notre étude (n=3367) [Sjogren *et al.* 2008].

Même si le rôle de FTO dans l'homéostasie énergétique a été montré, notamment chez la souris KO *Fto*^{-/-} [Fischer *et al.* 2009], les mécanismes impliqués sont encore actuellement méconnus. La protéine FTO a une localisation nucléaire et catalyse la déméthylation des acides nucléiques [Gerken *et al.* 2007]. Mais le lien entre le statut de méthylation des acides nucléiques et la régulation de la balance énergétique reste encore à établir. Par ailleurs, les mécanismes par lesquels des polymorphismes génétiques de FTO pourraient affecter la régulation de l'adiposité restent également à élucider. Le SNP rs9939609 est situé dans le 1^{er} intron du gène FTO et représente un tag-SNP pour un grand nombre de SNPs situés dans le même intron (HapMap). De par leur localisation, ces SNPs pourraient moduler le niveau d'expression du gène, notamment au niveau transcriptionnel. Aujourd'hui, le SNP causal expliquant les associations avec l'adiposité n'a pas encore été identifié. Il a été décrit que l'allèle A du SNP rs9939609 est associé à une diminution de l'activité lipolytique du TA *in vitro* et *in vivo*, suggérant un rôle de FTO dans la régulation de la lipolyse [Wahlen *et al.* 2008]. Cependant, dans cette étude, le SNP rs9939609 n'est pas associé à une différence d'expression de FTO au niveau ARNm. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour lever le voile sur les fonctions de FTO, et sur l'impact des polymorphismes du 1^{er} intron sur l'expression de FTO, en particulier au niveau protéique.

Récemment, un variant génétique rare dans le gène FTO, R316Q (MAF<0,0003), a été décrit comme responsable d'un syndrome, à hérédité autosomale et récessive, caractérisé par une létalité précoce (1 à 30 mois après la naissance) et de nombreuses malformations (retard de croissance, microcéphalie, retard des fonctions psychomotrices, défauts de fonctionnement du cerveau, dimorphisme facial et malformations cardiaques) [Boissel *et al.* 2009]. Il a été montré que ce variant inhibe l'activité déméthylase de FTO *in vitro*. De plus, des fibroblastes en culture, issus de ces patients, présentent une altération de la prolifération et un phénotype sénescence. Ces résultats suggèrent que FTO est essentiel dans le développement du système nerveux central et du système cardiovasculaire chez l'homme.

II. Etude du gène *NR1H3* codant LXR α

II.1. Contexte de l'étude

LXR α est un récepteur nucléaire activé par des dérivés du cholestérol. Il est codé par le gène *NR1H3* et est exprimé abondamment dans le foie, le tissu adipeux, l'intestin, la rate, les reins, les poumons et les macrophages [Apfel *et al.* 1994; Auboeuf *et al.* 1997; Willy *et al.* 1995]. LXR α régule l'expression de nombreux gènes en formant un hétérodimère avec RXR et en se fixant à une séquence spécifique, le LXRE, située dans le promoteur de ses gènes cibles [Willy *et al.* 1995]. Ses fonctions sont revues en détail dans les chapitres V.2.a. et V.2.b. de l'Introduction (pages 58-64). Brièvement, LXR α joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol notamment en stimulant le transport inverse du cholestérol [Baranowski 2008]. En particulier, LXR α induit l'expression du gène ABCA1, permettant ainsi l'efflux du cholestérol des macrophages. De plus, LXR α stimule la lipogenèse hépatique. D'autre part, l'activation de LXR α diminue la glycémie et améliore la sensibilité à l'insuline dans plusieurs modèles animaux diabétiques [Baranowski 2008]. Enfin, LXR α est impliqué dans le contrôle adrénérgique du RAAS et pourrait jouer un rôle dans la biologie vasculaire [Jamroz-Wisniewska *et al.* 2007]. LXR α est donc impliqué dans les 5 principales voies métaboliques participant au développement du syndrome métabolique, et constitue ainsi un excellent gène candidat.

ORIGINAL ARTICLE

Association between liver X receptor α gene polymorphisms and risk of metabolic syndrome in French populations

V Legry¹, D Cotel¹, J Ferrières², G Chinetti³, T Deroide¹, B Staels³, P Amouyel¹ and A Meirhaeghe¹

¹INSERM, U744, Lille; Institut Pasteur de Lille, Lille; Université de Lille 2, UMR-S744, Lille, France; ²INSERM, U558, Toulouse; Faculté de Médecine, Toulouse, France and ³Institut Pasteur de Lille, Département d'Athérosclérose, Lille; INSERM, U545, Lille; Université de Lille 2, Faculté de Pharmacie et Faculté de Médecine, Lille, France

Context: The metabolic syndrome is a complex and multifactorial disorder often associated with type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases. The liver X receptor α (NR1H3) plays numerous roles in metabolic pathways involved in metabolic syndrome.

Objective: In the search for susceptibility genes to metabolic syndrome, we hypothesized that common genetic variation in NR1H3 gene influences metabolic syndrome susceptibility.

Design: Two large French population-based studies ($n=1130$ and 1160) including overall 664 individuals with and 1626 individuals without metabolic syndrome were genotyped for three polymorphisms (rs12221497, rs11039155 and rs2279239) of NR1H3.

Results: We found that the $-6A$ allele of rs11039155 was consistently associated with a 30% reduction in risk of metabolic syndrome in the two independent population samples (adjusted OR (95% CI) = 0.68 (0.53–0.86), $P=0.001$ for the combined sample). Moreover, it was associated with an increase in plasma HDL-cholesterol concentrations ($P=0.02$ for the combined sample). Neither rs12221497 nor rs11039155, both polymorphisms located in the 5' region of NR1H3, had significant influence on NR1H3 and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene expression in primary human macrophages.

Conclusions: These results suggest that NR1H3 plays an important role in the HDL-cholesterol metabolism and in the genetic susceptibility to metabolic syndrome.

International Journal of Obesity (2008) 32, 421–428; doi:10.1038/sj.ijo.0803705; published online 22 January 2008

Keywords: metabolic syndrome; polymorphism; NR1H3; HDL-cholesterol; association study; LXRA

Introduction

The concept of metabolic syndrome, according to the 2005 National Cholesterol Education Program (NCEP) III guidelines,¹ corresponds to the clustering of three among the five following factors in individuals: abdominal obesity, hyperglycemia, hypertriglyceridemia, hypoalphalipoproteinemia (low HDL-cholesterol levels) and arterial hypertension. Detecting individuals with a metabolic syndrome allows the discovery of individuals with a high risk of developing cardiovascular diseases. The metabolic syndrome is a complex and multifactorial disorder as its origin is

due to the interaction between genetic susceptibility and environmental factors. Moreover, the metabolic pathways implicated in this syndrome are numerous and interact mutually. As an example, obesity favors dyslipidemia, insulin resistance and hypertension whereas insulin resistance often leads to gain weight. In our laboratory, we already identified several genetic susceptibility factors to metabolic syndrome^{2,3} but many are still to discover. The identification of genes associated with metabolic syndrome is important to understand better the development of this disorder.

Liver X receptor α (NR1H3, LXRA) is a nuclear receptor expressed in liver, spleen, kidney, adipose tissue, small intestine and macrophages⁴ encoded by a gene located on 11p11.2. After its activation by cholesterol-derived oxysterols and heterodimerization with the retinoid X receptor, NR1H3 regulates the transcription of many target genes involved in cholesterol homeostasis, lipoprotein

Correspondence: Dr A Meirhaeghe, INSERM U744, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, BP 245, Lille Cedex 59019, France.

E-mail: aline.meirhaeghe-hurez@pasteur-lille.fr

Received 5 February 2007; revised 3 June 2007; accepted 25 June 2007; published online 22 January 2008

metabolism and lipogenesis. Among them, one can cite the genes encoding the ATP-binding cassette transporters and the apolipoprotein CI, CII, CIV and E, promoting the efflux and the reverse cholesterol transport. Genes encoding PLTP (phospholipid transfer protein)⁵ and CETP (cholesterol ester transfer protein)⁶ are also activated by NR1H3, which explains the role for NR1H3 in lipoprotein remodeling. Moreover, in liver, NR1H3 increases the expression of SREBP-1c (sterol regulatory element binding protein 1c), FAS (fatty acid synthase) and PLTP, leading to *de novo* lipogenesis. Thus, NR1H3 plays numerous roles in metabolic pathways involved in metabolic syndrome and, therefore, it represents an excellent candidate gene for metabolic syndrome susceptibility. Little is known about the pathophysiological role of NR1H3 in humans. Although NR1H3 is not located in a susceptibility locus for the metabolic syndrome or related traits from genetic linkage analysis according to the 2005 Obesity Gene Map,⁷ one study found significant association between a NR1H3 polymorphism and body mass index in Swedish women.⁸ Therefore, we performed a large-scale association study of NR1H3 in two large French population-based studies ($n = 1130$ and 1160).

Methods

Subjects

Participants were recruited in the framework of the WHO-MONICA population survey conducted from 1995 to 1997 in different regions of France: the Urban Community of Lille in the North (Lille, $n = 1195$) and the Haute-Garonne county in the South (Toulouse, $n = 1182$). The sample included individuals aged 35–65 years randomly selected on electoral rolls after stratification by town size, gender and age to obtain 200 participants for each gender and 10-year age group (WHO-MONICA Project protocol).^{9,10} The Ethical Committee of each center approved the protocol. After signing an informed consent, participants were administered a standard questionnaire and physical measurements were made by a specially trained nurse. The level of physical activity during leisure time was categorized as: no physical activity, light (light physical activity almost every week), intense (at least 20 min of intense physical activity more than once a week). Current cigarette smokers were defined as individuals reporting at least one cigarette per day. Total alcohol intake was expressed as the sum of ml alcohol per week from wine, beer, cider and spirits. The anthropometric measurements included body weight (rounded to the nearest even decimal), waist (at a level midway between lower rib margin and iliac crest; to the nearest 0.5 cm) and were taken on individuals in light clothing without shoes. Body mass index was calculated according to the Quetelet equation. Blood pressure was measured on the right arm, with the subject in a sitting position and after a minimum 5-min rest, using a standard mercury sphygmomanometer. The mean value of two consecutive blood pressure readings was taken

Table 1 Characteristics of subjects with (MetS) and without (No MetS) metabolic syndrome in Lille and Toulouse population samples

	Lille		Toulouse	
	No MetS (n = 767)	MetS (n = 363)	No MetS (n = 859)	MetS (n = 301)
Age, years	50 ± 8	54 ± 8 ^a	49 ± 9	54 ± 8 ^a
Men, n (%)	371 (47)	215 (57) ^a	422 (48)	192 (62) ^a
Waist girth, cm	85.4 ± 11.3	102.6 ± 11.1 ^a	83.2 ± 10.6	98.7 ± 11.7 ^a
BMI, kg/m ²	24.8 ± 3.8	30.4 ± 5.1 ^a	24.2 ± 3.1	29.2 ± 4.5 ^a
Triglycerides, mmol/l	1.07 ± 0.64	2.15 ± 1.63 ^a	1.00 ± 0.52	1.72 ± 0.99 ^a
HDL-cholesterol, mmol/l	1.62 ± 0.46	1.23 ± 0.39 ^a	1.55 ± 0.42	1.22 ± 0.39 ^a
Glucose, mmol/l	5.12 ± 0.73	6.47 ± 2.24 ^a	5.53 ± 1.15	6.24 ± 1.47 ^a
SBP, mm Hg	128 ± 18	145 ± 18 ^a	127 ± 17	142 ± 17 ^a
DBP, mm Hg	80 ± 11	89 ± 11 ^a	78 ± 10	85 ± 10 ^a

Abbreviations: BMI, body mass index; DBP, diastolic blood pressure; HDL, high-density lipoprotein; SBP, systolic blood pressure. ^a $P < 0.0001$ for the difference between subjects with or without metabolic syndrome.

into account. Individuals with metabolic syndrome ($n = 363$ and 301 in Lille and Toulouse studies respectively) were identified on the basis of the 2005 National Cholesterol Education Program (NCEP) III guidelines.¹ See Table 1 for the clinical characteristics of the subjects by center. From the 2290 individuals included in the MONICA study, 197 individuals had type 2 diabetes on the basis of a medical diagnosis and/or fasting glycaemia ≥ 7 mmol/l (1.26 g/l) and/or on the existence of a specific treatment or diet.¹¹

Laboratory methods

A blood sample of 20 ml was drawn on disodium ethylenediaminetetraacetic acid after the subjects had fasted for at least 10 h. Lipid and lipoprotein levels were all measured in the Purpan Hospital Biochemical Laboratory (Toulouse). The quality of biological measures was assessed within the framework of the MONICA Project. Plasma glucose was measured by a standard glucose hexokinase method (DuPont Dimension, Brussels, Belgium). Plasma insulin was measured by radio-immunoassay (Medgenix Diagnostics, Brussels, Belgium). Plasma total cholesterol and triglyceride levels were measured by enzymatic methods (DuPont Dimension). Plasma high-density lipoprotein (HDL) cholesterol was measured after sodium phosphotungstate/magnesium chloride precipitation (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Plasma low-density lipoprotein cholesterol was calculated with the Friedewald equation.

DNA isolation and genotyping

Genomic DNA was extracted from white blood cells isolated from 20 ml of whole blood using a commercially available DNA isolation kit (DNA extraction kit; Stratagene, La Jolla, CA, USA). The typing of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was done by the restriction fragment length polymorphism method (see Supplementary Information). Genotype data

were available for 1130 and 1160 subjects in the Lille and Toulouse population studies respectively. For each SNP, the PCR products had internal restriction sites (except for rs1449627) to avoid genotyping errors. Success rate was above 98% for all SNPs. All SNPs were in the Hardy–Weinberg equilibrium in the two population studies (all $P > 0.05$). Pairwise linkage disequilibrium estimates were calculated using GOLD.¹²

Cell culture

Human mononuclear cells were isolated from healthy blood donors by Ficoll density gradient centrifugation. Mature monocyte-derived macrophages were used after 10 days of culture in RPMI-1640 medium supplemented with 10% human serum.

RNA extraction and analysis

Total cellular RNA isolated from human macrophages treated or not for 24 h with the LXR ligand T0901317 (1 μmol/l) using Trizol (Invitrogen), was reverse-transcribed using random hexameric primers and multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). cDNAs were quantified by quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) on an MX4000 apparatus (Stratagene) using brilliant SYBR green (Stratagene) and specific primers: AGGGCTGCAAGG GATTCTTCC (forward), TCTGACAGCACACTCCTCCC (reverse) for NR1H3, AAGGTCTTGTTACCTCAGCCATGAC (forward), GTGAACAGCTCCAGCTCCTCCAC (reverse) for ABCA1 and GCATACGGGTCCTGGCATCTTGTC (forward), ATGGTGATCTTCTTGCTGGTCTGC (reverse) for cyclophilin. NR1H3 and ABCA1 mRNA levels were subsequently normalized to those of cyclophilin.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with the SAS statistical software, version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Statistical significance was considered when $P \leq 0.05$. Reported P -values are nominal. P -values for the comparison of the percentage of men (in Table 1) or genotypes (in Table 2) between subject groups were assessed using the χ^2 test. Multivariate logistic regression was used to calculate the odds ratio. Comparison of differences for quantitative variables among genotype groups were performed using a general linear model (proc GLM) in the combined Lille and Toulouse sample. A dominant model was used as the number of homozygous subjects for the minor allele was low. Power calculations indicated that a difference of 2 cm, 0.2, 0.06, 0.2 mmol/l, 3 and 2 mm Hg could be detected between genotype groups for waist circumference, triglycerides, HDL-cholesterol, glucose, systolic and diastolic blood pressure, respectively. Otherwise indicated, adjustment variables were age, gender, smoking habit, alcohol consumption and physical activity and further adjusted for center in the combined sample. Haplotype analyses were based on the maximum likelihood model described¹³ linked to the SEM algorithm¹⁴ and performed using the software developed by INSERM U525, Paris, France (<http://ecgene.net/genecanvas>). In Q-PCR analysis, statistical differences between groups were analyzed by Student's t - and ANOVA tests.

Results

NR1H3 SNPs were extracted from the NCBI dbSNP database. We selected 7 NR1H3 SNPs according to their minor allele frequency (above 8%) and potential functional consequence: rs12221497 (–115 G > A), rs11039155 (–6 G > A), rs2279239 (intron2 T > C), rs2279238 (exon3 C > T), rs7120118 (intron6 T > C), rs1449626 (intergenic region + 512 A > C) and rs1449627 (intergenic region + 737 T > G) (according to the NM_005693.1 sequence). To build the linkage disequilibrium map, a hundred individuals randomly selected from the MONICA Lille population were genotyped for these seven SNPs. The frequencies of the minor alleles were 13, 11, 27, 12, 26, 14 and 23% for the SNPs rs12221497, rs11039155,

Table 2 Genotype distribution for the NR1H3 rs12221497, rs11039155 and rs2279239 SNPs in subjects with (MetS) or without (No MetS) metabolic syndrome by MONICA population studies

	Rs12221497 (–115G > A)				Rs11039155 (–6G > A)				Rs2279239 (intron2 T > C)			
	GG	GA	AA	P (crude)	GG	GA	AA	P (crude)	TT	TC	CC	P (crude)
<i>Lille</i>												
No MetS (n = 767)	589 (76.8)	168 (21.9)	10 (1.3)	0.04	570 (74.3)	182 (23.7)	15 (2.0)	0.18	419 (54.6)	289 (37.7)	59 (7.7)	0.43
MetS (n = 363)	257 (70.8)	96 (26.5)	10 (2.7)		288 (79.3)	69 (19.0)	6 (1.7)		184 (50.7)	151 (41.6)	28 (7.7)	
Adjusted OR	1.44 [1.07–1.94] P = 0.02				0.66 [0.48–0.91] P = 0.01				1.12 [0.86–1.46] P = 0.39			
<i>Toulouse</i>												
No MetS (n = 859)	665 (77.4)	176 (20.5)	18 (2.1)	0.63	686 (79.9)	165 (19.2)	8 (0.9)	0.14	490 (57.0)	316 (36.8)	53 (6.2)	0.31
MetS (n = 301)	231 (76.8)	66 (21.9)	4 (1.3)		255 (84.7)	45 (15.0)	1 (0.3)		187 (62.1)	98 (32.6)	16 (5.3)	
Adjusted OR	1.15 [0.83–1.60] P = 0.41				0.70 [0.48–1.00] P = 0.05				0.86 [0.65–1.14] P = 0.28			

Abbreviations: OR, odds ratio; SNP, single nucleotide polymorphism. Data are n (%). OR: Odds Ratio using a dominant model, adjusted for age, gender, physical activity, smoking habit and alcohol consumption. [:] Values within square brackets show 95% confidence interval.

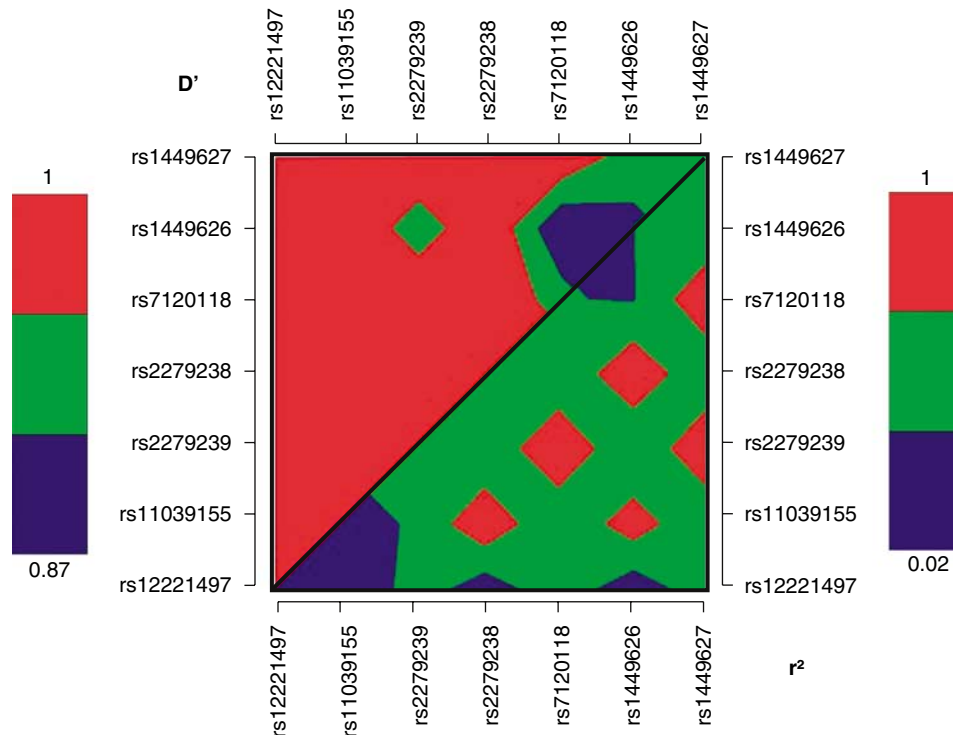


Figure 1 Linkage disequilibrium between 7 *NR1H3* polymorphisms. The D' is displayed on the left upper corner and the r^2 on the right lower corner.

rs2279239, rs2279238, rs7120118, rs1449626 and rs1449627, respectively. The linkage disequilibrium pattern across the SNPs was assessed using both D' and r^2 (Figure 1). We identified two haplotype blocks in which three SNPs were in complete and perfect linkage disequilibrium ($D' = +1$, $0.95 \leq r^2 \leq 1$) (block 1: rs11039155, rs2279238 and rs1449626; block 2: rs2279239, rs7120118 and rs1449627). These results were in accordance with the HapMap database, at least for the three SNPs described in HapMap (rs12221497, rs2279238 and rs7120118). The SNP rs12221497 was not in complete linkage disequilibrium with the other SNPs ($|D'| = 1$, $r^2 < 0.5$). Therefore, we typed the three SNPs rs12221497, rs11039155 and rs2279239, in the MONICA Lille and Toulouse studies ($n = 1130$ and 1160 respectively, comprising overall 664 individuals with metabolic syndrome) and assessed their impact on metabolic syndrome risk and related phenotypes.

In MONICA Lille ($n = 1130$), the frequencies of the *NR1H3* rs12221497 ($-115G > A$), rs11039155 ($-6G > A$) and rs2279239 (intron2 T > C) minor alleles were 13.4, 12.8 and 27.1%, respectively. We compared the genotype distribution of these three polymorphisms between individuals with ($n = 363$) and without ($n = 767$) metabolic syndrome. The $-115A$ allele frequency was higher in subjects with metabolic syndrome than in subjects without (Table 2). The adjusted odds ratio (OR) (95% CI) of metabolic syndrome was 1.44 (1.07–1.94), $P = 0.02$, for $-115A$ allele bearers. Similarly, the adjusted OR (95% CI) of metabolic

syndrome was 0.66 (0.48–0.91), $P = 0.01$, for $-6A$ allele bearers. No significant association could be detected between the intron2 T > C polymorphism and risk of metabolic syndrome.

In MONICA Toulouse ($n = 1160$), the frequencies of the *NR1H3* rs12221497 ($-115G > A$), rs11039155 ($-6G > A$) and rs2279239 (intron2 T > C) minor alleles were 12.3, 9.8 and 23.8%, respectively. There were 301 subjects with and 859 subjects without metabolic syndrome in this population sample. Neither the $-115G > A$ polymorphism nor the intron2 T > C polymorphism was significantly associated with risk of metabolic syndrome (Table 2). In contrast, the $-6G > A$ polymorphism was significantly associated with metabolic syndrome that is the adjusted OR of metabolic syndrome was 0.70 (0.48–1.00), $P = 0.05$, for $-6A$ allele bearers.

The ORs of metabolic syndrome for individuals carrying the $-6A$ allele of the rs11039155 SNP were homogenous between the two population studies (Breslow – Day test $P = 0.83$), allowing the pooling of the two samples. In the combined Lille and Toulouse population sample (664 subjects with and 1626 subjects without metabolic syndrome), the OR of metabolic syndrome for individuals carrying the $-6A$ allele was 0.76 (0.60–0.95), $P = 0.02$ (crude) and 0.68 (0.53–0.86), $P = 0.001$, after adjustment for covariables. This association between the $-6G > A$ polymorphism and risk of metabolic syndrome was homogenous in men and women: the adjusted OR of metabolic syndrome for individuals bearing the $-6A$ allele was 0.67 (0.49–0.92),

$P=0.012$, for men (398 men with and 781 men without metabolic syndrome) and 0.68 (0.47–0.99), $P=0.044$, for women (266 women with and 845 women without metabolic syndrome). Exclusion of subjects with type 2 diabetes ($n=197$) did not modify the association: the adjusted OR of metabolic syndrome for individuals bearing the $-6A$ allele was 0.65 (0.50–0.85), $P=0.0016$ in the combined Lille and Toulouse population sample.

To understand the present association between the *NR1H3* $-6G>A$ SNP and the risk of metabolic syndrome, we evaluated the impact of this SNP on the clinical variables related to metabolic syndrome (that is, waist circumference, blood pressure, plasma glucose, triglyceride and HDL-cholesterol levels) (Table 3). We used combined whole Lille and Toulouse samples as they are population-based studies. We detected significant associations between the $-6G>A$ polymorphism and plasma HDL-cholesterol concentrations; the $-6A$ allele being associated with higher HDL-cholesterol levels (1.47 ± 0.45 vs 1.53 ± 0.48 mmol/l in *GG* vs *GA+AA* subjects respectively, $P=0.007$ or $P=0.02$ after adjustment for age, gender, BMI, smoking habit, alcohol consumption, physical activity and center). This association was homogenous between population studies: 1.48 ± 0.46 vs 1.55 ± 0.50 mmol/l (adjusted $P=0.15$) and 1.45 ± 0.44 vs 1.50 ± 0.44 mmol/l (adjusted $P=0.06$) for *GG* vs *GA+AA* subjects, in Lille and Toulouse studies respectively.

We also performed haplotype analyses with the three *NR1H3* SNPs. We used the combined Lille and Toulouse sample to increase statistical power. Of the eight potential haplotypes defined by three SNPs, six inferred haplotypes were indeed observed in the sample.

Of these haplotypes, four occurred at frequencies $>1\%$ and accounted for 99.5% of the observed haplotypes. The frequencies for these four haplotypes are presented in Table 4. The statistical analyses confirmed the importance of rs11039155 in metabolic syndrome. Indeed, the *GAC* haplotype (corresponding to the rs2221497, rs11039155 and rs2279239 SNPs in this order) was significantly associated with a decreased risk of metabolic syndrome (adjusted OR=0.73 (0.58–0.91), $P=0.006$) when compared to the *GGT* reference haplotype (Table 4). No other haplotype was associated with metabolic syndrome risk.

To investigate a possible role of *NR1H3* $-6G>A$ and $-115G>A$ polymorphisms on the expression of *NR1H3* and *ABCA1*—a target gene of *NR1H3* involved in macrophage cholesterol efflux and HDL metabolism—Q-PCR analysis was performed on primary human macrophages treated or not with the LXR ligand T0901317 ($1 \mu\text{mol/l}$). *NR1H3* expression level was not significantly different between genotype groups in the basal state (Figure 2a) and T0901317 activated *NR1H3* expression similarly in all genotype groups (1.5-fold) (Figure 2b). Moreover, *ABCA1* gene expression was induced 10-fold by T0901317 in either subjects carrying the $-115GG/-6GG$ genotypes or in carriers of the $-115A$ allele, and 12-fold in carriers of the $-6A$ allele (Figure 3) (ns).

Discussion

In this study, we found a consistent association between the *NR1H3* $-6A$ allele of rs11039155 and a lower risk of

Table 3 Impact of the *NR1H3* rs11039155 SNP on the biological variables associated with metabolic syndrome in the combined Lille and Toulouse population studies

Rs11039155 ($-6G>A$) (n)	GG (1799)	GA (461)	AA (30)	P (GA+AA vs GG)	Adjusted P
Waist circumference (cm)	89.1 ± 13.6	89.1 ± 13.0	89.6 ± 13.1	0.98	0.22 ^a
Triglycerides, mmol/l ^c	1.34 ± 1.53	1.28 ± 1.05	1.39 ± 1.31	0.25	0.16 ^b
HDL-cholesterol, mmol/l	1.47 ± 0.45	1.53 ± 0.48	1.45 ± 0.44	0.007	0.02 ^b
Glucose, mmol/l ^c	5.64 ± 1.38	5.63 ± 1.55	5.38 ± 0.79	0.60	0.93 ^b
SBP, mm Hg	132.4 ± 18.8	132.1 ± 18.4	130.0 ± 16.9	0.59	0.20 ^b
DBP, mm Hg	81.4 ± 11.3	80.7 ± 10.8	81.9 ± 9.8	0.28	0.09 ^b

Abbreviations: DBP: diastolic blood pressure, HDL, high-density lipoprotein; SBP: systolic blood pressure. ^a P -value adjusted for age, gender, alcohol consumption, physical activity, smoking habit and center. ^b P -values adjusted for age, gender, BMI, alcohol consumption, physical activity, smoking habit and center. ^cData were log-transformed to obtain normal distributions.

Table 4 Haplotype analyses including the *NR1H3* rs2221497, rs11039155 and rs2279239 SNPs on metabolic syndrome in the combined Lille and Toulouse population studies

Haplotype	No MetS (n = 1626)	MetS (n = 664)	P (global effect)	OR (95% CI)	Adjusted P
GGT (%)	0.741	0.740		Reference	—
AGC (%)	0.122	0.140	$P=0.04$ (crude)	1.20 (0.98–1.47)	0.08
GAC (%)	0.118	0.094	$P=0.005$ (adjusted)	0.73 (0.58–0.91)	0.006
GCC (%)	0.016	0.020		1.17 (0.76–1.81)	0.47

Abbreviation: SNP, single nucleotide polymorphism. P -values were adjusted on age, gender, physical activity, alcohol consumption, smoking habit and center. Order of the SNPs in the haplotype analyses: rs2221497, rs11039155 and rs2279239. Only haplotypes with a frequency above 1% are represented.

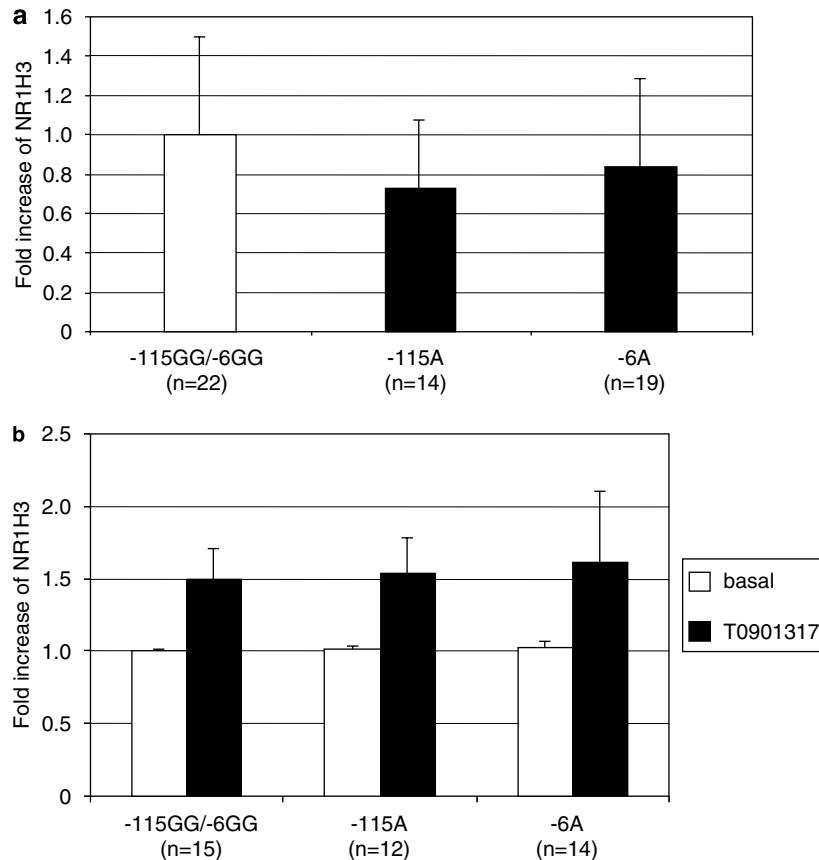


Figure 2 NR1H3 gene expression according to genotype groups for the $-115G>A$ and $-6G/A$ polymorphisms. Quantitative-PCR analysis of NR1H3 was performed on RNA isolated from primary human macrophages treated (b) or not (a) for 24 h with T0901317 ($1 \mu\text{mol/l}$). NR1H3 mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA. Expression level was set at 1 for $-115GG/-6GG$ subjects. Data with treatment were expressed relative to the levels in untreated cells set at 1. Results are expressed as mean \pm s.e.m. of triplicate determinations obtained for the indicated number of macrophage preparations.

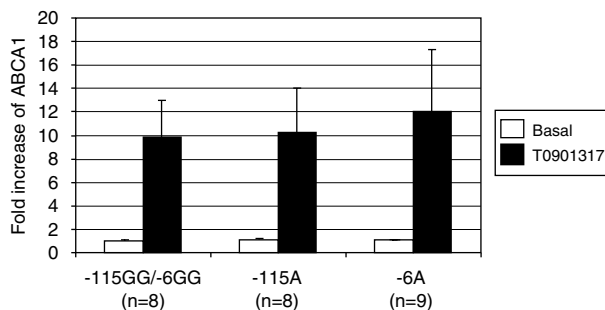


Figure 3 Induction of ABCA1 by T0901317 according to genotype groups for the $-115G>A$ and $-6G/A$ polymorphisms. Quantitative-PCR analysis of ABCA1 was performed on RNA isolated from primary human macrophages treated (black bars) or not (white bars) for 24 h with T0901317 ($1 \mu\text{mol/l}$). ABCA1 mRNA levels were normalized to cyclophilin mRNA and are expressed relative to the levels in untreated cells set at 1. Results are expressed as mean \pm s.e.m. of duplicate determinations obtained for the indicated number of macrophage preparations.

metabolic syndrome in two independent population samples. Similar results were found when using the International Diabetes Federation criteria of metabolic syndrome (data not shown). Moreover, carriers of the $-6A$ allele displayed higher

plasma HDL-cholesterol concentrations compared with $-6GG$ subjects.

These results are in accordance with the physiological role of NR1H3. NR1H3 regulates many target genes involved in lipid uptake and efflux and lipoprotein metabolism.¹⁵ NR1H3 activators promote (i) the cellular transmembrane transport of endogenous lipid substrates via the induction of ABCA1, ABCG1, ABCG5, ABCG4, ABCG8^{16,17} in human macrophages and intestine;¹⁸ (ii) the cholesterol trafficking from the endosome/lysosome to the plasma membrane through the activation of Niemann-Pick C (NPC) 1 and NPC2 expression in human macrophages;¹⁹ (iii) the regulation of acceptors in cholesterol efflux such as ApoE, ApoCI, ApoCII and ApoCIV expression in adipocytes and macrophages²⁰; and (iv) the remodeling of lipoproteins through the control of modifying enzymes such as lipoprotein lipase (LPL)²¹ and PLTP in liver and macrophages.⁵ To support this, it has been shown that NR1H3 agonists raise plasma HDL-cholesterol and triglyceride levels.²² Therefore, NR1H3 plays a central role in many pathways involved in the onset of the metabolic syndrome, especially in HDL-cholesterol metabolism. It is worth noting that no significant association could

be detected between *NR1H3* SNPs and plasma triglyceride concentrations in our study.

Our results point towards the same direction than the study of Dahlman *et al.*⁸ They showed that the CC genotype of SNP rs2279238 was associated with lower body mass index in Swedish women. In our population sample, rs2279238 was in perfect linkage disequilibrium with rs11039155, the SNP we found associated with a protective role against metabolic syndrome ($D' = +1$, $r^2 = 0.95$) whereas in Dahlman's study, it was not ($D' = +0.34$, $r^2 = 0.11$).

Both rs12221497 (−115G>A) and rs11039155 SNP (−6G>A), being located in the 5' region of *NR1H3*, could modify NR1H3 gene expression. We quantified NR1H3 mRNA levels in human primary macrophages but we did not detect any significant difference in NR1H3 expression level between genotype groups. Same results were obtained for ABCA1, a target gene of NR1H3 involved in cholesterol efflux in human macrophages which is associated with HDL-cholesterol levels in association studies.^{23,24} These data suggest that these polymorphisms do not modify NR1H3 or ABCA1 gene expression, at least in macrophages. Other cell types/tissues need to be tested. On the other hand, the −6G>A polymorphism is located six base pairs upstream from the ATG site, a position shown by Kozak to affect recognition of the AUG codon. The fact that the sequence flanking the AUG start codon in NR1H3 mRNA (GAAGA GATGT) does not closely match the Kozak consensus sequence (GACACCATGG) makes it more likely that the polymorphism might affect translational efficiency; that is a mutation in position −6 is more likely to have an effect in the absence of A in position −3 and G in position +4.²⁵ It would be therefore interesting to compare the level of NR1H3 protein produced in various tissues for example, liver, macrophages, adipose tissue between individuals with contrasted genotypes for the *NR1H3* SNP rs11039155. On the other hand, it cannot be ruled out that another variant in linkage disequilibrium with the SNP rs11039155 may explain the present association.

In conclusion, we have assessed the role of common genetic variation in *NR1H3* in susceptibility to metabolic syndrome. Among the different *NR1H3* SNPs investigated, only the rs11039155 (−6G>A) polymorphism demonstrated consistent association with HDL-cholesterol levels and metabolic syndrome. The −6A allele was associated with an increase in HDL-cholesterol levels and a 30% reduction in the risk of metabolic syndrome. Other large populations of different countries are necessary to confirm this finding.

Acknowledgements

The Lille and Toulouse MONICA population studies were supported by Grants from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, ONIVINS, Parke-Davis Laboratory, the Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale (MGEN), the Groupe Fournier, the Réseau National de Santé Publique, the

Direction Générale de la Santé, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Institut Pasteur de Lille and the Unité d'Évaluation du Centre Hospitalier et Universitaire de Lille. This study was part of the CRESCENDO (Consortium for Research into Nuclear Receptors in Development and Aging) consortium funded by the Commission's Sixth Framework Programme (integrated project LSHM-CT-2005-018652). We thank Dr Rébecca Dièvert and Lionel Helin for technical experiments.

References

- 1 Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome. An American heart association/national heart, lung, and blood institute scientific statement. Executive summary. *Cardiol Rev* 2005; **13**: 322–327.
- 2 Dallongeville J, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P, Meirhaeghe A. The Gly16→Arg16 and Gln27→Glu27 polymorphisms of beta2-adrenergic receptor are associated with metabolic syndrome in men. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; **88**: 4862–4866.
- 3 Meirhaeghe A, Cottel D, Amouyel P, Dallongeville J. Association between peroxisome proliferator-activated receptor gamma haplotypes and the metabolic syndrome in French men and women. *Diabetes* 2005; **54**: 3043–3048.
- 4 Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev* 1995; **9**: 1033–1045.
- 5 Laffitte BA, Joseph SB, Chen M, Castrillo A, Repa J, Wilpitz D *et al.* The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 2182–2191.
- 6 Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression *in vitro* and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest* 2000; **105**: 513–520.
- 7 Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G, Walts B *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 2006; **14**: 529–644.
- 8 Dahlman I, Nilsson M, Jiao H, Hoffstedt J, Lindgren CM, Humphreys K *et al.* Liver X receptor gene polymorphisms and adipose tissue expression levels in obesity. *Pharmacogenet Genomics* 2006; **16**: 881–889.
- 9 Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of cardiovascular disease. The world health organization MONICA project. *Int J Epidemiol* 1994; **23**: 505–516.
- 10 Marques-Vidal P, Ruidavets JB, Amouyel P, Ducimetiere P, Arveiler D, Montaye M *et al.* Change in cardiovascular risk factors in France, 1985–1997. *Eur J Epidemiol* 2004; **19**: 25–32.
- 11 Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1997; **20**: 1183–1197.
- 12 Abecasis GR, Cookson WO. GOLD – graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics* 2000; **16**: 182–183.
- 13 Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet* 2004; **68**: 165–177.
- 14 Tregouet DA, Barbaux S, Escolano S, Tahri N, Golmard JL, Tiret L *et al.* Specific haplotypes of the P-selectin gene are associated with myocardial infarction. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 2015–2023.
- 15 Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature* 1996; **383**: 728–731.
- 16 Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 28240–28245.

- 17 Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA *et al*. Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 12097–12102.
- 18 Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K *et al*. Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000; **289**: 1524–1529.
- 19 Rigamonti E, Helin L, Lestavel S, Mutka AL, Lepore M, Fontaine C *et al*. Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ Res* 2005; **97**: 682–689.
- 20 Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK, Mangelsdorf DJ *et al*. Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31900–31908.
- 21 Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem* 2001; **276**: 43018–43024.
- 22 Lund EG, Peterson LB, Adams AD, Lam MH, Burton CA, Chin J *et al*. Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol* 2006; **71**: 453–463.
- 23 Jensen MK, Pai JK, Mukamal KJ, Overvad K, Rimm EB. Common genetic variation in the ATP-binding cassette transporter A1, plasma lipids, and risk of coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2007, in press.
- 24 Sviridov D, Nestel PJ. Genetic factors affecting HDL levels, structure, metabolism and function. *Curr Opin Lipidol* 2007; **18**: 157–163.
- 25 Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol* 1987; **196**: 947–950.

Supplementary Information accompanies the paper on International Journal of Obesity website (<http://www.nature.com/ijo>)

II.2. Synthèse des résultats de l'article

Nous avons sélectionné les SNPs du gène *NR1H3* selon les données du NCBI et de HapMap disponibles en 2005. Seuls 3 SNPs étaient décrits sur HapMap (rs12221497, rs2279238, rs7120118). Nous avons alors sélectionné 7 SNPs à partir de la base de données du NCBI (dont les 3 SNPs décrits dans HapMap) en fonction de leur fréquence (>8%) et de leur fonctionnalité potentielle. Après avoir génotypé une centaine d'individus pris au hasard dans l'échantillon MONICA Lille, nous avons construit la carte de DL qui nous a permis d'identifier 3 tag-SNPs résumant les 7 SNPs : rs12221497 (-115G>A), rs11039155 (-6G>A) et rs2279239 (intron 2 T>C). Nous avons alors réalisé des études d'association entre ces 3 SNPs et le risque de syndrome métabolique dans les échantillons MONICA Lille et Toulouse (voir leurs caractéristiques dans le chapitre III.1. des Matériels et Méthodes page 80).

L'allèle -6A du rs11039155 (MAF 0,11) est associé à une diminution du risque de syndrome métabolique dans les 2 échantillons MONICA Lille (OR=1,68) et Toulouse (OR=1,70) ainsi qu'à une augmentation du taux plasmatique de HDL-cholestérol dans l'échantillon combiné. De plus, l'allèle -115A du rs12221497 est associé à une augmentation du risque de syndrome métabolique dans l'échantillon MONICA Lille (OR=1,44) mais cette association n'a pas été retrouvée dans l'échantillon MONICA Toulouse.

Comme le SNP rs12221497 est situé dans l'intron 1 du gène *NR1H3* (115 pb en amont de l'ATG) et le SNP rs11039155 est situé dans le 5'UTR (6 pb en amont de l'ATG), nous avons émis l'hypothèse qu'ils pourraient tous deux moduler l'expression du gène *NR1H3* et par conséquent l'expression des gènes cibles de LXR α . Etant donné le rôle des macrophages dans le transport inverse du cholestérol, nous avons testé la fonctionnalité de ces SNPs dans des cultures primaires de macrophages humains traitées ou non par le TO901317 (agoniste synthétique des LXRs). Nous avons alors comparé le niveau d'expression des gènes *NR1H3* et *ABCA1* (gène cible connu de LXR α impliqué dans l'efflux du cholestérol) au niveau ARNm par rétro-transcription PCR quantitative en temps réel. A l'état basal, nous n'avons pas détecté de différence significative de l'expression de *NR1H3* entre les groupes de génotypes. L'activation des LXRs par le TO901317 augmente l'expression de *NR1H3* et de *ABCA1* de manière similaire entre les groupes de génotypes. Nous n'avons donc pas détecté d'impact significatif des SNPs rs12221497 et rs11039155 sur l'expression de *NR1H3* et *ABCA1* au niveau ARNm.

II.3. Etudes fonctionnelles complémentaires non publiées

II.3.a. Dans les cultures primaires de macrophages humains

De même que pour ABCA1, nous avons comparé l'expression de *FAS* (autre gène cible connu de LXR α dans les macrophages) au niveau ARNm entre les groupes de génotypes déterminés par le rs12221497 (-115G>A) ou le rs11039155 (-6G>A) dans les cultures de macrophages humains traitées ou non au TO901317 (Figure 27). L'activation des LXRs augmente, comme attendu l'expression de *FAS* (5-6 fois) mais aucune différence significative entre les groupes de génotype n'a été détectée.

Le SNP rs11039155 (-6G>A) est situé dans la séquence Kozak jouant un rôle important dans l'initiation de la traduction [Kozak 1987]. Ce SNP pourrait donc affecter l'efficacité de la traduction et ainsi entraîner une différence au niveau de la quantité de protéine LXR α . Nous avons alors extrait les protéines totales des cultures de macrophages afin de réaliser des *western blots* sur les protéines LXR α et de comparer la quantité de protéines LXR α produites entre les groupes de génotypes déterminés par le rs11039155 (-6G>A) (Figure 28). Nous avons bien retrouvé l'activation de l'expression de LXR α par le TO901317 au niveau protéique, mais nous n'avons pas détecté de différence significative entre les allèles du rs11039155 (-6G>A) au niveau basal ou en présence du ligand.

II.3.b. Etude de l'activité du promoteur de NR1H3 dans un vecteur rapporteur

Nous avons réalisé des analyses *in silico* à l'aide du logiciel Genomatix (www.genomatix.de) afin de voir si les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) modifient des sites potentiels de fixation de facteurs de transcription. D'après ces analyses, l'allèle -115A du rs12221497 crée un site potentiel de fixation pour NERF/ELF2 (*new Ets-related factor / E74-like factor 2*) (Figure 29). Le rôle de ce facteur de transcription est assez mal connu, mais il semble être impliqué dans la régulation de l'expression des gènes spécifiques des lymphocytes B et T [Oettgen *et al.* 1996], dans le développement des vaisseaux sanguins et le remodelage vasculaire [Gaspar *et al.* 2002] et dans la prolifération cellulaire et le développement des métastases [Qiu *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2007; Cho *et al.* 2004]. Il existe 3 isoformes (issues du même gène) NERF1a, NERF1b et NERF2, qui sont exprimées dans de nombreux tissus, notamment le foie, le tissu adipeux, l'intestin, le pancréas, la rate et les macrophages. LXR α et NERFs sont donc exprimés dans des tissus communs et nous avons émis l'hypothèse que NERF pouvait réguler l'expression de LXR α .

Afin d'évaluer l'impact des SNPs rs12221497 (-115G>A) et le rs11039155 (-6G>A) sur l'activité transcriptionnelle du promoteur de *NR1H3* à l'état basal ainsi qu'en présence

des facteurs de transcription NERFs, nous avons cloné un fragment d'ADN (nommé LXRAprom) contenant ces 2 SNPs dans le vecteur rapporteur luciférase pGL3 *basic* (Promega) (Figure 30). Par mutagenèse dirigée, nous avons obtenu les 4 formes haplotypiques du fragment cloné : -115G/-6G (les 2 allèles fréquents), -115A/-6G, -115G/-6A et -115A/-6A (les 2 allèles rares).

Dans un premier temps, nous avons transfecté les vecteurs pGL3 *basic* (vide) ou pGL3 *basic*-LXRAprom G/G dans les cellules COS-7 (lignée cellulaire de rein de singe) connue pour être facilement transfectable. Le dosage de l'activité luciférase (rapportant l'activité de l'insert) a révélé que le fragment LXRAprom a une faible activité transcriptionnelle (à peine le double de celle du vecteur pGL3 *basic* vide) (Figure 31 A). Nous avons alors sous-cloné les 4 formes haplotypiques du fragment LXRAprom dans les vecteurs pGL3 *enhancer* et *promoter* (Promega) (Figure 30). Le vecteur pGL3 *enhancer*-LXRAprom avait encore une activité luciférase trop faible, nous conduisant à ne garder que le pGL3 *promoter* pour nos expériences.

Nous avons alors transfecté les vecteurs pGL3 *promoter* vide, LXRAprom G/G, G/A, A/G ou A/A dans les cellules HepG2 (lignée d'hépatome humain) car LXR α est connu pour être exprimé de manière abondante dans le foie. Nous avons co-transfecté les vecteurs d'expression pCI-NERF1a, NERF1b et NERF2 provenant du Dr Oettgen (Boston, USA) [Oettgen *et al.* 1996]. A l'état basal (sans ajout des vecteurs d'expression des NERFs), le vecteur pGL3 *promoter*-LXRAprom présente une activité transcriptionnelle au même niveau que le vecteur pGL3 *promoter* vide (Figure 31 B). L'ajout des vecteurs d'expression de NERF1a et NERF1b tend à inhiber un peu l'expression de LXRAprom (ns) tandis que NERF2 semble l'augmenter (ns). Nous n'avons pas détecté de différence entre les 4 haplotypes, que ce soit à l'état basal ou en présence des vecteurs d'expression des NERFs.

Nous avons également transfecté les vecteurs pGL3 *promoter* vide, LXRAprom G/G, G/A, A/G ou A/A dans les cellules HeLa (lignée humaine de carcinome du col de l'utérus), type cellulaire n'exprimant pas de façon endogène les NERFs [Oettgen *et al.* 1996]. Là non plus, nous n'avons pas détecté de différence entre les haplotypes au niveau basal ou en présence des vecteurs d'expression des NERFs (Figure 31 C). On peut relever que NERF2 active l'expression de l'ensemble des vecteurs pGL3 *promoter*-LXRAprom ($p=0,004$).

En conclusion, nous n'avons pas mis en évidence d'impact des SNPs rs12221497 (-115G>A) et le rs11039155 (-6G>A) sur l'expression de LXR α (ou de certains de ses gènes cibles) dans les différents modèles utilisés.

II.4. Etudes d'association complémentaires non publiées

II.4.a. Etude d'association des SNPs rs12221497 et rs11039155 dans l'étude HELENA

Dans l'étude MONICA, nous avons montré que les SNPs rs12221497 (-115G>A), rs11039155 (-6G>A) et rs2279239 (intron 2 T>C) couvrent la variabilité génétique connue du gène *NR1H3*. Notre étude [Legry *et al.* 2008] et celle de Robitaille *et al.* [Robitaille *et al.* 2007] ont montré que les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sont associés à des variations du profil lipidique plasmatique. De plus, Dahlman *et al.* [Dahlman *et al.* 2006] ont décrit que le SNP rs2279238, en DL parfait ($r^2=1$) avec le SNP rs11039155 (-6G>A), est associé à une diminution de l'IMC. Nous avons alors génotypé les 1155 adolescents de l'étude HELENA composée de 1155 adolescents (voir leurs caractéristiques dans le chapitre III.3 des Matériels et Méthodes page 82) pour les 3 SNPs rs12221497 (-115G>A), rs11039155 (-6G>A) et rs2279239 (intron 2 T>C).

Nous avons comparé les moyennes des paramètres anthropométriques et lipidiques entre groupe de génotypes. Pour le SNP rs2279239 (intron 2 T>C), tout comme dans MONICA, aucune association significative n'a été observée. Au contraire, les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sont significativement associés au taux plasmatique de HDL-cholestérol : les porteurs de l'allèle -115A du rs12221497 présentent un taux plasmatique de HDL-cholestérol plus bas que les individus GG ($1,39 \pm 0,28$ versus $1,44 \pm 0,27$ mmol/L, $p=0,016$), tandis que les porteurs de l'allèle -6A du rs11039155 présentent un taux plasmatique de HDL-cholestérol plus élevé que les individus GG ($1,47 \pm 0,28$ versus $1,42 \pm 0,27$ mmol/L, $p=0,006$) (Tableau 16). Le fait que les deux allèles mineurs -115A et -6A soient associées à des effets opposés est sûrement dû à leur DL négatif ($D'=-1$, $r^2=0.02$). Par ailleurs, l'allèle -115A est associé à une augmentation du taux plasmatique en ApoB ($0,67 \pm 0,16$ chez les porteurs de l'allèle -115A versus $0,65 \pm 0,16$ chez les GG, $p=0,042$).

En conclusion, nous avons confirmé l'association du SNP rs11039155 (-6G>A) avec le taux plasmatique de HDL-cholestérol dans l'étude HELENA. Ces résultats suggèrent que les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) modulent le profil lipidique dès l'adolescence.

II.4.b. Etude d'association des SNPs rs12221497 et rs11039155 dans l'étude MONEUR

Puisque les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sont associés au risque de syndrome métabolique dans l'étude MONICA *via* leur effet sur les HDL-cholestérol

et au taux plasmatique de HDL-cholestérol dans l'étude HELENA, que le syndrome métabolique est lui-même associé à un risque accru de MCV (OR=2,18 [Gami *et al.* 2007]) et que le taux plasmatique de HDL-cholestérol est un facteur prédictif du risque de MCV, nous avons émis l'hypothèse que ces SNPs pouvaient moduler directement le risque de MCV. Nous avons alors génotypé les individus de l'étude cas-témoins reconstituée MONEUR, constituée de 585 patients atteints de coronaropathie aiguë provenant des études EUROASPIRE I et II et de 585 témoins provenant de l'étude MONICA (voir leurs caractéristiques dans les chapitres III.2.a. et III.2.b. des Matériels et Méthodes, page 81) pour ces 2 SNPs.

Nous avons comparé les fréquences génotypiques des ces 2 SNPs entre patients coronariens, ainsi que le sous-groupe de patients ayant eu un infarctus du myocarde (n=350), et les témoins (Tableau 17). Nous n'avons pas détecté de différence des fréquences génotypiques entre cas et témoins. Nous avons calculé le risque de coronaropathie aiguë ou d'infarctus du myocarde, mais là encore nous n'avons pas détecté d'impact significatif de ces 2 SNPs.

En conclusion, nous n'avons pas mis en évidence d'association des SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sur le risque de coronaropathie dans l'étude MONEUR.

II.5. Discussion

Nous avons donc montré que la variabilité génétique du gène *NR1H3* est associée au taux plasmatique de HDL-cholestérol dans 2 études différentes : le SNP rs11039155 (-6G>A) est associé à une augmentation du taux plasmatique de HDL-cholestérol chez les adultes de l'étude MONICA et les adolescents de l'étude HELENA, tandis que le SNP rs12221497 (-115G>A) est associé à une diminution du taux plasmatique de HDL-cholestérol uniquement dans l'étude HELENA. Ces derniers résultats sont relativement cohérents avec l'étude de Robitaille *et al* dans laquelle l'allèle -115A est associé à une augmentation des taux plasmatiques de TG et de cholestérol total [Robitaille *et al.* 2007]. Dans une récente GWAS, les SNPs rs2167079 (situé 10 kpb en amont de *NR1H3*) et rs7120118 (intron 6) sont associés à une augmentation du taux de HDL-cholestérol [Sabatti *et al.* 2009]. Le SNP rs7120118 (intron 6) est en DL parfait avec le rs2279239 (intron 2 T>C) dans l'étude MONICA (Figure 1 de l'article). Contrairement à cette étude, nous n'avons pas trouvé d'association significative entre le rs2279239 et le taux plasmatique de HDL-cholestérol ni dans l'étude MONICA, ni dans l'étude HELENA. Par ailleurs, dans la récente GWAS d'Aulchenko *et al*, le locus *MADD-FOLH1* est associé au taux plasmatique de HDL-

cholestérol [Aulchenko *et al.* 2009]. Les auteurs de cette étude suggèrent que l'effet de ce *locus* pourrait en fait être expliqué par *NR1H3*, situé à 500 pb du *locus* associé. L'ensemble de ces études génétiques s'accorde pour dire que le *locus NR1H3* semble moduler le taux plasmatique de cholestérol.

Ces résultats sont parfaitement concordants avec le rôle important que joue LXR α dans le métabolisme du cholestérol, notamment dans le transport inverse du cholestérol. D'abord, dans les tissus périphériques, les LXRs stimulent (i) la captation du cholestérol par les macrophages en activant l'expression des gènes codant l'ApoE, la LPL et la cavéoline-1 [Bultel *et al.* 2008] (ii) la mobilisation du cholestérol intracellulaire en activant l'expression des gènes *NPCs* [Rigamonti *et al.* 2005] et (iii) l'efflux du cholestérol en activant l'expression des gènes *ABCA1*, *ABCG1*, *ApoE/C-III/C-IV/C-II* et *ApoA-IV* [Willy *et al.* 1995; Costet *et al.* 2000; Fayos *et al.* 1994; Laffitte *et al.* 2001b; Mak *et al.* 2002; Liang *et al.* 2004a]. De plus, les LXRs participent au remodelage des lipoprotéines plasmatiques en activant l'expression des gènes codant la PLTP, la CETP et la LPL [Cao *et al.* 2002; Laffitte *et al.* 2003b; Luo *et al.* 2000]. En particulier, LXR α est nécessaire à l'activation de l'expression de la LPL permettant la captation du cholestérol par le foie [Zhang *et al.* 2001]. Les LXRs favorisent également l'excrétion du cholestérol du foie vers l'intestin en activant l'expression des transporteurs *ABCG5* et *ABCG8* [Yu *et al.* 2003; Repa *et al.* 2002; Yu *et al.* 2002] et empêchent l'absorption du cholestérol intestinal en inhibant l'expression du gène *NPC1L1* [Altmann *et al.* 2004; Duval *et al.* 2006], permettant ainsi l'excrétion du cholestérol par les fèces.

LXR α joue un rôle important dans la régulation de la lipogenèse hépatique. En effet, LXR α induit l'expression des gènes lipogéniques *SREBP1c*, *FAS*, *SCD* et *ChREBP* [Eberle *et al.* 2004; Chu *et al.* 2006; Joseph *et al.* 2002a; Talukdar *et al.* 2006; Cha *et al.* 2007]. Nous n'avons pas trouvé d'association entre les 3 SNPs couvrant la variabilité génétique connue de *NR1H3* et le taux plasmatique de TG ni dans l'étude MONICA, ni dans l'étude HELENA. Seule l'étude de Robitaille *et al.* a décrit une association entre le SNP rs12221497 (-115G>A) et le taux plasmatique de TG [Robitaille *et al.* 2007]. De même, LXR α semble jouer un rôle non négligeable dans l'homéostasie glucidique puisqu'il inhibe directement l'expression des gènes clés de la gluconéogenèse (*PEPCK*, *G6Pase*, *FBPase*) [Stulnig *et al.* 2002b; Grempler *et al.* 2005] et induit l'expression de *GLUT4* dans le TA, permettant la captation du glucose [Dalen *et al.* 2003]. Nous n'avons pas trouvé d'association entre les 3 SNPs étudiés et les paramètres lipidiques (glycémie, insulinémie et HOMA-IR) ni dans l'étude MONICA, ni dans l'étude HELENA. L'étude de Dahlman *et al.* ne décrit pas non plus d'association avec ces paramètres glucidiques (n=2041 non diabétiques) ou le risque de DT2 (n=988 cas et 941 témoins) [Dahlman *et al.* 2009].

Dahlman *et al* ont décrit une association entre le SNP rs2279238, en DL parfait ($r^2=1$) avec les SNP rs11039155 (-6G>A) et une diminution de l'IMC chez 559 femmes [Dahlman *et al.* 2006]. Ce résultat est cohérent avec le rôle potentiel de LXR α dans le métabolisme du TA. En effet, LXR α est un gène cible de PPAR γ et favorise l'accumulation de lipides dans les adipocytes [Chawla *et al.* 2001; Darimont *et al.* 2006; Juvet *et al.* 2003]. Cependant, nous n'avons pas trouvé d'association avec le risque d'obésité ou les paramètres anthropométriques ni dans l'étude MONICA, ni dans l'étude HELENA. De plus, Dahlman *et al* n'ont pas non plus retrouvé l'association entre le rs2279238 et l'IMC chez 1721 individus normo-glycémiques [Dahlman *et al.* 2009], suggérant que l'association de ce SNP chez les 559 femmes était sans doute biaisée.

Le processus de l'athérosclérose commence très tôt dans la vie, processus selon lequel des stries lipidiques dans l'enfance peuvent évoluer en plaques athéromateuses dès l'adolescence et à l'âge adulte [Williams *et al.* 2002]. Un taux plasmatique de HDL-cholestérol anormalement bas (<1,0 mmol/L) est un facteur prédictif de MCV chez les hommes comme chez les femmes. A chaque diminution de 0,025 mmol/L (1 mg/dL), le risque de coronaropathie augmente de 2 à 3 % [Gordon *et al.* 1989]. De plus, un taux plasmatique élevé de HDL-cholestérol ($\geq 1,50$ mmol/L) est associé à une diminution du risque cardiovasculaire [2002]. Comme les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sont associés au taux plasmatique de HDL-cholestérol dès l'adolescence et que les LXRs ont des propriétés anti-athérosclérotiques [Joseph *et al.* 2002b; Terasaka *et al.* 2003; Levin *et al.* 2005], nous avons étudié l'impact de ces SNPs sur le risque de coronaropathie dans l'étude MONEUR. Nous n'avons pas détecté d'association entre les SNPs rs12221497 (-115G>A) ou rs11039155 (-6G>A) et le risque de coronaropathie ou d'infarctus du myocarde dans cette étude. La récente GWAS de Willer *et al* n'a pas non plus décrit d'association entre des SNPs localisés à proximité du gène *NR1H3* et le risque de coronaropathie (n=1 926 cas et 12 301 témoins) [Willer *et al.* 2008]. Aucune étude ne suggère donc à ce jour, un impact de la variabilité génétique de *NR1H3* sur le risque de MCV.

Dans notre étude d'association portant sur l'étude MONICA (article), nous avons décrit que les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sont associés au risque de syndrome métabolique dans l'échantillon MONICA Lille, ainsi que dans l'échantillon MONICA Toulouse pour le rs11039155 (-6G>A). Ces résultats ont été obtenus en considérant les critères de diagnostic du NCEP modifiés par l'AHA en 2005. Nous avons également estimé le risque de syndrome métabolique selon d'autres définitions. Si l'on considère celle de l'IDF, les résultats pour les 2 SNPs sont très semblables à ceux décrits dans l'article. Les critères du NCEP/AHA et de l'IDF sont en effet similaires au niveau des paramètres lipidiques (Tableau 1), auxquels sont d'ailleurs associés rs12221497 et

rs11039155. Le SNP rs11039155 (-6G>A) tend également à être associé au syndrome métabolique selon la définition de l'OMS (OR=0,82, $p=0,15$ dans les échantillons Lille et Toulouse combinés) mais pas du tout selon la définition de l'EGIR (OR=1,00, $p=0,99$). Or, la définition de l'EGIR est la seule des 4 définitions à exclure les individus diabétiques. Comme le SNP rs11039155 (-6G>A) tend aussi à être associé au risque de DT2 (OR=0,78 [0,54-1,14] $p=0,21$ dans les échantillons Lille et Toulouse combinés), l'absence des individus diabétiques dans la définition du syndrome métabolique par l'EGIR pourrait en partie masquer l'effet de l'allèle -6A. Concernant le SNP rs12221497 (-115G>A), l'association avec le syndrome métabolique disparaît si les définitions de l'EGIR et de l'OMS sont utilisées (OR=1,02, $p=0,94$ et OR=0,94, $p=0,72$, dans l'échantillon MONICA Lille, respectivement). Ces 2 définitions mettent l'accent sur le désordre glucidique en en faisant un critère obligatoire, et accordent moins d'importance aux paramètres lipidiques, en considérant les taux de HDL-cholestérol et de TG comme 1 seul paramètre, que les définitions du NCEP/AHA et de l'IDF (Tableau 1). Or ce SNP n'a aucun effet sur l'homéostasie glucidique et le risque de DT2 (OR=1,01, $p=0,97$ dans MONICA Lille). L'association du rs12221497 avec le syndrome métabolique selon le NCEP pourrait donc refléter son effet sur le métabolisme lipidique. Ainsi, les associations des SNPs du gène *NR1H3* avec le risque de syndrome métabolique dépendent de la définition utilisée, en particulier de l'importance accordée aux paramètres lipidiques.

Les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) sont situés dans la région 5' proximale du gène et pourraient donc moduler l'expression de *NR1H3*. Le SNP rs11039155 (-6G>A) est situé dans le 5'UTR, 6 pb en amont de l'ATG, dans la séquence Kozak. Cette séquence joue un rôle important dans la traduction puisqu'elle permet l'assemblage de la petite sous-unité ribosomique à l'ARNm [Kozak 1987]. Le fait que la séquence entourant le codon d'initiation AUG dans le gène *NR1H3* (GAAGAGATGT) soit relativement éloigné de la séquence consensus Kozak (GACACCATGG) renforce l'hypothèse que le SNP -6G>A pourrait altérer l'efficacité de traduction, puisque Kozak a montré qu'une mutation en -6 a plus d'impact en l'absence d'une adénine en position -3 et d'une guanine en position +4 [Kozak 1987]. Par ailleurs, nos analyses *in silico* ont suggéré que le SNP rs12221497 (-115G>A) modifiait un site potentiel de fixation pour les facteurs de transcription NERFs (l'allèle A créant un site potentiel). Nous avons alors employé 2 méthodes pour mettre en évidence la fonctionnalité de ces SNPs. La première a consisté à comparer le niveau d'expression de *NR1H3* et de ses gènes cibles dans des cultures primaires de macrophages humains. Cependant, nous n'avons pas détecté d'impact significatif des 2 SNPs ni sur l'expression de *NR1H3*, *ABCA1* et *FAS* au niveau ARNm, ni sur l'expression de LXR α au niveau protéique. Si l'on regarde d'un peu plus près la Figure 2.a

de l'article, il semblerait que les 2 SNPs soient associés à une légère diminution (-20% environ) de l'expression à l'état basal (sans TO901317). Mais la variabilité interindividuelle est trop grande pour que cette différence soit significative. Cela constitue l'une des limites de cette étude. De plus, il n'est pas possible d'avoir accès aux données, telles que l'âge et le sexe des donneurs de monocytes, qui auraient pu aider à comprendre cette variabilité entre donneurs. Etant donné l'effet escompté de ces SNPs (20%) et la variabilité interindividuelle observée, il faudrait plus de 150 échantillons pour avoir la puissance suffisante et mettre en évidence un effet significatif de ces SNPs. Toutefois, il serait intéressant de comparer le niveau d'expression de *NR1H3* et de ses gènes cibles entre les allèles des SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) dans d'autres tissus, comme le foie ou le tissu adipeux par exemple. Cependant, ces tissus sont plus difficiles à obtenir.

La seconde méthode a consisté à comparer l'activité transcriptionnelle du promoteur proximal de *NR1H3* entre les allèles des 2 SNPs en utilisant un vecteur rapporteur luciférase. Nous avons transfecté les cellules HepG2 (car *LXRα* est exprimé de manière abondante dans le foie) et les cellules HeLa (car les facteurs de transcription NERFs n'y sont pas exprimés) avec les vecteurs rapporteurs luciférase ± les vecteurs d'expression des NERFs. Nous n'avons pas détecté de différence entre les allèles -115G et -115A ou -6 G et -6A à l'état basal ou lorsque les facteurs de transcription NERFs étaient surexprimés. La limite de cette étude réside en le fait que le fragment du gène *NR1H3* que nous avons cloné (comprenant les 1284 pb en amont de l'ATG) n'a pas montré d'activité promotrice, et c'est peut-être pour cela que nous n'avons pas vu d'impact des SNPs. Il faudrait peut-être cloner les 4 kpb en 5' de l'ATG afin que le fragment contienne l'ensemble du promoteur et notamment les sites LXRE et PPRE importants pour l'activation de la transcription de *NR1H3* [Laffitte *et al.* 2001a]. Enfin, on ne peut pas exclure que les SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) ne soient pas les SNPs causaux. Le SNP rs11039155 (-6G>A) est un tag SNP, en DL parfait avec les SNPs rs2279238 (Ser99Ser) et rs1449626 (en 3' intergénique). Les associations observées en population pourraient donc aussi bien être causées par ces 2 SNPs ou encore un autre SNP non décrit dans les bases de données. C'est aussi le cas pour le SNP rs12221497 (SNP indépendant des autres SNPs étudiés).

En conclusion, nous avons montré que deux polymorphismes, situés dans le promoteur proximal de *NR1H3*, sont associés à des variations du taux de HDL-cholestérol chez les adolescents et les adultes et au risque de syndrome métabolique chez les adultes. Cependant, ils ne semblent pas être associés au risque de maladie coronaire. Enfin, la fonctionnalité de ces polymorphismes reste à élucider.

III. Etude du gène *NR1H2* codant LXR β

III.1. Contexte de l'étude

LXR β est un récepteur nucléaire, activé par des dérivés du cholestérol, comme LXR α . Il est codé par le gène *NR1H2* dont l'expression est ubiquitaire, contrairement à celle de LXR α [Repa *et al.* 2000b]. Comme il l'a été détaillé dans les chapitres V.2.a et V.2.b de l'Introduction (pages 58-64), LXR β régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol, au même titre que LXR α , et favorise ainsi le transport inverse du cholestérol des tissus périphériques vers le foie et son élimination par les fèces [Baranowski 2008; Bradley *et al.* 2007]. LXR β est également impliqué dans le métabolisme du TA et semble être nécessaire à la croissance des adipocytes [Gerin *et al.* 2005]. A la différence de LXR α , LXR β ne stimule pas la lipogenèse hépatique [Alberti *et al.* 2001] et apparaît ainsi comme une cible thérapeutique intéressante pour le traitement de l'athérosclérose [Quinet *et al.* 2006]. Par ailleurs, LXR β est la seule isoforme exprimée dans les cellules β du pancréas [Zitzer *et al.* 2006] et semble être requise pour la sécrétion d'insuline [Gerin *et al.* 2005]. LXR β est donc impliqué dans plusieurs voies métaboliques participant au développement du syndrome métabolique. Etant donné que l'expression de LXR β est ubiquitaire, des polymorphismes génétiques du gène *NR1H2* pourraient alors affecter le métabolisme de nombreux tissus et c'est pourquoi *NR1H2* représente un gène candidat pertinent pour l'identification de facteurs de susceptibilité génétique aux maladies métaboliques.

**Liver X receptor β polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and obesity
–a three cohort study; the Norwegian HUNT 2, the French MONICA and
the European HELENA-CSS**

Karianne Solaas^{1,2*}, Vanessa Legry^{3*}, Kjetil Retterstol⁴, Kirsten B Holven², Jean Ferrières⁵, Philippe Amouyel³, Helge Rootwelt⁶, Paul R Berg⁷, Sigbjorn Lien⁷, Serena Tonstad⁸, Bente L Halvorsen⁹, Marit S Nenseter⁹, Jara Valtueña¹⁰, Javier Romeo¹¹, Kurt Widhalm¹², Jonatan R. Ruiz¹³, Jean Dallongeville³, Kåre I Birkeland¹, Per M Thorsby¹⁴, Aline Meirhaeghe^{3#}, Hilde I Nebb^{2#}

¹Department of Endocrinology, Oslo University Hospital, Aker, Oslo, Norway. ²Department of Nutrition, Faculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway. ³INSERM, U744; Institut Pasteur de Lille, Univ. Lille Nord de France; UDSL; Lille, France. ⁴The Lipid Clinic, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway. ⁵Department of Cardiology, Toulouse University School of Medicine, Rangueil Hospital, Toulouse, France. ⁶Department of Medical Biochemistry, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway. ⁷Centre for Integrative Genetics, The Norwegian University of Life Sciences, Aas, Norway.

⁸Department of Preventive Medicine, Oslo University Hospital, Ulleval, Norway. ⁹Research Institute for Internal Medicine, Oslo University Hospital, Rikshospitalet, Oslo, Norway.

¹⁰Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte- INEF, Universidad Politécnica de Madrid, Madrid, Spain. ¹¹Immunonutrition group, Department of Metabolism and Nutrition, Institute Frio-ICTAN, Spanish Scientific Research Council, Madrid, Spain. ¹²Department of Pediatrics, Division of Clinical Nutrition and Prevention, Medical University of Vienna, 1090 Vienna, Austria. ¹³Unit for Preventive Nutrition, Department of Biosciences and Nutrition at NOVUM, Karolinska Institutet, 14157 Stockholm, Sweden. ¹⁴The Hormone Laboratory, Oslo University Hospital, Aker, Oslo, Norway.

* These authors contributed equally to this work.

#Joint corresponding authors:

Professor Hilde I Nebb
Department of Nutrition
Faculty of Medicine
University of Oslo
PObox 1046 Blindern
NO-0316 Oslo
Norway

Phone: +47 22851510

Fax: +47 22851341

E-mail: h.i.nebb@medisin.uio.no

Dr Aline Meirhaeghe

INSERM U744

Insitut Pasteur de Lille

1 rue du Pr Calmette,

BP 245

Lille F-59019

France

Phone: +33 3 20 87 73 91.....

Fax: + + 33 3 20 87 78 94.....

E-mail: Aline.Meirhaeghe-Hurez@pasteur-lille.fr

Abbreviated title: LXR β polymorphisms in type 2 diabetes mellitus and obesity

Abbreviations:

LXR, liver X receptor; LXRE, liver X receptor response element; RXR, retinoid X receptor; NR, nuclear receptor; SNP, single nucleotide polymorphism; HNF4, hepatic nuclear factor 4; NF1, nuclear factor 1; T2D, type 2 diabetes mellitus; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HUNT, The Nord-Trøndelag Health Study 2; GSR, genotyping success rate; TG, triglyceride; ABCA1, ATP binding cassette transporter A1; SREBP-1c, sterol receptor binding protein 1c; VLDL, very low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; TF, transcription factor; CVD, cardiovascular disease; GWA, genome wide association; BMI, body mass index; OR, odds ratio; MAF, minor allele frequency.

ABSTRACT

Background and aims

The liver X receptors α and β (LXR α and LXR β , respectively) play important roles in the control of lipid and carbohydrate homeostasis and inflammation in mice. LXR α and LXR β have similar protein structure and ligand binding, but somewhat different physiological functions. LXR β (nuclear receptor 1H2) is ubiquitously expressed and is the only isoform expressed in pancreatic β -cells. It thus also has a prominent regulatory role in glucose homeostasis. In the present study, we tested for association between five tagSNPs, capturing all common variation in the *LXR β* gene and risk of type 2 diabetes, obesity and related traits in 5,141 adults and 1,155 adolescents from 2 population-based studies and a type 2 diabetes case-control study.

Methods

We identified SNPs in the *LXR β* gene by gene sequencing. Eleven SNPs with a minor allele frequency above 5% could be minimized to 5 SNPs, based on the linkage disequilibrium. The five *LXR β* SNPs (rs17373080, rs2695121, rs56151148, rs2303044 and rs3219281) were genotyped in participants from the nested case-control study for T2D (age 66 ± 14 y, n=835 cases/1986 controls) issued from the Norwegian HUNT 2 population-based study, the MONICA Lille and Toulouse (age 35-65 y) population-based studies (n=2325) and the European HELENA-Cross Sectional Study (age 12-18 y, n=1155). We tested for association between each SNP and risk of diabetes or obesity using multivariate logistic regression, and with continuous traits (BMI, waist-to-hip ratio, waist circumference, plasma glucose and insulin levels, HOMA indexes, plasma HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and triglyceride levels) using multivariate linear regression. The potential functional disease associated SNPs were analyzed *in silico* and *in vitro*.

Results

We identified an association between rs17373080 and on one hand with the risk of T2D (OR=0.84, p=0.05) in the HUNT case-control study and on the other hand with the risk of obesity in the MONICA population-based study (OR=1.26, p=0.05) and the risk of overweight/obesity in the adolescent HELENA-CSS (OR=1.59, p=0.002). *In silico* analyses showed that another SNP located in intron 4 (rs28514894, T>C change) – a perfect proxy for rs17373080 – would create a binding site for the hepatic nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) and

nuclear factor 1 (NF1A, B, C and X) transcription factors. *In vitro* electrophoretic mobility shift assays (EMSA) showed that both HNF4 α or NF1s could bind to the binding site, in a similar manner whatever the allele (T or C). Cell transient transfections were also performed to examine the impact of rs28514894 on *LXR β* expression in JEG3 and HepG2 cells. Despite a ~20% higher basal activity for the *LXR β* fragment carrying the C allele compared with the T allele, no difference in response to HNF4 α or NF1s between the alleles could be detected.

Conclusion

Our results indicate that rs17373080 in the *LXR β* gene is associated with T2D and obesity.

Key words:

LXR, SNP, polymorphism, type 2 diabetes, obesity, insulin resistance.

INTRODUCTION

Liver X receptors (LXRs) are nuclear receptors involved in the control of lipid and carbohydrate homeostasis as well as inflammation [reviewed in Bensinger SJ and Tontonoz P 2008; Baranowski M 2008; Zelcer N and Tontonoz P 2006]. LXRs consist of two isoforms, LXR α (encoded by NR1H3) and LXR β (encoded by NR1H2), sharing approximately 78% amino acid identity (3). LXR α and β are encoded by separate genes, located on chromosome 11 (11p11.2) and 19 (19q13.3), respectively. High expression of LXR α is restricted to metabolic active tissues like adipose tissue, intestine, liver, kidney and muscle, whereas LXR β is ubiquitously expressed (Lu TT et al. 2001). LXR β is the only isoform expressed in pancreatic β -cells [Zitzer H et al. 2006]. Both isoforms form obligate heterodimers with the retinoid X receptor (RXR). The LXR-RXR heterodimers regulate gene expression by binding to LXR response elements (LXREs) in the promoter regions of the target genes. Without any ligand bound to it, the heterodimer recruits co-repressors. Upon ligand binding, a conformation change occurs to exchange the co-repressor complex by a co-activator complex for transcription of the target gene to take place [Hu X et al. 2003; Glass CK and Rosenfeld MG. 2000]. The possibility of specific cofactors for transactivation of each LXR isoform have been suggested [Mouzat K et al. 2007]. Most of the endogenous LXR ligands identified so far activate both LXR isoforms. However, a few relatively selective LXR α ligands are described [Janowski BA et al. 1999; Song C et al. 2000A; Song C et al. 2000B].

Despite the lack of widely available LXR β specific ligands, the study of mice deficient for either or both LXR isoforms has revealed important specific functions for LXR β [reviewed in Gabbi C et al. 2009]. LXR β ^{-/-} mice exhibit markedly decreased glucose tolerance due to impaired insulin secretion [Gerin I et al. 2005] and pancreatic islets isolated from LXR β ^{-/-} mice are characterized by significantly reduced basal and glucose-stimulated insulin secretion [Zitzer H et al. 2006]. The stimulatory effect of LXR agonists on insulin secretion seems to be mediated by regulation of both glucose and lipid metabolism in pancreatic β -cells [Efanov AM et al. 2004; Zitzer H et al. 2006]. Interestingly, it has been suggested that chronic increased activation of LXR may contribute to the dysfunction of pancreatic β -cells observed in T2D [Choe SS et al. 2007]. LXR β ^{-/-} mice fed a chow diet have reduced amounts of adipose tissue, similar insulin sensitivity [Gerin I et al. 2005] and decreased hepatic and serum triglyceride (TG) levels [Schuster GU et al. 2002, Gerin I et al. 2005] compared to wild type (wt) mice. However, these mice are glucose intolerant due to impaired glucose-induced insulin secretion. LXR β ^{-/-} mice fed a high-fat diet are leaner with less gonadal fat pads

compared to wt mice on the same diet [Gerin I et al. 2005]. In addition, it seems that the lack of LXR β is responsible for the lean phenotype observed in the double knock-out (KO) LXR α ^{-/-} β ^{-/-} mice [Gabbi C et al. 2009]. Thus, LXR β most probably has a significant role in fat metabolism regarding resistance in gaining weight. A diet containing 2% cholesterol seems to affect LXR β ^{-/-} mice similarly to wt mice [Schuster GU et al. 2002]. However, in a study treating mice deficient in LXR α and/or LXR β with dual or LXR α selective agonists, a specific activation of LXR α or LXR β was found to yield distinctive lipid outcome [Lund EG et al. 2006]. Activation of LXR β stimulated cholesterol efflux and increased HDL-cholesterol without raising TG levels. In addition, in another study in which selective activation of LXR β was achieved by treatment of LXR α ^{-/-} mice with a dual agonist, an increased plasma HDL-cholesterol level without significant changes in plasma TG or very low density lipoprotein (VLDL) levels were observed [Quinet EM et al. 2006]. In a mechanistic perspective, genes involved in fatty acid and TG biosynthesis were not induced in liver, but in peripheral tissues, the *ABCA1* and *SREBP-1c* genes were induced. From these studies it seems possible that a specific agonist of LXR β would most probably raise plasma HDL-cholesterol levels and stimulate cholesterol efflux from the body without causing hepatic TG accumulation, as observed when treating wild type mice with a dual LXR agonist. Several potential strategies for dissociating anti-atherosclerotic and anti-diabetic effects of LXR agonists from their lipogenic effects have been proposed [Lund EG et al. 2003]. These strategies specifically include development of LXR β selective agonists. Thus, the above reviewed mice studies show that LXR β plays numerous roles in metabolic pathways involved in T2D, obesity, and metabolic syndrome.

Regarding human studies, single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *LXR β* gene have been so far associated with Alzheimer's disease [Adighibe O et al. 2006; Rodríguez-Rodríguez E et al. 2008; Infant J et al. 2008] in several studies and with obesity [Dahlman I et al. 2006] and T2D [Dahlman I et al. 2009]. In the study associating *LXR β* SNPs with obesity, the *LXR β* gene was sequenced in 24 obese and non-obese women to identify *LXR β* SNPs in which four were genotyped in the whole cohort [Dahlman I et al. 2006]. In the T2D study, three SNPs covering 57% of the gene variability were genotyped in the cohorts [Dahlman I et al. 2009].

In the present study, we identified SNPs in the *LXR β* gene by direct sequencing from 96 individuals (males and females with and without metabolic syndrome) and designed a three cohort study in order to test if the *LXR β* SNPs are associated with T2D, obesity, or related phenotypes. The identified disease-associated SNPs were analyzed for functionality *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The HUNT 2 Study

The Nord-Trøndelag Health Study 2 (HUNT 2 Study) has been described elsewhere [Holmen J et al. 2003; <http://www.ntnu.no/english>]. In brief, it is a large (n=65,905) population-based health survey carried out in Norway during 1995–97. Nord-Trøndelag County (n=127,000) is representative of rural Norway. The population has been geographically and ethnically stable for several generations, with only 0,3% of non-Caucasian origin. All inhabitants ≥ 20 y were invited and the attendance rate was 71%. Data were obtained from non-fasting blood samples, physical tests, and from questionnaires covering e.g. medications, life style, and health-related behaviour. Measurement of anthropometric, clinical and biochemical parameters have been described elsewhere [Thorsby PM et al. 2009]. From this sample, 1040 diabetic subjects were randomly selected among 1972 individuals with self-reported diabetes (n=942) or with a non-fasting serum glucose level >11.1 mmol/L (n=98). We also selected 2,080 age and gender-matched non-diabetic control subjects, two for each case, with random serum glucose level ≤ 5.5 mmol/L. All patients who started insulin therapy within the first year of diagnosis of diabetes or had serum level of anti-GAD ≥ 0.08 U/L were regarded as having a type 1 diabetes and were excluded from the present analysis (n=171), resulting in a final number of 869 T2D individuals who were slightly older than the controls (p=0.02) (see supplementary Table 1). DNA extraction was performed using a salting out procedure [Miller SA et al. 1988]. The use of data and DNA materials from the subjects in HUNT 2 for this publication was approved by the Norwegian Regional Committee for Medical Research Ethics, Southern Region, the Norwegian Social Data Services, and the Norwegian Directorate for Health and Social Affairs.

The MONICA Study

Participants were recruited in the framework of the WHO-MONICA population survey conducted from 1995 to 1997 in different regions of France: the Urban Community of Lille in the North (Lille, n=1195) and the Haute-Garonne county in the South (Toulouse, n=1182). The sample included individuals aged 35-65 years randomly selected on electoral rolls after stratification by town size, gender and age to obtain 200 participants for each gender and 10-year age group (WHO-MONICA Project protocol) [1994]. The Ethical Committee of each centre approved the protocol. After signing an informed consent, participants were

administered a standard questionnaire and physical measurements were made by a specially trained nurse. Physical activity was defined as at least 15 min walk a day, and/or lifting or carrying heavy objects at work daily, and/or doing sport or physical exercise more than 2 h a week. Current cigarette smokers were defined as individuals reporting at least one cigarette per day. Total alcohol intake was expressed as the sum of ml alcohol per week from wine, beer, cider and spirits. The anthropometric measurements included body weight (rounded to the nearest even decimal), waist (at a level midway between lower rib margin and iliac crest; to the nearest 0.5 cm) and were taken on individuals in light clothing without shoes. Body mass index was calculated according to the Quetelet equation. Blood pressure was measured on the right arm, with the subject in a sitting position and after a minimum 5-min rest, using a standard mercury sphygmomanometer. The mean value of two consecutive blood pressure readings was taken into account. The characteristics of the subjects from MONICA Lille and Toulouse samples have been described elsewhere [Cottel D et al. 2000].

The HELENA-CSS

Participants were recruited as part of the HELENA-CSS (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence-Cross Sectional Study, <http://www.helenastudy.com>) performed from 2006 to 2007 in 10 centres from 9 European countries (Athens and Heraklion in Greece, Dortmund in Germany, Ghent in Belgium, Lille in France, Pécs in Hungary, Rome in Italy, Västerås in Sweden, Vienna in Austria and Zaragoza in Spain) as previously described [Moreno LA et al. 2008A]. The protocol was approved by the appropriate ethics committee in each centre. Written, informed consent was obtained from each subject and both of his/her parents or legal representatives. Participation in the study was voluntary. The sample included a total of 3865 adolescents (14.8 ± 1.4 y) recruited through their schools; the latter were randomly selected according to a proportional cluster sampling methodology taking into account geographical repartition within each city, private/public school ratio, and number of classes by school [Moreno LA et al. 2008B]. In each centre, anthropometric measurements (including weight, height, waist and hip circumferences) were taken by trained physicians with the participants barefoot and in their underwear. Waist and hip circumferences were measured three consecutive times and with a non-elastic tape (Seca 200) to the nearest 0.1 cm. The body mass index (BMI) was calculated. The percentage of body fat (%BF) was estimated from skin-fold measurements, according to Slaughter *et al.* [Slaughter MH et al. 1988].

In order to investigate clinical biochemistry assays and genetic analyses, one third of the classes were randomly selected for blood collection, resulting in a total of 1155 subjects,

whose characteristics have been described previously [Legry et al. 2009]. Blood samples were drawn at school according to a standardised collection protocol (after a 10-hour overnight fast), and were sent to a central laboratory (the Analytical Laboratory at the University of Bonn [IEL], Germany) for subsequent biochemical measurements. Serum TG, HDL and LDL-cholesterol, glucose were measured on the Dimension RxL clinical chemistry system (Dade Behring, Schwalbach, Germany) with enzymatic methods. Blood for DNA extraction was collected in EDTA K3 tubes. DNA was extracted from white blood cells with the Puregene kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) by the Genomic analysis Laboratory at the Institut Pasteur de Lille in Lille, France.

Gene sequencing and SNP genotyping

The *LXR β* gene (all exons, exon-intron junctions, 1500 bp 5' and 1000 bp 3' of the gene) (see primer positions in supplementary Table 2) was sequenced. Primers were designed to generate overlapping amplicons. Putative SNPs were identified and confirmed as described [Nilsen H et al. 2008].

In the HUNT Study, the SNPs were genotyped on a MASSARRAY system using assay design software, genotyping protocols and genotyping software as recommended by manufacturer (Sequenom) as earlier described [Nilsen H et al. 2008]. Primers are provided on request. The genotyping success rates (GSR) were greater than 98%. Genotypes were available for a maximum of 835 T2D cases and 1986 controls.

In the HELENA-CSS, genotyping was performed on an Illumina system, using GoldenGate technology. The GSRs were at least 99.7%.

In the MONICA samples, genotyping was performed by the restriction fragment length polymorphism method. Primers and conditions are available on request. The GSRs were greater than 98%.

All genotype distribution respected the Hardy-Weinberg equilibrium except for rs2303044 in MONICA ($p=0.017$), however it respected the Hardy-Weinberg equilibrium in the subgroup of normal-weight subjects ($n=1076$, $p=0.14$).

In silico analyses

MatInspector version 7.0 and EIDorado from Genomatix [Cartharius K et al. 2005] (Genomatix Software GmbH, Germany) was used to identify which transcription factor binding sites were affected by the SNPs, using the vertebrate matrix.

Cell lines

The human JEG3 choriocarcinoma cell line, obtained from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) was cultured in monolayer in Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich Norway AS) supplemented with 10% foetal calf serum (Integro, Dieren, Holland), 2 mM L-glutamine, penicillin (50 units/mL) and streptomycin (50 µg/mL) at 37 °C in 5% CO₂. The human hepatoma HepG2 cell line, from ATCC (ATCC, Manassas, VA), was cultured in Dulbecco's Modified Essential Medium (Invitrogen, USA) with 10% foetal calf serum (Invitrogen, USA), 2 mM L-glutamine, 1% MEM NEAA (Invitrogen, USA), penicillin (50 units/mL), and streptomycin (50 µg/mL) at 37 °C in 5% CO₂.

Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

As JEG3 cells do not express NF1 and HNF4α, this cell line was transfected by NF1s or HNF4α and nuclear extracts were prepared for EMSA. For preparation of nuclear extracts, JEG3 cells were transfected in 10-cm dishes with 4 µg of expression vector and 8 µl of LipofectAMINE2000 (Invitrogen) in 3.5 ml of OptiMem (Gibco, Invitrogen) for 5 hr, followed by 24 hr incubation in 12 ml of Minimum Essential Medium Eagle (Sigma-Aldrich Norway AS) containing serum and antibiotics. The NF1 expression vectors were a kind gift from Dr R. Gronostajski (Buffalo, NY, USA). The HNF4α expression vector used was bought at OriGene Technologies, Inc. (Rockville, MD, USA) (TrueClone SC123863). Nuclear extracts were isolated using CellLytic NuCLEAR Extraction Kit (Sigma-Aldrich Norway AS) according to the manufacturer's instructions with extra EDTA-free Complete proteinase inhibitor cocktail (Roche Applied Science) added. The double stranded oligos used in EMSA were (only one strand is shown): rs28514894 T allele 5'-TCC TCT GGC TCT TTG CCT GGG GAT C-3', rs28514894 C allele 5'-TCC TCT GGC TCT TTG CCC GGG GAT C-3', HNF4α positive control 5'-GCG CTG GGC AAA GGT CAC CTG C-3', HNF4α negative control 5'- GCG CTG GCG AAA GGA GAC CTG C -3', NF1 positive control 5'-GCG GCT CTT GGC CCA AAG CCA GAC CT-3', and NF1 negative control 5'-TCC TAC TTA CAC CCT AAG TTT TAT C-3'. Bold letters in rs28514894T and rs28514894C oligonucleotides indicate the SNP nucleotides. Bold letters in the HNF4α positive and negative oligonucleotides represent the mutated nucleotides. In order to hinder NF1 binding, the NF1 negative control oligonucleotide was heavily mutated. The double-stranded oligonucleotides were radiolabelled and the probes purified followed by binding reactions and separation of the protein-DNA complexes from free probes as described [Dalen KT et al. 2003]. For supershift

assays, 1 μ L anti-HA antibody (Roche Diagnostics GmbH) was pre-incubated with nuclear extracts for 45 minutes at 4°C.

Cloning and transient transfections

The pGL3-*LXR β* vector was obtained by amplification of the fragment of 1922 bp containing part of the promoter until the end of intron 4 of the *LXR β* gene under its two allelic forms (T and C) for rs28514894 with primers 5'-GGC CGC AGG CTC AGA GAA GCG-3' (forward) and 5'-CTG GGG TGG GTA GGT AGA GGC-3' (reverse) and its insertion into the luciferase reporter pGL3-basic vector. Integrity of the sequence was checked by sequencing. Cells were transiently transfected with 500 ng of pGL3 vectors \pm 250 ng of pCMV6-XL4-HNF4 α or pCH-NF1A, B, C or X with a FuGENE HD (Roche Applied Science): DNA ratio of 5:1 for HepG2 cells and 4:1 for JEG3 cells. Luciferase activities were measured 40 hours after transfection with the Dual Luciferase Assay kit (Promega, Madison, WI). The *firefly* luciferase activity of the pGL3 vectors was normalized on the *renilla* luciferase activity obtained from the co-transfected pRL-CMV vector (Promega, Madison, WI). Results are expressed as means \pm SEM from at least 3 independent experiments performed in duplicates in each cell line.

Statistical analyses

The linkage disequilibrium between SNPs was based on D' and r^2 and evaluated using Haploview [Barrett et al. 2005] and Thesias [Tregouet DA et al. 2007] softwares. Statistical analyses were performed with SAS statistical software (SAS Institute Inc., Cary, NC). Odds ratios were obtained by multivariate linear regression analyses. In order to obtain normal data distributions, log-transformation was used for TG and insulin levels in all samples and for glucose levels in the MONICA sample. An exponential-transformation was applied for glucose levels in control subjects of the HUNT case-control study. Inter-group comparisons of quantitative variables were made using a general linear model (GLM) procedure. Reported p values are nominal and were systematically adjusted for confounding variables. In the HUNT 2 case-control study, confounding variables were age and gender, with the addition of BMI for biochemical variables or T2D risk. In the MONICA sample, confounding variables were age, gender, centre, smoking habit, alcohol consumption and physical activity level for anthropometric variables, with the addition of BMI for biochemical variables. In the HELENA-CSS, confounding variables were age, gender and centre for anthropometric

variables, with the addition of BMI for biochemical variables. Statistical significance was considered as $p \leq 0.05$.

RESULTS

Identification of *LXRβ* SNPs and haplotype blocks

We sequenced the *LXRβ* gene in 96 individuals (86 with metabolic syndrome and 10 normolipemic control individuals) and identified 15 SNPs (table 1), of which 4 had a minor allele frequency (MAF) below 0.05.

We genotyped the HUNT 2 case-control study for the 11 SNPs with a $MAF \geq 0.05$ (table 1) and evaluated the linkage disequilibrium (LD) existing between the SNPs (figure 1). Two haplotype blocks were detected, the first one included rs17373080, rs28514894, rs41432149, rs1405655, rs2303045 and rs4802703. Rs17373080 was chosen as a tagSNP for this block. The second haplotype block was composed of rs1052677 and rs3219281; and rs3219281 was chosen as a tagSNP. Rs56151148, rs2695121 and rs2303044 were independent SNPs. To note, in the HapMap database (Rel24/phaseII Nov08, NCBI B36 assembly, dbSNP b126), only 3 SNPs were described: rs1405655 and rs4802703 -being in strong LD and located in the first haplotype block- and rs2248949. As we missed LD information for rs2248949, we genotyped 96 randomly selected individuals for rs2248949 and observed that it was in complete LD with rs2695121 ($D' = +1$, $r^2 = 1$) (data not shown); and rs2695121 was chosen as a tagSNP of this block. Thus, the three tagSNPs (rs17373080, rs3219281 and rs2695121) and the 2 independent SNPs (rs56151148 and rs2303044) were selected in the following association studies to cover the whole common genetic variability of the *LXRβ* gene.

Association between the *LXRβ* SNPs and T2D in HUNT 2

We compared the genotype distributions of the 5 SNPs between individuals with T2D (n=835) and controls (n=1986) (Table 2). No genotype distribution differed significantly between cases and controls. However, when considering a dominant model, rs17373080 was associated with the risk of T2D. Indeed, subjects bearing the G allele had a lower risk of T2D than CC subjects (adjusted OR=0.82 [0.69-0.98], $p=0.03$). To note, there was no significant interaction with gender for this SNP ($p=0.13$).

Association between the *LXRβ* SNPs and obesity in MONICA

Individuals from the MONICA Lille and MONICA Toulouse samples (overall n=2325) were genotyped for the 5 SNPs (see MAFs in table 1). We combined the MONICA Lille and Toulouse studies because (i) they are similar French population based-studies and (ii) the ORs for obesity for individuals carrying the minor alleles of each SNP were homogenous between the two MONICA population studies (assessed by the Breslow-Day test), allowing the pooling of the two MONICA samples. In the combined MONICA Lille and Toulouse sample, we compared the genotype distribution of the 5 SNPs between obese and non-obese individuals (373 obese subjects and 1945 non-obese subjects) (table 3a). The genotype distributions were not significantly different between subject groups. However, again for rs17373080, when using a dominant model, the adjusted OR for obesity was 1.26 [1.00-1.59], p=0.05 for G allele carriers compared with CC individuals. There was no significant interaction with gender for this SNP (p=0.65).

Association between the *LXRβ* SNPs and obesity/overweight in HELENA-CSS

Adolescents from the HELENA-CSS (n=1155) were genotyped for the 5 SNPs (see MAFs in table 1). In this sample, there were 70 obese and 195 overweight adolescents. In order to have more statistical power, we pooled these two subject categories to get 265 overweight or obese children. We then compared the genotype distribution of the 5 *LXRβ* SNPs between obese or overweight (n=265) and normal-weight (n=879) children (table 3b). Like in MONICA, the G allele of rs17373080 was associated with a higher risk of overweight/obesity (adjusted OR=1.59 [1.19-2.13], p=0.002) (table 3b). Moreover, individuals carrying either the T allele of rs2303044 or the T allele of rs3219281 had also a higher risk of obesity (OR=1.84 [1.27-2.66], p=0.001 and 1.78 [1.25-2.52], p=0.001, respectively) compared with respective homozygous CC individuals.

Association between the *LXRβ* SNPs and obesity or T2D-related quantitative phenotypes in HUNT, MONICA and HELENA-CSS

We looked for associations between the 5 *LXRβ* SNPs and obesity or T2D-related quantitative phenotypes in the three cohorts, namely BMI, waist circumference, waist-to-hip ratio, plasma glucose, TG, total cholesterol and HDL-cholesterol levels.

First, in control individuals from the HUNT 2 case-control study (table 4), the G allele of rs17373080 was associated with lower plasma glucose levels (4.96 ± 0.43 mmol/L in G allele

bearers versus 4.99 ± 0.43 mmol/L in CC subjects, $p=0.03$) and the T allele of rs56151148 was associated with lower plasma TG levels (1.62 ± 0.91 mmol/L in T allele bearers versus 1.69 ± 0.92 mmol/L in CC subjects, $p=0.03$). No significant association was detected for rs2695121, rs2303044 or rs3219281.

Second, in the MONICA study (table 5), the GG genotype of rs17373080 was associated with higher waist-to-hip ratio (0.893 ± 0.09 in GG subjects versus 0.884 ± 0.09 in C allele bearers, $p=0.03$). The T allele of rs3219281 was associated with higher plasma TG levels (1.40 ± 1.10 in T allele bearers versus 1.28 ± 0.94 mmol/L in CC subjects, $p=0.01$). No significant association was detected for rs56151148, rs2695121 or rs2303044.

Last, in the HELENA-CSS (table 6), the G allele of rs17373080 was associated with higher fasting insulin levels (10.51 ± 6.66 μ U/mL in G allele bearers versus 9.82 ± 7.99 μ U/mL in CC individuals, $p=0.04$) and HOMA-IR (2.36 ± 1.52 in G allele bearers versus 2.07 ± 1.22 in CC subjects, $p=0.02$). The T allele of rs2695121 was associated with lower fasting insulin levels (9.44 ± 5.12 μ U/mL in T allele bearers versus 10.85 ± 6.98 μ U/mL in CC subjects, $p=0.008$), lower HOMA-IR (2.10 ± 1.18 in T allele bearers versus 2.45 ± 1.71 in CC subjects, $p=0.007$) and lower HOMA-B cell index (136.7 ± 127.3 % in T allele bearers versus 153.1 ± 110.9 % in CC subjects, $p=0.03$). The T allele of rs2303044 was associated with higher BMI (22.1 ± 4.3 in T allele carriers versus 21.2 ± 3.6 kg/m² in CC subjects, $p=0.006$). Finally, rs3219281 T allele carriers had higher BMI (21.9 ± 4.2 versus 21.2 ± 3.6 kg/m², respectively, $p=0.009$) and higher waist circumference (72.0 ± 9.0 versus 73.4 ± 10.7 , respectively, $p=0.03$) than CC subjects. No significant association could be detected for rs56151148.

Identification of a potentially functional SNP (rs28514894) in perfect LD with rs17373080

We performed *in silico* analyses using the MatInspector and EIDorado Genomatix softwares to determine which transcription factor binding sites are affected by the SNPs. No relevant TF binding site could be detected for rs17373080. However, we observed that the C allele of rs28514894 (located in intron 4 or intron 2 after the translation initiation site), a perfect proxy for the G allele of 17373080 ($r^2=0.99$), would create a binding site for hepatic nuclear factor 4 alpha (HNF4 α) and nuclear factor 1 (NF1A, B, C and X). These binding sites were not identified in the presence of the common T allele of rs28514894. Therefore, we hypothesized that rs28514894 could possibly be a SNP modifying LXR β transcription level and therefore explaining the association between rs17373080 and obesity and T2D.

***In vitro* functional studies of the rs28514894 SNP**

In order to test the functionality of the theoretical HNF4 α and NF1 binding sites, *in vitro* electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were conducted with JEG3 or HepG2 nuclear extracts transfected with the HNF4 α or NF1 expression vectors. We observed that either HNF4 α or NF1A, B, C or X could bind to the binding site, in a similar manner whatever the allele (T or C) (figure 2 and data not shown). No quantitative differences in binding between the alleles could be observed. The binding between the proteins on the C allele probe was completely prevented by adding a 10-fold excess of unlabelled T allele probe and *vice versa*. Specificity of the bindings were confirmed for NF1 with complete supershifts when adding the anti-HA tag (figure 2). Nuclear extracts prepared from cells transfected with the empty vectors did not bind to any probes tested.

We went on to evaluate the impact of the rs28514894 (intron 4) SNP on LXR β promoter activity. We cloned a fragment of 1922 bp containing part of the promoter until the end of intron 4 of the *LXR β* gene under its two allelic forms (T and C) for rs28514894 into the luciferase reporter pGL3-basic vector to create the pGL3-*LXR β* vector. In HepG2 cells, when comparing the luciferase activity of the pGL3-*LXR β* vector with the empty pGL3-basic vector, the *LXR β* fragment was active. At the basal state, the *LXR β* fragment displayed ~1.25 fold higher activity ($p < 0.05$) when carrying the C allele than when carrying the T allele (figure 3). Because the rs28514894 SNP is located in a putative binding site for HNF4 α or NF1s, we also co-transfected the pGL3-*LXR β* vector together with an expression vector encoding the human HNF4 α or NF1A, NF1B, NF1C or NF1X cDNA. In HepG2 cells, the presence of HNF4 α increased the LXR β activity to a level similar between the two allelic forms of the construct (~1.6 fold for both compared with the T construct at the basal state), suggesting that rs28514894 did not modify HNF4 α ability to enhance LXR β transcriptional activity (figure 3A). In HepG2 cells, the presence of NF1s repressed by 60% *LXR β* activity to a level similar for the two allelic forms of the construct (compared with the T construct at the basal state), suggesting that rs28514894 did not modify NF1s ability to repress LXR β transcriptional activity (figure 3A). We tested the 4 different NF1s (NF1A, NF1B, NF1C, NF1X) and obtained similar results (data not shown). Last, similar results were found in JEG3 cells, except we observed a repressing effect of HNF4 α instead of an activation on LXR β (figure 3B).

DISCUSSION

In this three cohort study, we identified associations between the rs17373080 SNP, representing a large 5,7 kbp haplotype block in *LXRβ*, and obesity or T2D risk. Our results are in line with two previous studies by Dahlman *et al.* who showed rs35463555 and rs17373080 predisposed to obesity [Dahlman I et al. 2006] and that rs17373080 was associated with a lower risk of T2D [Dahlman I et al. 2009]. To our knowledge, no *LXRβ* SNPs have been significantly associated with these disorders in genome wide association (GWA) studies for obesity or T2D. However, due to the required very low p value threshold in GWAS ($<10^{-8}$), SNPs in the *LXRβ* gene might have been nominally associated with these disorders and not actually reported. In any case, the associations with the disease were probably weak. The associations in our present study were weaker in adults (OR=0.85 for the risk of T2D or 1.26 for the risk of obesity for rs17273080) than in adolescents (1.59<OR<1.84 for the risk of overweight/obesity) but were probably overestimated as the number of subjects studied is lower than in GWAS.

The protective association between rs17273080 and T2D can be explained by the association between rs17273080 and lower plasma glucose levels, as shown in the HUNT 2 study. This is opposite of what would be expected from the *LXRβ*^{-/-} KO mice phenotype [Gerin I et al. 2005]. As discussed by Dahlman *et al.* [Dahlman I et al. 2009], this may reflect species differences. We speculate that this may also reflect differences between a complete KO of the gene and subtle changes due to common SNPs. Also, the SNPs may induce the recruitment of different co-factors to modify the effect of *LXRβ* on target genes. For example, if the disease-associated allele -or an allele in high LD with it- creates a binding site for an activating TF-therefore increasing *LXRβ* action-, the disease-association would be opposite from the *LXRβ*^{-/-} phenotype. This seems to be the case for rs28514894: the C allele, in perfect LD with the protective G allele of rs17373080, was associated with higher *LXRβ* basal promoter activity, suggesting that these alleles could be associated with higher *LXRβ* mRNA levels. In addition, the fact that *LXRβ* is expressed in several tissues adds to the complexity of the association. Indeed, as shown in transient transfection experiments, HNF4α activated *LXRβ* in HepG2 but repressed it in JEG3 cells.

It has been shown that the activation of LXR β in pancreatic β -cells increases insulin secretion and insulin mRNA expression via SREBP-1-regulated pathway [Zitzer H et al. 2006; Efanov AM et al. 2004]. Our data are in accordance with these results as we showed that 2 LXR β SNPs (rs17373080 and rs2695121) were associated with fasting insulin levels, HOMA-IR and HOMA-B in adolescents.

Our data also confirmed the association between LXR β and adiposity. The minor allele of rs17373080 was associated with higher obesity risk in both adults and adolescents but it was associated with higher BMI only in the adolescent sample. Dahlman *et al.* did not find either any association between LXR β SNPs and BMI in ~2000 normoglycemic subjects [Dahlman I et al. 2009]. The presence of many confounding factors and compensation mechanisms in adults may hide the impact of LXR β on fat mass.

The associations reported in this study would become non-significant after correction for multiple testing (150 tests performed). However, since our data confirm results from others, we think that to conclude negatively from a purely statistical point of view would be too stringent. Using additional large population samples and performing meta-analyses will be necessary to truly ascertain the association between LXR β genetic variability and obesity and T2D.

While we were performing this work, Dahlman *et al.* [Dahlman I et al. 2009] analysed the potential functional impact of rs17373080 and performed a theoretical search for TF binding sites using the transcription element search system (TESS). They found that a potential NF1 binding site overlapped rs17373080. EMSAs showed that the DNA fragment containing either the C or the G allele of rs17373080 could bind these TF and transient transfection experiments showed that each TF could regulate LXR β activity, whatever the allele was. In our study, we used MatInspector and EIDorado from Genomatix and observed that the minor C allele of rs28514894, in perfect LD with the minor G allele of rs17373080, could create a binding site for either HNF4 α or NF1. However, whereas we showed that the C allele of rs28514894 was associated with higher LXR β basal promoter activity, we did not observe any differences between the T and C alleles in DNA-binding and transactivation of a reporter gene by HNF4 α or NF1 family members. However, the possibility exists that the differences between the alleles in respect to TF binding and transcriptional activity are too

small to be detected by these methods, but still makes a difference in the whole organism over years, especially if differences between different tissues exists, as would be expected. The complete mechanistic and physiological relevance of the statistical associations found in this and other previous studies may be elucidated in other cell lines expressing the *LXRβ* gene with the specific disease-associated SNP.

In conclusion, this three cohort study demonstrated associations between an *LXRβ* haplotype block tagged by rs17373080 and T2D and obesity. Together with the earlier studies associating *LXRβ* SNPs with obesity and T2D in other cohorts, the associations are strengthened. However, understanding the mechanisms behind the *LXRβ* SNP-disorder link necessitate further experiments.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported with grants from Norwegian Research Council, South-Eastern Norway Regional Health Authority and the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The Lille and Toulouse MONICA population studies were supported by Grants from the Conseil Régional du Nord-Pas de Calais, ONIVINS, Parke-Davis Laboratory, the Mutuelle Générale de l'Éducation Nationale (MGEN), the Groupe Fournier, the Réseau National de Santé Publique, the Direction Générale de la Santé, the INSERM, the Institut Pasteur de Lille and the Unité d'Évaluation du Centre Hospitalier et Universitaire de Lille. The HUNT Study is a collaboration between the HUNT Research Centre, Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and Technology, Norwegian Institute of Public Health, and Nord-Trøndelag County Council. The HELENA-CSS received funding from the European Union's Sixth RTD Framework Programme (Contract FOOD-CT-2005-007034), Universidad Politécnica de Madrid (CH/018/2008), Axis-Shield Diagnostics Ltd (Oslo, Norway), Abbot Científica S.A. (Spain) and Cognis GmbH (Germany).

This study was part of the CRESCENDO (Consortium for Research into Nuclear Receptors in Development and Aging) consortium funded by the Commission's Sixth Framework Programme (integrated project LSHM-CT-2005-018652). Vanessa Legry is funded by the Institut Pasteur de Lille.

We thank Nina Andreassen and Kristil Kindem Sundaasen for excellent laboratory work. We thank Dr R. Gronostajski (Buffalo, NY, USA) for providing us with the NF1 expression vectors.

DECLARATION OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

References

- (1994) Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of cardiovascular disease. The World Health Organization MONICA Project. *Int. J. Epidemiol.* 23:505-16.
- Adighibe O, Arepalli S, Duckworth J, Hardy J, Wavrant-De Vrièze F. (2006) *Neurobiol Aging.* 27:1431-4.
- Baranowski M. (2008) *J Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 7:31-55.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. (2005) 21, 263-5.
- Bensinger SJ, Tontonoz P. (2008) *Nature.* 454:470-7.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. (2005) *Bioinformatics.* 21:2933-42.
- Choe SS, Choi AH, Lee JW, Kim KH, Chung JJ, Park J, Lee KM, Park KG, Lee IK, Kim JB. (2007) *Diabetes.* 56:1534-43.
- Cotel D, Dallongeville J, Wagner A, Ruidavets JB, Arveiler D, Ferrières J, Bingham A, Marécaux N, Ducimetière P, Amouyel P. (2000) *Eur J Epidemiol.* 16:317-22.
- Dahlman I, Nilsson M, Jiao H, Hoffstedt J, Lindgren CM, Humphreys K, Kere J, Gustafsson JA, Arner P, Dahlman-Wright K. (2006) *Pharmacogenet Genomics.* 16:881-9.
- Dahlman I, Nilsson M, Gu HF, Lecoeur C, Efendic S, Ostenson CG, Brismar K, Gustafsson JA, Froguel P, Vaxillaire M, Dahlman-Wright K, Steffensen KR. (2009) *BMC Med Genet.* 17;10:27.
- Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, and Nebb HI. (2003) *J. Biol. Chem.* 278:48283-91.
- Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, Gromada J. (2004) *Diabetes.* 53 Suppl 3:S75-8.
- Gabbi C, Warner M, Gustafsson JA. (2009) *Mol Endocrinol.* 23:129-36.
- Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, Kennedy RT, Chiang SH, Burant CF, Steffensen KR, Gustafsson JA, MacDougald OA. (2005) *J Biol Chem.* 280(24):23024-31.
- Glass CK, Rosenfeld MG. (2000) *Genes Dev.* 14:121-41.
- Holmen J, Midthjell K, Krüger Ø, Langhammer A, Holmen TL, Bratberg GH, Vatten L, Lund-Larsen PG (2003) *Norsk Epidemiologi* 13:19-32.

- Hu X, Li S, Wu J, Xia C, Lala DS. (2003) *Mol Endocrinol.* 17:1019-26.
- Infante J, Rodríguez-Rodríguez E, Mateo I, Llorca J, Vázquez-Higuera JL, Berciano J, Combarros O. (2008), doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.05.025
- Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. (1999) *Proc Natl Acad Sci.* 96:266-71.
- Legry V, Cotel D, Ferrières J, Chinetti G, Deroide T, Staels B, Amouyel P, Meirhaeghe A. (2008) *Int J Obes.* 32:421-8.
- Legry V, Bokor S, Cotel D, Beghin L, Catasta G, Nagy E, Gonzalez-Gross M, Spinneker A, Stehle P, Molnar D, Moreno L, Amouyel P, Dallongeville J, Meirhaeghe A. (2009). *J Clin Endoc Metab. In revision.*
- Lu TT, Repa JJ, Mangelsdorf DJ. (2001) *J Biol Chem.* 276:37735-8.
- Lund EG, Menke JG, Sparrow CP. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:1169-77.
- Lund EG, Peterson LB, Adams AD, Lam MH, Burton CA, Chin J, Guo Q, Huang S, Latham M, Lopez JC, Menke JG, Milot DP, Mitnaul LJ, Rex-Rabe SE, Rosa RL, Tian JY, Wright SD, Sparrow CP. (2006) *Biochem Pharmacol.* 71:453-63.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
- Moreno LA, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, de Henauw S, Beghin L, Sjostrom M, Hagstromer M, Manios Y, Gilbert CC, Ortega FB, Dallongeville J, Arcella D, Warnberg J, Hallberg M, Fredriksson H, Maes L, Widhalm K, Kafatos AG, Marcos A. (2008A) *Public Health Nutr.* 11:288-299.
- Moreno LA, de Henauw S, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, Gottrand F, Barrios L, Sjostrom M, Manios Y, Gilbert CC, Leclercq C, Widhalm K, Kafatos A, Marcos A. (2008B) *Int J Obes (Lond).* 32 Suppl 5:S4-11.
- Mouzat K, Prod'homme M, Volle DH, Sion B, Déchelotte P, Gauthier K, Vanacker JM, Lobaccaro JM. (2007) *J Biol Chem.* 282:4693-701.
- Nilsen H, Hayes B, Berg PR, Roseth A, Sundsaasen KK, Nilsen K, Lien S. (2008) *Anim Genet.* 39:97-104.
- Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU, Gustafsson JA, Basso MD, Nambi P. (2006) *Mol Pharmacol.* 70:1340-9.
- Rodríguez-Rodríguez E, Sánchez-Juan P, Mateo I, Infante J, Sánchez-Quintana C, García-Gorostiaga I, Berciano J, Combarros O. (2008) *J Neurol Sci.* 264:97-9.
- Schuster GU, Parini P, Wang L, Alberti S, Steffensen KR, Hansson GK, Angelin B, Gustafsson JA. (2002) *Circulation.* 106:1147-53.

- Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Van Loan MD, Bembien DA. (1988) Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol.* 60:709-23.
- Song C, Hiipakka RA, Liao S. (2000A) *Steroids.* 65:423-7.
- Song C, Liao S. (2000B) *Endocrinology.* 141:4180-4.
- Thorsby PM, Midthjell K, Gjerlaugsen N, Holmen J, Hanssen KF, Birkeland KI, Berg JP. (2009) *Scand J Clin Lab Invest.* 69:282-7.
- Tregouet DA, Garelle V. (2007) *Bioinformatics.* 23:1038-9.
- Zelcer N, Tontonoz P. (2006) *J Clin Invest.* 116:607-14.
- Zitzer H, Wente W, Brenner MB, Sewing S, Buschard K, Gromada J, Efanov AM. (2006) *Endocrinology.* 147:3898-905.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Linkage disequilibrium map of the 11 LXR β SNPs ($MAF \geq 0.05$) genotyped in the HUNT study. The linkage disequilibrium was analyzed using genotypes from controls of the HUNT 2 case-control study for T2D. D' and r^2 values were calculated using Haploview software. D' values are represented by a colour scale: from white ($D'=0$) to red ($D'=1$). r^2 values are given within the diamonds.

Figure 2. EMSA experiments show no difference in TF binding between the rs28514894 SNP alleles; exemplified with NF1C binding. EMSA of nuclear extracts (2 μ g) isolated from JEG3 cells transfected with the NF1-C expression vector formed a strong specific complex with the LXR β oligos around the rs28514894 SNP with both SNP alleles (T or C). The competition experiments were performed using unlabeled oligonucleotides (indicated by *) as competitors in 10-fold excess. The upper array indicates the supershift with anti-HA-mouse antibody binding to the NF1-C protein-oligo complex, and the lower array indicates the NF1C protein-oligo complexes.

Figure 3. Functional analyses of the rs28514894 SNP in luciferase reporter gene transfections in HepG2 (A) or JEG3 (B) cells. HepG2 or JEG3 cells were transiently co-transfected with either the empty basic-pGL3 (O) or the pGL3-LXR β /T allele or the pGL3-LXR β /C allele vector with or without HNF4 α or NF1s expression vector. Activity is expressed as fold activity compared to pGL3-LXR β /T vector activity and to the empty basic-pGL3 vector. White and black bars represent activities obtained without or with HNF4 α or NF1s, respectively. Each bar represents the means \pm SEM of at least 3 independent experiments. Firefly luciferase activities were normalised to the *renilla* luciferase activities. Data were compared with the Kruskal & Wallis non-parametric test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 1.

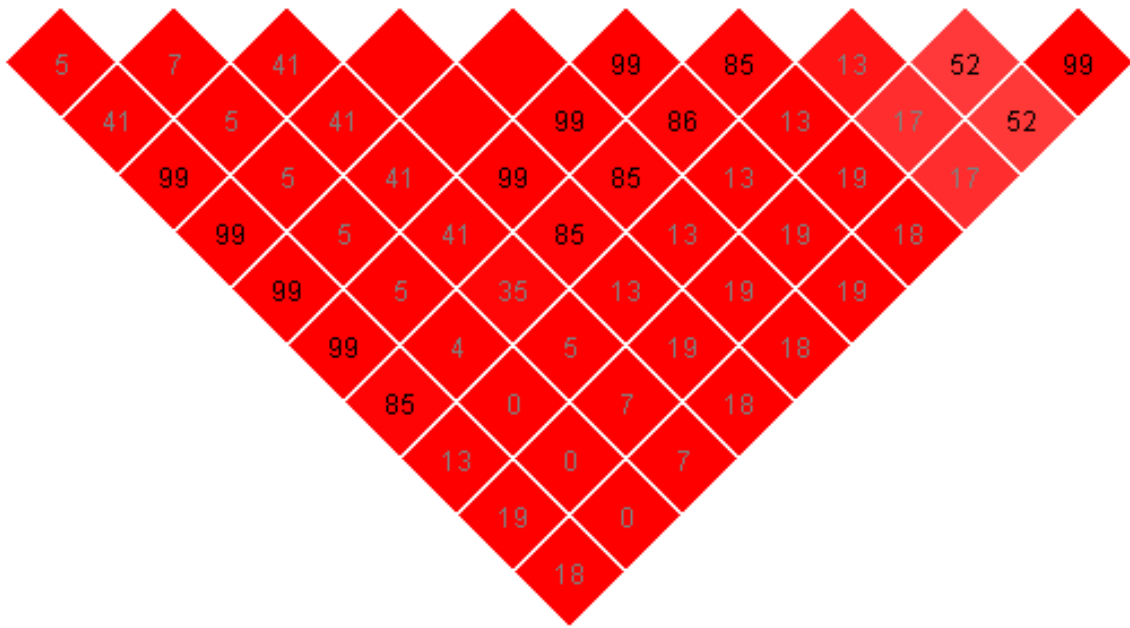


Figure 2.

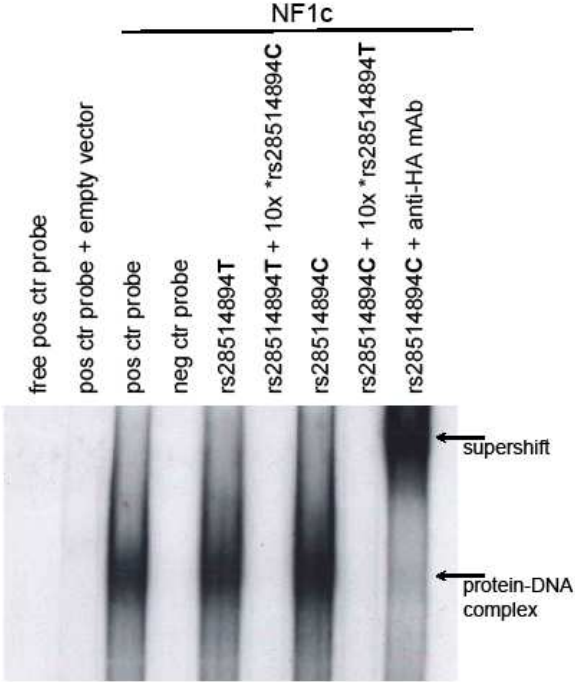
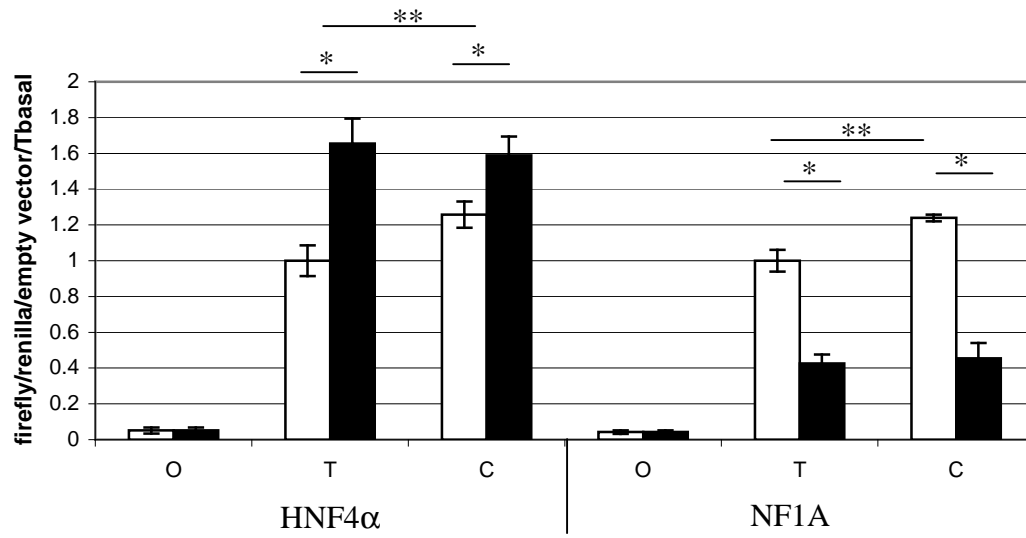


Figure 3.

A.



B.

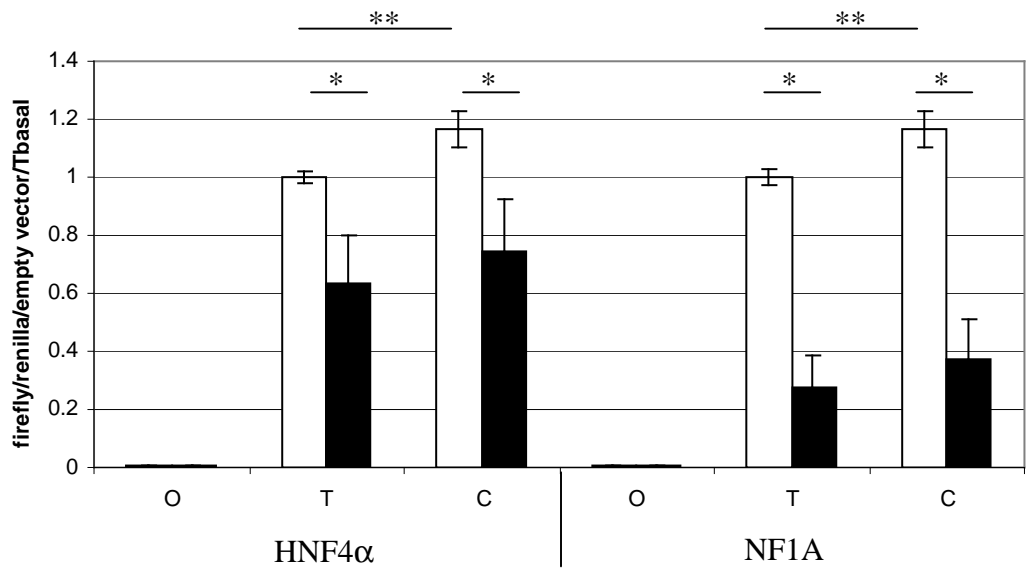


Table 1. SNPs detected by sequencing in the *LXR β* gene

rsnumber	Position on chromosome 19	Position from ATG	Location	Base change	MAF in sequenced individuals (n=96)	MAF in HUNT-2 controls (n=1986)	MAF in MONICA (n=2325)	MAF in HELENA-CSS (n=1155)
rs17373080	55,571,336	-1339	5' near gene	C/G	0.37	0.35	0.31	0.32
rs56151148	55,571,364	-1311	5' near gene	C/T	0.05	0.08	0.09	0.08
rs55794952	55,571,487	-1188	5' near gene	G/T	0.005 (1 heterozygous subject)	-	-	-
rs2695121	55,572,553	-122	intron 2	C/T	0.44	0.44	0.43	0.40
rs28514894	55,573,138	+464	intron 4	C/T	0.33	0.35	-	-
rs41432149	55,573,984	+1309	intron 6	C/T	0.36	0.35	-	-
NA	55,574,080	+1405	exon 7	C/G -> Pro252Arg	0.005 (1 heterozygous subject)	-	-	-
NA	55,574,374	+1700	intron 7	A/G	0.005 (1 heterozygous subject)	-	-	-
rs1405655	55,574,431	+1757	intron 7	C/T	0.36	0.35	-	-
rs2303045	55,574,730	+2056	intron 7	C/G	0.35	0.35	-	-
rs4802703	55,576,697	+4023	intron 8	A/C	0.40	0.32	-	-
rs2303044	55,577,013	+4339	intron 8	A/G	0.10	0.07	0.08	0.08
rs1052677	55,577,993	+5319	3' UTR	C/G	0.16	0.09	-	-
NA	55,578,378	+5704	3' near gene	A/C	0.005 (1 heterozygous subject)	-	-	-
rs3219281	55,578,899	+6225	3' near gene	C/T	0.15	0.09	0.09	0.10

Positions based on NM_007121 sequence.

MAF: minor allele frequency.

The 5 SNPs selected for association studies are indicated in bold.

Table 2. Genotype distribution for the 5 *LXR β* SNPs in individuals with T2D and controls from the HUNT 2 case control study and ORs [95%CI] of type 2 diabetes

	Controls (n=1986)			T2D (n=835)		<i>p</i>	adjusted OR	[95% CI]	adjusted <i>p</i>
	Genotype	n	frequency	n	frequency				
rs17373080	CC	815	0,41	381	0,46	0,08	0,82	[0,69-0,98]	0,03
	CG	934	0,47	367	0,44				
	GG	236	0,12	87	0,10				
	Total	1985		835					
rs56151148	CC	1655	0,84	684	0,82	0,23*	1,15	[0,92-1,45]	0,22
	CT	303	0,15	141	0,17				
	TT	12	0,01	9	0,01				
	Total	1970		834					
rs26955121	CC	629	0,32	262	0,31	0,79	1,02	[0,85-1,23]	0,80
	CT	970	0,49	401	0,48				
	TT	382	0,19	170	0,20				
	Total	1981		833					
rs2303044	CC	1726	0,87	733	0,88	0,43*	0,84	[0,65-1,09]	0,20
	CT	242	0,12	96	0,12				
	TT	12	0,01	2	0,00				
	Total	1980		831					
rs3219281	CC	1624	0,83	696	0,84	0,27*	0,87	[0,69-1,10]	0,25
	CT	323	0,16	128	0,15				
	TT	21	0,01	4	0,00				
	Total	1968		828					

* Fisher exact test

ORs and *p* were adjusted for age, gender and BMI. A dominant model was used to calculate the odds ratios.

Table 3a. Genotype distribution for the 5 *LXRβ* SNPs in obese and non obese individuals from the MONICA samples and ORs [95%CI] of obesity

Combined MONICA Lille and Toulouse											
		Global (n=2318)		Non obese (n=1945)		Obese (n=373)					
	Genotype	n	frequency	n	frequency	n	frequency	<i>p</i>	adjusted OR	[95% CI]	adjusted <i>p</i>
rs17373080	CC	1094	0,48	937	0,48	157	0,43	0,13	1,26	[1,00-1,59]	0,05
	CG	970	0,42	804	0,42	166	0,45				
	GG	234	0,10	191	0,10	43	0,12				
	Total	2298		1932		366					
rs56151148	CC	1909	0,83	1595	0,83	314	0,85	0,46*	0,78	[0,57-1,08]	0,13
	CT	378	0,16	325	0,17	53	0,14				
	TT	12	0,01	11	0,01	1	0,00				
	Total	2299		1931		368					
rs26955121	CC	744	0,32	616	0,32	128	0,35	0,30	0,90	[0,71-1,14]	0,39
	CT	1129	0,49	947	0,49	182	0,49				
	TT	429	0,19	370	0,19	59	0,16				
	Total	2302		1933		369					
rs2303044	CC	1966	0,85	1658	0,85	308	0,83	0,41*	1,23	[0,91-1,67]	0,18
	CT	322	0,14	262	0,14	60	0,16				
	TT	23	0,01	20	0,01	3	0,01				
	Total	2311		1940		371					
rs3219281	CC	1876	0,83	1571	0,83	305	0,82	0,77*	1,03	[0,76-1,39]	0,85
	CT	371	0,16	310	0,16	61	0,16				
	TT	24	0,01	19	0,01	5	0,01				
	Total	2271		1900		371					

Table 3b. Genotype distribution for the 5 *LXRβ* SNPs in overweight or obese and normal weight individuals from the HELENA-CSS and ORs [95%CI] of overweight/obesity

HELENA											
		Global (n=1134)		Normal weight (n=879)		Overweight/Obese (n=265)					
	Genotype	n	frequency	n	frequency	n	frequency	<i>p</i>	adjusted OR	[95% CI]	adjusted <i>p</i>
rs17373080	CC	529	0,46	427	0,49	102	0,39	0,01	1,59	[1,19-2,13]	0,002
	CG	491	0,43	366	0,42	125	0,48				
	GG	121	0,11	85	0,10	36	0,14				
	Total	1141		878		263					
rs56151148	CC	961	0,84	728	0,83	233	0,88	0,13*	0,72	[0,47-1,11]	0,14
	CT	173	0,15	142	0,16	31	0,12				
	TT	10	0,01	9	0,01	1	0,00				
	Total	1144		879		265					
rs26955121	CC	407	0,36	301	0,34	106	0,40	0,15	0,76	[0,57-1,02]	0,07
	CT	553	0,48	430	0,49	123	0,47				
	TT	183	0,16	148	0,17	35	0,13				
	Total	1143		879		264					
rs2303044	CC	968	0,85	761	0,87	207	0,78	0,003*	1,84	[1,27-2,66]	0,001
	CT	164	0,14	111	0,13	53	0,20				
	TT	9	0,01	5	0,01	4	0,02				
	Total	1141		877		264					
rs3219281	CC	932	0,81	732	0,83	200	0,75	0,01*	1,78	[1,25-2,52]	0,001
	CT	197	0,17	138	0,16	59	0,22				
	TT	15	0,01	9	0,01	6	0,02				
	Total	1144		879		265					

* Fisher exact test

ORs and *p* were adjusted for age, gender and centre.

Table 4. Associations for the 5 *LXRβ* SNPs in control individuals from the HUNT 2 case control study

LXRb rs17373080 (n)	CC (807)	CG (915)	GG (231)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> G* vs CC
BMI, kg/m ²	26,4 ± 3,9	26,4 ± 4,0	26,1 ± 3,7	0,49	0,55
Waist circumference, cm	87,6 ± 11,1	88,2 ± 11,2	87,5 ± 10,8	0,43	0,99
Waist/hip ratio	0,854 ± 0,077	0,862 ± 0,081	0,860 ± 0,080	0,12	0,33
Glucose, mmol/L	4,99 ± 0,43	4,96 ± 0,43	5,00 ± 0,39	0,12	0,03
Triglyceride, mmol/L	1,70 ± 0,92	1,68 ± 0,94	1,66 ± 0,88	0,72	0,28
Cholesterol, mmol/L	6,27 ± 1,24	6,27 ± 1,25	6,30 ± 1,24	0,96	0,96
HDL-cholesterol, mmol/L	1,41 ± 0,40	1,42 ± 0,42	1,44 ± 0,41	0,61	0,31
LXRb rs56151148 (n)	CC (1628)	CT (299)	TT (12)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	26,4 ± 3,8	26,5 ± 4,3	26,0 ± 4,0	0,90	0,67
Waist circumference, cm	87,9 ± 11,1	88,0 ± 11,5	83,9 ± 8,3	0,46	0,82
Waist/hip ratio	0,858 ± 0,080	0,860 ± 0,079	0,822 ± 0,058	0,29	0,87
Glucose, mmol/L	4,97 ± 0,42	5,01 ± 0,46	4,98 ± 0,38	0,10	0,07
Triglyceride, mmol/L	1,69 ± 0,92	1,63 ± 0,92	1,52 ± 0,91	0,24	0,03
Cholesterol, mmol/L	6,28 ± 1,25	6,25 ± 1,21	6,42 ± 1,30	0,84	0,57
HDL-cholesterol, mmol/L	1,41 ± 0,42	1,44 ± 0,40	1,48 ± 0,32	0,53	0,25
LXRb rs2695121 (n)	CC (620)	CT (951)	TT (379)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	26,3 ± 4,0	26,4 ± 3,9	26,5 ± 3,7	0,62	0,32
Waist circumference, cm	88,0 ± 11,1	87,7 ± 11,1	88,1 ± 11,2	0,74	0,51
Waist/hip ratio	0,862 ± 0,082	0,856 ± 0,077	0,859 ± 0,081	0,25	0,75
Glucose, mmol/L	4,98 ± 0,42	4,97 ± 0,43	4,99 ± 0,43	0,85	0,92
Triglyceride, mmol/L	1,66 ± 0,94	1,68 ± 0,88	1,73 ± 0,99	0,52	0,19
Cholesterol, mmol/L	6,32 ± 1,20	6,23 ± 1,27	6,30 ± 1,24	0,36	0,18
HDL-cholesterol, mmol/L	1,43 ± 0,43	1,42 ± 0,40	1,39 ± 0,42	0,36	0,12
LXRb rs2303044 (n)	CC (1702)	CT (235)	TT (12)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	26,4 ± 3,9	26,7 ± 4,0	25,9 ± 3,4	0,46	0,52
Waist circumference, cm	87,8 ± 11,1	88,8 ± 11,4	88,8 ± 6,0	0,42	0,53
Waist/hip ratio	0,858 ± 0,079	0,864 ± 0,084	0,878 ± 0,059	0,40	0,37
Glucose, mmol/L	4,98 ± 0,44	4,99 ± 0,36	4,88 ± 0,55	0,79	0,73
Triglyceride, mmol/L	1,68 ± 0,92	1,74 ± 0,98	1,35 ± 0,34	0,49	0,79
Cholesterol, mmol/L	6,27 ± 1,24	6,34 ± 1,23	5,93 ± 1,25	0,43	0,40
HDL-cholesterol, mmol/L	1,42 ± 0,42	1,42 ± 0,40	1,33 ± 0,36	0,79	0,64
LXRb rs3219281 (n)	CC (1850)	CT (368)	TT (23)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	26,4 ± 3,9	26,4 ± 3,9	26,6 ± 4,0	0,97	0,78
Waist circumference, cm	87,8 ± 11,1	87,9 ± 11,3	91,7 ± 9,3	0,29	0,97
Waist/hip ratio	0,858 ± 0,079	0,860 ± 0,081	0,902 ± 0,072	0,04	0,37
Glucose, mmol/L	4,98 ± 0,43	4,97 ± 0,41	4,90 ± 0,51	0,57	0,53
Triglyceride, mmol/L	1,69 ± 0,94	1,70 ± 0,87	1,47 ± 0,49	0,56	0,63
Cholesterol, mmol/L	6,26 ± 1,24	6,37 ± 1,27	6,18 ± 1,18	0,32	0,07
HDL-cholesterol, mmol/L	1,41 ± 0,41	1,42 ± 0,44	1,33 ± 0,31	0,59	0,43

Data are means ± SD.

Table 5. Associations for the 5 *LXR β* SNPs in the MONICA study

LXRb rs17373080 (n)	CC (1093)	CG (969)	GG (234)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> G* vs CC	Adjusted <i>p</i> GG vs C*
BMI, kg/m ²	25,9 ± 4,5	26,1 ± 4,8	26,4 ± 4,5	0,42	0,23	0,32
Waist circumference, cm	89,0 ± 13,4	88,9 ± 13,7	90,2 ± 13,2	0,38	0,40	0,12
Waist/hip ratio	0,885 ± 0,094	0,882 ± 0,090	0,893 ± 0,095	0,43	0,40	0,03
Glucose, mmol/L	5,66 ± 1,51	5,59 ± 1,28	5,64 ± 1,25	0,60	0,35	0,82
Insulin, μU/mL	11,26 ± 9,04	11,00 ± 6,95	11,39 ± 6,44	0,57	0,46	0,83
HOMA-IR index	2,95 ± 3,13	2,84 ± 2,44	2,96 ± 2,10	0,47	0,28	0,79
HOMA-B cell index, %	134,0 ± 476,0	119,0 ± 73,8	127,9 ± 118,2	0,64	0,71	0,86
Triglycerides, mmol/L	1,27 ± 0,90	1,28 ± 0,92	1,43 ± 1,34	0,28	0,40	0,14
HDL-cholesterol, mmol/L	1,47 ± 0,45	1,50 ± 0,46	1,45 ± 0,44	0,29	0,36	0,26
LDL-cholesterol, mmol/L	3,84 ± 1,01	3,79 ± 1,00	3,77 ± 0,87	0,49	0,29	0,52
LXRb rs56151148 (n)	CC (1907)	CT (378)	TT (12)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC	
BMI, kg/m ²	26,0 ± 4,7	25,9 ± 4,3	26,2 ± 4,8	0,85	0,31	
Waist circumference, cm	89,1 ± 13,5	88,9 ± 13,4	87,0 ± 11,3	0,82	0,24	
Waist/hip ratio	0,885 ± 0,092	0,883 ± 0,095	0,863 ± 0,102	0,68	0,21	
Glucose, mmol/L	5,64 ± 1,43	5,59 ± 1,21	5,32 ± 0,78	0,62	0,72	
Insulin, μU/mL	11,28 ± 8,28	10,53 ± 5,29	11,00 ± 10,15	0,33	0,09	
HOMA-IR index	2,94 ± 2,89	2,69 ± 1,76	2,56 ± 2,45	0,32	0,13	
HOMA-B cell index, %	129,6 ± 365,8	114,0 ± 61,8	140,3 ± 110,7	0,48	0,15	
Triglycerides, mmol/L	1,30 ± 0,95	1,26 ± 1,03	1,00 ± 0,41	0,35	0,27	
HDL-cholesterol, mmol/L	1,48 ± 0,45	1,47 ± 0,47	1,49 ± 0,34	0,85	0,43	
LDL-cholesterol, mmol/L	3,81 ± 1,00	3,87 ± 0,96	3,74 ± 0,85	0,55	0,31	
LXRb rs2695121 (n)	CC (744)	CT (1128)	TT (428)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC	Adjusted <i>p</i> TT vs C*
BMI, kg/m ²	26,2 ± 4,7	25,9 ± 4,8	26,0 ± 4,2	0,39	0,25	0,99
Waist circumference, cm	89,5 ± 13,6	88,6 ± 13,3	88,6 ± 13,6	0,31	0,37	0,23
Waist/hip ratio	0,885 ± 0,092	0,882 ± 0,092	0,889 ± 0,094	0,42	0,58	0,23
Glucose, mmol/L	5,61 ± 1,29	5,62 ± 1,43	5,69 ± 1,46	0,57	0,51	0,36
Insulin, μU/mL	11,29 ± 6,55	10,75 ± 6,28	11,37 ± 7,59	0,09	0,30	0,18
HOMA-IR index	2,93 ± 2,48	2,74 ± 1,96	2,98 ± 2,59	0,18	0,56	0,16
HOMA-B cell index, %	124,6 ± 93,9	114,6 ± 60,1	162,1 ± 757,2	0,09	0,20	0,30
Triglycerides, mmol/L	1,33 ± 1,11	1,27 ± 0,91	1,28 ± 0,83	0,77	0,51	0,82
HDL-cholesterol, mmol/L	1,48 ± 0,45	1,48 ± 0,46	1,48 ± 0,46	1,00	0,41	0,95
LDL-cholesterol, mmol/L	3,77 ± 0,94	3,84 ± 1,00	3,82 ± 1,04	0,37	0,11	0,91
LXRb rs2303044 (n)	CC (1964)	CT (322)	TT (23)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC	
BMI, kg/m ²	26,0 ± 4,6	26,2 ± 4,7	25,8 ± 4,8	0,74	0,35	
Waist circumference, cm	89,1 ± 13,4	89,1 ± 13,7	91,8 ± 16,7	0,63	0,33	
Waist/hip ratio	0,884 ± 0,092	0,884 ± 0,094	0,910 ± 0,096	0,41	0,15	
Glucose, mmol/L	5,63 ± 1,42	5,59 ± 1,21	5,72 ± 1,16	0,75	0,56	
Insulin, μU/mL	11,05 ± 7,88	11,69 ± 8,22	13,55 ± 10,88	0,23	0,16	
HOMA-IR index	2,87 ± 2,75	3,03 ± 2,70	3,67 ± 3,42	0,35	0,34	
HOMA-B cell index, %	126,6 ± 358,3	130,7 ± 121,8	123,2 ± 78,1	0,22	0,84	
Triglycerides, mmol/L	1,28 ± 0,94	1,31 ± 0,99	1,92 ± 1,88	0,08	0,16	
HDL-cholesterol, mmol/L	1,48 ± 0,45	1,48 ± 0,47	1,28 ± 0,40	0,11	0,32	
LDL-cholesterol, mmol/L	3,81 ± 0,98	3,86 ± 1,02	3,92 ± 0,95	0,65	0,31	
LXRb rs3219281 (n)	CC (1875)	CT (371)	TT (24)	Crude <i>p</i>	Adjusted <i>p</i> T* vs CC	
BMI, kg/m ²	26,0 ± 4,7	26,1 ± 4,5	26,6 ± 4,6	0,78	0,58	
Waist circumference, cm	89,1 ± 13,6	89,6 ± 13,1	93,4 ± 15,0	0,26	0,26	
Waist/hip ratio	0,884 ± 0,092	0,890 ± 0,093	0,906 ± 0,064	0,26	0,08	
Glucose, mmol/L	5,63 ± 1,40	5,62 ± 1,26	6,17 ± 1,59	0,07	0,86	
Insulin, μU/mL	11,05 ± 7,89	11,57 ± 7,95	14,10 ± 8,94	0,07	0,09	
HOMA-IR index	2,87 ± 2,78	3,01 ± 2,60	4,19 ± 3,33	0,03	0,13	
HOMA-B cell index, %	126,6 ± 366,1	127,1 ± 114,9	111,5 ± 62,3	0,50	0,19	
Triglycerides, mmol/L	1,28 ± 0,94	1,39 ± 1,10	1,52 ± 1,11	0,03	0,01	
HDL-cholesterol, mmol/L	1,48 ± 0,46	1,46 ± 0,45	1,22 ± 0,40	0,02	0,16	
LDL-cholesterol, mmol/L	3,82 ± 0,99	3,83 ± 1,02	3,85 ± 1,03	0,99	0,99	

Data are means ± SD.

Table 6. Associations for the 5 *LXR* β SNPs in the HELENA-CSS

LXRb rs17373080	CC	CG	GG	Crude	Adjusted
(n)	(532)	(494)	(122)	<i>p</i>	<i>p</i> G* vs CC
BMI, kg/m ²	21,2 ± 3,5	21,4 ± 4,0	21,5 ± 3,8	0,45	0,84
Waist circumference, cm	72,2 ± 9,1	72,4 ± 9,6	72,4 ± 9,3	0,90	0,27
Waist/hip ratio	0,794 ± 0,069	0,796 ± 0,072	0,787 ± 0,060	0,45	0,95
Glucose, mmol/L	5,01 ± 0,41	5,02 ± 0,39	4,99 ± 0,40	0,58	0,21
Insulin, μ U/mL	9,24 ± 4,84	10,28 ± 6,23	11,39 ± 7,82	0,03	0,04
HOMA-IR index	2,07 ± 1,22	2,31 ± 1,45	2,55 ± 1,79	0,01	0,02
HOMA-B cell index, %	136,2 ± 95,3	147,2 ± 126,6	163,5 ± 129,7	0,06	0,24
Triglycerides, mmol/L	0,78 ± 0,34	0,79 ± 0,41	0,78 ± 0,37	0,91	0,88
HDL-cholesterol, mmol/L	1,43 ± 0,26	1,43 ± 0,28	1,45 ± 0,30	0,61	0,28
LDL-cholesterol, mmol/L	2,49 ± 0,63	2,43 ± 0,63	2,44 ± 0,66	0,72	0,84
LXRb rs56151148	CC	CT	TT	Crude	Adjusted
(n)	(967)	(174)	(10)	<i>p</i>	<i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	21,4 ± 3,8	20,9 ± 3,7	20,9 ± 1,9	0,23	0,18
Waist circumference, cm	72,3 ± 9,5	72,1 ± 8,8	71,8 ± 4,6	0,94	0,68
Waist/hip ratio	0,794 ± 0,073	0,791 ± 0,052	0,789 ± 0,042	0,84	0,73
Glucose, mmol/L	5,00 ± 0,40	5,01 ± 0,40	4,95 ± 0,37	0,90	0,52
Insulin, μ U/mL	10,33 ± 7,80	10,20 ± 6,88	6,28 ± 1,86	0,07	0,63
HOMA-IR index	2,33 ± 1,94	2,27 ± 1,74	1,34 ± 0,42	0,22	0,56
HOMA-B cell index, %	144,6 ± 115,2	143,6 ± 106,8	81,5 ± 18,7	0,06	0,97
Triglycerides, mmol/L	0,78 ± 0,40	0,77 ± 0,34	0,77 ± 0,27	0,94	0,93
HDL-cholesterol, mmol/L	1,43 ± 0,28	1,42 ± 0,26	1,60 ± 0,39	0,10	0,53
LDL-cholesterol, mmol/L	2,44 ± 0,63	2,45 ± 0,72	2,50 ± 0,80	0,92	0,37
LXRb rs2695121	CC	CT	TT	Crude	Adjusted
(n)	(411)	(555)	(184)	<i>p</i>	<i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	21,5 ± 4,0	21,2 ± 3,6	21,1 ± 3,5	0,31	0,13
Waist circumference, cm	72,8 ± 9,5	71,9 ± 9,4	72,1 ± 8,7	0,39	0,16
Waist/hip ratio	0,795 ± 0,065	0,793 ± 0,076	0,794 ± 0,060	0,93	0,70
Glucose, mmol/L	5,01 ± 0,42	5,00 ± 0,38	5,00 ± 0,40	0,77	0,27
Insulin, μ U/mL	10,85 ± 6,98	9,48 ± 5,20	9,16 ± 4,68	0,03	0,008
HOMA-IR index	2,45 ± 1,71	2,11 ± 1,17	2,05 ± 1,12	0,01	0,002
HOMA-B cell index, %	153,1 ± 110,9	137,4 ± 113,6	142,9 ± 118,7	0,03	0,03
Triglycerides, mmol/L	0,77 ± 0,35	0,79 ± 0,42	0,78 ± 0,36	0,79	0,23
HDL-cholesterol, mmol/L	1,43 ± 0,28	1,44 ± 0,28	1,41 ± 0,26	0,60	0,66
LDL-cholesterol, mmol/L	2,46 ± 0,65	2,45 ± 0,65	2,40 ± 0,61	0,64	0,79
LXRb rs2303044	CC	CT	TT	Crude	Adjusted
(n)	(959)	(161)	(9)	<i>p</i>	<i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	21,2 ± 3,6	22,0 ± 4,4	22,6 ± 3,1	0,01	0,006
Waist circumference, cm	72,2 ± 9,2	73,1 ± 10,6	73,4 ± 7,4	0,48	0,18
Waist/hip ratio	0,794 ± 0,065	0,794 ± 0,079	0,757 ± 0,075	0,26	0,96
Glucose, mmol/L	5,01 ± 0,40	5,02 ± 0,37	5,12 ± 0,45	0,64	0,91
Insulin, μ U/mL	10,19 ± 7,46	10,52 ± 8,98	14,09 ± 5,84	0,06	0,73
HOMA-IR index	2,29 ± 1,86	2,36 ± 2,16	3,36 ± 1,50	0,04	0,84
HOMA-B cell index, %	141,4 ± 105,3	153,9 ± 154,0	191,5 ± 76,2	0,11	0,73
Triglycerides, mmol/L	0,78 ± 0,39	0,83 ± 0,39	0,86 ± 0,45	0,20	0,29
HDL-cholesterol, mmol/L	1,43 ± 0,27	1,39 ± 0,28	1,56 ± 0,30	0,05	0,53
LDL-cholesterol, mmol/L	2,44 ± 0,65	2,47 ± 0,62	2,34 ± 0,51	0,77	0,72
LXRb rs3219281	CC	CT	TT	Crude	Adjusted
(n)	(937)	(199)	(15)	<i>p</i>	<i>p</i> T* vs CC
BMI, kg/m ²	21,2 ± 3,6	21,8 ± 4,3	22,3 ± 3,5	0,05	0,01
Waist circumference, cm	72,0 ± 9,0	73,5 ± 11,0	72,2 ± 6,4	0,13	0,03
Waist/hip ratio	0,794 ± 0,070	0,794 ± 0,069	0,770 ± 0,048	0,42	0,82
Glucose, mmol/L	90,85 ± 7,32	91,28 ± 7,13	93,31 ± 5,83	0,32	0,18
Insulin, μ U/mL	10,42 ± 10,51	10,48 ± 8,71	13,60 ± 6,93	0,05	0,87
HOMA-IR index	2,28 ± 1,86	2,37 ± 2,11	3,19 ± 1,69	0,03	0,74
HOMA-B cell index, %	141,7 ± 104,7	151,6 ± 149,3	172,5 ± 84,3	0,22	0,61
Triglycerides, mmol/L	68,66 ± 35,56	69,88 ± 31,95	67,94 ± 26,42	0,62	0,67
HDL-cholesterol, mmol/L	55,60 ± 10,58	54,02 ± 10,76	57,69 ± 10,96	0,11	0,31
LDL-cholesterol, mmol/L	94,82 ± 25,26	94,82 ± 24,29	84,56 ± 19,25	0,27	0,38

Data are means ± SD.

Supplementary table 1. Clinical characteristics of controls and T2D cases in HUNT 2

	Controls (n=1986)	T2D (n=835)	<i>p</i>
Men, n (%)	978 (49)	407 (49)	ns
Age, yrs	65,6 ± 14,3	66,9 ± 13,6	0,02
BMI, kg/m ²	26,4 ± 3,9	29,1 ± 5,0	<0,001
Waist circumference, cm	87,9 ± 11,2	96,2 ± 12,5	<0,001
Waist/hip ratio	0,86 ± 0,08	0,90 ± 0,08	<0,001
Glucose, mmol/L	4,98 ± 0,43	10,20 ± 4,52	<0,001
Triglyceride, mmol/L	1,68 ± 0,92	2,50 ± 1,80	<0,001
Cholesterol, mmol/L	6,27 ± 1,25	6,10 ± 1,30	<0,001
HDL-cholesterol, mmol/L	1,41 ± 0,41	1,20 ± 0,40	<0,001

Data are means ± SD or n (%).

Supplementary table 2. *LXRβ* gene sequencing primers

Primer pair	Forward primer 5' - 3'	Reverse primer 5' - 3'
1	CGATGGGCCTGAGTAGACAT	TGCAAAAATGGTTTCAATAACTTG
2	GGTCCGAGACTGAGCTTTTT	AACCCATTTCTCGCTTCTT
3	CCAATCACCAAGTTATTGAAACC	GGGAGGAAATGGAAGGAGAG
4	TCCGGTGAGTTTCCAACCTC	TCCAATCCACCTGCTTTTTTC
5	GAGGTGGGGTCAGAATGAGA	CAAAGAGCCAGAGGATGGAG
6	GAGGGGTTTAGGAAGGGAGA	GTGGGCAGATGGACCATTA
7	CCCTCCACAACCTTGAGTGT	CTCCAACAGGGATGAGTTGG
8	TGAGCCAAGGAGAGAAAGGA	CTTGGGTGAGACCACGTTTT
9	CACGTGGCAGGTACTIONCAGTG	CCAGATCTCCGACAGCAGA
10	GTTTCGGGCTGAGGGAGT	ACCCTATGTGCCACCCTTTT
11	GGGCTTCTAGGGACCTCAGT	CCTGGCTTGATCTGTTCTCC

The sequencing was performed between each primer pair.

III.2. Synthèse des résultats

Les polymorphismes génétiques du gène *NR1H2* ont été identifiés par séquençage en collaboration avec le laboratoire du Pr Hilde Nebb (Oslo, Norvège). Nous avons détecté 11 SNPs ayant une MAF>0,05 et avons déterminé, grâce à la carte de DL, que 5 SNPs (rs17373080, rs56151148, rs2695121, rs2303044 et rs3219281) couvrent la totalité de la variabilité génétique commune de *LXRβ*. Ces 5 SNPs ont alors été génotypés chez les participants de l'étude cas-témoins pour le DT2 nichée dans HUNT 2, des échantillons MONICA Lille et Toulouse et de HELENA (voir les caractéristiques des sujets pages 80-83).

Le SNP rs17373080 (C>G, MAF 0,33) – tag SNP d'un bloc haplotypique de 5,7 kpb – **est associé au risque de DT2** dans l'étude HUNT (OR=0,84), **d'obésité** dans l'étude MONICA (OR=1,26) **et de surpoids** chez les adolescents de l'étude HELENA (OR=1,59). Des analyses *in silico* ont révélé que le SNP rs28514894 (T>C), en parfait DL avec le rs17373080, pouvait créer un site potentiel de fixation pour les facteurs de transcription HNF4α (*hepatic nuclear factor 4 alpha*) et NF1s (*nuclear factor 1 A, B, C et X*). Des expériences de retard sur gel ont montré que HNF4α et les NF1s sont capables de se fixer sur leur élément de réponse quelque soit l'allèle. De plus, des expériences de transfection cellulaire ont été menées afin de voir l'impact du SNP rs28514894 sur l'expression de *LXRβ* dans les cellules HepG2 et JEG3. Malgré une légère différence d'expression du fragment *LXRβ* comportant le SNP entre les allèles C et T, nous n'avons pas détecté de différence de réponse aux facteurs de transcription HNF4α et NF1s.

III.3. Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que le SNP rs17373080 du gène codant *LXRβ* est associé au risque de DT2 et d'obésité. Ces résultats sont parfaitement cohérents avec les études de Dahlman *et al* qui ont décrit que les SNPs rs35463555 et rs17373080 prédisposaient à l'obésité [Dahlman *et al.* 2006] et que le rs17373080 était associé à une diminution du risque de DT2 [Dahlman *et al.* 2009]. Notons que le rs17373080 est associé au risque d'obésité chez les adultes et les adolescents mais il est associé à l'IMC seulement chez les adolescents. L'étude plus récente de Dahlman *et al* ne décrit pas non plus d'association de ce polymorphisme avec l'IMC (étude avec ~2000 individus). Il est possible que la présence de nombreux facteurs de confusion et des mécanismes de compensation chez les adultes masque l'effet des polymorphismes de *LXRβ* sur la masse grasse. A ce jour, aucune GWAS n'a rapporté d'association entre un SNP de *LXRβ* et ces désordres métaboliques. Toutefois, les études GWA requièrent un seuil de significativité tellement

exigent ($<10^{-8}$) qu'on ne peut exclure que des polymorphismes de *LXRβ* aient été associés de façon marginale (seuil de significativité au-delà de 10^{-8} mais inférieur à 0,05) mais que ces associations n'aient pas été décrites.

L'effet protecteur de l'allèle G du rs17373080 sur le DT2 peut s'expliquer par son association avec une glycémie plus basse dans l'étude HUNT 2. Ces associations peuvent sembler à l'inverse de ce à quoi l'on pourrait s'attendre de l'effet de l'allèle mineur d'un SNP au vu du phénotype des souris *LXRβ*^{-/-} [Gerin *et al.* 2005]. Ces souris présentent en effet une réduction de la masse grasse mais une intolérance au glucose (due à une altération de la sécrétion d'insuline induite par le glucose). Toutefois, on peut s'attendre à des conséquences différentes entre le KO complet d'un gène et les variations subtiles que sont les SNPs. De plus, il se peut que l'allèle mineur d'un SNP induise en fait le recrutement de facteurs de transcription et entraîne alors une augmentation de l'expression du gène. C'est ce qui semble être le cas pour l'allèle C du rs28514894, en parfait DL avec l'allèle mineur G du rs17373080, qui est associé à une légère augmentation de l'activité du promoteur *LXRβ* dans nos expériences de transfection cellulaire, suggérant que les allèles C et G des SNPs rs28514894 et rs17373080, respectivement, soient associés avec une augmentation du niveau d'ARNm *LXRβ*. L'effet protecteur de ces allèles sur le DT2 est donc cohérent avec le phénotype des souris KO *LXRβ*^{-/-} décrit par Gerin *et al.* [Gerin *et al.* 2005].

Dahlman *et al.* ont récemment décrit des études fonctionnelles pour le rs17373080 [Dahlman *et al.* 2009]. Ces auteurs ont réalisé les analyses *in silico* à l'aide du logiciel TESS (*transcription element search system*) et ont trouvé un site potentiel de fixation pour les facteurs de transcription NF1s chevauchant le SNP rs17373080. Leurs expériences de retard sur gel et de transfection cellulaire ont montré que les NF1s pouvaient se lier et activer l'expression du fragment contenant le rs17373080, quelque soit l'allèle. Dans notre étude, nous avons réalisé les analyses *in silico* à l'aide du logiciel Genomatix [Cartharius *et al.* 2005], selon lequel l'allèle C du rs28514894 créerait un site potentiel de fixation pour les facteurs de transcription HNF4α et NF1. Nos expériences ont montré que ces facteurs de transcription pouvaient se fixer et réguler l'expression du fragment contenant le SNP rs28514894, quelque soit l'allèle. Il se peut que la différence de réponse aux facteurs de transcription entre les allèles soit trop petite pour être détectée par ces méthodes. Néanmoins, même une petite différence peut avoir un impact sur l'ensemble de l'organisme au cours du temps, en particulier s'il existe des différences d'expression entre tissus. Les mécanismes moléculaires sous-tendant les associations observées en population restent donc à éclaircir.

En conclusion, nous avons montré qu'un bloc haplotypique du gène codant LXR β , marqué par le SNP rs17373080, est associé au risque de DT2 et d'obésité. Cependant, la compréhension des mécanismes moléculaires expliquant ces associations nécessite d'autres expériences.

IV. Etude des gènes *ANGPTL3* et *ANGPTL4*

IV.1. Contexte de l'étude

Comme nous l'avons vu dans le chapitre V.3.a. et V.3.b. de l'Introduction (pages 67-71), de récentes données suggèrent un rôle important pour Angptl3 et Angptl4 dans le métabolisme énergétique, tout au moins chez la souris [Hato *et al.* 2008]. Ces deux protéines appartiennent à la famille des ANGPTLs, qui sont des protéines plasmatiques agissant comme des facteurs endocriniens sur leurs tissus cibles. ANGPTL3 et 4 sont les membres les plus apparentés de cette famille et partagent des fonctions communes [Hato *et al.* 2008]. Toutes les deux sont impliquées dans le métabolisme des lipides par leur activité inhibitrice de lipases (LPL, EL, HL et ATGL), entraînant entre autre une augmentation de la concentration plasmatique de TG [Shimizugawa *et al.* 2002; Yoshida *et al.* 2002; Shimamura *et al.* 2007; Mandard *et al.* 2006; Lichtenstein *et al.* 2007]. De plus, elles stimulent la lipolyse du TA, conduisant à une augmentation du taux d'AGL dans le sang [Shimamura *et al.* 2003; Yoshida *et al.* 2002]. Par ailleurs, Angptl4 empêche le stockage des graisses en stimulant l'oxydation des AG et l'utilisation des stocks de TG [Mandard *et al.* 2006]. Angptl4 interagit également avec la flore intestinale dans l'absorption des graisses [Backhed *et al.* 2004; Backhed *et al.* 2007]. Enfin, Angptl4 pourrait intervenir dans le métabolisme glucidique mais son rôle reste à éclaircir [Xu *et al.* 2005; Koster *et al.* 2005; Mandard *et al.* 2006]. ANGPTL3 et 4 sont exprimées principalement dans le foie, mais ANGPTL4 est aussi exprimée dans le TA et son expression est régulée par les PPARs et induite par le jeûne [Romeo *et al.* 2009; Yoon *et al.* 2000; Kersten *et al.* 2009; Kersten *et al.* 2000].

1 **Associations between common genetic polymorphisms in angiotensin-like proteins 3**
2 **and 4 and lipid metabolism and adiposity in European adolescents and adults**

3

4 Abbreviated title: *ANGPTL3* and *ANGPTL4* polymorphisms

5

6 Précis: The present study shows associations between an *ANGPTL3* polymorphism and HDL-
7 cholesterol metabolism and between an *ANGPTL4* polymorphism and adiposity markers.

8

9 Vanessa Legry¹, Szilvia Bokor¹, Dominique Cottel¹, Laurent Beghin^{2,3}, Giovina Catasta⁴, Eniko
10 Nagy⁵, Marcela Gonzalez-Gross⁶, Andre Spinneker⁷, Peter Stehle⁷, Dénes Molnár⁵, Luis A. Moreno⁸,
11 Philippe Amouyel¹, Jean Dallongeville¹, Aline Meirhaeghe¹

12

13 ¹ INSERM, U744, Lille; Institut Pasteur de Lille, Lille; Univ. Lille Nord de France, Lille; UDSL,
14 Lille, France.

15 ² EA-3925, Université Lille 2 Droit et Santé, Faculté de Médecine, Lille, France.

16 ³ CIC-9301-CH&U-Inserm de Lille, IFR 114, IMPRT, CHRU de Lille, Lille, France.

17 ⁴ National Research Institute for Food and Nutrition (INRAN), Roma, Italy.

18 ⁵ University of Pécs, Department of Pediatrics, Pécs, Hungary.

19 ⁶ Facultad de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte - INEF, Universidad Politécnica de
20 Madrid, Madrid, Spain.

21 ⁷ Institut für Ernährungs- und Lebensmittelwissenschaften – Humanernährung, Rheinische Friedrich-
22 Wilhelms Universität, Bonn, Germany.

23 ⁸ GENUD (Growth, Exercise, Nutrition and Development) Research Group, Escuela Universitaria de
24 Ciencias de la Salud, Universidad de Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain.

25

26

1 **Corresponding author:**

2 Dr Aline Meirhaeghe, INSERM U744, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr. Calmette, BP 245, F-
3 59019 LILLE cedex, France. Tel: + 33 3 20 87 73 91. Fax: +33 3 20 87 78 94.

4 aline.meirhaeghe-hurez@pasteur-lille.fr

5

6

7 DISCLOSURE STATEMENT: The authors have nothing to disclose.

8

9 **Number of words (text):** 3324

10 **Number of words (abstract):** 223

11 **Number of tables:** 4 + 1 supplementary table

12 **Number of figures:** 1 + 2 supplementary figures

13

14

15 **Statement of financial support:**

16 The HELENA-CSS received funding from the European Union's Sixth RTD Framework Programme
17 (Contract FOOD-CT-2005-007034), the Spanish Ministry of Education (EX-2007-1124; AGL2007-
18 29784-E/ALI; AP-2005-3827), Universidad Politécnica de Madrid (CH/018/2008), Axis-Shield
19 Diagnostics Ltd (Oslo, Norway), Abbot Científica S.A. (Spain) and Cognis GmbH (Germany).

20 The writing group takes sole responsibility for the content of this article and the European Union is not
21 liable for any use that may be made of the information contained therein.

22 The MONICA Lille population study was funded by grants from the Conseil Régional du Nord-Pas de
23 Calais, ONIVINS, Parke-Davis, the Mutuelle Générale de l'Education Nationale (MGEN), the Réseau
24 National de Santé Publique, the Direction Générale de la Santé, the Institut National de la Santé et de
25 la Recherche Médicale (INSERM), the Institut Pasteur de Lille and the Unité d'Evaluation du Centre
26 Hospitalier et Universitaire de Lille. Vanessa Legry is funded by the Institut Pasteur de Lille.

27

1 **Abstract**

2 **Context.** Plasma-borne angiopoietin-like (ANGPTL) proteins act as endocrine factors on their target
3 tissues. Since ANGPTL3 and ANGPTL4 play important roles in lipid metabolism and the regulation
4 of adiposity in mice, we hypothesized that genetic variability at the *ANGPTL3* and *ANGPTL4* genes
5 loci might influence lipid metabolism and fat deposition in humans.

6
7 **Objective.** To examine the association between *ANGPTL3* and *ANGPTL4* genetic polymorphisms and
8 metabolic phenotypes in adolescent and adult samples.

9
10 **Design and Participants.** Two independent population-based studies, one composed of 1144
11 adolescents (mean age 14.8 ± 1.4 y) from 9 European countries (the HELENA-CSS) and the other
12 composed of 1155 adults (age range 35-65 y) from Northern France (the MONICA Lille study), were
13 genotyped for one *ANGPTL3* polymorphism and 4 *ANGPTL4* polymorphisms.

14
15 **Results.** The *ANGPTL3* rs11207997 polymorphism (minor allele frequency (MAF) 0.32) was
16 associated with lower plasma HDL-cholesterol and ApoA1 levels in both adolescents ($p=0.0004$,
17 $p=0.00006$, respectively) and adults ($p=0.03$, $p=0.02$, respectively). The *ANGPTL4* rs4076317
18 polymorphism (MAF 0.29) was associated with a higher percentage of body fat ($p=0.02$) in
19 adolescents and a higher waist-to-hip ratio (in interaction with the peroxisome proliferator-activated
20 receptor γ (*PPARG*) Pro12Ala polymorphism) in adults ($p=0.0004$).

21
22 **Conclusion.** The present study underlines the role of ANGPTL3 in HDL-cholesterol metabolism as
23 early as in adolescence. Our data also suggest possible associations between *ANGPTL4*
24 polymorphisms and body fat but these findings require replication.

25
26 **Key terms:** ANGPTL, association study, polymorphism, gene-gene interaction, lipid metabolism,
27 adiposity.

1 **Introduction**

2 Angiopoietin-like (ANGPTL) proteins are a family of secreted proteins that was discovered a
3 decade ago. They are characterized by the presence of 2 structural domains shared with the
4 angiopoietins (a coiled-coil domain and a fibrinogen-like domain) and, unlike angiopoietins, their
5 inability to bind the TIE2 (a tyrosine kinase with immunoglobulin and epithelial growth factor (EGF)
6 homology domains) receptor. Seven members have been identified so far and denominated as
7 ANGPTLs 1 to 7 (1). Although it is known that ANGPTLs act as endocrine factors on target tissues,
8 the corresponding receptors and signaling pathways have yet to be determined.

9 Angptl3 and Angptl4 are the most closely related members of this protein family. Both inhibit
10 lipoprotein lipase (LPL) activity and prompt a decrease in very low density lipoprotein (VLDL)-
11 triglyceride (TG) clearance (2;3). Furthermore, Angptl3 and Angptl4 stimulate lipolysis in adipose
12 tissue and thus lead to the release of free fatty acids (FFAs) and glycerol from adipocytes (4;5).
13 Concordantly, mice lacking *Angptl3* and/or *Angptl4* exhibit hypotriglyceridemia, whereas
14 overexpression or intravenous injection of Angptl3 or Angptl4 increases plasma TG and FFA levels
15 (5-7). Furthermore, Angptl3 inhibits endothelial lipase (EL), which hydrolyses HDL phospholipids
16 and decreases plasma HDL levels (8) and Angptl4 reduces hepatic cholesterol uptake by inhibiting
17 LPL and hepatic lipase, leading to increase cholesterol synthesis in the liver (9). Double-knockout
18 mice die prenatally or do not survive beyond 2 months of age and present nearly undetectable TG
19 levels and low cholesterol levels – demonstrating the essential role of Angptl3/4 in the regulation of
20 circulating TG and lipoproteins (7).

21 However, Angptl3 and Angptl4 may not be redundant, as they are not always expressed in the
22 same tissues or at the same time. Whereas Angptl3 expression is restricted to the liver (regardless of
23 the nutritional status) (10), Angptl4 is expressed in adipose tissue, liver and (to a lesser extent) in
24 intestine and placenta and its transcription is strongly induced by fasting conditions (11). Indeed,
25 Angptl4 expression is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) (12). Angptl3
26 functions seem to be restricted to lipid metabolism, whereas Angptl4 has a broader sphere of activity.
27 Angptl4 overexpression in mice caused a 50% reduction in adipose tissue weight, partly by
28 stimulating fatty acid oxidation and uncoupling in fat (5). Furthermore, Angptl4 seems to mediate the

1 microbial regulation of peripheral fat storage (13). Lastly, *Angptl4* appears also to play a role in
2 glucose metabolism, although this finding remains controversial (5;7;9;14).

3 In humans, the *ANGPTL3* and *ANGPTL4* genes are located on chromosomes 1p31.3 and
4 19p13.2, respectively. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) nearby *ANGPTL3* have been
5 associated with plasma TG levels (15-17) and SNPs in *ANGPTL4* have been associated with plasma
6 HDL-cholesterol levels (17) in recent genome-wide association studies (GWAS). The goal of our
7 study was to explore the impact of the common sequence variability in *ANGPTL3* and *ANGPTL4* on
8 some metabolic phenotypes (anthropometric parameters, plasma glucose, insulin and lipid levels) in
9 both adult and adolescent samples. After selecting all the known common SNPs of each gene, we
10 performed association studies in two independent population-based samples: (i) the Healthy Lifestyle
11 in Europe by Nutrition in Adolescence-Cross Sectional Study (HELENA-CSS), composed of 1144
12 European adolescents and (ii) the MONICA Lille study, composed of 1155 French adults.

13

14 **Materials and Methods**

15 *The HELENA-CSS*

16 Participants were recruited as part of the HELENA-CSS (<http://www.helenastudy.com>)
17 performed from 2006 to 2007 in 9 European countries (Greece, Germany, Belgium, France, Hungary,
18 Italy, Sweden, Austria and Spain) as previously described (18). The protocol was approved by the
19 appropriate ethics committee in each center. Written, informed consent was obtained from each
20 subject and both of his/her parents or legal representatives. Participation in the study was voluntary.
21 The sample included a total of 3865 adolescents (mean age 14.8 ± 1.4 y) recruited through their
22 schools; the latter were randomly selected according to a proportional cluster sampling methodology
23 taking into account geographical repartition within each city, private/public school ratio, and number
24 of classes by school (19). Participants were barefoot and in underwear and anthropometric
25 measurements were taken by trained researchers. Waist and hip circumferences were measured three
26 consecutive times and with a non-elastic tape (Seca 200) to the nearest 0.1 cm. The body mass index
27 (BMI) was calculated. The percentage of body fat (%BF) was estimated from skin-fold measurements,
28 according to Slaughter *et al.* (20). Physical activity over a one-week period was evaluated using

1 accelerometers (Actigraph MTI, model GT1M, Manufacturing technology Inc., Fort Walton Beach,
2 FL, USA) (21).

3 One third of the classes ($n=1155$) were randomly selected for blood collection. Blood samples
4 were drawn at school according to a standardized collection protocol (after a 10-hour overnight fast),
5 and were sent to the Analytical Laboratory at the University of Bonn [IEL] (Germany) for subsequent
6 biochemical measurements (22). Serum TG, HDL and LDL cholesterol and glucose levels were
7 measured on the Dimension RxL clinical chemistry system (Dade Behring, Schwalbach, Germany)
8 with enzymatic methods. Serum apolipoprotein A-I and apolipoprotein B concentrations were
9 measured in an immunochemical reaction with a BN II analyser (Dade Behring, Schwalbach,
10 Germany). Blood for DNA extraction was collected in EDTA K3 tubes and sent to the Genomic
11 analysis Laboratory at the Institut Pasteur of Lille, France. DNA was extracted from white blood cells
12 with the Puregene kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France). Genotyping was performed on an Illumina
13 system, using GoldenGate technology. The genotyping success rates were 97.2% for rs11672433,
14 98.8% for rs11207997 and above 99.6% for the other SNPs. Data on BMI were available for 1144
15 subjects.

16

17 *The MONICA Lille study*

18 Participants were recruited as part of the WHO-MONICA population survey performed from
19 1995 to 1997 in the Lille Urban Community in Northern France ($n=1195$) as previously described
20 (23). The sample included individuals aged 35-65 randomly selected from electoral rolls after
21 stratification by town size, gender and age, in order to obtain 200 participants for each gender and each
22 10-year age group (WHO-MONICA Project protocol) (24). The study protocol was approved by the
23 local ethics committee. After signing an informed consent form, participants filled out a standard
24 questionnaire and physical measurements were taken by a specially trained nurse. Physical activity
25 was defined as at least 15 min walking a day and/or daily lifting or carrying heavy objects at work
26 and/or doing sport or physical exercise for more than 2 hours a week. Current cigarette smokers were
27 defined as individuals reporting at least one cigarette per day. Total alcohol intake (in ml alcohol) was
28 calculated as the sum per week from wine, beer, cider and spirits. A 20 ml blood sample was drawn on

1 disodium EDTA after a 10-hour overnight fast for 1155 subjects. Lipid and lipoprotein levels were all
2 measured at the Purpan Hospital Biochemical Laboratory (Toulouse). The genotyping was performed
3 using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method (see Supplementary table 1). The
4 genotyping success rate was above 98.7% for all SNPs.

5

6 *SNP selection*

7 SNPs were extracted from the NCBI dbSNP and HapMap (data release 23a/phase II, March
8 2008) databases. For *ANGPTL3*, the 7 validated SNPs described in the 10 kbp genomic region in the
9 NCBI database were all genotyped in the CEU panel from the HapMap Project. Only one SNP
10 (rs11207997) had a minor allele frequency (MAF) higher than 0.05. Hence, rs11207997 (MAF 0.30)
11 was the only SNP that could be analyzed in association studies for *ANGPTL3*.

12 There were 6 validated *ANGPTL4* SNPs with a MAF>0.02 reported in the NCBI dbSNP
13 database: rs4076317, rs2278236, rs7255436, rs1044250 (Thr266Met), rs35061979 (Arg278Gln) and
14 rs11672433 (Pro389Pro). In HapMap_{CEU}, rs2278236 was a perfect proxy for rs7255436 ($r^2=1$) and
15 therefore, rs2278236 was chosen a tagSNP of this block. Rs1044250, rs4076317, rs10404615 and
16 rs11672433 were independent SNPs ($r^2<0.8$). As the linkage disequilibrium (LD) of rs35061979 with
17 the other SNPs was not known, we typed rs35061979 in a hundred subjects from the MONICA Lille
18 study but it could not be detected and was not pursued. Thus, the rs4076317, rs2278236, rs1044250
19 and rs11672433 SNPs (accounting for over 99.9% of *ANGPTL4* common genetic variability) were
20 further analyzed in association studies.

21

22 *Statistical analyses*

23 Statistical analyses were performed with SAS statistical software, version 8 (SAS Institute
24 Inc., Cary, NC). In order to obtain a normal data distribution, log-transformation was used for TG and
25 insulin levels in both studies and also for glucose levels in the MONICA sample. In MONICA Lille,
26 inter-group comparisons of quantitative variables were made using a general linear model (GLM)
27 procedure, except for gene-gene interactions analyses for which the number of subjects was small in
28 one of the 4 groups ($n=18$), we first performed a rank transformation on the anthropometric variables

1 as described by Conover and Iman (25) and then used a multivariate GLM procedure. In the
2 HELENA-CSS, the effects were homogenous across centers as there was no significant genotype x
3 center interactions (ns). Reported p values are nominal and were systematically adjusted for
4 confounding variables. In MONICA Lille, confounding variables were age, gender, smoking status,
5 alcohol consumption and physical activity for anthropometric variables, with the addition of BMI for
6 biochemical variables. In the HELENA-CSS, we used age, gender and center as covariates for
7 anthropometric variables, with the addition of BMI for biochemical variables. Statistical significance
8 was considered as $p \leq 0.05$.

9

10 **Results**

11 Table 1 shows the clinical characteristics of the subjects from the HELENA-CSS and MONICA Lille.
12 We focused on the associations between the *ANGPTL3* SNPs with anthropometric measurements and
13 plasma lipids, glucose and insulin levels significant in both studies.

14

15 *Study of ANGPTL3's genetic variability*

16 The MAF for the *ANGPTL3* rs11207997 SNP was 0.30 in the HELENA-CSS and 0.34 in the
17 MONICA Lille sample. The genotype distribution did not deviate from the Hardy-Weinberg
18 equilibrium in either sample ($p > 0.54$). We detected significant associations between rs11207997 and
19 plasma HDL-cholesterol and ApoA1 levels (Table 2). Indeed, in the HELENA-CSS, *T* allele bearers
20 had significantly lower HDL-cholesterol and ApoA1 levels, compared with *CC* subjects (HDL = 1.40
21 ± 0.27 vs. 1.46 ± 0.28 mmol/L, $p = 0.0004$; ApoA1 = 1.48 ± 0.22 vs. 1.53 ± 0.22 g/L, $p = 0.00006$).
22 These associations were not modified by further adjustment for physical activity or for pubertal status
23 (data not shown). In the MONICA Lille study, *TT* subjects displayed lower HDL-cholesterol and
24 ApoA1 levels, compared with *C* allele bearers (HDL-cholesterol = 1.44 ± 0.43 vs. 1.51 ± 0.48
25 mmol/L, $p = 0.03$; ApoA1 = 1.68 ± 0.30 vs. 1.74 ± 0.31 g/L, $p = 0.02$). Given that (i) *ANGPTL3* is a
26 direct target gene of the LXR nuclear receptor (26) and that (ii) we have previously shown that the
27 *LXR α* rs11039155 (-6 G/A) SNP was associated with plasma HDL-cholesterol levels in the MONICA

1 Lille study (27), we checked whether the association between *ANGPTL3* rs11207997 and HDL-
2 cholesterol could be modulated by the *LXRα* rs11039155 SNP. However, no significant interaction
3 between these 2 SNPs on HDL-cholesterol levels could be detected ($p=0.29$).

4

5 *Study of ANGPTLA's genetic variability*

6 The MAFs for the rs4076317, rs2278236, rs1044250 and rs11672433 SNPs were respectively
7 0.29, 0.48, 0.29 and 0.14 in the HELENA-CSS and 0.28, 0.46, 0.30, and 0.16 in the MONICA Lille
8 study. Hardy-Weinberg equilibrium was observed for all 4 SNPs in the MONICA Lille study and in
9 all but one center for the HELENA-CSS. The exceptions were rs4076317 and rs2278236 in the
10 HELENA-CSS Vienna sample ($p=0.011$ and $p=0.047$, respectively), which may be due to the small
11 number of subjects recruited ($n\sim 100$).

12 We used Thesias (<http://ecgene.net/genecanvas>) (28) and Haploview
13 (<http://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>) softwares to evaluate the LD between the 4
14 *ANGPTLA* SNPs in the MONICA Lille study (Table 3). All SNPs were in weak LD with the others
15 ($r^2 < 0.50$). Similar LD pattern was observed in the HELENA-CSS (data not shown).

16 We did not find any association between rs2278236, rs1044250 or rs11672433 and any of the
17 studied phenotypes in either the HELENA-CSS or the MONICA Lille sample (data not shown). In
18 contrast, we found a significant association between rs4076317 and the percentage of body fat in the
19 HELENA-CSS; *GG* subjects had a significantly higher percentage of body fat than *C* allele bearers
20 (26.2 ± 11.3 vs. 23.6 ± 9.6 %, $p=0.02$) (Table 4). This association was still present after (i) further
21 adjustment for physical activity or pubertal status and (ii) removal of the Vienna center, in which the
22 Hardy-Weinberg equilibrium was not respected (data not shown).

23 In the MONICA Lille study, the percentage of body fat was not available but *GG* subjects had
24 a higher waist-to-hip ratio than *C* allele bearers (0.892 ± 0.09 vs. 0.885 ± 0.10 , $p=0.02$). Given that (i)
25 *ANGPTLA* is a direct target gene of PPARs (12) and (ii) we have previously reported that the *PPARG*
26 Pro12Ala (rs1801282 C>G) polymorphism was associated with adiposity parameters in the MONICA
27 Lille study (29), we looked at whether this *ANGPTLA* SNP interacted with the *PPARG* Pro12Ala
28 polymorphism regarding anthropometric measurements. In the MONICA Lille sample, we detected a

1 significant gene-gene interaction ($p=0.007$) between *ANGPTL4* rs4076317 (used in a recessive model)
2 and *PPARG* Pro12Ala (used in a dominant model) for the waist-to-hip ratio. Indeed, the group of
3 subjects carrying both the *PPARG* Ala12 allele and the *ANGPTL4* rs4076317 GG genotype ($n=18$) had
4 a higher waist-to-hip ratio ($p=0.0004$) than the three other subject groups (Figure 1). In the HELENA-
5 CSS, no such gene-gene interaction could be detected; maybe because of the youth of the subjects.

6

7 **Discussion**

8 In the present work, we examined the associations between *ANGPTL3* and *ANGPTL4*
9 common genetic variability and metabolic traits in adolescent and adult population-based studies.
10 Rs11207997 (the only frequent SNP described in the *ANGPTL3* gene) was consistently associated
11 with lower plasma HDL-cholesterol and ApoA1 levels in both adolescents and adults. Several GWAS
12 have described associations between three intergenic SNPs nearby the *ANGPTL3* locus (rs1748195,
13 rs12130333 and rs10889353) and plasma TG levels (15-17). These SNPs are located at 13.6 kbp
14 upstream and 47 kbp and 121 kbp downstream from the *ANGPTL3* gene, respectively, but, together
15 with rs11207997, belong to the same haplotype block (see supplementary Figure 1). Contrary to these
16 GWAS, we did not detect significant association between rs11207997 and plasma TG levels.
17 However, the effect size on TG levels described in these GWAS is too small to be detected in our
18 study. Indeed, Willer *et al.* reported a 7 mg/dL difference in TG levels between alleles (15) but the
19 statistical power of our study was only 29% to detect such a difference in MONICA Lille.

20 Unlike the present study, these GWAS did not report any significant associations between
21 *ANGPTL3* SNPs and HDL-cholesterol levels. Nevertheless, in the GWAS of Kathiresan *et al.*, the
22 rs10889353 SNP, in very high LD with rs11207997 ($r^2=0.88$), was associated with lower plasma
23 HDL-cholesterol ($p=0.04$), LDL-cholesterol ($p=0.016$), total cholesterol ($p=0.00024$), ApoB ($p=0.014$)
24 and ApoC3 ($p=0.004$) levels in Framingham Heart Study 2nd generation participants (16). Our results
25 may be overestimated but are coherent with these findings and with the role of *ANGPTL3* in HDL
26 metabolism: (i) *ANGPTL3* inhibits EL (8), which is a key regulator of HDL metabolism, that
27 hydrolyses HDL phospholipids and decreases plasma HDL levels (30;31), and (ii) human plasma
28 *ANGPTL3* levels are correlated with plasma HDL-cholesterol levels but not plasma TG levels (8),

1 suggesting that the role of ANGPTL3 in regulation of HDL metabolism may be as important as its role
2 in regulation of TG metabolism.

3 The rs11207997 polymorphism is located within the promoter region of the *ANGPTL3* gene,
4 1286 bp upstream from the transcription start site (TSS). Using Genomatix MatInspector and
5 EIDorado softwares (www.genomatix.de) {Cartharius, Frech, et al. 2005 59 /id}, we observed that a
6 binding site for NeuroD1 (neurogenic differentiation factor 1) was identified in the presence of the
7 rs11207997 C allele (matrix similarity = 1.00; core similarity = 0.98) and abolished in the presence of
8 the minor T allele. By RT-PCR, we checked whether ANGPTL3 and NeuroD1 were co-expressed in
9 brain (NeuroD1's main site of expression) or liver (ANGPTL3's main site of expression). NeuroD1
10 mRNA could be detected in brain but not in liver and *vice versa* for ANGPTL3 mRNA
11 (supplementary Figure 2); ruling out the hypothesis whereby NeuroD1 could regulate ANGPTL3
12 expression. Therefore, further studies are needed to unravel the molecular mechanisms underlying the
13 genetic associations.

14 Four *ANGPTL4* SNPs were analyzed in the present study. Several studies on *ANGPTL4*
15 genetic variability have revealed associations with lipid-related phenotypes. Romeo *et al.* showed that
16 the rare E40K variant (frequency: 0.03) was associated with lower TG levels and higher HDL-
17 cholesterol levels (32). This variant was also associated with lower plasma TG and LDL-cholesterol
18 levels, higher HDL-cholesterol levels, lower BMI, and lower risk of coronary heart disease in the
19 ARIC study (33). Staiger *et al.* did not find any associations between the four *ANGPTL4* SNPs
20 investigated in the present study and metabolic traits in a low-powered study ($n=629$) in which 76% of
21 the subjects had a family history of diabetes (34). Talmud *et al.* detected associations between the
22 rs1044250 (T266M) polymorphism and lower plasma TG and higher HDL-cholesterol levels in a
23 sample of 2772 men, although this effect was entirely due to the E40K mutation (35). We analyzed the
24 rs1044250 (T266M) SNP in our population samples but did not find any association. We did not
25 assess the effect of the E40K variant since the low MAF (0.03) of this mutation meant that only 5
26 subjects would have carried the *K40* allele in our sample. More recently, a GWAS has shown an
27 association between rs2967605 near *ANGPTL4* and plasma HDL-cholesterol levels in ~35000
28 individuals (17). This SNP is located 30 kbp downstream from *ANGPTL4* and is in weak LD ($r^2 < 0,33$

1 in HapMap) with the ones we studied and that are located within *ANGPTL4*. The association between
2 rs2967605 and HDL-cholesterol level reported in this GWAS may therefore well not be due to
3 *ANGPTL4*.

4 The association we detected between rs4076317 in *ANGPTL4* and body fat in adolescents or
5 waist-to-hip ratio in adults has not been shown before. However, *ANGPTL4* genetic variability has
6 been already associated with adiposity as Folsom *et al.* described an association between the
7 *ANGPTL4* E40K rare variant and BMI (33). To our knowledge, no *ANGPTL4* SNPs have been
8 significantly associated with adiposity parameters in GWAS. However, due to the required very low p
9 value threshold in GWAS ($<10^{-8}$), SNPs in *ANGPTL4* might have been nominally associated with
10 these parameters and not actually reported. In MONICA Lille, we detected a gene-gene interaction
11 between *ANGPTL4* and *PPARG* when considering the waist-to-hip ratio. *ANGPTL4* is a direct target
12 gene of PPAR γ , a major orchestrator of adipocyte differentiation (36) and the *PPARG* Pro12Ala
13 polymorphism is known to be associated with fat mass (37). The fact that the waist-to-hip ratio was
14 the only anthropometric parameter that came out of this gene-gene interaction suggests that the role of
15 *ANGPTL4* on fat mass might vary from one fat depot to another. However, as the number of subjects
16 carrying minor alleles of *PPARG* and *ANGPTL4* SNPs is small, these data need to be taken with
17 caution and replicated in other population samples. If this gene-gene interaction was confirmed, it
18 could also explain the fact *ANGPTL4* has not been associated with obesity in GWAS. Further studies
19 are needed to validate this hypothesis.

20 The association between *ANGPTL4* genetic variation and adiposity is coherent with the role of
21 the protein in fat mass regulation. First, LPL (which is inhibited by *ANGPTL4*) genetic variability is
22 associated with obesity (38). Second, *Angptl4* plays an important role in the intestine as a mediator of
23 the microbial regulation of peripheral fat storage (13). Last but not least, *Angptl4* induces adipose TG
24 lipase expression, which stimulates adipose tissue lipolysis and therefore promotes adipose tissue
25 weight loss (5). The rs4076317 polymorphism is located within the promoter region of the *ANGPTL4*
26 gene, 12 bp upstream from the TSS. According to Genomatix Eldorado software, there was no
27 difference between the rs4076317 C and G alleles in terms of different predicted binding sites.

1 In conclusion, the observed associations between *ANGPTL3* polymorphism and plasma HDL-
2 cholesterol and ApoA1 levels (as early as in adolescence) underline the role of *ANGPTL3* in HDL-
3 cholesterol metabolism in humans. Our data also suggest associations between *ANGPTL4* rs4076317
4 and indicators of fat mass. Although our findings warrant replication, they imply that (as in the mouse)
5 *ANGPTL4* is involved in the signaling pathways in fat and other tissues which prevent fat storage and
6 stimulate fat mobilization.

9 **Acknowledgements**

10 Many thanks to Christel Bierschbach, Adelheid Schuch, Anke Berchtold, Petra Pickert, Anke
11 Carstensen, for their contribution to laboratory work.

14 **References**

- 15 1 **Hato T, Tabata M, Oike Y** 2008 The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and
16 metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 18:6-14.
- 17 2 **Shimizu-gawa T, Ono M, Shimamura M, Yoshida K, Ando Y, Koishi R, Ueda K, Inaba T ,**
18 **Minekura H, Kohama T, Furukawa H** 2002 *ANGPTL3* decreases very low density lipoprotein
19 triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J Biol Chem* 277:33742-33748.
- 20 3 **Yoshida K, Shimizu-gawa T, Ono M, Furukawa H** 2002 Angiopoietin-like protein 4 is a potent
21 hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 43:1770-
22 1772.
- 23 4 **Shimamura M, Matsuda M, Kobayashi S, Ando Y, Ono M, Koishi R, Furukawa H,**
24 **Makishima M, Shimomura I** 2003 Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor,
25 activates lipolysis in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 301:604-609.
- 26 5 **Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F, Muller M, Kersten S** 2006
27 The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with
28 lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem* 281:934-944.

1 6 **Koishi R, Ando Y, Ono M, Shimamura M, Yasumo H, Fujiwara T, Horikoshi H, Furukawa**
2 **H** 2002 Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nat Genet* 30:151-157.

3 7 **Koster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA, Hale JE, Li D, Qiu Y, Fraser**
4 **CC, Yang DD, Heuer JG, Jaskunas SR, Eacho P** 2005 Transgenic angiopoietin-like (angptl)4
5 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride
6 metabolism. *Endocrinology* 146:4943-4950.

7 8 **Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K, Kono K, Shimizugawa T,**
8 **Ando Y, Koishi R, Kohama T, Sakai N, Kotani K, Komuro R, Ishida T, Hirata K,**
9 **Yamashita S, Furukawa H, Shimomura I** 2007 Angiopoietin-like protein3 regulates plasma
10 HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
11 27:366-372.

12 9 **Lichtenstein L, Berbee JF, van Dijk SJ, van Dijk KW, Bensadoun A, Kema IP, Voshol PJ,**
13 **Muller M, Rensen PC, Kersten S** 2007 Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via
14 inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*
15 27:2420-2427.

16 10 **Conklin D, Gilbertson D, Taft DW, Maurer MF, Whitmore TE, Smith DL, Walker KM,**
17 **Chen LH, Wattler S, Nehls M, Lewis KB** 1999 Identification of a mammalian angiopoietin-
18 related protein expressed specifically in liver. *Genomics* 62:477-482.

19 11 **Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, Gonzalez FJ, Desvergne**
20 **B, Wahli W** 2000 Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel
21 peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem* 275:28488-28493.

22 12 **Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, Friedman JM, Holmes**
23 **WE, Spiegelman BM** 2000 Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene
24 encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell*
25 *Biol* 20:5343-5349.

26 13 **Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, Semenkovich CF, Gordon JI**
27 2004 The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci*
28 *U S A* 101:15718-15723.

1 14 **Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RL, Xu JY, Chen B, Chow WS, Tso**
2 **AW, Lam KS** 2005 Angiopoietin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose
3 tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*
4 102:6086-6091.

5 15 **Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, Heath SC, Timpson**
6 **NJ, Najjar SS, Stringham HM, Strait J, Duren WL, Maschio A, Busonero F, Mulas A, Albai**
7 **G, Swift AJ, Morken MA, Narisu N, Bennett D, Parish S, Shen H, Galan P, Meneton P,**
8 **Hercberg S, Zelenika D, Chen WM, Li Y, Scott LJ, Scheet PA, Sundvall J, Watanabe RM,**
9 **Nagaraja R, Ebrahim S, Lawlor DA, Ben Shlomo Y, Davey-Smith G, Shuldiner AR, Collins**
10 **R, Bergman RN, Uda M, Tuomilehto J, Cao A, Collins FS, Lakatta E, Lathrop GM,**
11 **Boehnke M, Schlessinger D, Mohlke KL, Abecasis GR** 2008 Newly identified loci that
12 influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat Genet* 40:161-169.

13 16 **Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, Cooper GM, Roos C,**
14 **Voight BF, Havulinna AS, Wahlstrand B, Hedner T, Corella D, Tai ES, Ordovas JM,**
15 **Berglund G, Vartiainen E, Jousilahti P, Hedblad B, Taskinen MR, Newton-Cheh C, Salomaa**
16 **V, Peltonen L, Groop L, Altshuler DM, Orho-Melander M** 2008 Six new loci associated with
17 blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in
18 humans. *Nat Genet* 40:189-197.

19 17 **Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K, Schadt EE, Kaplan L,**
20 **Bennett D, Li Y, Tanaka T, Voight BF, Bonnycastle LL, Jackson AU, Crawford G, Surti A,**
21 **Guiducci C, Burt NP, Parish S, Clarke R, Zelenika D, Kubalanza KA, Morken MA, Scott**
22 **LJ, Stringham HM, Galan P, Swift AJ, Kuusisto J, Bergman RN, Sundvall J, Laakso M,**
23 **Ferrucci L, Scheet P, Sanna S, Uda M, Yang Q, Lunetta KL, Dupuis J, de Bakker PI,**
24 **O'Donnell CJ, Chambers JC, Kooner JS, Hercberg S, Meneton P, Lakatta EG, Scuteri A,**
25 **Schlessinger D, Tuomilehto J, Collins FS, Groop L, Altshuler D, Collins R, Lathrop GM,**
26 **Melander O, Salomaa V, Peltonen L, Orho-Melander M, Ordovas JM, Boehnke M, Abecasis**
27 **GR, Mohlke KL, Cupples LA** 2009 Common variants at 30 loci contribute to polygenic
28 dyslipidemia. *Nat Genet* 41:56-65.

- 1 18 **Moreno LA, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, de Henauw S, Beghin L, Sjostrom**
2 **M, Hagstromer M, Manios Y, Gilbert CC, Ortega FB, Dallongeville J, Arcella D, Warnberg**
3 **J, Hallberg M, Fredriksson H, Maes L, Widhalm K, Kafatos AG, Marcos A** 2008 Assessing,
4 understanding and modifying nutritional status, eating habits and physical activity in European
5 adolescents: the HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) Study.
6 *Public Health Nutr* 11:288-299.
- 7 19 **Moreno LA, de Henauw S, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, Gottrand F, Barrios**
8 **L, Sjostrom M, Manios Y, Gilbert CC, Leclercq C, Widhalm K, Kafatos A, Marcos A** 2008
9 Design and implementation of the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence Cross-
10 Sectional Study. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 5:S4-S11.
- 11 20 **Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ, Van Loan MD, Bemben**
12 **DA** 1988 Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol*
13 60:709-723.
- 14 21 **Hagstromer M, Bergman P, De B, I, Ortega FB, Ruiz JR, Manios Y, Rey-Lopez JP, Phillipp**
15 **K, von Berlepsch J, Sjostrom M** 2008 Concurrent validity of a modified version of the
16 International Physical Activity Questionnaire (IPAQ-A) in European adolescents: The HELENA
17 Study. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 5:S42-S48.
- 18 22 **Gonzalez-Gross M, Breidenassel C, Gomez-Martinez S, Ferrari M, Beghin L, Spinneker A,**
19 **Diaz LE, Maiani G, Demailly A, Al Tahan J, Albers U, Warnberg J, Stoffel-Wagner B,**
20 **Jimenez-Pavon D, Libersa C, Pietrzik K, Marcos A , Stehle P** 2008 Sampling and processing
21 of fresh blood samples within a European multicenter nutritional study: evaluation of biomarker
22 stability during transport and storage. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 5:S66-S75.
- 23 23 **Dallongeville J, Meirhaeghe A, Cottel D, Fruchart JC, Amouyel P, Helbecque N** 2000 Gender
24 related association between genetic variations of APOC-III gene and lipid and lipoprotein
25 variables in northern France. *Atherosclerosis* 150:149-157.
- 26 24 1994 Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of
27 cardiovascular disease. The World Health Organization MONICA Project. *Int J Epidemiol*
28 23:505-516.

- 1 25 **Conover WJ, Iman RL** 1982 Analysis of covariance using the rank transformation. *Biometrics*
2 38:715-724.
- 3 26 **Kaplan R, Zhang T, Hernandez M, Gan FX, Wright SD, Waters MG, Cai TQ** 2003
4 Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *J Lipid Res* 44:136-143.
- 5 27 **Legry V, Cottel D, Ferrieres J, Chinetti G, Deroide T, Staels B, Amouyel P, Meirhaeghe A**
6 2008 Association between liver X receptor alpha gene polymorphisms and risk of metabolic
7 syndrome in French populations. *Int J Obes (Lond)* 32:421-428.
- 8 28 **Tregouet DA, Garelle V** 2007 A new JAVA interface implementation of THESIAS: testing
9 haplotype effects in association studies. *Bioinformatics* 23:1038-1039.
- 10 29 **Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Deeb SS, Amouyel P** 2000 Impact
11 of the Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma2 Pro12Ala polymorphism on adiposity,
12 lipids and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:195-199.
- 13 30 **Badellino KO, Rader DJ** 2004 The role of endothelial lipase in high-density lipoprotein
14 metabolism. *Curr Opin Cardiol* 19:392-395.
- 15 31 **Broedl UC, Jin W, Rader DJ** 2004 Endothelial lipase: a modulator of lipoprotein metabolism
16 upregulated by inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 14:202-206.
- 17 32 **Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A, Hobbs HH, Cohen JC**
18 2007 Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides
19 and increase HDL. *Nat Genet* 39:513-516.
- 20 33 **Folsom AR, Peacock JM, Demerath E, Boerwinkle E** 2008 Variation in ANGPTL4 and risk of
21 coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Metabolism* 57:1591-
22 1596.
- 23 34 **Staiger H, Machicao F, Werner R, Guirguis A, Weisser M, Stefan N, Fritsche A, Haring HU**
24 2008 Genetic variation within the ANGPTL4 gene is not associated with metabolic traits in white
25 subjects at an increased risk for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 57:637-643.
- 26 35 **Talmud PJ, Smart M, Presswood E, Cooper JA, Nicaud V, Drenos F, Palmen J, Marmot**
27 **MG, Boekholdt SM, Wareham NJ, Khaw KT, Kumari M, Humphries SE** 2008 ANGPTL4

1 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and
2 CHD risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28:2319-2325.

3 36 **Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM** 1995 Regulation of adipocyte gene expression and
4 differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5:571-
5 576.

6 37 **Tonjes A, Stumvoll M** 2007 The role of the Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-
7 activated receptor gamma in diabetes risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:410-414.

8 38 **Chen Y, Zhu J, Lum PY, Yang X, Pinto S, MacNeil DJ, Zhang C, Lamb J, Edwards S,**
9 **Sieberts SK, Leonardson A, Castellini LW, Wang S, Champy MF, Zhang B, Emilsson V,**
10 **Doss S, Ghazalpour A, Horvath S, Drake TA, Lusk AJ, Schadt EE** 2008 Variations in DNA
11 elucidate molecular networks that cause disease. *Nature* 452:429-435.

12

1 **Figure legends**

2 **Figure 1.** Analysis of the gene-gene interaction between the *PPARG* Pro12Ala and *ANGPTL4*
3 rs4076317 C/G polymorphisms. Data are expressed as means adjusted for age, gender, smoking status,
4 alcohol consumption and physical activity, \pm standard error of the mean. Non-parametric tests were
5 used. Subjects carrying the *PPARG* ProPro genotype and the *ANGPTL4* rs4076317 C allele ($n=832$)
6 are represented in white. Subjects carrying the *PPARG* ProPro and the *ANGPTL4* rs4076317 GG
7 genotypes ($n=72$) are represented in light grey. Subjects carrying the *PPARG* Ala12 and the *ANGPTL4*
8 rs4076317 C alleles ($n=225$) are represented in dark grey. Subjects carrying both the *PPARG* Ala12
9 allele and the *ANGPTL4* rs4076317 GG genotype ($n=18$) are represented in black. The p value for the
10 *PPARG* x *ANGPTL4* interaction was 0.007. $p=0.0004$ for the comparison between
11 ProAla+AlaAla/GG and the 3 other groups.

12

13 **Supplementary Figure 1.** Linkage disequilibrium map of the region encompassing *ANGPTL3* and the
14 SNPs associated in GWAS (15-17). D' and r^2 values were calculated using Haploview software. D'
15 values are represented by a colour scale: from white ($D'=0$) to red ($D'=1$). r^2 values are given within
16 the diamonds. The 3 SNPs studied in GWAS (rs1748195, rs12130333 and rs10889353) are
17 surrounded by red squares, the rs11207997 SNP we studied is surrounded by a blue square.

18

19 **Supplementary Figure 2.** Analysis of NeuroD1 and *ANGPTL3* mRNA expression in brain and liver
20 using RT-PCR. Human liver total RNA was obtained from BioChain Institute (Clinisciences,
21 Montrouge, France). Human brain total RNA was a kind gift from Dr JC Lambert, Lille, France.
22 Reverse transcription was performed initially on 1 μ g of total RNA using random hexameric primers
23 and multiscribe reverse transcriptase (Applied Biosystems). cDNAs were amplified by PCR with
24 specific primers: 5'-GCTCAGGACCTACTAACAACAA-3' (forward) and 5'-
25 TCTTCCAGGTCCTCATCTTCGT-3' (reverse) for NeuroD1; 5'-CAGAAGGACTAGTATTCAAG-
26 3' (forward) and 5'-GTGATCCATCTATTCGATGT-3' (reverse) for *ANGPTL3*. The expected sizes
27 of the NeuroD1 and *ANGPTL3* RT-PCR products were 238 bp and 269 bp, respectively. A negative

- 1 control (NC) was performed by omitting the RNA sample. The RT-PCR products were run on a 3%
- 2 agarose gel.
- 3

1 **Table 1.** Characteristics of the subjects from the HELENA-CSS and MONICA Lille.

	HELENA-CSS (1144)	MONICA Lille (1155)
Male / female (%)	48.0 / 52.0	50.7 / 49.3
Age (years)	14.8 ± 1.4	51.3 ± 8.5
Weight (kg)	58.4 ± 13.0	74.3 ± 15.5
BMI (kg/m ²)	21.3 ± 3.8	26.6 ± 5.0
Waist (cm)	72.3 ± 9.3	91.0 ± 13.9
Waist/hip ratio	0.794 ± 0.07	0.885 ± 0.096
Body fat (%)	23.8 ± 9.8	NA
Triglyceride (mmol/L)	0.79 ± 0.40	1.41 ± 1.14
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.43 ± 0.27	1.50 ± 0.48
LDL-cholesterol (mmol/L)	2.45 ± 0.65	3.78 ± 1.03
ApoAI (g/L)	1.51 ± 0.22	1.73 ± 0.31
ApoB (g/L)	0.65 ± 0.16	1.21 ± 0.30
Glucose (mmol/L)	5.00 ± 0.40	5.55 ± 1.54
Insulin (µIU/mL)	9.93 ± 5.88	11.93 ± 7.92
Dyslipidemia (%)	NA	49.7
Hypertension (%)	NA	45.1
Coronary heart disease (%)	NA	2.5
Diabetes mellitus (%)	NA	10.9

2

3 Data are expressed as means ± SD or %. NA: not available.

1 **Table 2.** Association between *ANGPTL3* rs11207997 and anthropometric and biochemical phenotypes.

	HELENA-CSS						MONICA Lille					
	CC (549)	CT (478)	TT (104)	<i>p</i> trend	<i>p</i> CT/TT vs CC	<i>p</i> TT vs CC/CT	CC (499)	CT (503)	TT (140)	<i>p</i> trend	<i>p</i> CT/TT vs CC	<i>p</i> TT vs CC/CT
BMI (kg/m ²)	21.4 ± 3.7	21.4 ± 3.9	20.6 ± 3.4	0.39	0.87	0.10	26.5 ± 5.2	26.6 ± 4.9	27.1 ± 4.6	0.33	0.58	0.24
Waist / hip ratio	0.796 ± 0.06	0.794 ± 0.08	0.788 ± 0.06	0.54	0.62	0.60	0.882 ± 0.10	0.889 ± 0.09	0.887 ± 0.09	0.04	0.12	0.06
Body fat (%)	23.9 ± 9.6	24.0 ± 10.0	22.6 ± 9.4	0.80	0.54	0.62	NA					
Triglyceride (mmol/L) ^a	0.79 ± 0.39	0.79 ± 0.40	0.80 ± 0.50	0.73	0.77	0.78	1.43 ± 1.26	1.38 ± 1.14	1.19 ± 0.65	0.15	0.30	0.15
HDL-chol. (mmol/L) ^a	1.46 ± 0.28	1.41 ± 0.27	1.38 ± 0.26	0.0001	0.0004	0.02	1.50 ± 0.50	1.53 ± 0.47	1.45 ± 0.43	0.03	0.48	0.03
LDL-chol. (mmol/L) ^a	2.45 ± 0.63	2.45 ± 0.66	2.48 ± 0.67	0.63	0.86	0.42	3.79 ± 1.02	3.70 ± 1.03	3.77 ± 1.06	0.41	0.23	0.89
ApoAI (g/L) ^a	1.53 ± 0.22	1.48 ± 0.22	1.48 ± 0.22	0.00007	0.00006	0.06	1.74 ± 0.33	1.74 ± 0.30	1.69 ± 0.31	0.06	0.78	0.02
ApoB (g/L) ^a	0.65 ± 0.16	0.65 ± 0.16	0.67 ± 0.17	0.60	0.77	0.29	1.23 ± 0.29	1.21 ± 0.30	1.20 ± 0.31	0.77	0.47	0.75
Glucose (mmol/L) ^b	5.02 ± 0.38	4.99 ± 0.41	5.04 ± 0.44	0.50	0.85	0.23	5.39 ± 1.20	5.35 ± 0.88	5.27 ± 0.82	0.25	0.27	0.13
Insulin (μIU/mL) ^b	9.86 ± 5.75	10.07 ± 6.01	9.93 ± 6.15	0.11	0.18	0.04	12.06 ± 8.96	11.64 ± 6.98	11.76 ± 7.76	0.54	0.41	0.34

2

3 Data are expressed as means ± SD. *p* values are adjusted for confounding variables. In MONICA Lille, we excluded subjects treated with ^a lipid lowering

4 therapy or ^b antidiabetic drugs. NA : not available.

5

1 **Table 3.** Linkage disequilibrium (D' and r^2) between the 4 *ANGPTL4* SNPs in the MONICA Lille
2 study.

SNP (frequency)	rs4076317 (0.28)	rs2278236 (0.46)	rs1044250 (0.30)	rs11672433 (0.16)
rs4076317	-	+1.0	-1.0	-1.0
rs2278236	0.44	-	-1.0	-1.0
rs1044250	0.17	0.37	-	-1.0
rs11672433	0.07	0.15	0.08	-

3

4 D' values are displayed in the upper right corner and r^2 values in the lower left corner.

5

1 **Table 4.** Association between *ANGPTL4* rs4076317 and anthropometric and biochemical phenotypes.

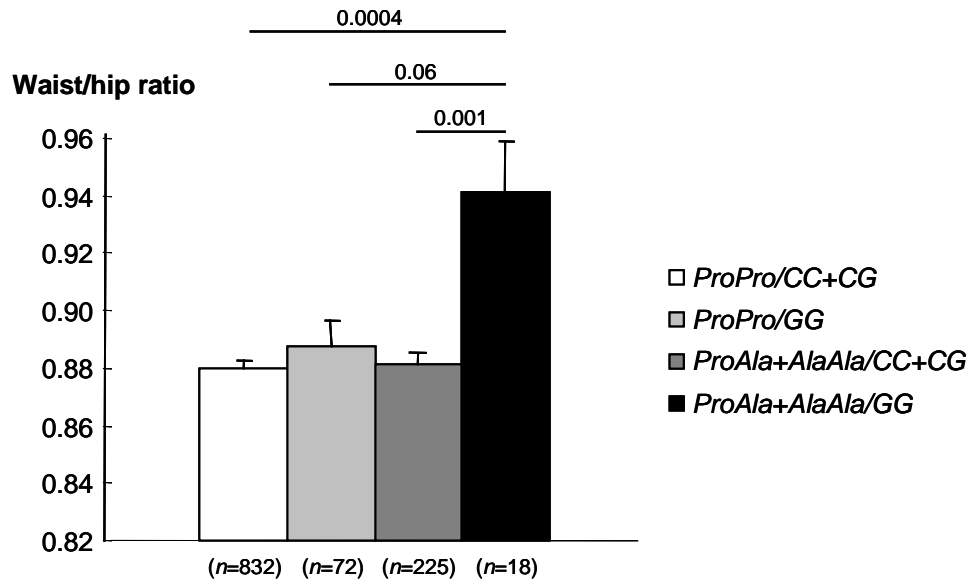
	HELENA-CSS						MONICA Lille					
	CC (593)	CG (439)	GG (112)	<i>p</i> trend	<i>p</i> CG/GG vs CC	<i>p</i> GG vs CC/CG	CC (584)	CG (474)	GG (90)	<i>p</i> trend	<i>p</i> CG/GG vs CC	<i>p</i> GG vs CC/CG
BMI (kg/m ²)	21.5± 3.7	21.1± 3.7	21.7± 4.1	0.25	0.07	0.64	26.6± 5.1	26.6± 4.8	27.3± 5.5	0.23	0.50	0.11
Waist / hip ratio	0.793± 0.07	0.793± 0.07	0.806± 0.08	0.38	0.59	0.15	0.885± 0.1	0.885± 0.09	0.892± 0.09	0.32	0.98	0.02
Body fat (%)	23.6± 9.6	23.5± 9.6	26.2± 11.3	0.29	0.83	0.02	NA					
Triglyceride (mmol/L) ^a	0.80± 0.43	0.76± 0.35	0.83± 0.43	0.97	0.87	0.52	1.44± 1.22	1.32± 1.11	1.33± 0.84	0.28	0.11	0.71
HDL-chol. (mmol/L) ^a	1.41± 0.27	1.45± 0.27	1.42± 0.29	0.20	0.09	0.98	1.52± 0.50	1.52± 0.46	1.39± 0.44	0.19	0.96	0.08
LDL-chol. (mmol/L) ^a	2.46± 0.65	2.43± 0.62	2.47± 0.73	0.83	0.68	0.85	3.74± 1.01	3.76± 1.01	3.78± 1.25	0.93	0.72	0.81
ApoAI (g/L) ^a	1.49± 0.22	1.52± 0.23	1.50± 0.20	0.20	0.09	0.97	1.74± 0.31	1.74± 0.31	1.66± 0.29	0.28	0.71	0.11
ApoB (g/L) ^a	0.66± 0.16	0.65± 0.15	0.65± 0.17	0.44	0.35	0.88	1.20± 0.30	1.19± 0.28	1.22± 0.35	0.68	0.86	0.38
Glucose (mmol/L) ^b	5.02± 0.40	5.00± 0.40	4.98± 0.37	0.19	0.23	0.34	5.37± 1.14	5.34± 0.89	5.36± 0.91	0.91	0.87	0.74
Insulin (μIU/mL) ^b	9.89± 5.91	9.90± 5.98	10.22± 5.37	0.88	0.84	0.99	11.91± 7.81	11.77± 8.34	11.64± 7.25	0.53	0.36	0.38

2

3 Data are expressed as means ± SD. *p* values are adjusted for confounding variables. In MONICA Lille, we excluded subjects treated with ^a lipid lowering

4 therapy or ^b antidiabetic drugs. NA : not available.

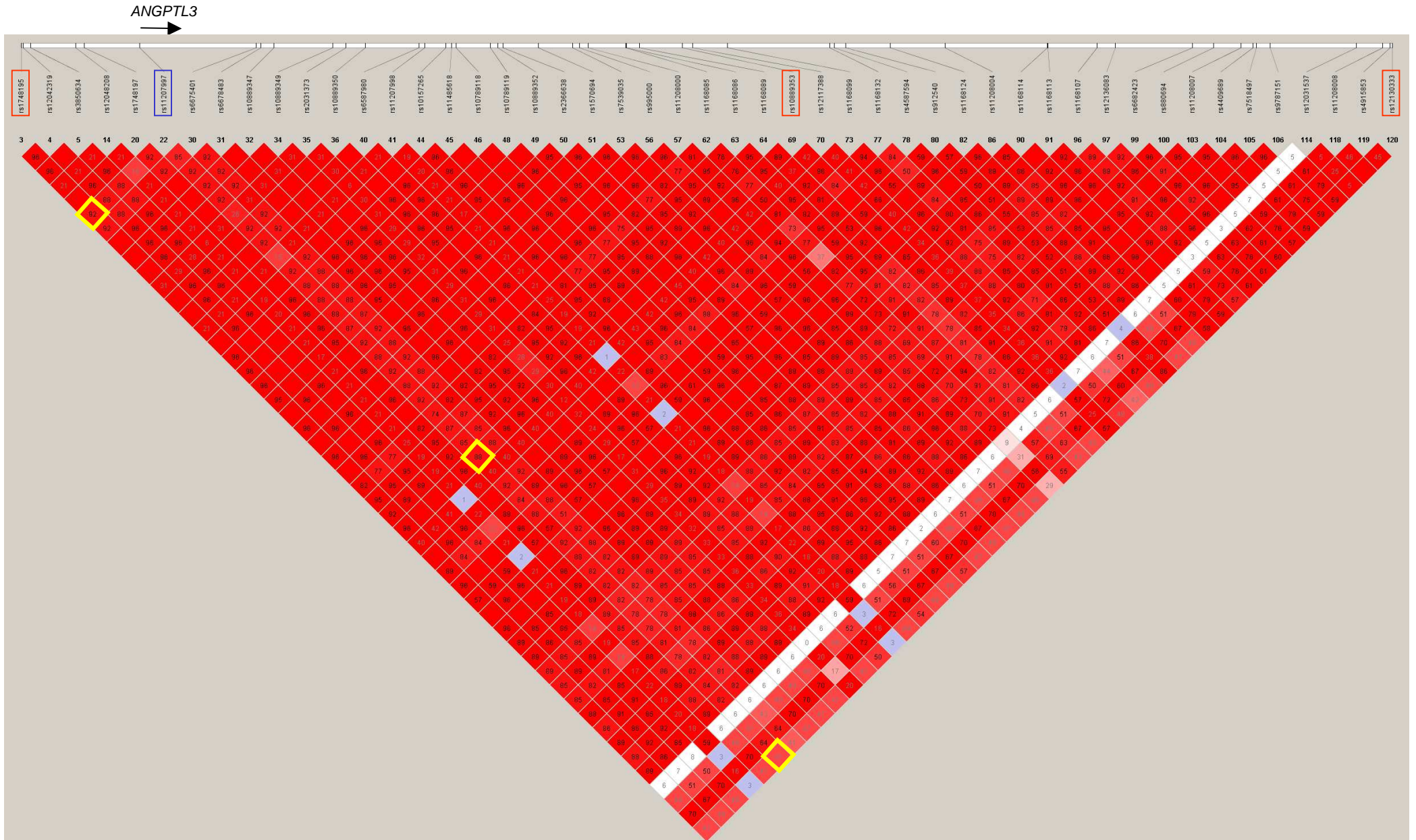
Figure 1. Analysis of the gene-gene interaction between the *PPARG* Pro12Ala and *ANGPTL4* rs4076317 C/G polymorphisms in the MONICA Lille study.



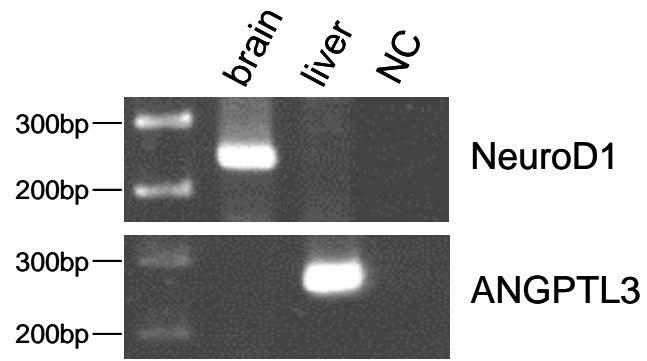
Supplementary table 1. Conditions of *ANGPTL-3* & *-4* SNPs genotyping by the restriction fragment length polymorphism method

Gene	SNPs	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature (°C)	MgCl ₂ (mM)	Restriction enzyme	Sizes of fragments (bp)
<i>ANGPTL3</i>	rs11207997	AGCACTGTTCTAAGTGCTCTA	CATGGATTAGTCTCCTCAAC	51	4.5	<i>Hpy</i> CH4III	C= 79+20+6 ; T= 99+6
<i>ANGPTL4</i>	rs4076317	GAGAGCCACAGTTTGGCATC	CGCTCAGCTCGGCTTCTC	58	1.5	<i>Bgl</i> I	C= 197 ; G= 139+58
	rs2278236	GATACAAGAGTGTTTCTGGTC	GGTGCTGGAGAAGGTAGAA	60	2.5	<i>Bse</i> RI	T= 190 ; C= 102+88
	rs1044250	TGCCTCATGGAGTGGCCTCT	TGTCCTCGCCACCCAGGT	60	2.5	<i>Nla</i> III	C= 156+9 ; T= 94+62+9
	rs35061979	CACGGTAGGTGTTTCTAGTGG	TGGAGAAGGGTACGGAGAGG	60	2.5	<i>Pst</i> I	G= 199+74+45 ; A= 169+74+45+30
	rs11672433	CTGCAGCCATTCCAACCTCA	GCAGAGCCAAGAGTCACCGT	60	2.5	<i>Msp</i> AII	G= 109+57+52 ; A= 166+52

Supplementary Figure 1. Linkage disequilibrium map of the region encompassing the *ANGPTL3* gene and the SNPs associated in GWAS



Supplementary Figure 2. Analysis of NeuroD1 and ANGPTL3 mRNA expression level in brain and liver using RT-PCR.



IV.2. Synthèse des résultats

L'analyse de la variabilité génétique d'*ANGPTL3* et -4 dans les bases de données HapMap et NCBI a révélé qu'il n'existe qu'un seul polymorphisme fréquent (MAF>0,33) dans le gène *ANGPTL3* (rs11207997, situé dans le promoteur) et nous a permis de sélectionner 4 SNPs du gène *ANGPTL4*: rs4076317 (promoteur), rs2278236 (intron 3), rs1044250 (T266M) et rs11672433 (P389P) couvrant la totalité de la variabilité génétique commune d'*ANGPTL4*. Nous avons alors génotypé les individus des études HELENA (n=1155) et MONICA Lille (n=1156) pour ces 5 polymorphismes et recherché des associations statistiques entre ces SNPs et les phénotypes métaboliques (voir les caractéristiques des populations étudiées dans les chapitres III.1. et III.3. des Matériels et Méthodes pages 80 et 82).

Le polymorphisme rs11207997 (MAF 0,32) d'*ANGPTL3* est associé à une diminution des taux plasmatiques de **HDL-cholestérol et d'ApoA1 chez les adolescents et les adultes**. Concernant *ANGPTL4*, le SNP rs4076317 (MAF 0,29) est associé à une diminution du taux plasmatique de TG chez les adultes mais pas chez les adolescents. De plus, ce même polymorphisme est associé à une augmentation du pourcentage de **masse grasse chez les adolescents** et une augmentation du **RTH chez les adultes**. Pour cette dernière association, nous avons en plus détecté une interaction gène-gène entre les polymorphismes rs4076317 de *ANGPTL4* et Pro12Ala du gène *PPARG* chez les adultes : c'est en fait la combinaison des allèles mineurs des 2 polymorphismes *ANGPTL4* et *PPARG* qui est associée à l'augmentation du RTH.

IV.3. Discussion

Nous avons donc détecté une association entre un SNP d'*ANGPTL3* et les concentrations plasmatiques d'HDL-cholestérol et d'ApoA1 dans 2 échantillons indépendants (adultes et adolescents). De récentes GWAS ont décrit des associations entre plusieurs SNPs situés à proximité du gène *ANGPTL3* et la concentration plasmatique de TG [Willer *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2009]. Certes ces SNPs sont éloignés du gène *ANGPTL3* (entre 13 kpb en 5' et 122 kpb en 3' du gène) mais ils semblent tous appartenir au même bloc haplotypique (voir la Figure supplémentaire de l'article). Contrairement à ces GWAS, nous n'avons pas détecté d'association entre le SNP rs11207997 d'*ANGPTL3* et le taux plasmatique de TG dans nos échantillons de population. Ceci pourrait s'expliquer par un manque de puissance de notre étude. En effet, les effectifs des échantillons HELENA et MONICA Lille (n=1155 et 1156, respectivement) ne permettent

pas de détecter l'effet observé sur le taux plasmatique de TG qui est reporté dans les GWAS [Willer *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2009]. Par ailleurs, ces GWAS n'ont pas reporté d'association significative entre les SNPs d'*ANGPTL3* et le HDL-cholestérol. Cependant, si l'on considère les associations nominales, c'est-à-dire les associations dont le test de significativité est compris entre le seuil corrigé pour tests multiples (5.10^{-8}) et le seuil standard (0,05), alors le SNP rs10889353, en DL parfait avec rs11207997 ($r^2=0,88$), est associé à une diminution des taux plasmatiques de HDL-cholestérol ainsi que du cholestérol total, du LDL-cholestérol, de l'ApoB, de l'ApoC3, des TG et des VLDL dans la GWAS de Kathiresan *et al* [Kathiresan *et al.* 2008]. Les associations entre le rs11207997 et les taux plasmatiques de HDL-cholestérol et d'ApoA1 que nous avons observées dans MONICA Lille et HELENA sont probablement surestimées. Néanmoins, l'ensemble des études génétiques d'*ANGPTL3* s'accordent pour dire que ce gène est situé dans un *locus* dont la variabilité génétique est associée à une modulation du profil lipidique [Korstanje *et al.* 2004; Willer *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2008; Kathiresan *et al.* 2009; Romeo *et al.* 2009]. Etant donné le rôle d'*ANGPTL3* dans le métabolisme des TG (par l'inhibition de la LPL, enzyme clé dans la clairance des VLDL) et du HDL-cholestérol (par l'inhibition de l'EL, enzyme clé dans le métabolisme du HDL) [Hato *et al.* 2008], les associations observées entre ces SNPs et le profil lipidique pourraient être attribuées à *ANGPTL3*. Nous avons alors envisagé de tester la fonctionnalité du SNP rs11207997. Comme il est situé dans le promoteur d'*ANGPTL3*, 1286 pb en amont du site d'initiation de la transcription, ce SNP pourrait modifier l'affinité pour un facteur de transcription qui régulerait l'expression d'*ANGPTL3*. Des analyses *in silico* ont révélé que l'allèle mineur de ce SNP abolit un site potentiel de fixation pour NeuroD1, facteur de transcription régulant l'expression du gène de l'insuline et associé au diabète [Naya *et al.* 1995; Malecki *et al.* 1999]. Néanmoins, nos études d'expression ont montré que *ANGPTL3* et NeuroD1 ne semblent pas être co-exprimés dans les mêmes tissus, écartant ainsi la possibilité d'une régulation d'*ANGPTL3* par NeuroD1. Enfin, on pourrait envisager que le SNP rs11207997 ne soit pas le SNP causal et soit en DL avec un SNP fonctionnel non identifié.

En ce qui concerne *ANGPTL4*, nous avons détecté une association entre le SNP rs4076317 et le taux plasmatique de TG ainsi que l'adiposité. Notre étude est la première à décrire une association entre ce SNP et ces traits métaboliques, bien qu'il ait déjà été examiné dans deux précédentes études [Staiger *et al.* 2008; Talmud *et al.* 2008]. Ces différences peuvent s'expliquer par la différence de population étudiée : l'étude de Staiger *et al* comporte 629 individus dont 76% sont apparentés à des patients diabétiques [Staiger *et al.* 2008] et celle de Talmud *et al* ne comporte que des hommes ($n=2772$) [Talmud *et al.* 2008]. L'association que nous avons observée avec le taux plasmatique de TG est en accord avec l'étude de Romeo *et al* qui a montré que des variants rares d'*ANGPTL4* sont associés

au taux de TG [Romeo *et al.* 2007]. Les associations que nous avons observées entre le SNP rs4076317 et, d'une part, une diminution du taux plasmatique de TG, et d'autre part, une augmentation de l'adiposité, reflètent tout à fait le caractère ambivalent d'ANGPTL4. En fait, ANGPTL4 exerce un effet plutôt délétère dans le métabolisme des TG puisqu'en inhibant la LPL, il inhibe la clairance des TG [Hato *et al.* 2008]. En revanche, ANGPTL4 joue un rôle plutôt protecteur dans l'adiposité puisqu'il stimule la lipolyse, empêche le stockage des graisses dans le TA, et inhibe l'absorption intestinale des graisses [Hato *et al.* 2008]. Par ailleurs, *ANGPTL4* est un gène cible de PPAR γ , le chef d'orchestre de la différenciation adipocytaire [Tontonoz *et al.* 2008]. En fait, l'association avec l'adiposité chez les adultes semble être modulée par le polymorphisme Pro12Ala du gène *PPARG*, connu pour être associé à une augmentation du TA [Tonjes *et al.* 2007]. Le fait que le RTH soit le seul paramètre anthropométrique pour lequel l'interaction gène-gène est significative suggère que le rôle d'ANGPTL4 pourrait varier suivant le type de dépôt de TA.

Récemment, une GWAS a décrit l'association d'un SNP situé à proximité du gène *ANGPTL4* avec la concentration d'HDL-cholestérol chez 40 000 individus environ [Kathiresan *et al.* 2009]. Cependant, ce SNP est localisé à 30 kpb en aval d'*ANGPTL4* et présente un faible DL avec les SNPs que nous avons étudiés et qui sont, eux, localisés au sein du gène ($r^2 < 0,33$ selon HapMap), remettant alors en question l'attribution de l'effet de ce SNP à *ANGPTL4*.

En conclusion, les associations que nous avons observées entre le seul polymorphisme fréquent d'*ANGPTL3* et les taux plasmatiques de HDL-cholestérol et d'ApoA1, et ce, dès l'adolescence, soulignent le rôle d'*ANGPTL3* dans le métabolisme des HDLs chez l'homme.

Nous avons également détecté des associations entre un polymorphisme d'*ANGPTL4* et des indicateurs de la quantité et de la répartition de la masse grasse. Bien que ces résultats requièrent confirmation, ils suggèrent que, comme chez la souris, *ANGPTL4* participerait à la régulation du stockage et de l'utilisation de l'énergie chez l'homme.

IV. Etude du gène *ANGPTL6*

IV.1. Contexte de l'étude

ANGPTL6 a été récemment découverte (en 2003) et peu d'études à son sujet sont publiées à ce jour. Comme les autres ANGPTLs, c'est une protéine plasmatique. Elle est sécrétée principalement par le foie [Romeo *et al.* 2009]. En 2005, Oike *et al.* ont décrit que les souris KO *Angptl6*^{-/-} qui survivent à la délétion du gène (seulement 20%) développent une obésité marquée et une insulino-résistance [Oike *et al.* 2005]. De plus, l'injection d'Angptl6 chez la souris entraîne une perte de poids et une amélioration de la sensibilité de l'insuline, et les souris transgéniques qui surexpriment *Angptl6* sont résistantes à une obésité induite par un régime hyperlipidique [Oike *et al.* 2005]. Au vu de ces données, nous avons émis l'hypothèse que la variabilité d'*ANGPTL6* pourrait influencer les phénotypes associés au syndrome métabolique.

ELSEVIER
MASSONAvailable online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.comElsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.comDiabetes
& Metabolism

Diabetes & Metabolism 35 (2009) 287–292

Original article

Association between angiotensin-like 6 (*ANGPTL6*) gene polymorphisms and metabolic syndrome-related phenotypes in the French MONICA Study

V. Legry^a, L. Goumidi^a, M. Huyvaert^a, D. Cattel^a, J. Ferrières^b, D. Arveiler^c, A. Bingham^d,
A. Wagner^c, J.-B. Ruidavets^b, P. Ducimetière^d, P. Amouyel^a, A. Meirhaeghe^{a,*}

^a Inserm U744, UMR, institut Pasteur de Lille, université de Lille 2, BP 245, 1, rue du Pr-Calmette, 59019 Lille cedex, France

^b Inserm U558, faculté de médecine, université Paul-Sabatier, Toulouse, France

^c EA 1801, laboratoire d'épidémiologie et santé publique, faculté de médecine, université Louis-Pasteur, Strasbourg, France

^d Inserm U909, université Paris-V, Villejuif, France

Received 20 November 2008; received in revised form 19 December 2008; accepted 22 December 2008

Available online 15 May 2009

Abstract

Aim. – Although the *ANGPTL6* (angiotensin-like 6) gene product is now known to be involved in the regulation of fat mass and insulin sensitivity in mice, its physiological functions in humans have yet to be determined.

Methods. – Subjects from the population-based French MONICA Study ($n = 3402$) were genotyped for single nucleotide polymorphisms (SNPs) in *ANGPTL6*, and associations with anthropometric or biochemical phenotypes were looked for.

Results. – On evaluating the frequency of 17 *ANGPTL6* SNPs in 100 randomly selected subjects on the basis of linkage disequilibrium mapping, four SNPs (rs6511435, rs8112063, rs11671983 and rs15723) were found to cover more than 95% of the known *ANGPTL6* genetic variability. Subjects from the entire MONICA Study were then genotyped for these four SNPs. No significant association was detected for rs11671983 and rs15723. In contrast, the *G* allele of rs8112063 was associated with lower plasma glucose levels ($P = 0.009$). Also, obese subjects carrying the *G* allele of rs6511435 had higher plasma insulin levels than *AA* subjects ($P = 0.0055$). Moreover, the *G* allele of rs6511435 tended to be associated with a 20% higher risk of the metabolic syndrome ($P = 0.034$). However, when false discovery rate testing (40 tests) was applied, these associations were no longer statistically significant.

Conclusion. – These findings constitute the first study in humans of *ANGPTL6* genetic variability. Although there was no evidence that polymorphisms in *ANGPTL6* might be significantly associated with the metabolic syndrome-related phenotypes, a weak association of these polymorphisms with these parameters cannot be excluded. Further association studies are needed to arrive at any definite conclusions.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *ANGPTL6* gene; Polymorphisms; Plasma glucose; Metabolic syndrome; Insulin resistance; Association study

Résumé

Étude d'association entre des polymorphismes du gène *ANGPTL6* et des phénotypes du syndrome métabolique dans l'étude française MONICA.

But. – Bien que le rôle de l'*ANGPTL6* (angiotensin-like 6) dans la régulation de la masse grasse et la sensibilité à l'insuline ait été mis en évidence chez la souris, ses fonctions physiologiques chez l'homme sont encore inconnues.

Méthodes. – Le génotypage des polymorphismes du gène *ANGPTL6* a été réalisé chez les sujets de l'étude MONICA, représentative de la population française âgée de 35 à 65 ans ($n = 3402$), à la recherche d'associations entre ces polymorphismes et les phénotypes anthropométriques et biologiques.

Résultats. – Nous avons évalué la fréquence de 17 polymorphismes du gène *ANGPTL6* chez 100 sujets tirés au sort de l'étude MONICA et, à partir de la carte de déséquilibre de liaison, nous avons montré que quatre polymorphismes (rs6511435, rs8112063, rs11671983 et rs15723) couvraient plus de 95 % de la variabilité génétique connue de *ANGPTL6*. Tous les individus de l'étude MONICA ont alors été génotypés pour ces quatre

Abbreviations: ANGPTL, Angiotensin-like protein; CI, Confidence interval; HOMA-IR, Homoeostasis model assessment–insulin resistance; RFLP, Restriction fragment length polymorphism; SNP, Single nucleotide polymorphism; WHO, World Health Organization.

* Corresponding author.

E-mail address: aline.meirhaeghe-hurez@pasteur-lille.fr (A. Meirhaeghe).

1262-3636/\$ – see front matter © 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

doi:10.1016/j.diabet.2008.12.005

polymorphismes. Aucune association n'a été détectée pour les polymorphismes rs11671983 et rs15723. À l'inverse, l'allèle G du polymorphisme rs8112063 était associé à une glycémie plus basse ($P=0,009$). De plus, les individus obèses porteurs de l'allèle G du polymorphisme rs6511435 présentaient une insulïnémie plus élevée que les individus AA ($P=0,0055$). L'allèle G du polymorphisme rs6511435 tendait également à être associé à une augmentation du risque de 20 % de syndrome métabolique ($P=0,034$). Cependant, lorsqu'on applique une correction pour tests multiples (40 tests réalisés), ces associations n'étaient plus significatives.

Conclusion. – En conclusion, ces résultats constituent la première étude de la variabilité génétique du gène *ANGPTL6* chez l'homme. Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'association significative entre les polymorphismes d'*ANGPTL6* et les phénotypes du syndrome métabolique, nous ne pouvons pas exclure pour autant que des polymorphismes de ce gène puissent être faiblement associés à ces phénotypes. D'autres études d'association sont nécessaires pour pouvoir conclure.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Gène de l'*ANGPTL6* ; Polymorphismes ; Glycémie ; Syndrome métabolique ; Insulinorésistance ; Études d'associations

1. Introduction

Angiopoietin-like proteins [ANGPTLs] or 'angiopoietin-related proteins' [ARPs] are orphan ligands with a degree of similarity to angiopoietins: they contain a coiled-coil domain and a fibrinogen-like domain, and have angiogenic effects [1–10]. The ANGPTL family has seven members (ANGPTL 1–7), which have been found in both humans and mice [11] (except for ANGPTL5, identified only in humans [12]). The ANGPTLs are secreted proteins that serve as endocrine signals in the peripheral tissues. Its most interesting member (in terms of glucose, lipid homeostasis and insulin sensitivity) is ANGPTL6 (also called 'angiopoietin-related growth factor' [AGF]). ANGPTL6 was first identified in 2003, and has been characterized as an angiogenic factor involved in epidermal proliferation and wound healing [9,13]. Recently, it was shown that ANGPTL6 is involved in the development of obesity and its related insulin resistance in mouse models [14]. Indeed, Oike et al. have shown that mice surviving deletion of the *Angptl6* gene develop marked obesity, characterized by an increase in fat depots and adipocyte size, hypercholesterolaemia, elevated plasma non-esterified fatty acid (NEFA) levels, hyperinsulinaemia and glucose intolerance. The increased fat mass was due to a decrease in energy expenditure rather than an increase in food intake. In addition, transgenic mice in which *Angptl6* was overexpressed displayed a significant reduction in body weight (resulting from increased energy expenditure) and improved insulin sensitivity [14]. These mice were also protected against high-fat diet-induced obesity and non-adipose-tissue steatosis.

Little is known of the physiology of *ANGPTL6*. The mechanisms by which it stimulates energy expenditure and insulin sensitivity, and the nature of the tissues targeted by the protein have yet to be established. In mice, *Angptl6* is expressed predominantly in the liver, but also in haematopoietic cells [13]. In humans, the *ANGPTL6* gene is located on chromosome 19p13.2, but nothing is known of its expression and function. For this reason, we aimed to establish whether *ANGPTL6* genetic variability could be associated with anthropometric or biochemical phenotypes in humans using a sample population ($n=3402$) from the French population-based MONICA Study.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Participants were recruited from the WHO–MONICA population survey carried out from 1995 to 1997 in different regions of France: the Lille Urban Community in the north (Lille, $n=1195$); the Bas-Rhin county in the east (Strasbourg, $n=1131$); and the Haute-Garonne county in the south (Toulouse, $n=1182$), as described elsewhere [15]. The study protocol was approved by the independent ethics committee of each respective region. After signing an informed consent form, participants were administered a standard questionnaire, while physical measurements were taken by a specially trained nurse. Physical activity was defined as at least 15 min/day of walking and/or the daily lifting or carrying of heavy objects at work and/or doing sports or physical exercise for more than 2 h/week. Current cigarette smokers were defined as those who smoked at least one cigarette/day. Total alcohol intake (in mL) was calculated as the total sum per week of wine, beer, cider and spirits. Anthropometric measurements were taken with the subjects wearing light clothing and no shoes. Body mass index (BMI) was calculated according to the Quetelet equation, and the metabolic syndrome was assessed using the WHO criteria [16].

2.2. Laboratory methods

A 20 mL blood sample was drawn on disodium EDTA after the subject had fasted for at least 10 h. Lipid and lipoprotein levels were all measured at the Purpan Hospital Biochemical Laboratory (Toulouse), as described elsewhere [15]. The homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index was calculated as the product of fasting plasma insulin (in $\mu\text{U/mL}$) and fasting plasma glucose (in mmol/L), divided by 22.5 [17].

2.3. Genotyping

Single nucleotide polymorphism (SNP) typing was performed using the restriction fragment length polymorphism (RFLP) method (see Supplementary Data Table). The genotyping success rate was greater than 96% for all SNPs. All SNPs

respected the Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.05$), except for rs6511435 ($P = 0.002$). However, the RFLP method can lead to genotyping errors due to incomplete digestion so, to avoid this, the restriction enzyme was always added in excess. The genotypes in excess for the rs6511435 SNP corresponded to both the GG homozygote (uncut) and AA homozygote (cut) genotypes, ruling out the hypothesis that this was due to uncut digestion products. Moreover, on checking 30% of the genotypes of rs6511435 ($n = 934$) with another primer pair and another restriction enzyme that cuts the other (G) allele (see [Supplementary Data Table](#)), only six discordant genotypes (0.6%) were found, ruling out a problem with the genotyping technique. Indeed, no reason for deviation from the Hardy–Weinberg equilibrium can be identified in some cases [18]. Paired linkage disequilibrium estimates were calculated using GOLD software [19].

2.4. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using SAS statistical software, version 8 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Inter-group comparisons of quantitative variables were tested using a general linear model (the GLM procedure in SAS). Data for triglyceride, HOMA, glucose and insulin levels were log-transformed to obtain a normal distribution. For anthropometric variables, the confounding variables were age, gender, centre, smoking status, alcohol consumption and physical activity. For biochemical variables, the confounding variables were age, gender, centre, BMI, smoking status, alcohol consumption and physical activity. Multivariate logistic-regression analyses were used to calculate the odds ratios (OR) for the metabolic syndrome adjusted for age, gender, centre, smoking status, alcohol consumption and physical activity. Reported P values are nominal.

3. Results

ANGPTL6 SNPs were extracted from the Children's Hospital Informatics Program SNP (snpper.chip.org) and the NCBI dbSNP databases, out of which 17 SNPs were selected, located from 1000 bp upstream of the first exon to 1000 bp downstream of the last exon: rs6511435; rs7260319; rs8109578; rs8101501; rs10417676; rs9749206; rs10410922; rs8112063; rs11671983; rs8107814; rs2336689; rs6511432; rs6511431; rs10408727; rs10408244; rs1044611; and rs15723. In the HapMap database (release 23), only the rs8109578, rs8112063, rs10408244 and rs15723 SNPs were reported, and no tag SNPs were described.

To build the linkage disequilibrium map, 100 randomly selected individuals from the MONICA Study were genotyped for the 17 selected SNPs. However, rs7260319, rs8101501, rs10417676, rs9749206, rs2336689, rs6511431, rs10408727 and rs1044611 were not detected in this sample, and the minor allele frequencies of the rs8109578, rs6511432 and rs10408244 SNPs were too low (0.05, 0.04 and 0.01, respectively) to yield sufficient statistical power in the analyses and so were not pursued. The minor allele frequencies of the rs6511435, rs10410922, rs8112063, rs11671983, rs8107814 and rs15723 SNPs were 0.25, 0.37, 0.37, 0.13, 0.10 and 0.10, respectively. The linkage disequilibrium pattern across the SNPs was assessed using both D' and r^2 (Fig. 1). Although the rs10410922, rs8112063, rs11671983, rs8107814 and rs15723 SNPs were in linkage disequilibrium ($|D'| = 1$), complete allelic association ($r^2 = 1$) was only observed for rs10410922 and rs8112063, and for rs8107814 and rs15723. Rs6511435 was independent of the other SNPs (maximum $|D'| = 0.3$ and $r^2 = 0.03$).

Subjects from the MONICA population study ($n = 3402$) were then genotyped for the four SNPs — rs6511435, rs8112063 (tagging rs10410922), rs11671983 and rs15723 (tagging rs8107814) — that covered more than 95% of the known genetic

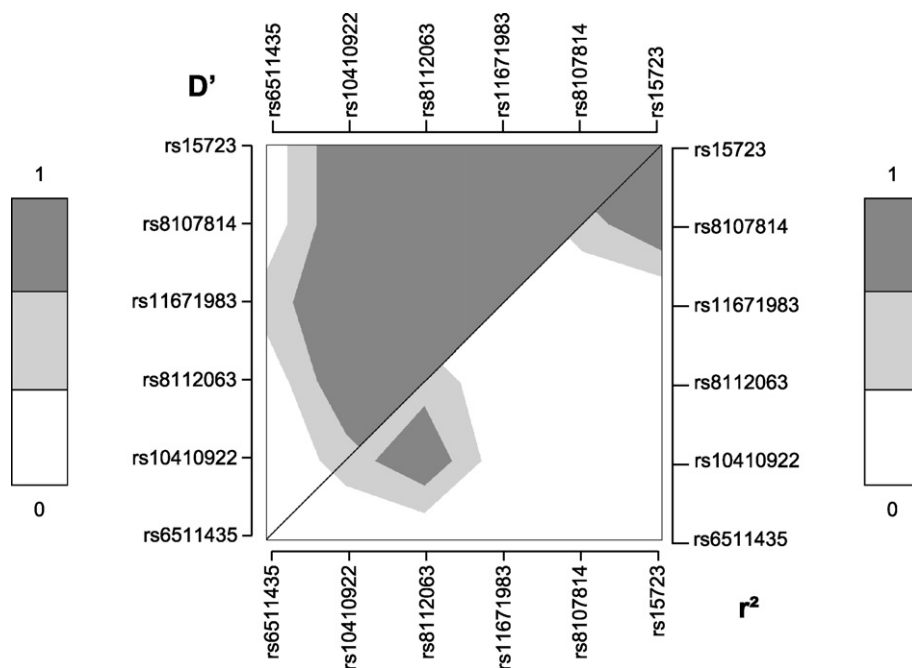


Fig. 1. Linkage disequilibrium across six *ANGPTL6* polymorphisms. The D' is displayed in the upper left corner and the r^2 is displayed in the lower right corner.

Table 1
Association between rs15723 and anthropometric and biochemical parameters.

rs15723 (n)	TT (2751)	TC (528)	CC (35)	P CC + TC vs TT
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 4.6	26.5 ± 4.7	27.8 ± 5.9	0.444
Waist/hip ratio	0.89 ± 0.09	0.89 ± 0.09	0.89 ± 0.09	0.683
Cholesterol (mmol/L)	5.89 ± 1.06	5.94 ± 1.01	5.70 ± 0.88	0.870
HDL cholesterol (mmol/L)	1.47 ± 0.44	1.49 ± 0.44	1.51 ± 0.49	0.391
LDL cholesterol (mmol/L)	3.85 ± 1.00	3.90 ± 0.94	3.65 ± 0.84	0.965
Triglycerides (mmol/L)	1.30 ± 0.97	1.25 ± 0.92	1.47 ± 1.21	0.176
Glucose (mmol/L)	5.56 ± 1.43	5.46 ± 0.90	6.10 ± 2.00	0.090
Insulin (uU/mL)	11.24 ± 9.33	11.54 ± 7.84	10.91 ± 4.21	0.552
HOMA-IR	2.90 ± 3.19	2.86 ± 2.14	3.14 ± 2.21	0.974

Data are expressed as means ± S.D.

Table 2
Association between rs11671983 and anthropometric and biochemical parameters.

rs11671983 (n)	CC (2488)	CG (782)	GG (51)	P GG + CG vs CC
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 4.7	26.1 ± 4.5	27.1 ± 4.4	0.698
Waist/hip ratio	0.88 ± 0.09	0.89 ± 0.10	0.88 ± 0.10	0.108
Cholesterol (mmol/L)	5.90 ± 1.06	5.89 ± 1.03	5.82 ± 0.97	0.695
HDL cholesterol (mmol/L)	1.49 ± 0.45	1.47 ± 0.43	1.46 ± 0.47	0.328
LDL cholesterol (mmol/L)	3.86 ± 0.99	3.86 ± 0.98	3.75 ± 0.94	0.654
Triglycerides (mmol/L)	1.28 ± 0.95	1.30 ± 0.96	1.55 ± 1.56	0.215
Glucose (mmol/L)	5.53 ± 1.37	5.61 ± 1.36	5.60 ± 1.42	0.064
Insulin (uU/mL)	11.14 ± 9.00	11.81 ± 9.48	10.16 ± 4.68	0.062
HOMA-IR	2.84 ± 2.89	3.10 ± 3.52	2.63 ± 1.74	0.023

Data are expressed as means ± S.D.

variability of *ANGPTL6*. The minor allele frequencies of the *ANGPTL6* rs6511435, rs8112063, rs11671983 and rs15723 SNPs in the MONICA sample were 0.28, 0.43, 0.13 and 0.09, respectively.

Next, the association of these four *ANGPTL6* SNPs was assessed against anthropometric and biochemical phenotypes — namely, mean BMI, waist-to-hip ratio, plasma cholesterol (total, HDL and LDL), triglycerides, glucose and insulin levels, and insulin sensitivity (estimated by the HOMA-IR). No significant interaction between the SNPs and either gender or physical activity could be detected with these parameters.

Analysis of rs15723 (a T > C substitution in the 3' untranslated region) showed no associations with the considered phenotypes (Table 1). Table 2 shows the associations for rs11671983 (a C > G change in intron 1) with the studied parameters. HOMA-IR values tended to be higher in G allele bearers

($P=0.023$) but, as this was due to the impact of the heterozygote subjects only, this association was considered spurious.

As for rs6511435 (an A > G substitution in the promoter region), subjects carrying the G allele had higher plasma fasting insulin concentrations ($P=0.022$) and were more insulin resistant ($P=0.034$) than AA subjects (Table 3). We detected an interaction ($P=0.02$) between rs6511435, plasma insulin levels and obesity, defined as a BMI less than 30 ($n=2766$) or greater or equal to 30 kg/m² ($n=597$). Indeed, mean insulin levels were similar ($P=0.23$) between non-obese rs6511435 G allele carriers and AA subjects whereas obese subjects carrying the G allele had higher insulin levels than obese AA subjects (18.00 ± 10.57 vs 16.17 ± 8.67 uU/mL, respectively; $P=0.0055$). Given that insulin resistance is a major risk factor for the occurrence of the metabolic syndrome, logistic-regression analyses were performed to evaluate the risk of the metabolic syndrome. In the

Table 3
Association between rs6511435 and anthropometric and biochemical parameters.

rs6511435 (n)	AA (1735)	AG (1278)	GG (303)	P GG + AG vs AA
BMI (kg/m ²)	26.3 ± 4.6	26.3 ± 4.7	26.4 ± 4.6	0.782
Waist/hip ratio	0.89 ± 0.09	0.88 ± 0.10	0.88 ± 0.09	0.289
Cholesterol (mmol/L)	5.91 ± 1.04	5.89 ± 1.09	5.85 ± 0.97	0.689
HDL cholesterol (mmol/L)	1.49 ± 0.46	1.48 ± 0.43	1.45 ± 0.39	0.144
LDL cholesterol (mmol/L)	3.85 ± 0.96	3.88 ± 1.04	3.85 ± 0.92	0.419
Triglycerides (mmol/L)	1.31 ± 1.01	1.26 ± 0.92	1.27 ± 0.84	0.743
Glucose (mmol/L)	5.56 ± 1.49	5.54 ± 1.23	5.52 ± 1.18	0.721
Insulin (uU/mL)	11.02 ± 9.20	11.55 ± 9.35	11.53 ± 6.55	0.022
HOMA-IR	2.82 ± 2.98	2.97 ± 3.20	2.97 ± 2.61	0.034

Data are expressed as means ± S.D.

Table 4
Association between rs8112063 and anthropometric and biochemical parameters.

rs8112063 (n)	AA (1068)	AG (1631)	GG (623)	P GG vs AA + AG
BMI (kg/m ²)	26.4 ± 4.8	26.3 ± 4.6	26.4 ± 4.4	0.689
Waist/hip ratio	0.89 ± 0.10	0.89 ± 0.09	0.89 ± 0.09	0.848
Cholesterol (mmol/L)	5.90 ± 1.06	5.89 ± 1.03	5.82 ± 0.97	0.058
HDL cholesterol (mmol/L)	1.47 ± 0.43	1.48 ± 0.44	1.50 ± 0.48	0.396
LDL cholesterol (mmol/L)	3.85 ± 1.02	3.88 ± 0.99	3.83 ± 0.94	0.190
Triglycerides (mmol/L)	1.30 ± 0.97	1.31 ± 1.01	1.23 ± 0.80	0.096
Glucose (mmol/L)	5.57 ± 1.38	5.57 ± 1.44	5.45 ± 1.13	0.009
Insulin (uU/mL)	11.56 ± 9.66	11.22 ± 9.41	10.99 ± 6.80	0.414
HOMA-IR	3.01 ± 3.39	2.89 ± 3.11	2.74 ± 2.02	0.089

Data are expressed as means ± S.D.

MONICA Study, 19.0% ($n=645$) of the subjects presented with the metabolic syndrome. Those carrying the *G* allele of rs6511435 tended to have a higher risk of the metabolic syndrome (adjusted OR = 1.21 [1.01–1.45]; $P=0.034$) compared with AA subjects.

As regards rs8112063 (an A>G substitution in intron 1), GG subjects had lower fasting plasma glucose levels compared with A allele bearers ($P=0.009$; Table 4), although the risk of the metabolic syndrome in GG subjects was not significantly modified (OR = 0.82 [0.65–1.04]; $P=0.106$).

Multiple testing (40 tests) was performed in this study and, when applying a correction such as the Benjamini and Hochberg false discovery rate (FDR) [20], the best corrected P value was 0.22, suggesting that none of the associations described above was statistically significant.

4. Discussion

In the present study, we explored the genetic variability of the *ANGPTL6* gene. We assessed the frequency of 17 SNPs and found that four common SNPs covered 95% of the known genetic variability in the gene. We studied the associations between these four SNPs and several anthropometric and biochemical phenotypes (including risk of the metabolic syndrome) in the French MONICA Study sample ($n=3402$). Statistically, no significant associations were detected between any of the four SNPs and the studied phenotypes. However, we observed that the *G* allele of rs8112063 was associated with lower plasma glucose levels. In addition, obese subjects carrying the *G* allele of rs6511435 had higher plasma insulin levels than the AA subjects. The *G* allele of rs6511435 also tended to be associated with a 20% higher risk of the metabolic syndrome. We looked at the publicly available genome-wide association datasets for quantitative glycaemic (glucose, insulin, HOMA-IR) traits (Diabetes Genetics Initiative, <http://www.broad.mit.edu/diabetes/>) and at the risk of type 2 diabetes (DIAGRAM, <http://www.well.ox.ac.uk/DIAGRAM/>) [21] to see whether or not *ANGPTL6* SNPs had been previously associated with glycaemic traits and/or type 2 diabetes. Unfortunately, no *ANGPTL6* SNP had been explored in any of those studies.

Nevertheless, our findings could be consistent with a physiological role of Angptl6 in terms of insulin sensitivity and

glucose metabolism as reported by Oike et al. in transgenic mice [14]. Also, it has recently been shown that Angptl6 inhibits glucose production in rat hepatocytes by preventing expression of glucose-6-phosphatase, a key enzyme in gluconeogenesis [22]. Furthermore, Hato et al. reported that diet-induced obese mice receiving Angptl6 showed increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity (which improves insulin signaling in skeletal muscle) and that, in C2C12 myoblasts, the addition of insulin after pretreatment with Angptl6 increased IRS-1 (insulin receptor substrate-1) phosphorylation, PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase) activity and glucose uptake, thereby resulting in enhanced insulin signaling [11].

Although Oike et al. showed that Angptl6 is involved in fat metabolism and may counteract obesity in mice [14], we detected no significant association between *ANGPTL6* polymorphisms and body-weight-related variables in the French MONICA sample. This was not because of a lack of power as, even when considering the most rare allele (frequency 0.09), we would have detected a 0.7 kg/m² difference in mean BMI in our study. However, an increased fat mass (as seen in obesity) might accentuate the role of *ANGPTL6* on insulin metabolism.

The *ANGPTL6* SNPs we studied are non-coding polymorphisms. Indeed, rs6511435 is located in the gene promoter region, 1066 bp upstream of the transcription start site. This *ANGPTL6* SNP was totally independent of the other SNPs tested. Rs8112063 and rs11671983 are located in the first intron of *ANGPTL6*, which stretches out over nearly 6 kbp. As rs8112063 also tagged rs10410922, the associations observed for rs8112063 could be functionally explained by rs10410922, also located in the first intron, 775 bp away. As the introns (especially the first one) are known to be regulatory regions that modulate gene expression, these SNPs may have an influence on *ANGPTL6* expression levels. In addition, rs15723 is located in the 3' untranslated region of the gene. Functional analyses of these SNPs could shed light on the regulation of *ANGPTL6* gene expression, of which nothing is currently known.

In conclusion, these results constitute the first study findings in humans of *ANGPTL6* genetic variability. We found no evidence that polymorphisms of *ANGPTL6* had any significant influence on the metabolic syndrome-related phenotypes, but a minor role of these polymorphisms on these parameters can-

not be excluded either. Further association studies are needed to allow any definite conclusions to be made.

5. Conflict of interests

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Acknowledgements

The French arm of the WHO–MONICA population study was funded by grants from the *Conseil régional du Nord-Pas de Calais*, the *Caisse primaire d'assurance maladie de Sélestat*, the *Association régionale de cardiologie d'Alsace*, ONIVINS, Parke-Davis, the *Mutuelle générale de l'Éducation nationale* (MGEN), the *Réseau national de santé publique*, the *Direction Générale de la santé*, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the *Institut Pasteur de Lille* and the *Unité d'évaluation du CHU de Lille*. VL is funded by the *Institut Pasteur de Lille*.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.diabet.2008.12.005.

References

- [1] Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS, Kwak HJ, et al. Molecular cloning, expression, and characterization of angiotensin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem* 1999;274:26523–8.
- [2] Kim I, Kim HG, Kim H, Kim HH, Park SK, Uhm CS, et al. Hepatic expression, synthesis and secretion of a novel fibrinogen/angiotensin-related protein that prevents endothelial-cell apoptosis. *Biochem J* 2000;346:603–10.
- [3] Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M, Hass P, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem* 2002;277:17281–90.
- [4] Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y, Soukas A, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiotensin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol* 2000;20:5343–9.
- [5] Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D, Chambon P, et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem* 2000;275:28488–93.
- [6] Dhanabal M, LaRochelle WJ, Jeffers M, Herrmann J, Rastelli L, McDonald WF, et al. Angioarrestin: an antiangiogenic protein with tumor-inhibiting properties. *Cancer Res* 2002;62:3834–41.
- [7] Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamande N, Favier J, et al. Angiotensin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 2003;162:1521–8.
- [8] Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, Hamada K, Miyata K, Matsumoto S, et al. Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiotensin-related protein 4. *Cancer Res* 2003;63:6651–7.
- [9] Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y, Akao M, et al. Angiotensin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood* 2004;103:3760–5.
- [10] Oike Y, Yasunaga K, Suda T. Angiotensin-related/angiotensin-like proteins regulate angiogenesis. *Int J Hematol* 2004;80:21–8.
- [11] Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiotensin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med* 2008;18:6–14.
- [12] Zeng L, Dai J, Ying K, Zhao E, Jin W, Ye Y, et al. Identification of a novel human angiotensin-like gene expressed mainly in heart. *J Hum Genet* 2003;48:159–62.
- [13] Oike Y, Yasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H, Morisada T, et al. Angiotensin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:9494–9.
- [14] Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T, Ito Y, et al. Angiotensin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat Med* 2005;11:400–8.
- [15] Dallongeville J, Delcroix AG, Wagner A, Ducimetière P, Ruidavets JB, Arveiler D, et al. The APOA4 Thr347->Ser347 polymorphism is not a major risk factor of obesity. *Obes Res* 2005;13:2132–8.
- [16] World Health Organization. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Part I: Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1999.
- [17] Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412–9.
- [18] Hosking L, Lumsden S, Lewis K, Yeo A, McCarthy L, Bansal A, et al. Detection of genotyping errors by Hardy-Weinberg equilibrium testing. *Eur J Hum Genet* 2004;12:395–9.
- [19] Abecasis GR, Cookson WO. GOLD—graphical overview of linkage disequilibrium. *Bioinformatics* 2000;16:182–3.
- [20] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Statist Soc B* 1995;57:289–300.
- [21] Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL, Hu T, et al. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet* 2008;40:638–45.
- [22] Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinuma T, Hashimoto S. Angiotensin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the Akt/forkhead box class O1-dependent pathway in hepatocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:787–93.

IV.2. Synthèse des résultats

Lorsque nous avons commencé ce travail en 2005, la base de données HapMap ne comptait que 4 SNPs situés dans le gène *ANGPTL6* (rs8109578, rs8112063, rs10408244 et rs15723) et aucun tag-SNP n'était décrit. En revanche dans la base de données du NCBI, 17 SNPs étaient décrits (comprenant les 4 de HapMap). Afin de vérifier leur existence et de calculer leur DL, nous avons génotypé l'ensemble de ces SNPs chez une centaine d'individus pris au hasard dans l'échantillon MONICA Lille. Nous avons ainsi déterminé que les SNPs rs6511435 (promoteur), rs8112063 (intron 1), rs11671983 (intron 1) et rs15723 (3'UTR) couvrent 95% de la variabilité génétique connue d'*ANGPTL6*. Nous avons alors recherché des associations statistiques entre ces 4 SNPs et les phénotypes métaboliques dans les échantillons MONICA Lille, Strasbourg et Toulouse.

Dans l'étude combinée des 3 populations MONICA (n=3402), **le SNP rs8112063 (MAF 0,43) est associé à une diminution de la glycémie**. De plus, **le polymorphisme rs6511435 (MAF 0,28) est associé à une augmentation de l'insulinorésistance** en particulier chez les individus obèses. L'allèle G de ce polymorphisme tend également à être associé à une augmentation du risque de syndrome métabolique (OR=1,21). Cependant, lorsqu'on applique une correction pour tests multiples (40 tests réalisés dans cette étude), ces associations ne sont plus statistiquement significatives.

IV.3. Discussion

Dans notre article, nous avons appliqué une correction pour tests multiples en accord avec les nouvelles recommandations pour les études d'association. Nous avons utilisé la méthode de correction de Benjamini et Hochberg dite de FDR [Fernando *et al.* 2004] en considérant 40 tests effectués (4 SNPs, 10 phénotypes). Dans notre étude, aucune valeur *p* corrigée de cette façon n'atteint le seuil de significativité. Les associations entre les polymorphismes génétiques d'*ANGPTL6* et la glycémie et l'insulinorésistance que nous avons observées ne sont donc pas statistiquement significatives. Cependant, elles sont tout à fait cohérentes avec les observations chez la souris et le rat (inhibition de la gluconéogenèse et amélioration de la signalisation de l'insuline) [Kitazawa *et al.* 2007; Hato *et al.* 2008]. De plus, Ebert *et al.* ont décrit récemment que le taux plasmatique d'*ANGPTL6* est augmenté chez des patients diabétiques par rapport à des individus non diabétiques et qu'il est corrélé à la glycémie chez les patients et les témoins [Ebert *et al.* 2009]. Les auteurs suggèrent que l'induction d'*ANGPTL6* pourrait être un mécanisme compensateur chez les patients diabétiques permettant de limiter l'hyperglycémie, ou bien, que les patients diabétiques présentent une résistance à *ANGPTL6* conduisant à une augmentation de sa

production (au même titre que la résistance à l'insuline ou à la leptine). Nous avons recherché dans les données disponibles des GWAS concernant le DT2 (DIAGRAM, <http://www.well.ox.ac.uk/DIAGRAM/>) et les phénotypes associés (glycémie, insulinémie et HOMA-IR) (Diabetes Genetics Initiative, <http://www.broad.mit.edu/diabetes/>) si des polymorphismes génétiques d'*ANGPTL6* avaient déjà été étudiés [Zeggini *et al.* 2008]. Malheureusement, aucun SNP d'*ANGPTL6* n'a été analysé dans ces études.

Dans notre étude, l'effet d'*ANGPTL6* sur l'homéostasie glucidique semble entraîner une légère augmentation du risque de syndrome métabolique si on utilise la définition de l'OMS. Nous avons également estimé l'impact du SNP rs6511435 sur le risque de syndrome métabolique selon les autres définitions : les résultats sont similaires avec les critères de l'EGIR, mais si l'on considère les définitions de l'AHA ou de l'IDF, ce SNP perd son effet (OR=0,96, $p=0,58$ et OR=1,10, $p=0,23$). Cette différence peut s'expliquer par l'importance donnée au désordre glucidique dans les définitions du syndrome métabolique de l'OMS et de l'EGIR, qui en font un critère obligatoire, contrairement aux définitions du NCEP et de l'EGIR (Tableau 1). La prévalence du syndrome métabolique dans l'échantillon MONICA est moins élevée si l'on considère la définition de l'OMS par rapport à celle de l'AHA, illustrant le fait que les critères de l'OMS sélectionnent des individus plus insulinorésistants. En effet, la concentration plasmatique d'insuline et le HOMA-IR sont plus élevés chez les individus présentant un syndrome métabolique défini par l'OMS par rapport à ceux définis par l'AHA ($18,32 \pm 11,48$ vs. $14,88 \pm 8,94$ $\mu\text{U/ml}$, $p<0.0001$ et $5,28 \pm 3,47$ vs. $4,24 \pm 3,03$, $p<0.0001$, respectivement). Ainsi, l'association de ce polymorphisme avec le syndrome métabolique défini par l'OMS ne serait en fait que le reflet de son association avec l'insulinémie et le HOMA-IR. Son association avec le syndrome métabolique dépend alors du regard que l'on porte sur ce syndrome.

Afin de vérifier si nous avons bien couvert l'ensemble de la variabilité génétique connue du gène *ANGPTL6*, nous avons récemment regardé les données HapMap de 2009 (release 27). Par rapport à celles de 2005, un seul SNP d'*ANGPTL6* supplémentaire est décrit : le SNP rs10410922, qui est en effet en DL avec le rs8112063 selon HapMap et nos propres données. Les 4 tag-SNPs que nous avons déterminés (rs6511435, rs8112063, rs11671983 et rs15723) grâce à une recherche systématique dans un sous-échantillon de population des SNPs décrits dans la base de données dbSNP du NCBI, s'avère couvrir d'avantage de polymorphismes génétiques que ceux décrits par HapMap. Notamment, le SNP rs6511435, potentiellement associé à l'insulinorésistance et au syndrome métabolique, n'est pas inclus dans les données HapMap à ce jour. Ces données se révèlent donc encore aujourd'hui incomplètes. Etant donné que les GWAS se basent essentiellement sur les données HapMap, elles peuvent donc passer à côté de facteurs de susceptibilité génétique

aux maladies métaboliques, ce qui constitue l'une des principales limites des GWAS à ce jour.

En conclusion, il est délicat de conclure que *ANGPTL6* n'est définitivement pas associé aux phénotypes associés à l'homéostasie glucidique. Seules d'autres études en population portant sur un plus grand nombre d'individus permettant ainsi d'obtenir une puissance statistique supérieure, pourront aider à confirmer ou infirmer nos conclusions.

Discussion générale

Le syndrome métabolique est un désordre complexe impliquant de nombreux troubles métaboliques, dont la physiopathologie est encore mal connue. La présence de ce syndrome chez un individu augmente le risque de DT2, de MCV et de décès. Aujourd'hui, on estime qu'un européen sur cinq présente un syndrome métabolique et au vu des tendances outre-Atlantique, ce chiffre pourrait encore augmenter. Bien que l'environnement « obésogène » dans lequel nous vivons aujourd'hui soit à l'origine de l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du syndrome métabolique, il existe des différences entre les individus et l'on observe ainsi des familles plus touchées que d'autres. En effet, la part attribuable à l'héritabilité génétique du syndrome métabolique a été estimée à 30% [Teran-Garcia *et al.* 2007]. L'identification des facteurs de susceptibilité génétique au syndrome métabolique et aux phénotypes associés aide à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces désordres métaboliques.

I. Difficultés des études sur le syndrome métabolique

Le syndrome métabolique est le sujet d'importantes polémiques depuis quelques années [Kahn *et al.* 2005; Gale 2005; Gale 2008; Alberti *et al.* 2008]. Même si cela ne fait aucun doute que certains facteurs de risque cardiovasculaire, notamment l'insulinorésistance, l'obésité abdominale, l'augmentation de la pression artérielle et les dyslipidémies ont tendance à cohabiter chez un individu, l'intérêt d'utiliser le terme de syndrome métabolique est toujours débattu. Dans les années 1980, de nombreux efforts de recherche se sont concentrés sur les MCV et en particulier sur leur prévention, par l'identification des facteurs de risque. Le syndrome métabolique est alors apparu comme un outil intéressant pour identifier les individus à risque même s'ils ne présentent pas les facteurs de risque classiques (âge, être un homme, être fumeur, avoir des antécédents familiaux de MCV). Or, la définition du syndrome métabolique et sa valeur prédictive du risque cardiovasculaire sont aujourd'hui remises en cause. En effet, non seulement il existe plusieurs définitions différentes, mais en plus, les définitions manquent de précision. Par exemple, aucune recommandation concernant la mesure du tour de taille n'est décrite dans les différentes définitions du syndrome métabolique, ce qui génère une variabilité entre les examinateurs et les études. Par ailleurs, même si le syndrome métabolique est associé à une augmentation du risque cardiovasculaire [Gami *et al.* 2007], il n'a pas été clairement établi que ce risque est plus élevé que la simple somme des risques associés à chaque composante [Kahn *et al.* 2005; Grundy 2006b]. De plus, plusieurs études ont montré que le score de Framingham avait une meilleure valeur prédictive du risque cardiovasculaire que le

syndrome métabolique [Wilson *et al.* 1998; Stern *et al.* 2004]. L'intérêt d'utiliser le syndrome métabolique en clinique semble donc limité.

L'existence même du syndrome métabolique a été remise en doute [Kahn *et al.* 2005]. Selon Kahn *et al.*, un syndrome se définit soit par une combinaison de facteurs qui augmente le risque de maladie, soit par une association de phénotypes tous liés à une physiopathologie commune. En effet, le syndrome métabolique ne semble pas répondre à la première partie de cette définition, en tout cas tel qu'il est défini actuellement. En revanche, la seconde partie de cette définition fait débat. Ce n'est pas parce qu'aucune cause physiopathologique unique du syndrome métabolique n'a encore été identifiée qu'elle n'existe pas. De plus, le terme « syndrome » ne renvoie pas obligatoirement à une unique cause physiopathologique [Grundy 2006a], contrairement à la maladie qui elle, est définie en principe, par une cause spécifique [Gluckman 2007]. Selon Alberti et Zimmet [Alberti *et al.* 2008], la définition la plus simple d'un syndrome est un simple regroupement de choses. Pour ces auteurs, la définition du syndrome métabolique est même plus robuste puisqu'elle détermine l'association non fortuite de différents facteurs de risque cardiovasculaire et de DT2. De plus, le syndrome métabolique, comme de nombreux autres syndromes et maladies, est d'origine multifactorielle. L'absence ou la méconnaissance d'une cause physiopathologique unique du syndrome métabolique ne remet donc pas en cause l'existence du syndrome métabolique.

Le manque de définition consensuelle du syndrome métabolique rend les études d'épidémiologie génétique particulièrement difficiles. En effet, selon la définition utilisée dans un échantillon représentatif de la population générale, certains individus seront tantôt considérés comme ayant un syndrome métabolique, tantôt considérés comme n'ayant pas de syndrome métabolique. En plus des différentes définitions officielles proposées (OMS, EGIR, NCEP, AHA, IDF), de nombreuses études emploient leur propre définition du syndrome métabolique en fonction des données dont elles disposent. Par exemple, le tour de taille est une mesure qui n'est pas toujours disponible dans les études épidémiologiques et est alors souvent remplacé par l'IMC, contrairement aux recommandations de l'EGIR, du NCEP, de l'AHA et de l'IDF. De même, dans l'étude MONICA comme dans de nombreuses études, le clamp hyperinsulinique euglycémique n'a pas pu être réalisé et l'insulinorésistance est alors estimée par la concentration plasmatique d'insuline, contrairement aux recommandations de l'OMS. Comme nous l'avons vu, les études génétiques portant sur les maladies multifactorielles souffrent d'un manque de réplication des résultats entre les différentes populations étudiées. Les études génétiques du syndrome métabolique souffrent, en plus de cela, du problème de sa définition s'exerçant à de multiples niveaux :

- l'imprécision et l'ambiguïté de certains critères,
- le nombre de définitions officielles,
- le nombre d'études utilisant leur propre définition ou une définition officielle réarrangée.

Dans ces conditions, il est difficile de comparer les résultats et d'obtenir la réplication d'une association entre un polymorphisme génétique et le risque de syndrome métabolique dans différentes populations.

Il reste donc d'énormes progrès à faire dans l'étude du syndrome métabolique, notamment au niveau des critères de diagnostic. Déjà, ces critères pourraient être continus (comme c'est le cas du score de Framingham), ce qui éviterait de devoir établir des limites arbitraires qui simplifient trop la complexité du syndrome. De plus, les critères devraient se baser sur des paramètres facilement mesurables et reproductibles, avec des recommandations précises. Une classification plus fine des individus atteints et non-atteints devraient permettre de meilleures études génétiques.

Tant que la définition du syndrome métabolique n'aura pas été améliorée, les associations entre polymorphismes génétiques et le risque de syndrome métabolique seront à prendre avec prudence. C'est pour ces raisons que j'ai étudié le syndrome métabolique en utilisant différentes définitions, et que je me suis également intéressée aux phénotypes associés, c'est-à-dire l'obésité, le DT2 et les dyslipidémies.

II. Synthèse des travaux personnels, critiques et perspectives

Le but de mes travaux a été d'identifier et de caractériser de nouveaux déterminants génétiques du syndrome métabolique et de ses phénotypes associés en population. Je me suis intéressée à la variabilité génétique commune de plusieurs gènes candidats et j'ai réalisé des études d'association entre des polymorphismes génétiques et le risque de syndrome métabolique, d'obésité et de DT2 ainsi que les phénotypes associés (IMC, tour de taille, RTH, concentrations plasmatiques en TG, cholestérol, apolipoprotéines, glucose, insuline et les indices d'insulinorésistance HOMA-IR et HOMA-B). Pour cela, j'ai utilisé différents échantillons (soit des échantillons représentatifs de la population générale, soit des échantillons de cas et de témoins) composés d'adultes ou d'adolescents. Pour certains polymorphismes, j'ai également tenté de comprendre les mécanismes moléculaires sous-tendant les associations observées en population.

Je me suis intéressée au gène *FTO*, symbole du succès des GWAS dans le domaine de la génétique de l'obésité et qui représente une découverte capitale dans ce domaine. En effet, le SNP rs9939609 du gène *FTO* a été établi comme déterminant génétique de l'adiposité dans de nombreuses études [Scuteri *et al.* 2007; Frayling *et al.* 2007; Cotsapas *et al.* 2009; Thorleifsson *et al.* 2009; Loos *et al.* 2008; Meyre *et al.* 2009; Heard-Costa *et al.* 2009]. J'ai pu confirmer l'association du polymorphisme rs9939609 avec le risque d'obésité et de DT2 et les phénotypes associés (IMC, tour de taille, RTH) et trouvé des associations avec le taux d'insuline plasmatique, l'HOMA-IR et la pression artérielle systolique dans l'échantillon français MONICA. Il serait intéressant d'étudier l'impact de ce polymorphisme chez les adolescents de l'étude HELENA qui présente l'avantage de disposer d'un grand nombre de données concernant les habitudes alimentaires, l'environnement socio-économique des adolescents et leur niveau d'activité physique. Les interactions entre le polymorphisme de *FTO* et ces facteurs environnementaux pourraient alors être étudiées.

J'ai également étudié la variabilité génétique commune des gènes codant LXR α et LXR β . Au début de ma thèse, aucune étude d'association n'était publiée sur LXR α et seule une étude d'association entre LXR β et la maladie d'Alzheimer était décrite [Adighibe *et al.* 2006]. J'ai montré que deux polymorphismes (situés dans l'intron 1 et le 5'UTR) du gène codant LXR α étaient associés au taux plasmatique de HDL-cholestérol chez les adolescents et les adultes, ainsi qu'au risque de syndrome métabolique chez les adultes. D'autres études ont confirmé l'association de polymorphismes génétiques de LXR α avec le profil lipidique et en particulier le taux plasmatique de HDL-cholestérol [Robitaille *et al.* 2007; Sabatti *et al.* 2009]. Par ailleurs, j'ai trouvé une association entre un polymorphisme du gène codant LXR β et le risque de DT2 et d'obésité. L'association de ce polymorphisme avec le risque de DT2 et d'obésité vient également d'être décrite dans 2 autres études [Dahlman *et al.* 2009; Dahlman *et al.* 2006].

J'ai réalisé des études *in vitro* de la fonctionnalité des polymorphismes des LXRs associés aux traits métaboliques en population. Ces polymorphismes peuvent potentiellement moduler la régulation de l'expression des LXRs et de leurs gènes cibles. D'une part, j'ai mesuré le niveau d'expression de LXR α et de certains de ses gènes cibles dans des cultures primaires de macrophages humains mais nous n'avons pas détecté de différence significative entre les allèles des polymorphismes de LXR α . D'autre part, des analyses *in silico* ont montré que les polymorphismes associés pouvaient affecter des sites potentiels de fixation pour certains facteurs de transcription (NERFs, HNF4 α et NF1s). J'ai alors réalisé des transfections cellulaires de vecteurs rapporteurs pour comparer l'activité du promoteur LXR α ou LXR β entre les 2 formes alléliques et en co-transfectant ou non les

vecteurs d'expression de ces facteurs de transcription. Même si, dans toutes mes expériences, les facteurs de transcription stimulent ou inhibent effectivement l'activité du promoteur comme prédit par les analyses *in silico*, aucune différence entre les allèles n'a cependant été observée. Il se peut que les polymorphismes modulent en réalité l'affinité pour les facteurs de transcription, mais que cette différence soit trop faible pour être détectée par les systèmes utilisés (transfections, retard sur gel). Pour l'étude de l'activité promotrice, j'aurais pu essayer de cloner 3 copies répétées de l'élément de réponse au facteur de transcription (sous les 2 formes alléliques) dans un vecteur rapporteur et de réaliser les co-transfections. Cela permet parfois d'amplifier la différence existant entre les formes alléliques mais l'inconvénient est que ce système est encore plus artificiel.

Enfin, je me suis intéressée à la variabilité génétique commune de plusieurs gènes de la famille des ANGPTLs. Au début de mes travaux, aucune étude d'association sur les ANGPTLs n'était publiée et le rôle de ces protéines dans le métabolisme énergétique chez la souris venait d'être décrit. J'ai montré que des polymorphismes des gènes *ANGPTL3* et *ANGPTL4* sont associés aux concentrations plasmatiques de HDL-cholestérol et de TG. Ces résultats ont également été décrits dans d'autres études [Kathiresan *et al.* 2008; Romeo *et al.* 2007]. J'ai aussi détecté une association entre un polymorphisme d'*ANGPTL4* et des mesures de l'adiposité (en interaction avec un polymorphisme de *PPARG*) mais ces résultats nécessitent d'être validés dans d'autres études. Par ailleurs, il semblerait que des polymorphismes génétiques d'*ANGPTL6* soient associés à la glycémie et à l'insulinorésistance chez les adultes, en particulier chez les individus obèses. Il serait intéressant d'étudier l'impact des polymorphismes génétiques d'*ANGPTL6* chez les jeunes, en particulier chez des individus obèses. En effet, la glycémie est une constante bien régulée chez les sujets jeunes, mais certains individus obèses présentent prématurément un profil diabétique, notamment dans leur réponse à une HPO [Weiss *et al.* 2006]. Il apparaît alors pertinent d'étudier l'impact des polymorphismes génétiques d'*ANGPTL6* sur la sécrétion d'insuline et la régulation de la glycémie dans un échantillon de jeunes individus obèses pour qui une HPO aurait été réalisée.

Je n'ai pas pu réaliser d'études fonctionnelles des polymorphismes des gènes de la famille des ANGPTLs. Les polymorphismes associés aux phénotypes métaboliques sont situés dans le promoteur des gènes *ANGPTL3* et *-4* et dans le promoteur et l'intron 1 du gène *ANGPTL6*, et pourraient moduler leur niveau d'expression. Cependant, les analyses *in silico* de prédiction des sites de fixation pour des facteurs de transcription n'ont pas permis d'émettre d'hypothèse pertinente pour étudier la fonctionnalité de ces polymorphismes. Les mécanismes moléculaires sous-tendant les associations observées en population restent donc à élucider.

Au cours de ma thèse, j'ai également systématiquement effectué les analyses haplotypiques des polymorphismes des gènes codant LXR α , LXR β , ANGPTL4 et ANGPTL6 (données non présentées). En effet, l'analyse des haplotypes peut non seulement révéler des associations qui sont indétectables dans les analyses des polymorphismes considérés individuellement, mais peut aussi parfois aider à comprendre les associations observées [Schaid 2004]. Cependant, dans nos études, les analyses haplotypiques n'ont pas apporté d'informations supplémentaires et c'est pourquoi nous ne les avons pas présentées.

Excepté pour le gène *FTO*, la variabilité génétique des gènes que j'ai étudiés a été analysée en totalité. Pour cela, je me suis basée sur les données disponibles du NCBI et de HapMap, et quand cela fut possible, nous avons également séquencé le gène (c'est le cas pour LXR β). En effet, le séquençage reste le meilleur moyen pour identifier tous les polymorphismes d'un gène. La banque de données dbSNP du NCBI est très dense mais comprend malheureusement de nombreux SNPs qui ne sont pas validés et qui ne sont que des erreurs de séquençage. En effet, je me suis basée entièrement sur cette base de données pour l'étude du gène *ANGPTL6* – parce qu'à l'époque la base de données HapMap n'était pas encore disponible – et 9 SNPs seulement sur les 17 qui étaient décrits ont pu être détectés dans un échantillon de 100 individus. La banque de données HapMap est très riche et présente notamment l'avantage d'inclure des informations sur le DL entre les polymorphismes mais elle n'inclue pas tous les polymorphismes. En effet, si l'on recherche les polymorphismes du gène codant LXR β dans la dernière base de HapMap (*release 27*, février 2009), aucune information n'est disponible pour les SNPs rs56151148 (associé au taux plasmatique de TG dans l'étude HUNT) et rs2303044 (associé à l'IMC dans l'étude HELENA). De même pour le gène *ANGPTL6*, aucune donnée n'est disponible pour le SNP rs6511435 (potentiellement associé à l'insulinorésistance). La base de données HapMap est donc un outil précieux pour les études génétiques mais reste encore insuffisante aujourd'hui pour réaliser des études approfondies.

III. Les études génétiques des maladies métaboliques

Les études d'épidémiologie génétique ont émergé il y a 20 ans avec l'apparition de la PCR. Elles ont d'abord connu un certain succès grâce à l'identification de nombreux gènes comme facteurs de susceptibilité aux diverses maladies communes étudiées. Grâce au séquençage entier du génome humain, ces études ont été de plus en plus approfondies,

évoluant depuis les études d'un seul polymorphisme pour un gène jusqu'à l'établissement des cartes de déséquilibre de liaison permettant de capturer toute l'information génétique d'un gène tout en réduisant le nombre de polymorphismes à génotyper. Cependant, la multiplication des associations non répliquées et même de résultats contradictoires remet en question la validité de ces études. Les exigences de publication ont alors évolué, nécessitant des effectifs toujours plus grands (pour éviter les faux positifs), la réplication des résultats dans des échantillons indépendants et des études fonctionnelles des polymorphismes associés.

Les GWAS sont une véritable révolution pour les études génétiques et ont ravivé l'optimisme des années 90. Durant ces 2 dernières années, elles ont permis de grandes avancées dans la compréhension des bases génétiques de diverses maladies. Leur approche sans *a priori* offre la possibilité de découvrir de nouveaux gènes et par conséquent, de nouvelles voies physiopathologiques et de nouvelles cibles thérapeutiques. Elles présentent néanmoins des limites. Comme pour les études génétiques classiques (approche gène candidat et études de liaison), des résultats contradictoires peuvent encore apparaître. Cela a été le cas pour le gène *INSIG2* décrit associé à l'IMC dans 5 échantillons indépendants par Herbert *et al* en 2007 [Herbert *et al.* 2006] et qui n'a pu être répliqué dans 3 autres études comprenant 20000 individus [Loos *et al.* 2007; Dina *et al.* 2007b; Roskopf *et al.* 2007]. Il n'est d'ailleurs toujours pas possible aujourd'hui de conclure quant à l'impact de ce gène sur l'IMC au vu du nombre de données incohérentes [Lyon *et al.* 2007; Fox *et al.* 2007]. Une autre limite des GWAS réside en le fait que, même si un très grand nombre de SNPs sont étudiés (500000), toute la variabilité génétique du génome humain n'est pas capturée dans ces études.

L'avenir des GWAS consistera déjà à augmenter les effectifs des échantillons étudiés afin d'identifier de nouveaux déterminants génétiques. En effet, les phénotypes métaboliques sont le résultat d'interactions complexes entre facteurs génétiques et environnementaux, et l'on s'attend à ce que les déterminants génétiques soient nombreux, exerçant chacun un faible impact sur les voies métaboliques. Il est donc nécessaire d'augmenter la puissance statistique afin de révéler les déterminants génétiques pour le moment dissimulés parmi les résultats négatifs. Les études GWA haplotypiques devraient également aider à identifier de nouveaux déterminants génétiques [Tregouet *et al.* 2009]. Les GWAS devront aussi s'intéresser aux autres types de polymorphismes (CNV, délétion-insertion) et tenir compte de l'existence possible d'interactions (gène-gène et gène-environnement). Enfin, des études complémentaires seront nécessaires pour affiner le signal, en particulier dans les cas où le *locus* associé au phénotype métabolique n'a pu être attribué à un gène, comme par exemple les *loci* *CDC123-CAMK1D* et *TSPAN8-LGR5* associés au risque de DT2 [Zeggini *et al.*

2008]. Les méthodes d'imputation de polymorphismes basée sur la structure haplotypique et de séquençage d'individus pour les régions d'intérêt devraient permettre d'identifier les polymorphismes (et les gènes) causaux. Dans ce cadre, les études d'association classiques pourront tenir un rôle non négligeable dans l'identification des polymorphismes causaux, à condition qu'elles soient réalisées sur des échantillons de grande taille et bien phénotypés.

Enfin, des études moléculaires et physiologiques seront nécessaires pour explorer les mécanismes responsables des associations observées et les voies métaboliques impliquées. Des études d'expression *genome-wide* à grande échelle ont commencé à voir le jour [Dixon *et al.* 2007; Stranger *et al.* 2007; Goring *et al.* 2007] et d'autres devraient bientôt émerger, permettant ainsi l'identification de polymorphismes influençant le niveau d'expression des gènes. De plus, de nouvelles données sur le génome générées par le projet ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) entre autres, offriront de précieuses informations sur la fonctionnalité des polymorphismes génétiques [Birney *et al.* 2007].

Aucune GWAS sur le syndrome métabolique n'a été publiée à ce jour. Les polémiques au sujet de l'existence du syndrome métabolique et de sa définition ainsi que le nombre de paramètres à prendre en compte sont probablement à l'origine de ce léger retard. Pourtant ces études devraient apporter de précieuses informations sur les bases génétiques du syndrome métabolique. En effet, les approches classiques des études de liaison et de gènes candidats ont montré leurs limites, notamment, au vu du nombre de voies métaboliques impliquées, le nombre de gènes candidats apparaît alors démesuré. Les GWAS devraient permettre d'identifier les déterminants génétiques du syndrome métabolique, mais aussi d'aider à comprendre ses mécanismes physiopathologiques. Il sera notamment intéressant de comparer les résultats obtenus entre différentes définitions du syndrome métabolique car l'identification d'un déterminant génétique commun à toutes les définitions pourrait révéler une voie physiologique commune aux différents désordres métaboliques.

Conclusion

En conclusion, j'ai recherché de nouveaux déterminants génétiques du syndrome métabolique et des phénotypes associés en population. J'ai identifié deux gènes, *LXR α* et *ANGPTL3*, associés au profil lipidique, notamment au taux plasmatique de HDL-cholestérol. J'ai confirmé que des polymorphismes des gènes *FTO* et *LXR β* sont des déterminants génétiques de l'obésité, du DT2 et des phénotypes associés. Deux gènes, *LXR α* et *ANGPTL6*, sont associés au risque de syndrome métabolique, mais ces associations sont dépendantes de la définition du syndrome métabolique utilisée. Une amélioration de la définition du syndrome métabolique est nécessaire pour conclure quant à l'impact réel de ces deux gènes sur le risque de syndrome métabolique. En outre, les mécanismes moléculaires sous-tendant les associations observées en population restent à élucider.

La révolution des GWAS est en marche et devrait permettre d'identifier encore de nouveaux déterminants génétiques des phénotypes métaboliques et d'ouvrir des portes sur de nouvelles voies métaboliques. Elles permettront peut-être de mieux comprendre la physiopathologie du syndrome métabolique.

L'intérêt pour la pratique clinique de ces nouvelles connaissances sur la génétique des maladies métaboliques reste malgré tout encore limité. Cependant, ces études devraient permettre dans le futur une meilleure prévention du syndrome métabolique et par conséquent du DT2 et des maladies cardiovasculaires, grâce à une prise en charge précoce, personnalisée et ainsi, mieux adaptée.

Références

Ecological analysis of the association between mortality and major risk factors of cardiovascular disease. The World Health Organization MONICA Project. *Int J Epidemiol.* 1994; **23**: 505-516.

Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care.* 1997; **20**: 1183-1197.

Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA.* 2001; **285**: 2486-2497.

Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002; **106**: 3143-3421.

The International HapMap Project. *Nature.* 2003; **426**: 789-796.

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2007a; **30 Suppl 1**: S42-S47.

Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature.* 2007b; **447**: 661-678.

The prevalence of retinopathy in impaired glucose tolerance and recent-onset diabetes in the Diabetes Prevention Program. *Diabet.Med.* 2007c; **24**: 137-144.

A

Accili D. Lilly lecture 2003: the struggle for mastery in insulin action: from triumvirate to republic. *Diabetes.* 2004; **53**: 1633-1642.

Adighibe O, Arepalli S, Duckworth J, Hardy J, Wavrant-De Vrieze F. Genetic variability at the LXR gene (NR1H2) may contribute to the risk of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2006; **27**: 1431-1434.

Agarwal AK, Giacchetti G, Lavery G, Nikkila H, Palermo M *et al.* CA-Repeat polymorphism in intron 1 of HSD11B2 : effects on gene expression and salt sensitivity. *Hypertension.* 2000; **36**: 187-194.

Aguilar-Salinas CA, Rojas R, Gomez-Perez FJ, Mehta R, Franco A *et al.* The metabolic syndrome: a concept hard to define. *Arch Med Res.* 2005; **36**: 223-231.

Aguilera CM, Gil-Campos M, Canete R, Gil A. Alterations in plasma and tissue lipids associated with obesity and metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond).* 2008; **114**: 183-193.

Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem.* 2000; **275**: 9047-9054.

Ailhaud G. Adipose tissue as a secretory organ: from adipogenesis to the metabolic syndrome. *C R Biol.* 2006; **329**: 570-577.

Akiyama TE, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Peters JM *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta regulates very low density lipoprotein production and catabolism in mice on a Western diet. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 20874-20881.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome--a new worldwide definition. *Lancet.* 2005; **366**: 1059-1062.

Alberti KG, Zimmet PZ. Should we dump the metabolic syndrome? No. *BMJ.* 2008; **336**: 641.

- Alberti S, Schuster G, Parini P, Feltkamp D, Diczfalusy U *et al.* Hepatic cholesterol metabolism and resistance to dietary cholesterol in LXRbeta-deficient mice. *J Clin Invest.* 2001; **107**: 565-573.
- Alberti S, Steffensen KR, Gustafsson JA. Structural characterisation of the mouse nuclear oxysterol receptor genes LXRalpha and LXRbeta. *Gene.* 2000; **243**: 93-103.
- Altmann SW, Davis HR, Jr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM *et al.* Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004; **20;303**: 1201-1204.
- Altshuler D, Hirschhorn JN, Klannemark M, Lindgren CM, Vohl MC *et al.* The common PPARgamma Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 2000; **26**: 76-80.
- Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest.* 1991; **87**: 2246-2252.
- Anderson LM, Choe SE, Yukhananov RY, Hopfner RL, Church GM *et al.* Identification of a novel set of genes regulated by a unique liver X receptor-alpha -mediated transcription mechanism. *J Biol Chem.* 2003; **278** : 15252-15260.
- Ando Y, Shimizugawa T, Takeshita S, Ono M, Shimamura M *et al.* A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Lipid Res.* 2003; **44**: 1216-1223.
- Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G *et al.* A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994; **14**: 7025-7035.
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys.Res Commun.* 1999; **257**: 79-83.
- Arya R, Blangero J, Williams K, Almasy L, Dyer TD *et al.* Factors of insulin resistance syndrome--related phenotypes are linked to genetic locations on chromosomes 6 and 7 in nondiabetic mexican-americans. *Diabetes.* 2002; **51**: 841-847.
- Assmann G, Guerra R, Fox G, Cullen P, Schulte H *et al.* Harmonizing the definition of the metabolic syndrome: comparison of the criteria of the Adult Treatment Panel III and the International Diabetes Federation in United States American and European populations. *Am J Cardiol.* 2007; **99**: 541-548.
- Assmann G, von Eckardstein A, Funke H. High density lipoproteins, reverse transport of cholesterol, and coronary artery disease. Insights from mutations . *Circulation.* 1993; **87**: III28-III34.
- Athyros VG, Ganotakis ES, Bathianaki M, Monedas I, Goudevenos IA *et al.* Awareness, treatment and control of the metabolic syndrome and its components: a multicentre Greek study. *Hellenic.J Cardiol.* 2005; **46**: 380-386.
- Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V *et al.* Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients. *Diabetes.* 1997; **46**: 1319-1327.
- Aulchenko YS, Ripatti S, Lindqvist I, Boomsma D, Heid IM *et al.* Loci influencing lipid levels and coronary heart disease risk in 16 European population cohorts. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 47-55.
- Austin MA, McKnight B, Edwards KL, Bradley CM, McNeely MJ *et al.* Cardiovascular disease mortality in familial forms of hypertriglyceridemia: A 20-year prospective study. *Circulation.* 2000; **20;101**: 2777-2782.
- Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. *Mol Cell Biochem.* 1998; **182**: 31-48.

B

- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 2004; **101**: 15718-15723.
- Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2007; **104**: 979-984.
- Badman MK, Flier JS. The gut and energy balance: visceral allies in the obesity wars. *Science.* 2005; **307**: 1909-1914.
- Bahia L, Aguiar LG, Villela N, Bottino D, Godoy-Matos AF *et al.* Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics.(Sao Paulo).* 2006; **61**: 433-440.
- Balkau B, Charles MA. Comment on the provisional report from the WHO consultation. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *Diabet.Med.* 1999; **16**: 442-443.
- Balkau B, Charles MA, Drivsholm T, Borch-Johnsen K, Wareham N *et al.* Frequency of the WHO metabolic syndrome in European cohorts, and an alternative definition of an insulin resistance syndrome. *Diabetes Metab.* 2002; **28**: 364-376.
- Balkau B, Valensi P, Eschwege E, Slama G. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* 2007; **33**: 405-413.
- Balkau B, Vernay M, Mhamdi L, Novak M, Arondel D *et al.* The incidence and persistence of the NCEP (National Cholesterol Education Program) metabolic syndrome. The French D.E.S.I.R. study. *Diabetes Metab.* 2003; **29**: 526-532.
- Balon TW, Nadler JL. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl.Physiol.* 1997; **82**: 359-363.
- Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM *et al.* Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA.* 2007; **298**: 309-316.
- Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol.* 2008; **59 Suppl 7**: 31-55.
- Barroso I, Gurnell M, Crowley VE, Agostini M, Schwabe JW *et al.* Dominant negative mutations in human PPARgamma associated with severe insulin resistance, diabetes mellitus and hypertension. *Nature.* 1999; **402**: 880-883.
- Barter PJ, Rye KA. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern.Med.* 2006; **259**: 447-454.
- Bataille V, Perret B, Dallongeville J, Arveiler D, Yarnell J *et al.* Metabolic syndrome and coronary heart disease risk in a population-based study of middle-aged men from France and Northern Ireland. A nested case-control study from the PRIME cohort. *Diabetes Metab.* 2006; **32**: 475-479.
- Beghin L, Castera M, Manios Y, Gilbert CC, Kersting M *et al.* Quality assurance of ethical issues and regulatory aspects relating to good clinical practices in the HELENA Cross-Sectional Study. *Int J Obes (Lond).* 2008; **32 Suppl 5**: S12-S18.
- Bennet AM, Di Angelantonio E, Ye Z, Wensley F, Dahlin A *et al.* Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA.* 2007; **19;298**: 1300-1311.
- Bergman RN, Kim SP, Hsu IR, Catalano KJ, Chiu JD *et al.* Abdominal obesity: role in the pathophysiology of metabolic disease and cardiovascular risk. *Am J Med.* 2007; **120**: S3-S8.

- Bergsma DJ, Ellis C, Kumar C, Nuthulaganti P, Kersten H *et al.* Cloning and characterization of a human angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys. Res Commun.* 1992; **183**: 989-995.
- Bernal-Mizrachi C, Weng S, Li B, Nolte LA, Feng C *et al.* Respiratory uncoupling lowers blood pressure through a leptin-dependent mechanism in genetically obese mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; **22**: 961-968.
- Beyer TP, Schmidt RJ, Foxworthy P, Zhang Y, Dai J *et al.* Coadministration of a liver X receptor agonist and a peroxisome proliferator activator receptor- α agonist in Mice: effects of nuclear receptor interplay on high-density lipoprotein and triglyceride metabolism in vivo. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 2004; **309**: 861-868.
- Binder A. A review of the genetics of essential hypertension. *Curr. Opin. Cardiol.* 2007; **22**: 176-184.
- Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR *et al.* Identification and analysis of functional elements in 1 of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 2007; **447**: 799-816.
- Bjorntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis.* 1990; **10**: 493-496.
- Bjorntorp P. Metabolic implications of body fat distribution. *Diabetes Care.* 1991; **14**: 1132-1143.
- Bjorntorp P. Abdominal obesity and the metabolic syndrome. *Ann Med.* 1992; **24**: 465-468.
- Blacker D, Bertram L, Saunders AJ, Moscarillo TJ, Albert MS *et al.* Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet.* 2003; **12**: 23-32.
- Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. *BMJ.* 1995; **310**: 170.
- Blaschke F, Leppanen O, Takata Y, Caglayan E, Liu J *et al.* Liver X receptor agonists suppress vascular smooth muscle cell proliferation and inhibit neointima formation in balloon-injured rat carotid arteries. *Circ. Res.* 2004; **95**: e110-e123.
- Bo S, Gentile L, Ciccone G, Baldi C, Benini L *et al.* The metabolic syndrome and high C-reactive protein: prevalence and differences by sex in a southern-European population-based cohort. *Diabetes Metab Res Rev.* 2005; **21**: 515-524.
- Boden G, Chen X, Ruiz J, White JV, Rossetti L. Mechanisms of fatty acid-induced inhibition of glucose uptake. *J Clin Invest.* 1994; **93**: 2438-2446.
- Boissel S, Reish O, Proulx K, Kawagoe-Takaki H, Sedgwick B *et al.* Loss-of-Function Mutation in the Dioxygenase-Encoding FTO Gene Causes Severe Growth Retardation and Multiple Malformations. *Am J Hum Genet.* 2009.
- Bokor S, Frelut ML, Vania A, Hadjiathanasiou CG, Anastasakou M *et al.* Prevalence of metabolic syndrome in European obese children. *Int J Pediatr. Obes.* 2008; **3 Suppl 2**: 3-8.
- Bonora E, Capaldo B, Perin PC, Del Prato S, De Mattia G *et al.* Hyperinsulinemia and insulin resistance are independently associated with plasma lipids, uric acid and blood pressure in non-diabetic subjects. The GISIR database. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2008; **18**: 624-631.
- Bonora E, Targher G, Formentini G, Calcaterra F, Lombardi S *et al.* The Metabolic Syndrome is an independent predictor of cardiovascular disease in Type 2 diabetic subjects. Prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabet. Med.* 2004; **21**: 52-58.
- Boronat M, Chirino R, Varillas VF, Saavedra P, Marrero D *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome in the island of Gran Canaria: comparison of three major diagnostic proposals. *Diabet. Med.* 2005; **22**: 1751-1756.

Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C, Sparso T, Holmkvist J *et al.* A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 89-94.

Bouatia-Naji N, Rocheleau G, Van Lommel L, Lemaire K, Schuit F *et al.* A polymorphism within the G6PC2 gene is associated with fasting plasma glucose levels. *Science.* 2008; **320**: 1085-1088.

Bradley MN, Hong C, Chen M, Joseph SB, Wilpitz DC *et al.* Ligand activation of LXR beta reverses atherosclerosis and cellular cholesterol overload in mice lacking LXR alpha and apoE. *J Clin Invest.* 2007; **117**: 2337-2346.

Brand E, Schorr U, Kunz I, Kertmen E, Ringel J *et al.* Tumor necrosis factor-alpha--308 G/A polymorphism in obese Caucasians. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001; **25**: 581-585.

Brasaemle DL, Rubin B, Harten IA, Gruia-Gray J, Kimmel AR *et al.* Perilipin A increases triacylglycerol storage by decreasing the rate of triacylglycerol hydrolysis. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 38486-38493.

Broedl UC, Lehrke M, Fleischer-Briellmaier E, Tietz AB, Nagel JM *et al.* Genetic variants of adiponectin receptor 2 are associated with increased adiponectin levels and decreased triglyceride/VLDL levels in patients with metabolic syndrome. *Cardiovasc Diabetol.* 2006; **5**: 11.

Brooks-Wilson A, Marcil M, Clee SM, Zhang LH, Roomp K *et al.* Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency. *Nat.Genet.* 1999; **22**: 336-345.

Brown J, III, Theisler C, Silberman S, Magnuson D, Gottardi-Littell N *et al.* Differential expression of cholesterol hydroxylases in Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 34674-34681.

Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 1986; **232**: 34-47.

Brunner EJ, Marmot MG, Nanchahal K, Shipley MJ, Stansfeld SA *et al.* Social inequality in coronary risk: central obesity and the metabolic syndrome. Evidence from the Whitehall II study. *Diabetologia.* 1997; **40** : 1341-1349.

Bultel S, Helin L, Clavey V, Chinetti-Gbaguidi G, Rigamonti E *et al.* Liver X receptor activation induces the uptake of cholesteryl esters from high density lipoproteins in primary human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; **28**: 2288-2295.

C

Camenisch G, Pisabarro MT, Sherman D, Kowalski J, Nagel M *et al.* ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha vbeta 3 and induces blood vessel formation in vivo. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 17281-17290.

Cameron AJ, Shaw JE, Zimmet PZ. The metabolic syndrome: prevalence in worldwide populations. *Endocrinol.Metab Clin North Am.* 2004; **33**: 351-75, table.

Campese VM. Salt sensitivity in hypertension. Renal and cardiovascular implications. *Hypertension.* 1994; **23**: 531-550.

Cannon B, Nedergaard J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev.* 2004; **84**: 277-359.

Cao G, Beyer TP, Yang XP, Schmidt RJ, Zhang Y *et al.* Phospholipid transfer protein is regulated by liver X receptors in vivo. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 39561-39565.

Cao G, Liang Y, Broderick CL, Oldham BA, Beyer TP *et al.* Antidiabetic action of a liver x receptor agonist mediated by inhibition of hepatic gluconeogenesis. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 1131-1136.

- Carey DG, Jenkins AB, Campbell LV, Freund J, Chisholm DJ. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: Direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes*. 1996; **45**: 633-638.
- Carmelli D, Cardon LR, Fabsitz R. Clustering of hypertension, diabetes, and obesity in adult male twins: same genes or same environments? *Am J Hum Genet*. 1994; **55**: 566-573.
- Carr MC. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol.Metab*. 2003; **88**: 2404-2411.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M *et al*. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 2005; **21**: 2933-2942.
- Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 10443-10449.
- Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M *et al*. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N.Engl.J Med*. 1994; **330**: 1629-1633.
- Cazes A, Galaup A, Chomel C, Bignon M, Brechot N *et al*. Extracellular matrix-bound angiotensin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ.Res*. 2006; **99**: 1207-1215.
- Cha JY, Repa JJ. The liver X receptor (LXR) and hepatic lipogenesis. The carbohydrate-response element-binding protein is a target gene of LXR. *J Biol Chem*. 2007; **282**: 743-751.
- Chakravarty K, Hanson RW. Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase-c gene transcription: the role of sterol regulatory element-binding protein 1c.
- Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y *et al*. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001; **7**: 161-171.
- Chen G, Liang G, Ou J, Goldstein JL, Brown MS. Central role for liver X receptor in insulin-mediated activation of Srebp-1c transcription and stimulation of fatty acid synthesis in liver. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A*. 2004; **101**: 11245-11250.
- Chen W, Srinivasan SR, Elkasabany A, Berenson GS. The association of cardiovascular risk factor clustering related to insulin resistance syndrome (Syndrome X) between young parents and their offspring: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis*. 1999a; **145**: 197-205.
- Chen WM, Erdos MR, Jackson AU, Saxena R, Sanna S *et al*. Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. *J Clin Invest*. 2008; **118**: 2620-2628.
- Chen X, Iqbal N, Boden G. The effects of free fatty acids on gluconeogenesis and glycogenolysis in normal subjects. *J Clin Invest*. 1999b; **103**: 365-372.
- Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. Regulation of cholesterol 7alpha-hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXRalpha). *Gene*. 2001; **262**: 257-265.
- Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B *et al*. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nat.Med*. 2001; **7**: 53-58.
- Cho JY, Akbarali Y, Zerbini LF, Gu X, Boltax J *et al*. Isoforms of the Ets transcription factor NERF/ELF-2 physically interact with AML1 and mediate opposing effects on AML1-mediated transcription of the B cell-specific blk gene. *J Biol Chem*. 2004; **279**: 19512-19522.

- Choe SS, Choi AH, Lee JW, Kim KH, Chung JJ *et al.* Chronic activation of liver X receptor induces beta-cell apoptosis through hyperactivation of lipogenesis: liver X receptor-mediated lipotoxicity in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2007; **56**: 1534-1543.
- Chu K, Miyazaki M, Man WC, Ntambi JM. Stearoyl-coenzyme A desaturase 1 deficiency protects against hypertriglyceridemia and increases plasma high-density lipoprotein cholesterol induced by liver X receptor activation. *Mol Cell Biol*. 2006; **26**: 6786-6798.
- Clayton D, McKeigue PM. Epidemiological methods for studying genes and environmental factors in complex diseases. *Lancet*. 2001; **20**; **358**: 1356-1360.
- Coe NR, Simpson MA, Bernlohr DA. Targeted disruption of the adipocyte lipid-binding protein (aP2 protein) gene impairs fat cell lipolysis and increases cellular fatty acid levels. *J Lipid Res*. 1999; **40**: 967-972.
- Cohen J, Pertsemlidis A, Kotowski IK, Graham R, Garcia CK *et al.* Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat.Genet*. 2005; **37**: 161-165.
- Cohen JC, Kiss RS, Pertsemlidis A, Marcel YL, McPherson R *et al.* Multiple rare alleles contribute to low plasma levels of HDL cholesterol. *Science*. 2004; **305**: 869-872.
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ*. 2000; **320**: 1240-1243.
- Coll AP, Farooqi IS, Challis BG, Yeo GS, O'Rahilly S . Proopiomelanocortin and energy balance: insights from human and murine genetics. *J Clin Endocrinol.Metab*. 2004; **89**: 2557-2562.
- Collins JL, Fivush AM, Watson MA, Galardi CM, Lewis MC *et al.* Identification of a nonsteroidal liver X receptor agonist through parallel array synthesis of tertiary amines. *J Med Chem*. 2002; **45**: 1963-1966.
- Commerford SR, Vargas L, Dorfman SE, Mitro N, Rocheford EC *et al.* Dissection of the insulin-sensitizing effect of liver X receptor ligands. *Mol Endocrinol*. 2007; **21**: 3002-3012.
- Cone RD. The Central Melanocortin System and Energy Homeostasis. *Trends Endocrinol.Metab*. 1999; **10**: 211-216.
- Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat.Neurosci*. 2005; **8**: 571-578.
- Conklin D, Gilbertson D, Taft DW, Maurer MF, Whitmore TE *et al.* Identification of a mammalian angiotensin-related protein expressed specifically in liver. *Genomics*. 1999; **62**: 477-482.
- Cook S, Auinger P, Li C, Ford ES. Metabolic syndrome rates in United States adolescents, from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *J Pediatr*. 2008; **152**: 165-170.
- Cook S, Weitzman M, Auinger P, Nguyen M, Dietz WH. Prevalence of a metabolic syndrome phenotype in adolescents: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Pediatr.Adolesc.Med*. 2003; **157**: 821-827.
- Corona G, Mannucci E, Petrone L, Balercia G, Paggi F *et al.* NCEP-ATPIII-defined metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and prevalence of hypogonadism in male patients with sexual dysfunction. *J Sex Med*. 2007; **4**: 1038-1045.
- Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor . *J Biol Chem*. 2000; **275**: 28240-28245.
- Cotsapas C, Speliotes EK, Hatoum IJ, Greenawalt DM, Dobrin R *et al.* Common BMI-associated variants confer risk of extreme obesity. *Hum Mol Genet*. 2009.

Cottam DR, Mattar SG, Barinas-Mitchell E, Eid G, Kuller L *et al.* The chronic inflammatory hypothesis for the morbidity associated with morbid obesity: implications and effects of weight loss. *Obes Surg.* 2004; **14**: 589-600.

Coviello AD, Legro RS, Dunaif A. Adolescent girls with polycystic ovary syndrome have an increased risk of the metabolic syndrome associated with increasing androgen levels independent of obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2006; **91**: 492-497.

Cowey S, Hardy RW. The metabolic syndrome: A high-risk state for cancer? *Am J Pathol.* 2006; **169**: 1505-1522.

Cowley AW, Jr. Long-term control of arterial blood pressure. *Physiol Rev.* 1992; **72**: 231-300.

Cowley AW, Jr. The genetic dissection of essential hypertension. *Nat.Rev Genet.* 2006; **7**: 829-840.

Cozzone D, Debard C, Dif N, Ricard N, Disse E *et al.* Activation of liver X receptors promotes lipid accumulation but does not alter insulin action in human skeletal muscle cells . *Diabetologia.* 2006; **49**: 990-999.

Csaszar A, Kekes E, Abel T, Papp R, Kiss I *et al.* Prevalence of metabolic syndrome estimated by International Diabetes Federation criteria in a Hungarian population. *Blood Press.* 2006; **15**: 101-106.

Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D *et al.* Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N.Engl.J Med.* 2009; **360**: 1509-1517.

D

Dahlman I, Nilsson M, Gu HF, Lecoecur C, Efendic S *et al.* Functional and genetic analysis in type 2 diabetes of liver X receptor alleles--a cohort study. *BMC Med Genet.* 2009; **10**: 27.

Dahlman I, Nilsson M, Jiao H, Hoffstedt J, Lindgren CM *et al.* Liver X receptor gene polymorphisms and adipose tissue expression levels in obesity. *Pharmacogenet Genomics.* 2006; **16**: 881-889.

Dalen KT, Ulven SM, Bamberg K, Gustafsson JA, Nebb HI. Expression of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 in adipocytes is dependent on liver X receptor alpha. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 48283-48291.

Dallongeville J, Cottel D, Arveiler D, Tauber JP, Bingham A *et al.* The association of metabolic disorders with the metabolic syndrome is different in men and women. *Ann Nutr Metab.* 2004; **48**: 43-50.

Dallongeville J, Cottel D, Ferrieres J, Arveiler D, Bingham A *et al.* Household income is associated with the risk of metabolic syndrome in a sex-specific manner. *Diabetes Care.* 2005a; **28**: 409-415.

Dallongeville J, Cottel D, Wagner A, Ducimetiere P, Ruidavets JB *et al.* The APOA5 Trp19 allele is associated with metabolic syndrome via its association with plasma triglycerides. *BMC Med Genet.* 2008; **9**: 84.

Dallongeville J, Delcroix AG, Wagner A, Ducimetière P, Ruidavets JB *et al.* The APOA4 Thr347->Ser347 polymorphism is not a major risk factor of obesity. *Obes.Res.* 2005b; **13**: 2132-2138.

Dallongeville J, Helbecque N, Cottel D, Amouyel P, Meirhaeghe A. The Gly16-->Arg16 and Gln27-->Glu27 polymorphisms of beta2-adrenergic receptor are associated with metabolic syndrome in men. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2003; **88**: 4862-4866.

Dalziel B, Gosby AK, Richman RM, Bryson JM, Caterson ID. Association of the TNF-alpha -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obes Res.* 2002; **10**: 401-407.

- Damcott CM, Ott SH, Pollin TI, Reinhart LJ, Wang J *et al.* Genetic variation in adiponectin receptor 1 and adiponectin receptor 2 is associated with type 2 diabetes in the Old Order Amish. *Diabetes*. 2005; **54**: 2245-2250.
- Darimont C, Avanti O, Zbinden I, Leone-Vautravers P, Mansourian R *et al.* Liver X receptor preferentially activates de novo lipogenesis in human preadipocytes. *Biochimie*. 2006; **88**: 309-318.
- Darmon N, Briand A, Drewnowski A. Energy-dense diets are associated with lower diet costs: a community study of French adults. *Public Health Nutr*. 2004; **7**: 21-27.
- Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996; **87**: 1161-1169.
- de Ferranti SD, Gauvreau K, Ludwig DS, Neufeld EJ, Newburger JW *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome in American adolescents: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2004; **19;110**: 2494-2497.
- Dedoussis GV. Apolipoprotein polymorphisms and familial hypercholesterolemia. *Pharmacogenomics*. 2007; **8**: 1179-1189.
- Deepa R, Velmurugan K, Arvind K, Sivaram P, Sientay C *et al.* Serum levels of interleukin 6, C-reactive protein, vascular cell adhesion molecule 1, and monocyte chemoattractant protein 1 in relation to insulin resistance and glucose intolerance--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES). *Metabolism*. 2006; **55**: 1232-1238.
- DeFronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest*. 1975; **55**: 845-855.
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol*. 1979; **237**: E214-E223.
- Dekker JM, Girman C, Rhodes T, Nijpels G, Stehouwer CD *et al.* Metabolic syndrome and 10-year cardiovascular disease risk in the Hoorn Study. *Circulation*. 2005; **112**: 666-673.
- deLemos AS, Wolfe ML, Long CJ, Sivapackianathan R, Rader DJ. Identification of genetic variants in endothelial lipase in persons with elevated high-density lipoprotein cholesterol. *Circulation*. 2002; **106**: 1321-1326.
- Denechaud PD, Bossard P, Lobaccaro JM, Millatt L, Staels B *et al.* ChREBP, but not LXRs, is required for the induction of glucose-regulated genes in mouse liver. *J Clin Invest*. 2008; **118**: 956-964.
- Desai U, Lee EC, Chung K, Gao C, Gay J *et al.* Lipid-lowering effects of anti-angiopoietin-like 4 antibody recapitulate the lipid phenotype found in angiopoietin-like 4 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2007; **104**: 11766-11771.
- Despres JP. Abdominal obesity as important component of insulin-resistance syndrome. *Nutrition*. 1993; **9**: 452-459.
- Despres JP, Lemieux I, Prud'homme D. Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patients. *BMJ*. 2001; **322**: 716-720.
- Despres JP, Moorjani S, Ferland M, Tremblay A, Lupien PJ *et al.* Adipose tissue distribution and plasma lipoprotein levels in obese women. Importance of intra-abdominal fat. *Arteriosclerosis*. 1989; **9**: 203-210.
- DeWan AT, Arnett DK, Atwood LD, Province MA, Lewis CE *et al.* A genome scan for renal function among hypertensives: the HyperGEN study. *Am J Hum Genet*. 2001; **68**: 136-144.
- Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A *et al.* Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet*. 2007a; **39**: 724-726.

- Dina C, Meyre D, Samson C, Tichet J, Marre M *et al.* Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science*. 2007b; **315**: 187.
- Dixon AL, Liang L, Moffatt MF, Chen W, Heath S *et al.* A genome-wide association study of global gene expression. *Nat.Genet.* 2007; **39**: 1202-1207.
- Do R, Bailey SD, Desbiens K, Belisle A, Montpetit A *et al.* Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 2008; **57**: 1147-1150.
- Doria A, Abumrad NA. Genome-wide associations and metabolic disease: the big revolution. *Curr.Opin.Clin Nutr Metab Care*. 2008; **11**: 363-365.
- Draznin B. Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes*. 2006; **55**: 2392-2397.
- Dresner A, Laurent D, Marcucci M, Griffin ME, Dufour S *et al.* Effects of free fatty acids on glucose transport and IRS-1-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Clin Invest*. 1999; **103**: 253-259.
- Drewnowski A, Specter SE. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. *Am J Clin Nutr*. 2004; **79**: 6-16.
- Druet C, Dabbas M, Baltakse V, Payen C, Jouret B *et al.* Insulin resistance and the metabolic syndrome in obese French children. *Clin Endocrinol.(Oxf)*. 2006; **64**: 672-678.
- Duggirala R, Blangero J, Almasy L, Arya R, Dyer TD *et al.* A major locus for fasting insulin concentrations and insulin resistance on chromosome 6q with strong pleiotropic effects on obesity-related phenotypes in nondiabetic Mexican Americans. *Am J Hum Genet*. 2001; **68**: 1149-1164.
- Dunaif A. Insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil.Steril*. 2006; **86 Suppl 1**: S13-S14.
- Dunajska K, Lwow F, Milewicz A, Jedrzejuk D, Laczanski L *et al.* beta(3)-adrenergic receptor polymorphism and metabolic syndrome in postmenopausal women. *Gynecol.Endocrinol.* 2008; **24**: 133-138.
- Duncan GE. Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose levels among US adolescents: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2002. *Arch Pediatr.Adolesc.Med*. 2006; **160**: 523-528.
- Duncan GE, Li SM, Zhou XH. Prevalence and trends of a metabolic syndrome phenotype among u.s. Adolescents, 1999-2000. *Diabetes Care*. 2004; **27**: 2438-2443.
- Duncan RE, Ahmadian M, Jaworski K, Sarkadi-Nagy E, Sul HS. Regulation of lipolysis in adipocytes. *Annu.Rev Nutr*. 2007; **27**: 79-101.
- Duncan T, Trewick SC, Koivisto P, Bates PA, Lindahl T *et al.* Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2002; **99**: 16660-16665.
- Duval C, Touche V, Tailleux A, Fruchart JC, Fievet C *et al.* Niemann-Pick C1 like 1 gene expression is down-regulated by LXR activators in the intestine. *Biochem Biophys.Res Commun*. 2006; **340**: 1259-1263.

E

- Eberle D, Hegarty B, Bossard P, Ferre P, Foufelle F. SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis. *Biochimie*. 2004; **86**: 839-848.

Ebert T, Bachmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M *et al.* Serum levels of angiopoietin-related growth factor in diabetes mellitus and chronic hemodialysis. *Metabolism*. 2009; **58**: 547-551.

Eckel RH. Mechanisms of the components of the metabolic syndrome that predispose to diabetes and atherosclerotic CVD. *Proc.Nutr Soc.* 2007; **66**: 82-95.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. The metabolic syndrome. *Lancet*. 2005; **365**: 1415-1428.

Edwards KL, Hutter CM, Wan JY, Kim H, Monks SA. Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome: the GENNID study. *Obesity.(Silver.Spring)*. 2008; **16**: 1596-1601.

Efanov AM, Sewing S, Bokvist K, Gromada J. Liver X receptor activation stimulates insulin secretion via modulation of glucose and lipid metabolism in pancreatic beta-cells. *Diabetes*. 2004; **53 Suppl 3**: S75-S78.

Egan BM. Insulin resistance and the sympathetic nervous system. *Curr.Hypertens Rep.* 2003; **5**: 247-254.

Ehrmann DA, Liljenquist DR, Kasza K, Azziz R, Legro RS *et al.* Prevalence and predictors of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2006; **91**: 48-53.

Einhorn D, Reaven GM, Cobin RH, Ford E, Ganda OP *et al.* American College of Endocrinology position statement on the insulin resistance syndrome. *Endocr.Pract.* 2003; **9**: 237-252.

Elias CF, Aschkenasi C, Lee C, Kelly J, Ahima RS *et al.* Leptin differentially regulates NPY and POMC neurons projecting to the lateral hypothalamic area. *Neuron*. 1999; **23**: 775-786.

Elmqvist JK, Elias CF, Saper CB. From lesions to leptin: hypothalamic control of food intake and body weight. *Neuron*. 1999; **22**: 221-232.

F

Fain JN, Garcija-Sainz JA. Adrenergic regulation of adipocyte metabolism. *J Lipid Res.* 1983; **24**: 945-966.

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology*. 2004; **145**: 2273-2282.

Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature*. 1997; **385**: 165-168.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005; **115**: 911-919.

Fantuzzi G, Faggioni R. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc.Biol.* 2000; **68**: 437-446.

Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T *et al.* Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N.Engl.J Med.* 2003; **20;348**: 1085-1095.

Fayos BE, Bartles JR. Regulation of hepatocytic glycoprotein sialylation and sialyltransferases by peroxisome proliferators. *J Biol Chem.* 1994; **269**: 2151-2157.

Fernandez-Real JM, Gutierrez C, Ricart W, Casamitjana R, Fernandez-Castaner M *et al.* The TNF-alpha gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. *Diabetes*. 1997; **46**: 1468-1472.

- Fernandez ML, Ruiz R, Gonzalez MA, Ramirez-Lorca R, Couto C *et al.* Association of NOS3 gene with metabolic syndrome in hypertensive patients. *Thromb Haemost.* 2004; **92**: 413-418.
- Fernando RL, Nettleton D, Southey BR, Dekkers JC, Rothschild MF *et al.* Controlling the proportion of false positives in multiple dependent tests. *Genetics.* 2004; **166**: 611-619.
- Ferrannini E, Buzzigoli G, Bonadonna R, Giorico MA, Oleggini M *et al.* Insulin resistance in essential hypertension. *N.Engl.J Med.* 1987; **317**: 350-357.
- Fink T, Abildtrup L, Fogd K, Abdallah BM, Kassem M *et al.* Induction of adipocyte-like phenotype in human mesenchymal stem cells by hypoxia. *Stem Cells.* 2004; **22**: 1346-1355.
- Finnegan PM, Gleason BL. Combination ACE inhibitors and angiotensin II receptor blockers for hypertension. *Ann Pharmacother.* 2003; **37**: 886-889.
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, Vierkotten J, Peters T *et al.* Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature.* 2009; **458**: 894-898.
- Fisher E, Schulze MB, Stefan N, Haring HU, Doring F *et al.* Association of the FTO rs9939609 Single Nucleotide Polymorphism With C-reactive Protein Levels. *Obesity.(Silver.Spring).* 2008; **465**.
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell.* 2004; **116**: 337-350.
- Florez JC, Burtt N, de Bakker PI, Almgren P, Tuomi T *et al.* Haplotype structure and genotype-phenotype correlations of the sulfonylurea receptor and the islet ATP-sensitive potassium channel gene region. *Diabetes.* 2004; **53**: 1360-1368.
- Florez JC, Manning AK, Dupuis J, McAteer J, Irenze K *et al.* A 100K genome-wide association scan for diabetes and related traits in the Framingham Heart Study: replication and integration with other genome-wide datasets. *Diabetes.* 2007; **56**: 3063-3074.
- Fojo SS, Brewer HB. Hypertriglyceridaemia due to genetic defects in lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *J Intern.Med.* 1992; **231**: 669-677.
- Folsom AR, Peacock JM, Demerath E, Boerwinkle E. Variation in ANGPTL4 and risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Metabolism.* 2008; **57**: 1591-1596.
- Ford ES. Prevalence of the metabolic syndrome defined by the International Diabetes Federation among adults in the U.S. *Diabetes Care.* 2005; **28**: 2745-2749.
- Ford ES, Giles WH. A comparison of the prevalence of the metabolic syndrome using two proposed definitions. *Diabetes Care.* 2003; **26**: 575-581.
- Ford ES, Giles WH, Dietz WH. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *JAMA.* 2002; **287**: 356-359.
- Ford ES, Giles WH, Mokdad AH. Increasing prevalence of the metabolic syndrome among u.s. Adults. *Diabetes Care.* 2004; **27**: 2444-2449.
- Ford ES, Li C. Defining the metabolic syndrome in children and adolescents: will the real definition please stand up? *J Pediatr.* 2008a; **152**: 160-164.
- Ford ES, Li C, Sattar N. Metabolic syndrome and incident diabetes: current state of the evidence. *Diabetes Care.* 2008b; **31**: 1898-1904.
- Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroepfer GJ, Jr., Evans RM. The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 1997; **94**: 10588-10593.

Fox CS, Heard-Costa N, Cupples LA, Dupuis J, Vasan RS *et al.* Genome-wide association to body mass index and waist circumference: the Framingham Heart Study 100K project. *BMC Med Genet.* 2007; **19;8 Suppl 1**: S18.

Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM *et al.* A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; **316**: 889-894.

Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim.Biophys.Acta.* 1986; **876**: 288-293.

Fried SK, Bunkin DA, Greenberg AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol.Metab.* 1998; **83**: 847-850.

Friedman JM. Obesity in the new millennium. *Nature.* 2000; **404**: 632-634.

Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. *Nutr Rev.* 2002; **60**: S1-14.

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J, Muruzabal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. *Am J Physiol Endocrinol.Metab.* 2001; **280**: E827-E847.

Fugier C, Tousaint JJ, Prieur X, Plateroti M, Samarut J *et al.* The lipoprotein lipase inhibitor ANGPTL3 is negatively regulated by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 11553-11559.

Fujiyoshi M, Ohtsuki S, Hori S, Tachikawa M, Terasaki T. 24S-hydroxycholesterol induces cholesterol release from choroid plexus epithelial cells in an apical- and apoE isoform-dependent manner concomitantly with the induction of ABCA1 and ABCG1 expression. *J Neurochem.* 2007; **100**: 968-978.

Furihata S, Ito T, Kamatani N. Test of association between haplotypes and phenotypes in case-control studies: examination of validity of the application of an algorithm for samples from cohort or clinical trials to case-control samples using simulated and real data. *Genetics.* 2006; **174**: 1505-1516.

G

Gable DR, Hurel SJ, Humphries SE. Adiponectin and its gene variants as risk factors for insulin resistance, the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2006; **188**: 231-244.

Gale EA. The myth of the metabolic syndrome. *Diabetologia.* 2005; **48**: 1679-1683.

Gale EA. Should we dump the metabolic syndrome? Yes. *BMJ.* 2008; **336**: 640.

Gambineri A, Vicennati V, Genghini S, Tomassoni F, Pagotto U *et al.* Genetic variation in 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 predicts adrenal hyperandrogenism among lean women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2006; **91**: 2295-2302.

Gami AS, Witt BJ, Howard DE, Erwin PJ, Gami LA *et al.* Metabolic syndrome and risk of incident cardiovascular events and death: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *J Am Coll.Cardiol.* 2007; **49**: 403-414.

Gaspar J, Thai S, Volland C, Dube A, Libermann TA *et al.* Opposing functions of the Ets factors NERF and ELF-1 during chicken blood vessel development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; **22**: 1106-1112.

- Gauthier A, Lau P, Zha X, Milne R, McPherson R. Cholesteryl ester transfer protein directly mediates selective uptake of high density lipoprotein cholesteryl esters by the liver. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; **25**: 2177-2184.
- Ge H, Cha JY, Gopal H, Harp C, Yu X *et al.* Differential regulation and properties of angiopoietin-like proteins 3 and 4. *J Lipid Res.* 2005; **46**: 1484-1490.
- Ge H, Yang G, Huang L, Motola DL, Pourbahrami T *et al.* Oligomerization and regulated proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 2038-2045.
- Genest JJ, Jr., Martin-Munley SS, McNamara JR, Ordovas JM, Jenner J *et al.* Familial lipoprotein disorders in patients with premature coronary artery disease. *Circulation.* 1992; **85**: 2025-2033.
- Gerin I, Dolinsky VW, Shackman JG, Kennedy RT, Chiang SH *et al.* LXRbeta is required for adipocyte growth, glucose homeostasis, and beta cell function. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 23024-23031.
- Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V *et al.* The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science.* 2007; **318**: 1469-1472.
- Gerstmayer B, Kusters D, Gebel S, Muller T, Van Miert E *et al.* Identification of RELMgamma, a novel resistin-like molecule with a distinct expression pattern. *Genomics.* 2003; **81**: 588-595.
- Gibbons GF. From gallstones to genes: two hundred years of sterol research. A tribute to George J. Schroepfer Jr. *Lipids.* 2002; **37**: 1153-1162.
- Ginsberg HN. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J Clin Invest.* 2000; **106**: 453-458.
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res.* 2005; **36**: 232-240.
- Giudicelli H, Combes-Pastre N, Boyer J. Lipolytic activity of adipose tissue. IV. The diacylglycerol lipase activity of human adipose tissue. *Biochim.Biophys.Acta.* 1974; **369**: 25-33.
- Glass CK, Rosenfeld MG. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 2000; **14**: 121-141.
- Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ *et al.* Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N.Engl.J Med.* 2004; **350**: 1838-1849.
- Gloyn AL, Weedon MN, Owen KR, Turner MJ, Knight BA *et al.* Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003; **52**: 568-572.
- Gluckman PD. Evolving a definition of disease. *Arch Dis.Child.* 2007; **92**: 1053-1054.
- Glund S, Krook A. Role of interleukin-6 signalling in glucose and lipid metabolism. *Acta Physiol (Oxf).* 2008; **192**: 37-48.
- Goldfine ID, Maddux BA, Youngren JF, Reaven G, Accili D *et al.* The role of membrane glycoprotein plasma cell antigen 1/ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 in the pathogenesis of insulin resistance and related abnormalities. *Endocr.Rev.* 2008; **29**: 62-75.
- Gonzalez-Baro MR, Lewin TM, Coleman RA. Regulation of Triglyceride Metabolism. II. Function of mitochondrial GPAT1 in the regulation of triacylglycerol biosynthesis and insulin action. *Am J Physiol Gastrointest.Liver Physiol.* 2007; **292**: G1195-G1199.

- Gonzalez-Gross M, Breidenassel C, Gomez-Martinez S, Ferrari M, Beghin L *et al.* Sampling and processing of fresh blood samples within a European multicenter nutritional study: evaluation of biomarker stability during transport and storage. *Int J Obes (Lond)*. 2008; **32 Suppl 5**: S66-S75.
- Gonzalez-Sanchez JL, Martinez-Larrad MT, Saez ME, Zabena C, Martinez-Calatrava MJ *et al.* Endothelial nitric oxide synthase haplotypes are associated with features of metabolic syndrome. *Clin Chem*. 2007; **53**: 91-97.
- Gonzalez AS, Guerrero DB, Soto MB, Diaz SP, Martinez-Olmos M *et al.* Metabolic syndrome, insulin resistance and the inflammation markers C-reactive protein and ferritin. *Eur J Clin Nutr*. 2006; **60**: 802-809.
- Goodfriend TL, Elliott ME, Catt KJ. Angiotensin receptors and their antagonists. *N.Engl.J Med*. 1996; **20;334**: 1649-1654.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP *et al.* High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies. *Circulation*. 1989; **79**: 8-15.
- Goring HH, Curran JE, Johnson MP, Dyer TD, Charlesworth J *et al.* Discovery of expression QTLs using large-scale transcriptional profiling in human lymphocytes. *Nat.Genet*. 2007; **39**: 1208-1216.
- Gradman AH, Schmieder RE, Lins RL, Nussberger J, Chiang Y *et al.* Aliskiren, a novel orally effective renin inhibitor, provides dose-dependent antihypertensive efficacy and placebo-like tolerability in hypertensive patients. *Circulation*. 2005; **111**: 1012-1018.
- Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, Kolz M, Heid IM *et al.* APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians. *J Lipid Res*. 2007; **48**: 2614-2621.
- Grant SF, Li M, Bradfield JP, Kim CE, Annaiah K *et al.* Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PLoS.ONE* 2008; **3**: e1746.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A *et al.* Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet*. 2006; **38**: 320-323.
- Greenberg AS, Egan JJ, Wek SA, Garty NB, Blanchette-Mackie EJ *et al.* Perilipin, a major hormonally regulated adipocyte-specific phosphoprotein associated with the periphery of lipid storage droplets. *J Biol Chem*. 1991; **266**: 11341-11346.
- Greenland S. Basic problems in interaction assessment. *Environ.Health Perspect*. 1993; **101 Suppl 4**: 59-66.
- Grefhorst A, Elzinga BM, Voshol PJ, Plosch T, Kok T *et al.* Stimulation of lipogenesis by pharmacological activation of the liver X receptor leads to production of large, triglyceride-rich very low density lipoprotein particles. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 34182-34190.
- Grefhorst A, van Dijk TH, Hammer A, van der Sluijs FH, Havinga R *et al.* Differential effects of pharmacological liver X receptor activation on hepatic and peripheral insulin sensitivity in lean and ob/ob mice. *Am J Physiol Endocrinol.Metab*. 2005; **289**: E829-E838.
- Gregg EW, Cadwell BL, Cheng YJ, Cowie CC, Williams DE *et al.* Trends in the prevalence and ratio of diagnosed to undiagnosed diabetes according to obesity levels in the U.S. *Diabetes Care*. 2004; **27**: 2806-2812.
- Grekin RJ, Vollmer AP, Sider RS. Pressor effects of portal venous oleate infusion. A proposed mechanism for obesity hypertension. *Hypertension*. 1995; **26**: 193-198.

Grempler R, Gunther S, Steffensen KR, Nilsson M, Barthel A *et al.* Evidence for an indirect transcriptional regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by liver X receptors. *Biochem Biophys. Res Commun.* 2005; **338**: 981-986.

Grundy SM. Does the metabolic syndrome exist? *Diabetes Care.* 2006a; **29**: 1689-1692.

Grundy SM. Metabolic syndrome: connecting and reconciling cardiovascular and diabetes worlds. *J Am Coll. Cardiol.* 2006b; **47**: 1093-1100.

Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008a; **28**: 629-636.

Grundy SM. Promise of low-density lipoprotein-lowering therapy for primary and secondary prevention. *Circulation.* 2008b; **117**: 569-573.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH *et al.* Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation.* 2005; **112**: 2735-2752.

Gu CC, Chang YP, Hunt SC, Schwander K, Arnett D *et al.* Haplotype association analysis of AGT variants with hypertension-related traits: the HyperGEN study. *Hum Hered.* 2005; **60**: 164-176.

Gual P, Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation. *Biochimie.* 2005; **87**: 99-109.

Gudmundsson J, Sulem P, Steinthorsdottir V, Bergthorsson JT, Thorleifsson G *et al.* Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. *Nat. Genet.* 2007; **39**: 977-983.

Guendouzi K, Collet X, Perret B, Chap H, Barbaras R. Remnant high density lipoprotein2 particles produced by hepatic lipase display high-affinity binding and increased endocytosis into a human hepatoma cell line (HEPG2). *Biochemistry.* 1998; **20**; **37**: 14974-14980.

Guyton AC. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. *Science.* 1991; **252**: 1813-1816.

Guyton AC, Coleman TG, Granger HJ. Circulation: overall regulation. *Annu. Rev Physiol.* 1972; **34**: 13-46.

Guzman B, Cormand B, Ribases M, Gonzalez-Nunez D, Botey A *et al.* Implication of chromosome 18 in hypertension by sibling pair and association analyses: putative involvement of the RKHD2 gene. *Hypertension.* 2006; **48**: 883-891.

H

Haffner SM, Miettinen H, Gaskill SP, Stern MP. Decreased insulin action and insulin secretion predict the development of impaired glucose tolerance. *Diabetologia.* 1996; **39**: 1201-1207.

Hagstromer M, Bergman P, De B, I, Ortega FB, Ruiz JR *et al.* Concurrent validity of a modified version of the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ-A) in European adolescents: The HELENA Study. *Int J Obes (Lond).* 2008; **32 Suppl 5**: S42-S48.

Hajjar I, Kotchen TA. Trends in prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the United States, 1988-2000. *JAMA.* 2003; **290**: 199-206.

Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H *et al.* The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern. Med.* 2005; **143**: 722-728.

- Hamid YH, Rose CS, Urhammer SA, Glumer C, Nolsoe R *et al.* Variations of the interleukin-6 promoter are associated with features of the metabolic syndrome in Caucasian Danes. *Diabetologia*. 2005; **48**: 251-260.
- Hammarstedt A, Sopasakis VR, Gogg S, Jansson PA, Smith U. Improved insulin sensitivity and adipose tissue dysregulation after short-term treatment with pioglitazone in non-diabetic, insulin-resistant subjects. *Diabetologia*. 2005; **48**: 96-104.
- Han TS, van Leer EM, Seidell JC, Lean ME. Waist circumference action levels in the identification of cardiovascular risk factors: prevalence study in a random sample. *BMJ*. 1995; **311**: 1401-1405.
- Hanley AJ, Wagenknecht LE, D'Agostino RB, Jr., Zinman B, Haffner SM. Identification of subjects with insulin resistance and beta-cell dysfunction using alternative definitions of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2003; **52**: 2740-2747.
- Hato T, Tabata M, Oike Y. The role of angiopoietin-like proteins in angiogenesis and metabolism. *Trends Cardiovasc Med*. 2008; **18**: 6-14.
- Hatsuda S, Shoji T, Shinohara K, Kimoto E, Mori K *et al.* Association between plasma angiopoietin-like protein 3 and arterial wall thickness in healthy subjects. *J Vasc Res*. 2007; **44**: 61-66.
- Havel PJ. Control of energy homeostasis and insulin action by adipocyte hormones: leptin, acylation stimulating protein, and adiponectin. *Curr Opin Lipidol*. 2002; **13**: 51-59.
- Heard-Costa NL, Zillikens MC, Monda KL, Johansson A, Harris TB *et al.* NRXN3 is a novel locus for waist circumference: a genome-wide association study from the CHARGE Consortium. *PLoS Genet*. 2009; **5**: e1000539.
- Hegele RA. Monogenic dyslipidemias: window on determinants of plasma lipoprotein metabolism. *Am J Hum Genet*. 2001; **69**: 1161-1177.
- Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications. *Nat Rev Genet*. 2009; **10**: 109-121.
- Hegele RA, Pollex RL. Genetic and physiological insights into the metabolic syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; **289**: R663-R669.
- Helgason A, Palsson S, Thorleifsson G, Grant SF, Emilsson V *et al.* Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet*. 2007; **39**: 218-225.
- Herbert A, Gerry NP, McQueen MB, Heid IM, Pfeufer A *et al.* A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity. *Science*. 2006; **312**: 279-283.
- Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes*. 2001; **50**: 241-247.
- Hillier TA, Rousseau A, Lange C, Lepinay P, Cailleau M *et al.* Practical way to assess metabolic syndrome using a continuous score obtained from principal components analysis. *Diabetologia*. 2006; **49**: 1528-1535.
- Holm C. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans*. 2003; **31**: 1120-1124.
- Holmen, J., Midthjell, K., and Bjartveit, K. The Nord-Trøndelag health survey 1984-86. Purpose, background and methods. Participation, non-participation and frequency. *Verdal, National Institute of public health, Centre of Community Medicine Research*. 1990; **4**.
- Hong Y, Rice T, Gagnon J, Despres JP, Nadeau A *et al.* Familial clustering of insulin and abdominal visceral fat: the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; **83**: 4239-4245.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. 1995; **95**: 2409-2415.

Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor α inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 1994; **91** : 4854-4858.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M *et al.* Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; **20**: 1595-1599.

Hovingh GK, de Groot E, van der SW, Boekholdt SM, Hutten BA *et al.* Inherited disorders of HDL metabolism and atherosclerosis. *Curr.Opin.Lipidol*. 2005; **16**: 139-145.

Hu G, Qiao Q, Tuomilehto J, Balkau B, Borch-Johnsen K *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome and its relation to all-cause and cardiovascular mortality in nondiabetic European men and women. *Arch Intern.Med*. 2004; **164**: 1066-1076.

Hube F, Hauner H. The role of TNF- α in human adipose tissue: prevention of weight gain at the expense of insulin resistance? *Horm.Metab Res*. 1999; **31**: 626-631.

Hummasti S, Laffitte BA, Watson MA, Galardi C, Chao LC *et al.* Liver X receptors are regulators of adipocyte gene expression but not differentiation: identification of apoD as a direct target. *J Lipid Res*. 2004; **45**: 616-625.

Hunter SJ, Garvey WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med*. 1998; **105**: 331-345.

Huuskonen J, Olkkonen VM, Jauhiainen M, Ehnholm C. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on HDL metabolism. *Atherosclerosis*. 2001; **155**: 269-281.

I

Inaba T, Matsuda M, Shimamura M, Takei N, Terasaka N *et al.* Angiopoietin-like protein 3 mediates hypertriglyceridemia induced by the liver X receptor. *J Biol Chem*. 2003; **278**: 21344-21351.

Incardona JP, Roelink H. The role of cholesterol in Shh signaling and teratogen-induced holoprosencephaly. *Cell Mol Life Sci*. 2000; **57**: 1709-1719.

Infante J, Rodriguez-Rodriguez E, Mateo I, Llorca J, Vazquez-Higuera JL *et al.* Gene-gene interaction between heme oxygenase-1 and liver X receptor-beta and Alzheimer's disease risk. *Neurobiol Aging*. 2008.

Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K *et al.* A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat.Genet*. 1998; **20**: 143-148.

Insel PA. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Adrenergic receptors--evolving concepts and clinical implications. *N.Engl.J Med*. 1996; **334**: 580-585.

Invitti C, Maffei C, Gilardini L, Pontiggia B, Mazzilli G *et al.* Metabolic syndrome in obese Caucasian children: prevalence using WHO-derived criteria and association with nontraditional cardiovascular risk factors. *Int J Obes (Lond)*. 2006; **30**: 627-633.

Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata K, Rubin EM *et al.* Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest*. 2003; **111**: 347-355.

Ito Y, Oike Y, Yasunaga K, Hamada K, Miyata K *et al.* Inhibition of angiogenesis and vascular leakiness by angiopoietin-related protein 4. *Cancer Res.* 2003; **63**: 6651-6657.

J

Jamroz-Wisniewska A, Wojcicka G, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part II: non-lipid effects, role in pathology, and therapeutic implications. *Postepy Hig.Med Dosw.(Online.)*. 2007; **61**: 760-785.

Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA *et al.* Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRbeta. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 1999; **96**: 266-271.

Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha. *Nature.* 1996; **383**: 728-731.

Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS *et al.* Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 1992; **71**: 169-180.

Jin W, Millar JS, Broedl U, Glick JM, Rader DJ. Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. *J Clin Invest.* 2003; **111**: 357-362.

Jonas A. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochim.Biophys.Acta.* 2000; **1529**: 245-256.

Jones B, Jones EL, Bonney SA, Patel HN, Mensenkamp AR *et al.* Mutations in a Sar1 GTPase of COPII vesicles are associated with lipid absorption disorders. *Nat.Genet.* 2003; **34**: 29-31.

Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat.Med.* 2003; **9**: 213-219.

Joseph SB, Laffitte BA, Patel PH, Watson MA, Matsukuma KE *et al.* Direct and indirect mechanisms for regulation of fatty acid synthase gene expression by liver X receptors. *J Biol Chem.* 2002a; **277**: 11019-11025.

Joseph SB, McKilligin E, Pei L, Watson MA, Collins AR *et al.* Synthetic LXR ligand inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2002b; **99**: 7604-7609.

Juvel LK, Andresen SM, Schuster GU, Dalen KT, Tobin KA *et al.* On the role of liver X receptors in lipid accumulation in adipocytes. *Mol Endocrinol.* 2003; **17**: 172-182.

K

Kadowaki T, Yamauchi T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr.Rev.* 2005; **26**: 439-451.

Kahn BB, Flier JS. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000; **106**: 473-481.

Kahn R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care.* 2005; **28**: 2289-2304.

Kahn SE, Prigeon RL, Schwartz RS, Fujimoto WY, Knopp RH *et al.* Obesity, body fat distribution, insulin sensitivity and Islet beta-cell function as explanations for metabolic diversity. *J Nutr.* 2001; **131**: 354S-360S.

Kakuma T, Lee Y, Higa M, Wang Z, Pan W *et al.* Leptin, troglitazone, and the expression of sterol regulatory element binding proteins in liver and pancreatic islets. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2000; **97**: 8536-8541.

- Kalaany NY, Gauthier KC, Zavacki AM, Mammen PP, Kitazume T *et al.* LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation. *Cell Metab.* 2005; **1**: 231-244.
- Kalyani RR, Dobs AS. Androgen deficiency, diabetes, and the metabolic syndrome in men. *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* 2007; **14**: 226-234.
- Kaplan NM. The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypertension. *Arch Intern.Med.* 1989; **149**: 1514-1520.
- Kaplan R, Zhang T, Hernandez M, Gan FX, Wright SD *et al.* Regulation of the angiopoietin-like protein 3 gene by LXR. *J Lipid Res.* 2003; **44**: 136-143.
- Karelis AD, Brochu M, Rabasa-Lhoret R. Can we identify metabolically healthy but obese individuals (MHO)? *Diabetes Metab.* 2004; **30**: 569-572.
- Karelis AD, Faraj M, Bastard JP, St Pierre DH, Brochu M *et al.* The metabolically healthy but obese individual presents a favorable inflammation profile. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2005; **90**: 4145-4150.
- Kase ET, Thoresen GH, Westerlund S, Hojlund K, Rustan AC *et al.* Liver X receptor antagonist reduces lipid formation and increases glucose metabolism in myotubes from lean, obese and type 2 diabetic individuals. *Diabetologia.* 2007; **50**: 2171-2180.
- Kase ET, Wensaas AJ, Aas V, Hojlund K, Levin K *et al.* Skeletal muscle lipid accumulation in type 2 diabetes may involve the liver X receptor pathway. *Diabetes.* 2005; **54**: 1108-1115.
- Kathiresan S, Manning AK, Demissie S, D'Agostino RB, Surti A *et al.* A genome-wide association study for blood lipid phenotypes in the Framingham Heart Study. *BMC Med Genet.* 2007; **19;8 Suppl 1**: S17.
- Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP *et al.* Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat.Genet.* 2008; **40**: 189-197.
- Kathiresan S, Willer CJ, Peloso GM, Demissie S, Musunuru K *et al.* Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 56-65.
- Kawamura T, Egusa G, Okubo M, Imazu M, Yamakido M. Association of beta3-adrenergic receptor gene polymorphism with insulin resistance in Japanese-American men. *Metabolism.* 1999; **48**: 1367-1370.
- Kawanami D, Maemura K, Takeda N, Harada T, Nojiri T *et al.* Direct reciprocal effects of resistin and adiponectin on vascular endothelial cells: a new insight into adipocytokine-endothelial cell interactions. *Biochem Biophys.Res Commun.* 2004; **314**: 415-419.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK *et al.* Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005; **365**: 217-223.
- Kehoe P, Wavrant-De Vrieze F, Crook R, Wu WS, Holmans P *et al.* A full genome scan for late onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet.* 1999; **8**: 237-245.
- Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol.Metab.* 2000; **278**: E941-E948.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2004; **89**: 2548-2556.
- Kershaw EE, Hamm JK, Verhagen LA, Peroni O, Katic M *et al.* Adipose triglyceride lipase: function, regulation by insulin, and comparison with adiponutrin. *Diabetes.* 2006; **55**: 148-157.

- Kersten S, Lichtenstein L, Steenbergen E, Mudde K, Hendriks HF *et al.* Caloric restriction and exercise increase plasma ANGPTL4 levels in humans via elevated free fatty acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; **29**: 969-974.
- Kersten S, Mandard S, Tan NS, Escher P, Metzger D *et al.* Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem.* 2000; **275**: 28488-28493.
- Kim-Motoyama H, Yasuda K, Yamaguchi T, Yamada N, Katakura T *et al.* A mutation of the beta 3-adrenergic receptor is associated with visceral obesity but decreased serum triglyceride. *Diabetologia.* 1997; **40**: 469-472.
- Kim C, Xuong NH, Taylor SS. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1alpha) subunits of PKA. *Science.* 2005; **307**: 690-696.
- Kim I, Moon SO, Koh KN, Kim H, Uhm CS *et al.* Molecular cloning, expression, and characterization of angiopoietin-related protein. angiopoietin-related protein induces endothelial cell sprouting. *J Biol Chem.* 1999; **274**: 26523-26528.
- Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, Goldstein M, Broman K *et al.* Quantitative trait loci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2000; **19;97** : 14478-14483.
- Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DJ, Hartz AJ *et al.* Relation of body fat distribution to metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol.Metab.* 1982; **54**: 254-260.
- Kitazawa M, Ohizumi Y, Oike Y, Hishinuma T, Hashimoto S. Angiopoietin-related growth factor suppresses gluconeogenesis through the Akt/forkhead box class O1-dependent pathway in hepatocytes. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 2007; **323**: 787-793.
- Koishi R, Ando Y, Ono M, Shimamura M, Yasumo H *et al.* Angptl3 regulates lipid metabolism in mice . *Nat.Genet.* 2002; **30**: 151-157.
- Koldamova RP, Lefterov IM, Ikonovic MD, Skoko J, Lefterov PI *et al.* 22R-hydroxycholesterol and 9-cis-retinoic acid induce ATP-binding cassette transporter A1 expression and cholesterol efflux in brain cells and decrease amyloid beta secretion. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 13244-13256.
- Koldamova RP, Lefterov IM, Staufienbiel M, Wolfe D, Huang S *et al.* The liver X receptor ligand T0901317 decreases amyloid beta production in vitro and in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Biol Chem.* 2005; **280**: 4079-4088.
- Komurcu-Bayrak E, Onat A, Poda M, Humphries SE, Acharya J *et al.* The S447X variant of lipoprotein lipase gene is associated with metabolic syndrome and lipid levels among Turks. *Clin Chim.Acta.* 2007; **383**: 110-115.
- Kooner JS, Chambers JC, Aguilar-Salinas CA, Hinds DA, Hyde CL *et al.* Genome-wide scan identifies variation in MLXIPL associated with plasma triglycerides. *Nat.Genet.* 2008; **40**: 149-151.
- Korstanje R, Eriksson P, Samnegard A, Olsson PG, Forsman-Semb K *et al.* Locating Ath8, a locus for murine atherosclerosis susceptibility and testing several of its candidate genes in mice and humans. *Atherosclerosis.* 2004; **177**: 443-450.
- Koster A, Chao YB, Mosior M, Ford A, Gonzalez-DeWhitt PA *et al.* Transgenic angiopoietin-like (angptl)4 overexpression and targeted disruption of angptl4 and angptl3: regulation of triglyceride metabolism. *Endocrinology.* 2005; **146**: 4943-4950.
- Kotronen A, Westerbacka J, Bergholm R, Pietilainen KH, Yki-Jarvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2007; **92**: 3490-3497.

Kozak M. At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J Mol Biol.* 1987; **196**: 947-950.

Kraja AT, Rao DC, Weder AB, Cooper R, Curb JD *et al.* Two major QTLs and several others relate to factors of metabolic syndrome in the family blood pressure program. *Hypertension.* 2005; **46**: 751-757.

Krauss RM, Burke DJ. Identification of multiple subclasses of plasma low density lipoproteins in normal humans. *J Lipid Res.* 1982; **23**: 97-104.

Krassak M, Falk PK, Dresner A, DiPietro L, Vogel SM *et al.* Intramyocellular lipid concentrations are correlated with insulin sensitivity in humans: a ¹H NMR spectroscopy study. *Diabetologia.* 1999; **42**: 113-116.

Kumada M, Kihara S, Ouchi N, Kobayashi H, Okamoto Y *et al.* Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation.* 2004; **109**: 2046-2049.

Kuroda S, Uzu T, Fujii T, Nishimura M, Nakamura S *et al.* Role of insulin resistance in the genesis of sodium sensitivity in essential hypertension. *J Hum Hypertens.* 1999; **13**: 257-262.

Kylin, E. Studien ueber das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom. *Zentralblatt fuer Innere Medizin.* 1923; 44: 105-127.

L

La Cava A, Alviggi C, Matarese G. Unraveling the multiple roles of leptin in inflammation and autoimmunity. *J Mol Med.* 2004; **82**: 4-11.

Laakso M, Sarlund H, Mykkanen L. Essential hypertension and insulin resistance in non-insulin-dependent diabetes. *Eur J Clin Invest.* 1989; **19**: 518-526.

Laaksonen DE, Lakka HM, Niskanen LK, Kaplan GA, Salonen JT *et al.* Metabolic syndrome and development of diabetes mellitus: application and validation of recently suggested definitions of the metabolic syndrome in a prospective cohort study. *Am J Epidemiol.* 2002a; **156**: 1070-1077.

Laaksonen DE, Lakka TA, Lakka HM, Nyyssonen K, Rissanen T *et al.* Serum fatty acid composition predicts development of impaired fasting glycaemia and diabetes in middle-aged men. *Diabet.Med.* 2002b; **19**: 456-464.

Laffitte BA, Chao LC, Li J, Walczak R, Hummasti S *et al.* Activation of liver X receptor improves glucose tolerance through coordinate regulation of glucose metabolism in liver and adipose tissue. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2003a; **100**: 5419-5424.

Laffitte BA, Joseph SB, Chen M, Castrillo A, Repa J *et al.* The phospholipid transfer protein gene is a liver X receptor target expressed by macrophages in atherosclerotic lesions. *Mol Cell Biol.* 2003b; **23**: 2182-2191.

Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC *et al.* Autoregulation of the human liver X receptor alpha promoter. *Mol Cell Biol.* 2001a; **21**: 7558-7568.

Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR *et al.* LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2001b; **98**: 507-512.

Lakka HM, Oksanen L, Tuomainen TP, Kontula K, Salonen JT. The common pentanucleotide polymorphism of the 3'-untranslated region of the leptin receptor gene is associated with serum insulin levels and the risk of type 2 diabetes in non-diabetic men: a prospective case-control study. *J Intern.Med.* 2000; **248**: 77-83.

- Large V, Reynisdottir S, Langin D, Fredby K, Klannemark M *et al.* Decreased expression and function of adipocyte hormone-sensitive lipase in subcutaneous fat cells of obese subjects. *J Lipid Res.* 1999; **40**: 2059-2066.
- Le Jan S, Amy C, Cazes A, Monnot C, Lamande N *et al.* Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2003; **162**: 1521-1528.
- Lee CM, Huxley RR, Wildman RP, Woodward M. Indices of abdominal obesity are better discriminators of cardiovascular risk factors than BMI: a meta-analysis. *J Clin Epidemiol.* 2008; **61**: 646-653.
- Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD *et al.* Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 1994; **91**: 10878-10882.
- Legry V, Cottel D, Ferrieres J, Chinetti G, Deroide T *et al.* Association between liver X receptor alpha gene polymorphisms and risk of metabolic syndrome in French populations. *Int J Obes (Lond).* 2008; **32**: 421-428.
- Lehman DM, Arya R, Blangero J, Almasy L, Puppala S *et al.* Bivariate linkage analysis of the insulin resistance syndrome phenotypes on chromosome 7q. *Hum Biol.* 2005; **77**: 231-246.
- Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB *et al.* Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997; **272**: 3137-3140.
- Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM *et al.* An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem.* 1995; **270**: 12953-12956.
- Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, Iqbal N, Rader DJ *et al.* An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans. *PLoS.Med.* 2004; **1**: e45.
- Leik CE, Carson NL, Hennan JK, Basso MD, Liu QY *et al.* GW3965, a synthetic liver X receptor (LXR) agonist, reduces angiotensin II-mediated pressor responses in Sprague-Dawley rats. *Br.J Pharmacol.* 2007; **151** : 450-456.
- Leng Y, Karlsson HK, Zierath JR. Insulin signaling defects in type 2 diabetes. *Rev Endocr.Metab Disord.* 2004; **5**: 111-117.
- Levin N, Bischoff ED, Daige CL, Thomas D, Vu CT *et al.* Macrophage liver X receptor is required for antiatherogenic activity of LXR agonists. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005; **25**: 135-142.
- Levy D, Ehret GB, Rice K, Verwoert GC, Launer LJ *et al.* Genome-wide association study of blood pressure and hypertension. *Nat.Genet.* 2009.
- Lewis GF. Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. *Curr.Opin.Cardiol.* 2006; **21**: 345-352.
- Lewis GF, Rader DJ. New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport. *Circ.Res.* 2005; **96**: 1221-1232.
- Lewis GF, Steiner G. Acute effects of insulin in the control of VLDL production in humans. Implications for the insulin-resistant state. *Diabetes Care.* 1996; **19**: 390-393.
- Lewis GF, Uffelman KD, Szeto LW, Steiner G. Effects of acute hyperinsulinemia on VLDL triglyceride and VLDL apoB production in normal weight and obese individuals. *Diabetes.* 1993; **42**: 833-842.

- Li S, Loos RJ. Progress in the genetics of common obesity: size matters. *Curr.Opin.Lipidol.* 2008; **19**: 113-121.
- Li Y, Bolten C, Bhat BG, Woodring-Dietz J, Li S *et al.* Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism. *Mol Endocrinol.* 2002; **16**: 506-514.
- Liang Y, Jiang XC, Liu R, Liang G, Beyer TP *et al.* Liver X receptors (LXRs) regulate apolipoprotein AIV-implications of the antiatherosclerotic effect of LXR agonists. *Mol Endocrinol.* 2004a; **18**: 2000-2010.
- Liang Y, Lin S, Beyer TP, Zhang Y, Wu X *et al.* A liver X receptor and retinoid X receptor heterodimer mediates apolipoprotein E expression, secretion and cholesterol homeostasis in astrocytes. *J Neurochem.* 2004b; **88**: 623-634.
- Lichtenstein L, Berbee JF, van Dijk SJ, van Dijk KW, Bensadoun A *et al.* Angptl4 upregulates cholesterol synthesis in liver via inhibition of LPL- and HL-dependent hepatic cholesterol uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **27**: 2420-2427.
- Liese AD, Mayer-Davis EJ, Tyroler HA, Davis CE, Keil U *et al.* Familial components of the multiple metabolic syndrome: the ARIC study. *Diabetologia.* 1997; **40**: 963-970.
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE *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**: 1988-1992.
- Lindgren CM, Heid IM, Randall JC, Lamina C, Steinthorsdottir V *et al.* Genome-wide association scan meta-analysis identifies three Loci influencing adiposity and fat distribution . *PLoS.Genet.* 2009; **5**: e1000508.
- Liu P, Ying Y, Zhao Y, Mundy DI, Zhu M *et al.* Chinese hamster ovary K2 cell lipid droplets appear to be metabolic organelles involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 3787-3792.
- Liu Y, Yan C, Wang Y, Nakagawa Y, Nerio N *et al.* Liver X receptor agonist T0901317 inhibition of glucocorticoid receptor expression in hepatocytes may contribute to the amelioration of diabetic syndrome in db/db mice. *Endocrinology.* 2006; **147**: 5061-5068.
- Lo J, Bernstein LE, Canavan B, Torriani M, Jackson MB *et al.* Effects of TNF-alpha neutralization on adipocytokines and skeletal muscle adiposity in the metabolic syndrome. *Am J Physiol Endocrinol.Metab.* 2007; **293**: E102-E109.
- Loffler M, Bilban M, Reimers M, Waldhausl W, Stulnig TM. Blood glucose-lowering nuclear receptor agonists only partially normalize hepatic gene expression in db/db mice. *J Pharmacol.Exp.Ther.* 2006; **316**: 797-804.
- Lonnqvist F, Arner P, Nordfors L, Schalling M. Overexpression of the obese (ob) gene in adipose tissue of human obese subjects. *Nat.Med.* 1995; **1**: 950-953.
- Loos RJ, Barroso I, O'Rahilly S, Wareham NJ. Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science.* 2007; **315**: 187.
- Loos RJ, Katzmarzyk PT, Rao DC, Rice T, Leon AS *et al.* Genome-wide linkage scan for the metabolic syndrome in the HERITAGE Family Study. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2003; **88**: 5935-5943.
- Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH *et al.* Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat.Genet.* 2008; **40**: 768-775.
- Lopez-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M, Sebastiani G, de Zegher F *et al.* The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin.Endocrinol.Metab.* 2008; **93**: 1501-1505.

Lopez-Capape M, Alonso M, Colino E, Mustieles C, Corbaton J *et al.* Frequency of the metabolic syndrome in obese Spanish pediatric population. *Eur J Endocrinol.* 2006; **155**: 313-319.

Lorenzo C, Okoloise M, Williams K, Stern MP, Haffner SM. The metabolic syndrome as predictor of type 2 diabetes: the San Antonio heart study. *Diabetes Care.* 2003; **26**: 3153-3159.

Lorenzo C, Serrano-Rios M, Martinez-Larrad MT, Gonzalez-Sanchez JL, Seclen S *et al.* Geographic variations of the International Diabetes Federation and the National Cholesterol Education Program-Adult Treatment Panel III definitions of the metabolic syndrome in nondiabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006; **29**: 685-691.

Lorenzo C, Williams K, Hunt KJ, Haffner SM. The National Cholesterol Education Program - Adult Treatment Panel III, International Diabetes Federation, and World Health Organization definitions of the metabolic syndrome as predictors of incident cardiovascular disease and diabetes. *Diabetes Care.* 2007; **30**: 8-13.

Lund EG, Peterson LB, Adams AD, Lam MH, Burton CA *et al.* Different roles of liver X receptor alpha and beta in lipid metabolism: effects of an alpha-selective and a dual agonist in mice deficient in each subtype. *Biochem Pharmacol.* 2006; **71**: 453-463.

Luo Y, Tall AR. Sterol upregulation of human CETP expression in vitro and in transgenic mice by an LXR element. *J Clin Invest.* 2000; **105**: 513-520.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; **407**: 233-241.

Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology.* 2003; **144**: 2195-2200.

Lyon HN, Emilsson V, Hinney A, Heid IM, Lasky-Su J *et al.* The association of a SNP upstream of INSIG2 with body mass index is reproduced in several but not all cohorts. *PLoS.Genet.* 2007; **3**: e61.

M

Ma X, Warram JH, Trischitta V, Doria A. Genetic variants at the resistin locus and risk of type 2 diabetes in Caucasians. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2002; **87**: 4407-4410.

MacDougald OA, Lane MD. Transcriptional regulation of gene expression during adipocyte differentiation. *Annu.Rev Biochem.* 1995; **64**: 345-373.

Maeda N, Funahashi T, Hibuse T, Nagasawa A, Kishida K *et al.* Adaptation to fasting by glycerol transport through aquaporin 7 in adipose tissue. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2004; **101**: 17801-17806.

Maffei M, Fei H, Lee GH, Dani C, Leroy P *et al.* Increased expression in adipocytes of ob RNA in mice with lesions of the hypothalamus and with mutations at the db locus. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 1995; **92**: 6957-6960.

Magi R, Pfeufer A, Nelis M, Montpetit A, Metspalu A *et al.* Evaluating the performance of commercial whole-genome marker sets for capturing common genetic variation. *BMC Genomics.* 2007; **8**: 159.

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ *et al.* Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 1997; **277**: 55-60.

Mak PA, Laffitte BA, Desrumaux C, Joseph SB, Curtiss LK *et al.* Regulated expression of the apolipoprotein E/C-I/C-IV/C-II gene cluster in murine and human macrophages. A critical role for nuclear liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 31900-31908.

Malecki MT, Jhala US, Antonellis A, Fields L, Doria A *et al.* Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nat.Genet.* 1999; **23**: 323-328.

- Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L'Italien GJ *et al.* Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation*. 2004; **110**: 1245-1250.
- Mandard S, Zandbergen F, van Straten E, Wahli W, Kuipers F *et al.* The fasting-induced adipose factor/angiopoietin-like protein 4 is physically associated with lipoproteins and governs plasma lipid levels and adiposity. *J Biol Chem*. 2006; **281**: 934-944.
- Matarese V, Bernlohr DA. Purification of murine adipocyte lipid-binding protein. Characterization as a fatty acid- and retinoic acid-binding protein. *J Biol Chem*. 1988; **263**: 14544-14551.
- Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 2006; **580**: 2917-2921.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; **28**: 412-419.
- Mattsson N, Ronnema T, Juonala M, Viikari JS, Raitakari OT. The prevalence of the metabolic syndrome in young adults. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *J Intern.Med*. 2007; **261**: 159-169.
- Maugeais C, Tietge UJ, Broedl UC, Marchadier D, Cain W *et al.* Dose-dependent acceleration of high-density lipoprotein catabolism by endothelial lipase. *Circulation*. 2003; **108**: 2121-2126.
- Mayer-Davis EJ, D'Agostino R, Jr., Karter AJ, Haffner SM, Rewers MJ *et al.* Intensity and amount of physical activity in relation to insulin sensitivity: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *JAMA*. 1998; **279**: 669-674.
- McCarthy JJ, Meyer J, Moliterno DJ, Newby LK, Rogers WJ *et al.* Evidence for substantial effect modification by gender in a large-scale genetic association study of the metabolic syndrome among coronary heart disease patients. *Hum Genet*. 2003; **114**: 87-98.
- McCoy MG, Sun GS, Marchadier D, Maugeais C, Glick JM *et al.* Characterization of the lipolytic activity of endothelial lipase. *J Lipid Res*. 2002; **43**: 921-929.
- McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002; **51**: 7-18.
- McPherson JD, Marra M, Hillier L, Waterston RH, Chinwalla A *et al.* A physical map of the human genome. *Nature*. 2001; **409**: 934-941.
- McQueen MJ, Hawken S, Wang X, Ounpuu S, Sniderman A *et al.* Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins as risk markers of myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): a case-control study. *Lancet*. 2008; **19**; **372**: 224-233.
- Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM *et al.* Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes*. 1997; **46**: 1594-1600.
- Meigs JB, Rutter MK, Sullivan LM, Fox CS, D'Agostino RB, Sr. *et al.* Impact of insulin resistance on risk of type 2 diabetes and cardiovascular disease in people with metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2007; **30**: 1219-1225.
- Meirhaeghe A, Cotel D, Amouyel P, Dallongeville J. Association between peroxisome proliferator-activated receptor gamma haplotypes and the metabolic syndrome in French men and women. *Diabetes*. 2005a; **54**: 3043-3048.
- Meirhaeghe A, Cotel D, Amouyel P, Dallongeville J. Lack of association between certain candidate gene polymorphisms and the metabolic syndrome. *Mol Genet Metab*. 2005b; **86**: 293-299.

- Merkel M, Eckel RH, Goldberg IJ. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* 2002; **43**: 1997-2006.
- Mertens I, Verrijken A, Michiels JJ, Van der PM, Ruige JB *et al.* Among inflammation and coagulation markers, PAI-1 is a true component of the metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond).* 2006; **30**: 1308-1314.
- Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, Samson C, Lecoeur C *et al.* Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat.Genet.* 2005; **37**: 863-867.
- Meyre D, Delplanque J, Chevre JC, Lecoeur C, Lobbens S *et al.* Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 157-159.
- Miao B, Zondlo S, Gibbs S, Cromley D, Hosagrahara VP *et al.* Raising HDL cholesterol without inducing hepatic steatosis and hypertriglyceridemia by a selective LXR modulator. *J Lipid Res.* 2004; **45**: 1410-1417.
- Miccoli R, Bianchi C, Odoguardi L, Penno G, Caricato F *et al.* Prevalence of the metabolic syndrome among Italian adults according to ATP III definition. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005; **15**: 250-254.
- Midthjell K, Kruger O, Holmen J, Tverdal A, Claudi T *et al.* Rapid changes in the prevalence of obesity and known diabetes in an adult Norwegian population. The Nord-Trondelag Health Surveys: 1984-1986 and 1995-1997. *Diabetes Care.* 1999; **22**: 1813-1820.
- Miles JM, Jensen MD. Counterpoint: visceral adiposity is not causally related to insulin resistance. *Diabetes Care.* 2005; **28**: 2326-2328.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; **16**: 1215.
- Minokoshi Y, Kahn BB. Role of AMP-activated protein kinase in leptin-induced fatty acid oxidation in muscle. *Biochem Soc Trans.* 2003; **31**: 196-201.
- Mitro N, Mak PA, Vargas L, Godio C, Hampton E *et al.* The nuclear receptor LXR is a glucose sensor . *Nature.* 2007; **445**: 219-223.
- Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA *et al.* Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem.* 2006; **281**: 15837-15844.
- Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A *et al.* Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. *J Clin Invest.* 1985; **75**: 809-817.
- Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998; **22**: 1145-1158.
- Molteni V, Li X, Nabakka J, Liang F, Wityak J *et al.* N-Acylthiadiazolines, a new class of liver X receptor agonists with selectivity for LXRbeta. *J Med Chem.* 2007; **50**: 4255-4259.
- Monajemi H, Stroes E, Hegele RA, Fliers E. Inherited lipodystrophies and the metabolic syndrome. *Clin Endocrinol.(Oxf).* 2007; **67**: 479-484.
- Monti LD, Barlassina C, Citterio L, Galluccio E, Berzuini C *et al.* Endothelial nitric oxide synthase polymorphisms are associated with type 2 diabetes and the insulin resistance syndrome. *Diabetes.* 2003; **52**: 1270-1275.
- Mooijaart SP, Kuningas M, Westendorp RG, Houwing-Duistermaat JJ, Slagboom PE *et al.* Liver X receptor alpha associates with human life span. *J Gerontol.A Biol Sci Med Sci.* 2007; **62**: 343-349.

- Moran TH. Cholecystokinin and satiety: current perspectives. *Nutrition*. 2000; **16**: 858-865.
- Morello F, de Boer RA, Steffensen KR, Gnechchi M, Chisholm JW *et al*. Liver X receptors alpha and beta regulate renin expression in vivo. *J Clin Invest*. 2005; **115**: 1913-1922.
- Moreno LA, de Henauw S, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D *et al*. Design and implementation of the Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence Cross-Sectional Study. *Int J Obes (Lond)*. 2008a; **32 Suppl 5**: S4-11.
- Moreno LA, Gonzalez-Gross M, Kersting M, Molnar D, de Henauw S *et al*. Assessing, understanding and modifying nutritional status, eating habits and physical activity in European adolescents: the HELENA (Healthy Lifestyle in Europe by Nutrition in Adolescence) Study. *Public Health Nutr*. 2008b; **11**: 288-299.
- Morrison JA, Friedman LA, Wang P, Glueck CJ. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J Pediatr*. 2008; **152**: 201-206.
- Muniyappa R, Lee S, Chen H, Quon MJ. Current approaches for assessing insulin sensitivity and resistance in vivo: advantages, limitations, and appropriate usage. *Am J Physiol Endocrinol.Metab*. 2008; **294**: E15-E26.

N

- Nakamura Y, Kotite L, Gan Y, Spencer TA, Fielding CJ *et al*. Molecular mechanism of reverse cholesterol transport: reaction of pre-beta-migrating high-density lipoprotein with plasma lecithin/cholesterol acyltransferase. *Biochemistry*. 2004; **43**: 14811-14820.
- Naya FJ, Stellrecht CM, Tsai MJ. Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. *Genes Dev*. 1995; **9**: 1009-1019.
- Nettleton JA, Volcik KA, Hoogeveen RC, Boerwinkle E. Carbohydrate intake modifies associations between ANGPTL4[E40K] genotype and HDL-cholesterol concentrations in White men from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Atherosclerosis*. 2009; **203**: 214-220.
- Newton-Cheh C, Johnson T, Gateva V, Tobin MD, Bochud M *et al*. Genome-wide association study identifies eight loci associated with blood pressure. *Nat.Genet*. 2009.
- Nielsen EM, Hansen L, Carstensen B, Echwald SM, Drivsholm T *et al*. The E23K variant of Kir6.2 associates with impaired post-OGTT serum insulin response and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003; **52**: 573-577.
- Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. 2004; **113**: 1582-1588.
- Nilsson PM, Engstrom G, Hedblad B. The metabolic syndrome and incidence of cardiovascular disease in non-diabetic subjects--a population-based study comparing three different definitions. *Diabet.Med*. 2007; **24**: 464-472.
- Ninomiya JK, L'Italien G, Criqui MH, Whyte JL, Gamst A *et al*. Association of the metabolic syndrome with history of myocardial infarction and stroke in the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Circulation*. 2004; **109**: 42-46.
- Nishigori H, Yamada S, Kohama T, Tomura H, Sho K *et al*. Frameshift mutation, A263fsinsGG, in the hepatocyte nuclear factor-1beta gene associated with diabetes and renal dysfunction. *Diabetes*. 1998; **47**: 1354-1355.
- Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA*. 2007; **298**: 299-308.

Norman RA, Thompson DB, Foroud T, Garvey WT, Bennett PH *et al.* Genomewide search for genes influencing percent body fat in Pima Indians: suggestive linkage at chromosome 11q21-q22. Pima Diabetes Gene Group. *Am J Hum Genet.* 1997; **60**: 166-173.

O

Oettgen P, Akbarali Y, Boltax J, Best J, Kunsch C *et al.* Characterization of NERF, a novel transcription factor related to the Ets factor ELF-1. *Mol Cell Biol.* 1996; **16**: 5091-5106.

Ogden CL, Flegal KM, Carroll MD, Johnson CL. Prevalence and trends in overweight among US children and adolescents, 1999-2000. *JAMA.* 2002; **288**: 1728-1732.

Oike Y, Akao M, Yasunaga K, Yamauchi T, Morisada T *et al.* Angiopoietin-related growth factor antagonizes obesity and insulin resistance. *Nat.Med.* 2005; **11**: 400-408.

Oike Y, Ito Y, Maekawa H, Morisada T, Kubota Y *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood.* 2004; **103**: 3760-3765.

Oike Y, Yasunaga K, Ito Y, Matsumoto S, Maekawa H *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 2003; **100**: 9494-9499.

Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K. Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv.Immunol.* 1998; **70**: 281-312.

Ono M, Shimizugawa T, Shimamura M, Yoshida K, Noji-Sakikawa C *et al.* Protein region important for regulation of lipid metabolism in angiopoietin-like 3 (ANGPTL3): ANGPTL3 is cleaved and activated in vivo. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 41804-41809.

Oparil S, Haber E. The renin-angiotensin system (first of two parts). *N.Engl.J Med.* 1974; **291**: 389-401.

Org E, Eyheramendy S, Juhanson P, Gieger C, Lichtner P *et al.* Genome-wide scan identifies CDH13 as a novel susceptibility locus contributing to blood pressure determination in two European populations. *Hum Mol Genet.* 2009; **18**: 2288-2296.

Otero M, Lago R, Gomez R, Lago F, Gomez-Reino JJ *et al.* Leptin: a metabolic hormone that functions like a proinflammatory adipokine. *Drug News Perspect.* 2006; **19**: 21-26.

Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C *et al.* Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett.* 2005; **579**: 295-301.

Ou J, Tu H, Shan B, Luk A, DeBose-Boyd RA *et al.* Unsaturated fatty acids inhibit transcription of the sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) gene by antagonizing ligand-dependent activation of the LXR. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2001; **98**: 6027-6032.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H *et al.* Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation.* 1999; **100**: 2473-2476.

Ouchi N, Shibata R, Walsh K. Cardioprotection by adiponectin. *Trends Cardiovasc Med.* 2006; **16**: 141-146.

Ozanne SE, Fernandez-Twinn D, HALES CN. Fetal growth and adult diseases. *Semin.Perinatol.* 2004; **28**: 81-87.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN *et al.* Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science.* 2004; **306**: 457-461.

P

- Paolisso G, Tataranni PA, Foley JE, Bogardus C, Howard BV *et al.* A high concentration of fasting plasma non-esterified fatty acids is a risk factor for the development of NIDDM. *Diabetologia*. 1995; **38**: 1213-1217.
- Parish JM, Adam T, Facchiano L. Relationship of metabolic syndrome and obstructive sleep apnea. *J Clin Sleep Med*. 2007; **3**: 467-472.
- Park HS, Park JY, Yu R. Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract*. 2005; **69**: 29-35.
- Park YW, Zhu S, Palaniappan L, Heshka S, Carnethon MR *et al.* The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Arch Intern.Med*. 2003; **163**: 427-436.
- Peet DJ, Turley SD, Ma W, Janowski BA, Lobaccaro JM *et al.* Cholesterol and bile acid metabolism are impaired in mice lacking the nuclear oxysterol receptor LXR alpha. *Cell*. 1998; **93**: 693-704.
- Peeters A, Beckers S, Verrijken A, Roevens P, Peeters P *et al.* Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab*. 2008; **93**: 481-484.
- Perry JR, Frayling TM. New gene variants alter type 2 diabetes risk predominantly through reduced beta-cell function. *Curr.Opin.Clin Nutr Metab Care*. 2008; **11**: 371-377.
- Peterfy M, Ben Zeev O, Mao HZ, Weissglas-Volkov D, Aouizerat BE *et al.* Mutations in LMF1 cause combined lipase deficiency and severe hypertriglyceridemia. *Nat.Genet*. 2007; **39**: 1483-1487.
- Peters T, Ausmeier K, Ruther U. Cloning of Fatso (Fto), a novel gene deleted by the Fused toes (Ft) mouse mutation. *Mamm.Genome*. 1999; **10**: 983-986.
- Phillips GB. The GILHT-E Syndrome? *Diabetes Care*. 2004; **27**: 2285-2286.
- Piccoli JC, Gottlieb MG, Castro L, Bodanese LC, Manenti ER *et al.* Association between 894G>T endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and metabolic syndrome. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol*. 2008; **52**: 1367-1373.
- Pizzuti A, Argiolas A, Di Paola R, Baratta R, Rauseo A *et al.* An ATG repeat in the 3'-untranslated region of the human resistin gene is associated with a decreased risk of insulin resistance. *J Clin Endocrinol.Metab*. 2002; **87**: 4403-4406.
- Pizzuti A, Frittitta L, Argiolas A, Baratta R, Goldfine ID *et al.* A polymorphism (K121Q) of the human glycoprotein PC-1 gene coding region is strongly associated with insulin resistance. *Diabetes*. 1999; **48**: 1881-1884.
- Pollex RL, Ban MR, Young TK, Bjerregaard P, Anand SS *et al.* Association between the -455T>C promoter polymorphism of the APOC3 gene and the metabolic syndrome in a multi-ethnic sample. *BMC Med Genet*. 2007; **20;8**: 80.
- Porte D, Jr., Baskin DG, Schwartz MW. Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr Rev*. 2002; **60**: S20-S29.
- Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C *et al.* Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol*. 1994; **73**: 460-468.
- Powell BL, Wiltshire S, Arscott G, McCaskie PA, Hung J *et al.* Association of PARL rs3732581 genetic variant with insulin levels, metabolic syndrome and coronary artery disease. *Hum Genet*. 2008; **124**: 263-270.

Prokopenko I, Langenberg C, Florez JC, Saxena R, Soranzo N *et al.* Variants in MTNR1B influence fasting glucose levels. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 77-81.

Q

Qiu Y, Morii E, Zhang B, Tomita Y, Aozasa K. E74-like factor 2 transactivates valosin-containing protein gene, a gene involved in cancer growth. *Exp.Mol Pathol.* 2008; **84**: 226-229.

Quinet EM, Savio DA, Halpern AR, Chen L, Schuster GU *et al.* Liver X receptor (LXR)-beta regulation in LXRalpha-deficient mice: implications for therapeutic targeting. *Mol Pharmacol.* 2006; **70**: 1340-1349.

R

Rader DJ, Daugherty A. Translating molecular discoveries into new therapies for atherosclerosis. *Nature.* 2008; **451**: 904-913.

Radziuk J. Insulin sensitivity and its measurement: structural commonalities among the methods. *J Clin Endocrinol.Metab.* 2000; **85**: 4426-4433.

Raffaitin C, Gin H, Empana JP, Helmer C, Berr C *et al.* Metabolic syndrome and risk for incident Alzheimer's disease or vascular dementia: the Three-City Study. *Diabetes Care.* 2009; **32**: 169-174.

Ragolia L, Begum N. Protein phosphatase-1 and insulin action. *Mol Cell Biochem.* 1998; **182**: 49-58.

Rahalkar AR, Hegele RA. Monogenic pediatric dyslipidemias: classification, genetics and clinical spectrum. *Mol Genet Metab.* 2008; **93**: 282-294.

Rajala MW, Scherer PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology.* 2003; **144**: 3765-3773.

Ranade K, Wu KD, Risch N, Olivier M, Pei D *et al.* Genetic variation in aldosterone synthase predicts plasma glucose levels. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2001; **98**: 13219-13224.

Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963; **1**: 785-789.

Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, Weisnagel SJ, Argyropoulos G *et al.* The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity.(Silver.Spring).* 2006; **14**: 529-644.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 1988; **37**: 1595-1607.

Reaven GM. Insulin resistance, the insulin resistance syndrome, and cardiovascular disease. *Panminerva Med.* 2005a; **47**: 201-210.

Reaven GM. The metabolic syndrome: requiescat in pace. *Clin Chem.* 2005b; **51**: 931-938.

Reinehr T, de Sousa G, Toschke AM, Andler W. Comparison of metabolic syndrome prevalence using eight different definitions: a critical approach. *Arch Dis.Child.* 2007; **92**: 1067-1072.

Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C, Richardson JA, Hobbs H *et al.* Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters ABCG5 and ABCG8 by the liver X receptors alpha and beta. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 18793-18800.

Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM *et al.* Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000a; **14**: 2819-2830.

- Repa JJ, Mangelsdorf DJ. The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu.Rev Cell Dev.Biol.* 2000b; **16**: 459-481.
- Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L *et al.* Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science.* 2000c; **289**: 1524-1529.
- Reynisdottir S, Langin D, Carlstrom K, Holm C, Rossner S *et al.* Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity. *Clin Sci (Lond).* 1995; **89**: 421-429.
- Rice TK, Schork NJ, Rao DC. Methods for handling multiple testing. *Adv.Genet.* 2008; **60**: 293-308.
- Ridker PM, Buring JE, Cook NR, Rifai N. C-reactive protein, the metabolic syndrome, and risk of incident cardiovascular events: an 8-year follow-up of 14 719 initially healthy American women. *Circulation.* 2003; **107**: 391-397.
- Rieusset J, Bouzakri K, Chevillotte E, Ricard N, Jacquet D *et al.* Suppressor of cytokine signaling 3 expression and insulin resistance in skeletal muscle of obese and type 2 diabetic patients. *Diabetes.* 2004; **53**: 2232-2241.
- Rigamonti E, Helin L, Lestavel S, Mutka AL, Lepore M *et al.* Liver X receptor activation controls intracellular cholesterol trafficking and esterification in human macrophages. *Circ.Res.* 2005; **97**: 682-689.
- Robitaille J, Brouillette C, Houde A, Despres JP, Tchernof A *et al.* Molecular screening of the 11beta-HSD1 gene in men characterized by the metabolic syndrome. *Obes Res.* 2004; **12**: 1570-1575.
- Robitaille J, Houde A, Lemieux S, Gaudet D, Perusse L *et al.* The lipoprotein/lipid profile is modulated by a gene-diet interaction effect between polymorphisms in the liver X receptor-alpha and dietary cholesterol intake in French-Canadians. *Br.J Nutr.* 2007; **97**: 11-18.
- Roden M, Krssak M, Stingl H, Gruber S, Hofer A *et al.* Rapid impairment of skeletal muscle glucose transport/phosphorylation by free fatty acids in humans. *Diabetes.* 1999; **48**: 358-364.
- Rodriguez-Rodriguez E, Llorca J, Mateo I, Infante J, Sanchez-Quintana C *et al.* No association of genetic variants of liver X receptor-beta with Alzheimer's disease risk. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr.Genet.* 2008a; **147B**: 650-653.
- Rodriguez-Rodriguez E, Sanchez-Juan P, Mateo I, Infante J, Sanchez-Quintana C *et al.* Interaction between CD14 and LXRBeta genes modulates Alzheimer's disease risk. *J Neurol Sci.* 2008b; **264**: 97-99.
- Rodriguez BL, Fujimoto WY, Mayer-Davis EJ, Imperatore G, Williams DE *et al.* Prevalence of cardiovascular disease risk factors in U.S. children and adolescents with diabetes: the SEARCH for diabetes in youth study. *Diabetes Care.* 2006; **29**: 1891-1896.
- Romeo S, Pennacchio LA, Fu Y, Boerwinkle E, Tybjaerg-Hansen A *et al.* Population-based resequencing of ANGPTL4 uncovers variations that reduce triglycerides and increase HDL. *Nat.Genet.* 2007; **39**: 513-516.
- Romeo S, Yin W, Kozlitina J, Pennacchio LA, Boerwinkle E *et al.* Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J Clin Invest.* 2009; **119**: 70-79.
- Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu.Rev Cell Dev.Biol.* 2000; **16**: 145-171.
- Rosmond R. The glucocorticoid receptor gene and its association to metabolic syndrome. *Obes Res.* 2002; **10**: 1078-1086.

Roskopf D, Bornhorst A, Rimmbach C, Schwahn C, Kayser A *et al.* Comment on "A common genetic variant is associated with adult and childhood obesity". *Science*. 2007; **315**: 187.

Rothman KJ, Greenland S, Walker AM. Concepts of interaction. *Am J Epidemiol*. 1980; **112**: 467-470.

Ruan H, Lodish HF. Insulin resistance in adipose tissue: direct and indirect effects of tumor necrosis factor- α . *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; **14**: 447-455.

Ruderman NB, Keller C, Richard AM, Saha AK, Luo Z *et al.* Interleukin-6 regulation of AMP-activated protein kinase. Potential role in the systemic response to exercise and prevention of the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2006; **55 Suppl 2**: S48-S54.

Russo P, Lauria F, Loguercio M, Barba G, Arnout J *et al.* -344C/T Variant in the promoter of the aldosterone synthase gene (CYP11B2) is associated with metabolic syndrome in men. *Am J Hypertens*. 2007; **20**: 218-222.

Ryden M, Dicker A, van H, V, Hauner H, Brunnberg M *et al.* Mapping of early signaling events in tumor necrosis factor- α -mediated lipolysis in human fat cells. *J Biol Chem*. 2002; **277**: 1085-1091.

S

Sabatti C, Service SK, Hartikainen AL, Pouta A, Ripatti S *et al.* Genome-wide association analysis of metabolic traits in a birth cohort from a founder population. *Nat.Genet*. 2009; **41**: 35-46.

Saez ME, Gonzalez-Sanchez JL, Ramirez-Lorca R, Martinez-Larrad MT, Zabena C *et al.* The CAPN10 gene is associated with insulin resistance phenotypes in the Spanish population. *PLoS.ONE*. 2008; **3**: e2953.

Saiki A, Oyama T, Endo K, Ebisuno M, Ohira M *et al.* Preheparin serum lipoprotein lipase mass might be a biomarker of metabolic syndrome. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007; **76**: 93-101.

Sainsbury A, Cooney GJ, Herzog H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best.Pract.Res Clin Endocrinol.Metab*. 2002; **16**: 623-637.

Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX? *Trends Endocrinol.Metab*. 2003; **14**: 365-370.

Sanchez-Margalet V, Martin-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Najib S *et al.* Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp.Immunol*. 2003; **133**: 11-19.

Sandhu MS, Waterworth DM, Debenham SL, Wheeler E, Papadakis K *et al.* LDL-cholesterol concentrations: a genome-wide association study. *Lancet*. 2008; **371**: 483-491.

Sandhu MS, Weedon MN, Fawcett KA, Wasson J, Debenham SL *et al.* Common variants in WFS1 confer risk of type 2 diabetes. *Nat.Genet*. 2007; **39**: 951-953.

Santoro N, Cirillo G, Lepore MG, Palma A, Amato A *et al.* Effect of the rs997509 polymorphism on the association between ectonucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase 1 and metabolic syndrome and impaired glucose tolerance in childhood obesity. *J Clin Endocrinol.Metab*. 2009; **94**: 300-305.

Santos AC, Barros H. Prevalence and determinants of obesity in an urban sample of Portuguese adults. *Public Health*. 2003; **117**: 430-437.

Sarlio-Lahteenkorva S, Lahelma E. The association of body mass index with social and economic disadvantage in women and men. *Int J Epidemiol*. 1999; **28**: 445-449.

Sato M, Kawata Y, Erami K, Ikeda I, Imaizumi K. LXR agonist increases the lymph HDL transport in rats by promoting reciprocally intestinal ABCA1 and apo A-I mRNA levels. *Lipids*. 2008; **43**: 125-131.

- Saunders CL, Chiodini BD, Sham P, Lewis CM, Abkevich V *et al.* Meta-analysis of genome-wide linkage studies in BMI and obesity. *Obesity.(Silver.Spring)*. 2007; **15**: 2263-2275.
- Savage DB, Sewter CP, Klenk ES, Segal DG, Vidal-Puig A *et al.* Resistin / Fizz3 expression in relation to obesity and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma action in humans. *Diabetes*. 2001; **50**: 2199-2202.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI *et al.* Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007; **316**: 1331-1336.
- Schaffler A, Scholmerich J, Buchler C. Mechanisms of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue--emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat.Clin Pract.Gastroenterol.Hepatol*. 2005; **2**: 273-280.
- Schaid DJ. Evaluating associations of haplotypes with traits. *Genet Epidemiol*. 2004; **27**: 348-364.
- Schalch DS, Kipnis DM. Abnormalities in carbohydrate tolerance associated with elevated plasma nonesterified fatty acids. *J Clin Invest*. 1965; **44**: 2010-2020.
- Schmuth M, Haqq CM, Cairns WJ, Holder JC, Dorsam S *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2004; **122**: 971-983.
- Schneider DJ. Abnormalities of coagulation, platelet function, and fibrinolysis associated with syndromes of insulin resistance. *Coron.Artery Dis*. 2005; **16**: 473-476.
- Schultz JR, Tu H, Luk A, Repa JJ, Medina JC *et al.* Role of LXRs in control of lipogenesis. *Genes Dev*. 2000; **14**: 2831-2838.
- Schuster GU, Parini P, Wang L, Alberti S, Steffensen KR *et al.* Accumulation of foam cells in liver X receptor-deficient mice. *Circulation*. 2002; **106**: 1147-1153.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000; **404**: 661-671.
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, Willer CJ, Li Y *et al.* A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science*. 2007; **316**: 1341-1345.
- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G *et al.* Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS.Genet*. 2007; **3**: e115.
- Sentinelli F, Romeo S, Arca M, Filippi E, Leonetti F *et al.* Human resistin gene, obesity, and type 2 diabetes: mutation analysis and population study. *Diabetes*. 2002; **51**: 860-862.
- Seo JB, Moon HM, Kim WS, Lee YS, Jeong HW *et al.* Activated liver X receptors stimulate adipocyte differentiation through induction of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression. *Mol Cell Biol*. 2004; **24**: 3430-3444.
- Seppala-Lindroos A, Vehkavaara S, Hakkinen AM, Goto T, Westerbacka J *et al.* Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol.Metab*. 2002; **87**: 3023-3028.
- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P *et al.* Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J*. 2001; **15**: 2099-2111.
- Shaibi GQ, Goran MI. Examining metabolic syndrome definitions in overweight Hispanic youth: a focus on insulin resistance. *J Pediatr*. 2008; **152**: 171-176.

- Shimamura M, Matsuda M, Kobayashi S, Ando Y, Ono M *et al.* Angiopoietin-like protein 3, a hepatic secretory factor, activates lipolysis in adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; **301**: 604-609.
- Shimamura M, Matsuda M, Yasumo H, Okazaki M, Fujimoto K *et al.* Angiopoietin-like protein3 regulates plasma HDL cholesterol through suppression of endothelial lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; **27**: 366-372.
- Shimizugawa T, Ono M, Shimamura M, Yoshida K, Ando Y *et al.* ANGPTL3 decreases very low density lipoprotein triglyceride clearance by inhibition of lipoprotein lipase. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 33742-33748.
- Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K *et al.* Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat: possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med.* 1996; **2**: 800-803.
- Shintani M, Ikegami H, Fujisawa T, Kawaguchi Y, Ohishi M *et al.* Leptin gene polymorphism is associated with hypertension independent of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; **87**: 2909-2912.
- Shoulders CC, Jones EL, Naoumova RP. Genetics of familial combined hyperlipidemia and risk of coronary heart disease. *Hum Mol Genet.* 2004; **13 Spec No 1**: R149-R160.
- Silventoinen K, Pankow J, Jousilahti P, Hu G, Tuomilehto J. Educational inequalities in the metabolic syndrome and coronary heart disease among middle-aged men and women. *Int J Epidemiol.* 2005; **34**: 327-334.
- Sims EA. Are there persons who are obese, but metabolically healthy? *Metabolism.* 2001; **50**: 1499-1504.
- Sjogren M, Lyssenko V, Jonsson A, Berglund G, Nilsson P *et al.* The search for putative unifying genetic factors for components of the metabolic syndrome. *Diabetologia.* 2008; **51**: 2242-2251.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L *et al.* A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature.* 2007; **445**: 881-885.
- Slaughter MH, Lohman TG, Boileau RA, Horswill CA, Stillman RJ *et al.* Skinfold equations for estimation of body fatness in children and youth. *Hum Biol.* 1988; **60**: 709-723.
- Smith SR, Lovejoy JC, Greenway F, Ryan D, deJonge L *et al.* Contributions of total body fat, abdominal subcutaneous adipose tissue compartments, and visceral adipose tissue to the metabolic complications of obesity. *Metabolism.* 2001; **50**: 425-435.
- Sniderman AD. Applying apoB to the diagnosis and therapy of the atherogenic dyslipoproteinemias: a clinical diagnostic algorithm. *Curr Opin Lipidol.* 2004; **15**: 433-438.
- Song C, Hiipakka RA, Liao S. Selective activation of liver X receptor alpha by 6alpha-hydroxy bile acids and analogs. *Steroids.* 2000a; **65**: 423-427.
- Song C, Hiipakka RA, Liao S. Auto-oxidized cholesterol sulfates are antagonistic ligands of liver X receptors: implications for the development and treatment of atherosclerosis. *Steroids.* 2001; **66**: 473-479.
- Song C, Kokontis JM, Hiipakka RA, Liao S. Ubiquitous receptor: a receptor that modulates gene activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1994; **91**: 10809-10813.
- Song C, Liao S. Cholestenic acid is a naturally occurring ligand for liver X receptor alpha. *Endocrinology.* 2000b; **141**: 4180-4184.
- Sookoian SC, Gonzalez C, Pirola CJ. Meta-analysis on the G-308A tumor necrosis factor alpha gene variant and phenotypes associated with the metabolic syndrome. *Obes Res.* 2005; **13**: 2122-2131.

- Sopasakis VR, Sandqvist M, Gustafson B, Hammarstedt A, Schmelz M *et al.* High local concentrations and effects on differentiation implicate interleukin-6 as a paracrine regulator. *Obes Res.* 2004; **12**: 454-460.
- Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001; **104**: 531-543.
- Sprangers F, Romijn JA, Endert E, Ackermans MT, Sauerwein HP. The role of free fatty acids (FFA) in the regulation of intrahepatic fluxes of glucose and glycogen metabolism during short-term starvation in healthy volunteers. *Clin Nutr.* 2001; **20**: 177-179.
- St Onge MP, Janssen I, Heymsfield SB. Metabolic syndrome in normal-weight Americans: new definition of the metabolically obese, normal-weight individual. *Diabetes Care.* 2004; **27**: 2222-2228.
- Staiger H, Machicao F, Werner R, Guirguis A, Weisser M *et al.* Genetic variation within the ANGPTL4 gene is not associated with metabolic traits in white subjects at an increased risk for type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2008; **57**: 637-643.
- Steffensen KR, Nilsson M, Schuster GU, Stulnig TM, Dahlman-Wright K *et al.* Gene expression profiling in adipose tissue indicates different transcriptional mechanisms of liver X receptors alpha and beta, respectively. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; **310**: 589-593.
- Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest.* 1994; **94**: 1172-1179.
- Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Jonsdottir T *et al.* A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2007; **39**: 770-775.
- Stephens JW, Hurel SJ, Lowe GD, Rumley A, Humphries SE. Association between plasma IL-6, the IL6 -174G>C gene variant and the metabolic syndrome in type 2 diabetes mellitus. *Mol Genet Metab.* 2007; **90**: 422-428.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature.* 2001; **409**: 307-312.
- Stern MP, Williams K, Gonzalez-Villalpando C, Hunt KJ, Haffner SM. Does the metabolic syndrome improve identification of individuals at risk of type 2 diabetes and/or cardiovascular disease? *Diabetes Care.* 2004; **27**: 2676-2681.
- Stranger BE, Nica AC, Forrest MS, Dimas A, Bird CP *et al.* Population genomics of human gene expression. *Nat Genet.* 2007; **39**: 1217-1224.
- Stulnig TM, Oppermann U, Steffensen KR, Schuster GU, Gustafsson JA. Liver X receptors downregulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression and activity. *Diabetes.* 2002a; **51**: 2426-2433.
- Stulnig TM, Steffensen KR, Gao H, Reimers M, Dahlman-Wright K *et al.* Novel roles of liver X receptors exposed by gene expression profiling in liver and adipose tissue. *Mol Pharmacol.* 2002b; **62**: 1299-1305.
- Sukonina V, Lookene A, Olivecrona T, Olivecrona G. Angiotensin-like protein 4 converts lipoprotein lipase to inactive monomers and modulates lipase activity in adipose tissue. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2006; **103**: 17450-17455.
- Sun SS, Liang R, Huang TT, Daniels SR, Arslanian S *et al.* Childhood obesity predicts adult metabolic syndrome: the Fels Longitudinal Study. *J Pediatr.* 2008; **152**: 191-200.
- Sun Y, Yao J, Kim TW, Tall AR. Expression of liver X receptor target genes decreases cellular amyloid beta peptide secretion. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 27688-27694.

Sutherland JP, McKinley B, Eckel RH. The metabolic syndrome and inflammation. *Metab Syndr.Relat Disord.* 2004; **2**: 82-104.

Sztalryd C, Xu G, Dorward H, Tansey JT, Contreras JA *et al.* Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation. *J Cell Biol.* 2003; **161**: 1093-1103.

T

Takata Y, Osawa H, Kurata M, Kurokawa M, Yamauchi J *et al.* Hyperresistinemia is associated with coexistence of hypertension and type 2 diabetes. *Hypertension.* 2008; **51**: 534-539.

Talmud PJ. How to identify gene-environment interactions in a multifactorial disease: CHD as an example. *Proc.Nutr Soc.* 2004; **63**: 5-10.

Talmud PJ. Rare APOA5 mutations--clinical consequences, metabolic and functional effects: an ENID review. *Atherosclerosis.* 2007; **194**: 287-292.

Talmud PJ, Smart M, Presswood E, Cooper JA, Nicaud V *et al.* ANGPTL4 E40K and T266M: effects on plasma triglyceride and HDL levels, postprandial responses, and CHD risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; **28**: 2319-2325.

Talukdar S, Hillgartner FB. The mechanism mediating the activation of acetyl-coenzyme A carboxylase-alpha gene transcription by the liver X receptor agonist T0-901317. *J Lipid Res.* 2006; **47**: 2451-2461.

Tamura K, Chen YE, Horiuchi M, Chen Q, Daviet L *et al.* LXRA functions as a cAMP-responsive transcriptional regulator of gene expression. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2000; **97**: 8513-8518.

Tamura K, Chen YE, Tanaka Y, Sakai M, Tsurumi Y *et al.* Nuclear receptor LXRA is involved in cAMP-mediated human renin gene expression. *Mol Cell Endocrinol.* 2004; **224**: 11-20.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat.Rev Mol Cell Biol.* 2006; **7**: 85-96.

Tansey JT, Huml AM, Vogt R, Davis KE, Jones JM *et al.* Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 8401-8406.

Tarugi P, Aversa M, Di Leo E, Cefalu AB, Noto D *et al.* Molecular diagnosis of hypobetalipoproteinemia: an ENID review. *Atherosclerosis.* 2007; **195**: e19-e27.

Tasic I, Milojkovic M, Sunder-Plassmann R, Lazarevic G, Tasic NM *et al.* The association of PC-1 (ENPP1) K121Q polymorphism with metabolic syndrome in patients with coronary heart disease. *Clin Chim.Acta.* 2007; **377**: 237-242.

Teran-Garcia M, Bouchard C. Genetics of the metabolic syndrome. *Appl.Physiol Nutr Metab.* 2007; **32**: 89-114.

Terasaka N, Hiroshima A, Koieyama T, Ubukata N, Morikawa Y *et al.* T-0901317, a synthetic liver X receptor ligand, inhibits development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *FEBS Lett.* 2003; **536**: 6-11.

Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC, Young RP, Critchley JA. The Trp64Arg polymorphism of the beta3-adrenergic receptor gene and obesity in Chinese subjects with components of the metabolic syndrome. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000; **24**: 545-551.

Thompson A, Di Angelantonio E, Sarwar N, Erqou S, Saleheen D *et al.* Association of cholesteryl ester transfer protein genotypes with CETP mass and activity, lipid levels, and coronary risk. *JAMA.* 2008; **299**: 2777-2788.

- Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, Steinthorsdottir V, Sulem P *et al.* Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 18-24.
- Tillin T, Forouhi N, Johnston DG, McKeigue PM, Chaturvedi N *et al.* Metabolic syndrome and coronary heart disease in South Asians, African-Caribbeans and white Europeans: a UK population-based cross-sectional study. *Diabetologia.* 2005; **48**: 649-656.
- Timpson NJ, Lindgren CM, Weedon MN, Randall J, Ouwehand WH *et al.* Adiposity-related heterogeneity in patterns of type 2 diabetes susceptibility observed in genome-wide association data. *Diabetes.* 2009; **58**: 505-510.
- Tobin KA, Steineger HH, Alberti S, Spydevold O, Auwerx J *et al.* Cross-talk between fatty acid and cholesterol metabolism mediated by liver X receptor-alpha. *Mol Endocrinol.* 2000; **14**: 741-752.
- Tonjes A, Stumvoll M. The role of the Pro12Ala polymorphism in peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes risk. *Curr.Opin.Clin Nutr Metab Care.* 2007; **10**: 410-414.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994; **79**: 1147-1156.
- Tontonoz P, Spiegelman BM. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. *Annu.Rev Biochem.* 2008; **77**: 289-312.
- Tooke JE, Hannemann MM. Adverse endothelial function and the insulin resistance syndrome. *J Intern.Med.* 2000; **247**: 425-431.
- Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; **44**: 248-252.
- Trayhurn P, Wood IS. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. *Biochem Soc Trans.* 2005; **33**: 1078-1081.
- Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new algorithm for haplotype-based association analysis: the Stochastic-EM algorithm. *Ann Hum Genet.* 2004; **68**: 165-177.
- Tregouet DA, König IR, Erdmann J, Munteanu A, Braund PS *et al.* Genome-wide haplotype association study identifies the SLC22A3-LPAL2-LPA gene cluster as a risk locus for coronary artery disease. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 283-285.
- Trigatti B, Covey S, Rizvi A. Scavenger receptor class B type I in high-density lipoprotein metabolism, atherosclerosis and heart disease: lessons from gene-targeted mice. *Biochem Soc Trans.* 2004; **32**: 116-120.
- Trigatti BL, Krieger M, Rigotti A. Influence of the HDL receptor SR-BI on lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; **23**: 1732-1738.
- Tripathy D, Mohanty P, Dhindsa S, Syed T, Ghanim H *et al.* Elevation of free fatty acids induces inflammation and impairs vascular reactivity in healthy subjects. *Diabetes.* 2003; **52**: 2882-2887.
- Tyrberg M, Melander A, Lovestam-Adrian M, Lindblad U. Retinopathy in subjects with impaired fasting glucose: the NANSY-Eye baseline report. *Diabetes Obes Metab.* 2008; **10**: 646-651.

U

- Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. *Diabetes.* 1995; **44**: 863-870.

Unger RH. Lipid overload and overflow: metabolic trauma and the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol.Metab.* 2003; **14**: 398-403.

Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K *et al.* Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; **28**: 827-834.

V

Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr.* 1956; **4**: 20-34.

van der Steeg WA, Boekholdt SM, Stein EA, El Harchaoui K, Stroes ES *et al.* Role of the apolipoprotein B-apolipoprotein A-I ratio in cardiovascular risk assessment: a case-control analysis in EPIC-Norfolk. *Ann Intern.Med.* 2007; **146**: 640-648.

Van Guilder GP, Hoetzer GL, Greiner JJ, Stauffer BL, Desouza CA. Influence of metabolic syndrome on biomarkers of oxidative stress and inflammation in obese adults. *Obesity.(Silver.Spring).* 2006; **14**: 2127-2131.

van Rossum EF, Lamberts SW. Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog.Horm.Res.* 2004; **59**: 333-357.

Vessby B, Unsitupa M, Hermansen K, Riccardi G, Rivellese AA *et al.* Substituting dietary saturated for monounsaturated fat impairs insulin sensitivity in healthy men and women: The KANWU Study. *Diabetologia.* 2001; **44**: 312-319.

Villena JA, Roy S, Sarkadi-Nagy E, Kim KH, Sul HS. Desnutrin, an adipocyte gene encoding a novel patatin domain-containing protein, is induced by fasting and glucocorticoids: ectopic expression of desnutrin increases triglyceride hydrolysis. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 47066-47075.

Viner RM, Segal TY, Lichtarowicz-Krynska E, Hindmarsh P. Prevalence of the insulin resistance syndrome in obesity. *Arch Dis.Child.* 2005; **90**: 10-14.

Vionnet N, Hani EH, Dupont S, Gallina S, Francke S *et al.* Genomewide search for type 2 diabetes-susceptibility genes in French whites: evidence for a novel susceptibility locus for early-onset diabetes on chromosome 3q27-qter and independent replication of a type 2-diabetes locus on chromosome 1q21-q24. *Am J Hum Genet.* 2000; **67**: 1470-1480.

Virkkamaki A, Ueki K, Kahn CR. Protein-protein interaction in insulin signaling and the molecular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest.* 1999; **103**: 931-943.

Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, Heglind M, Westergren R *et al.* Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N.Engl.J Med.* 2009; **360**: 1518-1525.

Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS.Biol.* 2008; **6**: e237.

W

Wagner BL, Villedor AF, Shao G, Daige CL, Bischoff ED *et al.* Promoter-specific roles for liver X receptor/corepressor complexes in the regulation of ABCA1 and SREBP1 gene expression. *Mol Cell Biol.* 2003; **23**: 5780-5789.

Wahlen K, Sjolín E, Hoffstedt J. The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res.* 2008; **49**: 607-611.

- Walczak R, Joseph SB, Laffitte BA, Castrillo A, Pei L *et al.* Transcription of the vascular endothelial growth factor gene in macrophages is regulated by liver X receptors. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 9905-9911.
- Walder K, Kerr-Bayles L, Civitarese A, Jowett J, Curran J *et al.* The mitochondrial rhomboid protease PSARL is a new candidate gene for type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2005; **48**: 459-468.
- Wallace C, Newhouse SJ, Braund P, Zhang F, Tobin M *et al.* Genome-wide association study identifies genes for biomarkers of cardiovascular disease: serum urate and dyslipidemia. *Am J Hum Genet.* 2008; **82**: 139-149.
- Wallace TM, Levy JC, Matthews DR. Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care.* 2004; **27**: 1487-1495.
- Wamala SP, Lynch J, Horsten M, Mittleman MA, Schenck-Gustafsson K *et al.* Education and the metabolic syndrome in women. *Diabetes Care.* 1999; **22**: 1999-2003.
- Wang J, Ban MR, Zou GY, Cao H, Lin T *et al.* Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum Mol Genet.* 2008; **17**: 2894-2899.
- Wang J, Cao H, Ban MR, Kennedy BA, Zhu S *et al.* Resequencing genomic DNA of patients with severe hypertriglyceridemia (MIM 144650). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007a; **27**: 2450-2455.
- Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat.Rev Genet.* 2005; **6**: 109-118.
- Wang Y, Lam KS, Lam JB, Lam MC, Leung PT *et al.* Overexpression of angiopoietin-like protein 4 alters mitochondria activities and modulates methionine metabolic cycle in the liver tissues of db/db diabetic mice. *Mol Endocrinol.* 2007b; **21**: 972-986.
- Wang Y, O'connell JR, McArdle PF, Wade JB, Dorff SE *et al.* From the Cover: Whole-genome association study identifies STK39 as a hypertension susceptibility gene. *Proc.Natl Acad.Sci U.S.A.* 2009; **106**: 226-231.
- Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Plomin R. Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr.* 2008; **87**: 398-404.
- Warram JH, Martin BC, Krolewski AS, Soeldner JS, Kahn CR. Slow glucose removal rate and hyperinsulinemia precede the development of type II diabetes in the offspring of diabetic parents. *Ann Intern.Med.* 1990; **113**: 909-915.
- Weiss R, Caprio S. Development of type 2 diabetes in children and adolescents. *Minerva Med.* 2006; **97**: 263-269.
- Weiss R, Dziura J, Burgert TS, Tamborlane WV, Taksali SE *et al.* Obesity and the metabolic syndrome in children and adolescents. *N.Engl.J Med.* 2004; **350**: 2362-2374.
- Weyer C, Wolford JK, Hanson RL, Foley JE, Tataranni PA *et al.* Subcutaneous abdominal adipocyte size, a predictor of type 2 diabetes, is linked to chromosome 1q21--q23 and is associated with a common polymorphism in LMNA in Pima Indians. *Mol Genet Metab.* 2001; **72**: 231-238.
- White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem.* 1994; **269**: 1-4.
- White PC, Agarwal AK, Nunez BS, Giacchetti G, Mantero F *et al.* Genotype-phenotype correlations of mutations and polymorphisms in HSD11B2, the gene encoding the kidney isozyme of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocr.Res.* 2000; **26**: 771-780.
- Whitfield AJ, Barrett PH, van Bockxmeer FM, Burnett JR. Lipid disorders and mutations in the APOB gene. *Clin Chem.* 2004; **50**: 1725-1732.

- Whitney KD, Watson MA, Collins JL, Benson WG, Stone TM *et al.* Regulation of cholesterol homeostasis by the liver X receptors in the central nervous system. *Mol Endocrinol.* 2002; **16**: 1378-1385.
- Whitney KD, Watson MA, Goodwin B, Galardi CM, Maglich JM *et al.* Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRalpha gene in human macrophages. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 43509-43515.
- Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL *et al.* Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat.Genet.* 2008; **40**: 161-169.
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, Li S, Lindgren CM *et al.* Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat.Genet.* 2009; **41**: 25-34.
- Williams CL, Hayman LL, Daniels SR, Robinson TN, Steinberger J *et al.* Cardiovascular health in childhood: A statement for health professionals from the Committee on Atherosclerosis, Hypertension, and Obesity in the Young (AHOY) of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation.* 2002; **106**: 143-160.
- Willy PJ, Umesonon K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA *et al.* LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995; **9**: 1033-1045.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H *et al.* Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation.* 1998; **97**: 1837-1847.
- Wilson PW, D'Agostino RB, Parise H, Sullivan L, Meigs JB. Metabolic syndrome as a precursor of cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus. *Circulation.* 2005; **112**: 3066-3072.
- Winckler W, Weedon MN, Graham RR, McCarroll SA, Purcell S *et al.* Evaluation of common variants in the six known maturity-onset diabetes of the young (MODY) genes for association with type 2 diabetes. *Diabetes.* 2007; **56**: 685-693.
- Winocour PH, Durrington PN, Bhatnagar D, Ishola M, Arrol S *et al.* Abnormalities of VLDL, IDL, and LDL characterize insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb.* 1992; **12**: 920-928.
- Wolf AM, Wolf D, Rumpold H, Enrich B, Tilg H. Adiponectin induces the anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1RA in human leukocytes. *Biochem Biophys.Res Commun.* 2004; **323**: 630-635.
- World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Its Complications: Part I: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Geneva, Switzerland: World Health Organization.* 1999.
- Wu J, Zhang Y, Wang N, Davis L, Yang G *et al.* Liver X receptor-alpha mediates cholesterol efflux in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004; **287**: F886-F895.
- Wulster-Radcliffe MC, Ajuwon KM, Wang J, Christian JA, Spurlock ME. Adiponectin differentially regulates cytokines in porcine macrophages. *Biochem Biophys.Res Commun.* 2004; **316**: 924-929.

X

- Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J *et al.* Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A.* 2005; **102**: 6086-6091.

Y

- Yaffe K. Metabolic syndrome and cognitive disorders: is the sum greater than its parts? *Alzheimer Dis.Assoc Disord.* 2007; **21**: 167-171.

Yoon JC, Chickering TW, Rosen ED, Dussault B, Qin Y *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma target gene encoding a novel angiopoietin-related protein associated with adipose differentiation. *Mol Cell Biol.* 2000; **20**: 5343-5349.

Yoshida K, Shimizugawa T, Ono M, Furukawa H. Angiopoietin-like protein 4 is a potent hyperlipidemia-inducing factor in mice and inhibitor of lipoprotein lipase. *J Lipid Res.* 2002; **43**: 1770-1772.

Yoshikawa T, Shimano H, Yahagi N, Ide T, Amemiya-Kudo M *et al.* Polyunsaturated fatty acids suppress sterol regulatory element-binding protein 1c promoter activity by inhibition of liver X receptor (LXR) binding to LXR response elements. *J Biol Chem.* 2002; **277**: 1705-1711.

Young SG, Davies BS, Fong LG, Gin P, Weinstein MM *et al.* GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Curr Opin Lipidol.* 2007; **18**: 389-396.

Youngren JF. Regulation of insulin receptor function. *Cell Mol Life Sci.* 2007; **64**: 873-891.

Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, von Bergmann K, Lutjohann D *et al.* Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002; **99**: 16237-16242.

Yu L, York J, von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC *et al.* Stimulation of cholesterol excretion by the liver X receptor agonist requires ATP-binding cassette transporters G5 and G8. *J Biol Chem.* 2003; **278**: 15565-15570.

Yu X, Burgess SC, Ge H, Wong KK, Nasseem RH *et al.* Inhibition of cardiac lipoprotein utilization by transgenic overexpression of Angptl4 in the heart. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; **102**: 1767-1772.

Z

Zaman MA, Oparil S, Calhoun DA. Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; **1**: 621-636.

Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF, Marchini JL *et al.* Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2008; **40**: 638-645.

Zeggini E, Weedon MN, Lindgren CM, Frayling TM, Elliott KS *et al.* Replication of genome-wide association signals in UK samples reveals risk loci for type 2 diabetes. *Science.* 2007; **316**: 1336-1341.

Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science.* 2009; **325**: 100-104.

Zhang B, Tomita Y, Qiu Y, He J, Morii E *et al.* E74-like factor 2 regulates valosin-containing protein expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; **356**: 536-541.

Zhang CC, Kaba M, Ge G, Xie K, Tong W *et al.* Angiopoietin-like proteins stimulate ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Nat Med.* 2006a; **12**: 240-245.

Zhang Y, Hu X, Tian R, Wei W, Hu W *et al.* Angiopoietin-related growth factor (AGF) supports adhesion, spreading, and migration of keratinocytes, fibroblasts, and endothelial cells through interaction with RGD-binding integrins. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006b; **347**: 100-108.

Zhang Y, Repa JJ, Gauthier K, Mangelsdorf DJ. Regulation of lipoprotein lipase by the oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *J Biol Chem.* 2001; **276**: 43018-43024.

Zhou J, Febbraio M, Wada T, Zhai Y, Kuruba R *et al.* Hepatic fatty acid transporter Cd36 is a common target of LXR, PXR, and PPARgamma in promoting steatosis. *Gastroenterology.* 2008; **134**: 556-567.

Zimmermann R, Haemmerle G, Wagner EM, Strauss JG, Kratky D *et al.* Decreased fatty acid esterification compensates for the reduced lipolytic activity in hormone-sensitive lipase-deficient white adipose tissue. *J Lipid Res.* 2003; **44**: 2089-2099.

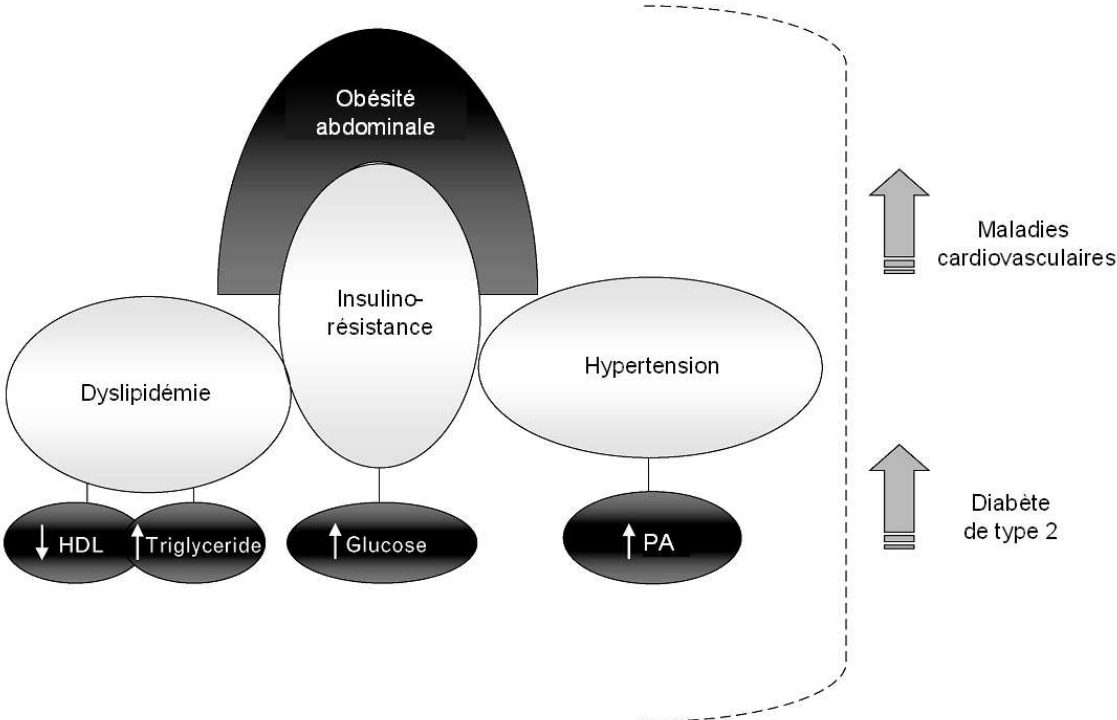
Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R *et al.* Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science.* 2004; **19**;306: 1383-1386.

Zimmet P, Alberti G, Kaufman F, Tajima N, Silink M *et al.* The metabolic syndrome in children and adolescents. *Lancet.* 2007; **369**: 2059-2061.

Zintzaras E, Kitsios G, Stefanidis I. Endothelial NO synthase gene polymorphisms and hypertension: a meta-analysis. *Hypertension.* 2006; **48**: 700-710.

Zitzer H, Wente W, Brenner MB, Sewing S, Buschard K *et al.* Sterol regulatory element-binding protein 1 mediates liver X receptor-beta-induced increases in insulin secretion and insulin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology.* 2006; **147**: 3898-3905.

Figure 1 : Composantes du syndrome métabolique et morbidité associée (adapté de Doria et al. 2008).



Les principaux phénotypes du syndrome métabolique sont l'obésité abdominale, la dyslipidémie, l'insulino-résistance et l'hypertension (PA : pression artérielle). La présence de ces phénotypes chez un individu augmente le risque de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2.

Figure 2 : Prévalence du syndrome métabolique dans différents pays selon les critères du NCEP (adapté de Cameron *et al.* 2004).

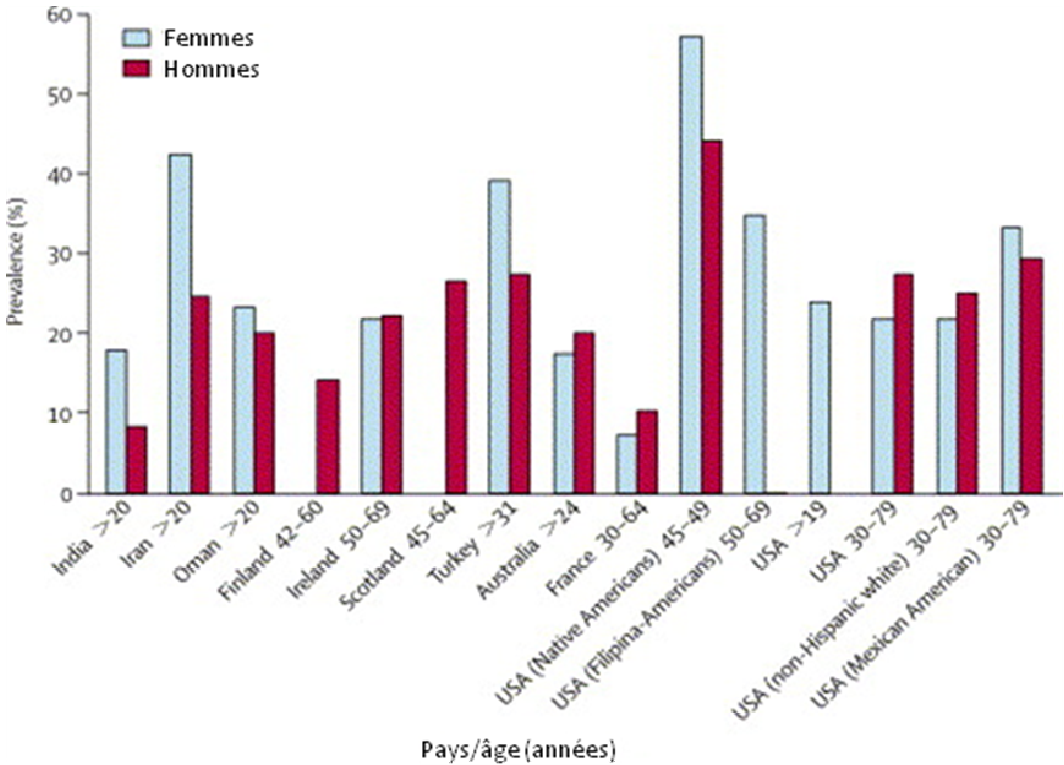
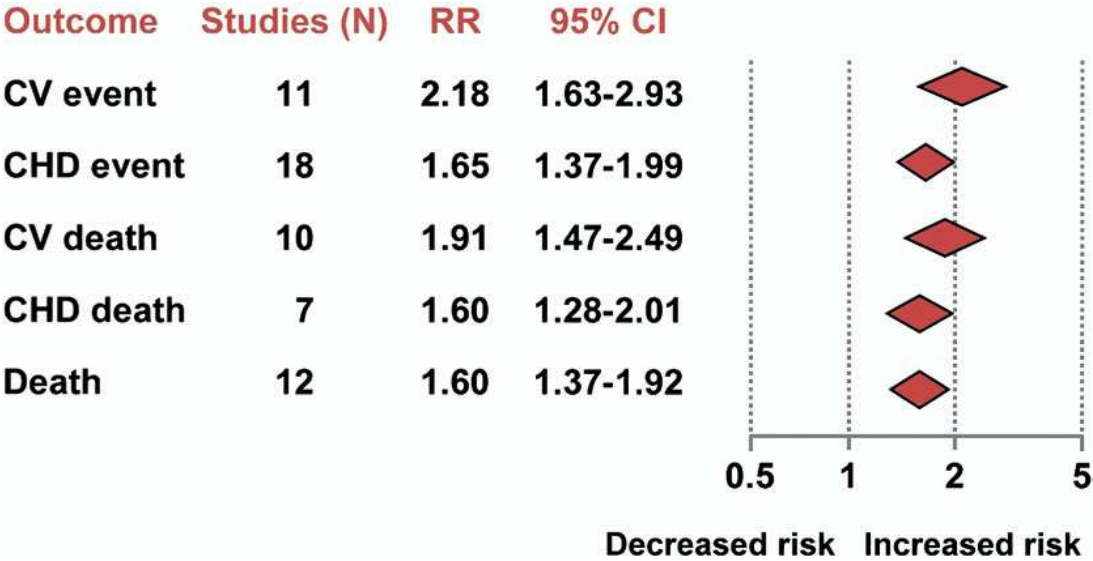
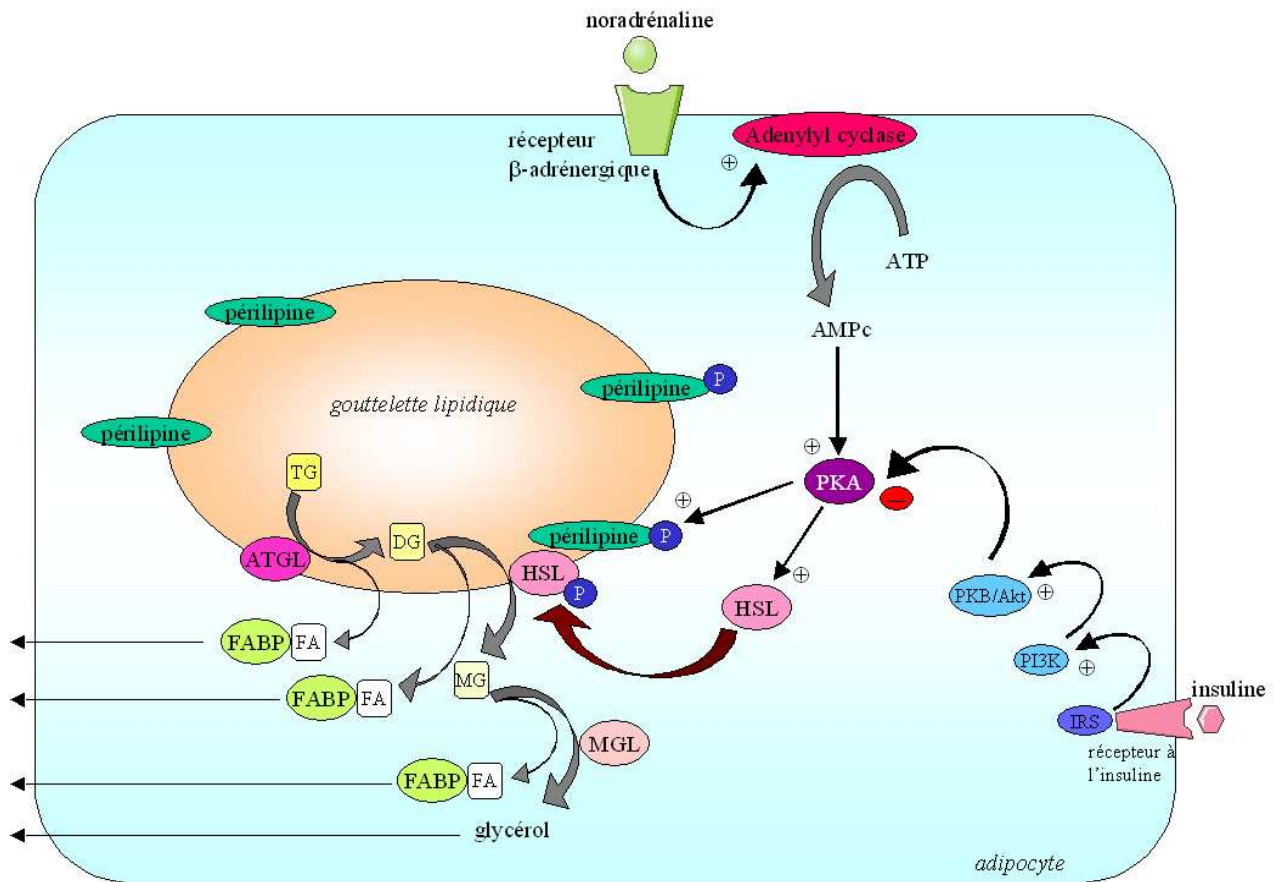


Figure 3 : Risque relatif et IC 95% de MCV et mortalité associé au syndrome métabolique (adapté de Gami *et al.* 2007).



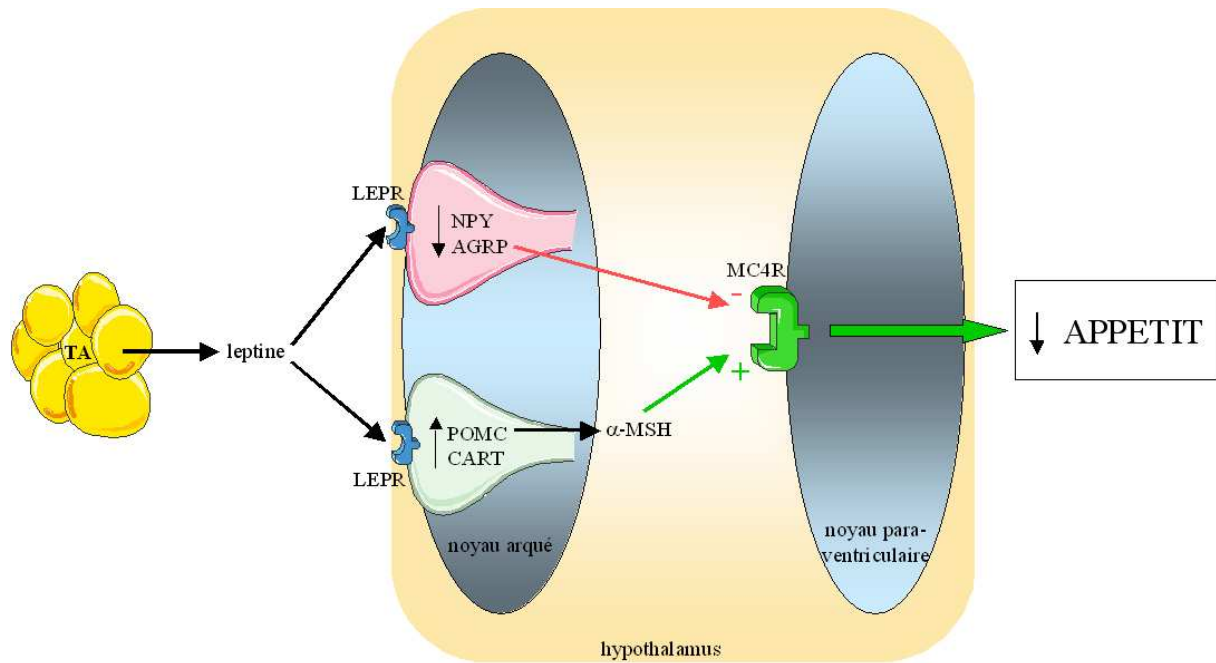
Les losanges représentent le pool des risques relatifs (RR) et l'intervalle de confiance (CI) à 95% des différentes études ayant analysé les conséquences (*outcome*) : maladie cardiovasculaire (*CV event*), maladie coronarienne (*CHD event*), et décès suite à ces maladies (*death*). Certaines études ont analysé plusieurs conséquences.

Figure 4 : Principaux acteurs de la lipolyse du tissu adipeux.



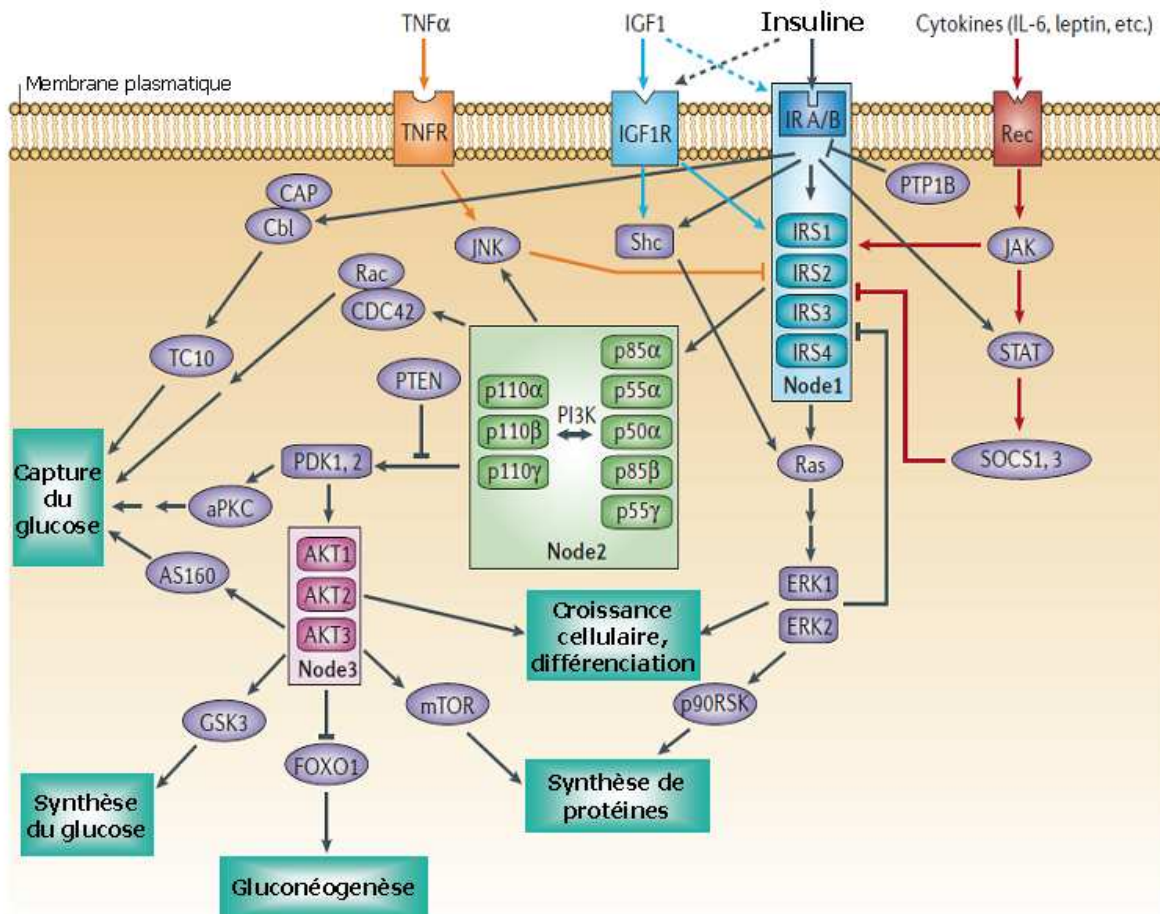
L'activation du récepteur β -adrénergique par la noradrénaline entraîne une conversion de l'ATP (adénosine triphosphate) en AMPc (adénosine monophosphate cyclique) par l'adénylyl cyclase. L'AMPc active la protéine kinase A (PKA) qui va alors phosphoryler la périlipine et la lipase hormono-sensible (HSL), permettant la translocation de la HSL vers la gouttelette lipidique. La lipase des triglycérides (TG) adipeux (ATGL) hydrolyse les TG en diglycérides (DG), eux-mêmes hydrolysés en monoglycérides (MG) par la HSL. La monoglycéride lipase (MGL) hydrolyse finalement les MG en glycérol. Chaque étape d'hydrolyse s'accompagne par une libération d'acides gras (FA) qui sont pris en charge par la *fatty acid-binding protein* (FABP) qui permet leur exportation. L'insuline inhibe la lipolyse, notamment en inhibant la PKA : l'activation des substrats du récepteur à l'insuline (IRS) active la phosphatidylinositol 3 phosphate kinase (PI3-K) qui va activer à son tour la protéine kinase B (PKB/Akt) entraînant une inhibition de la PKA.

Figure 5 : La voie leptine-mélanocortine.



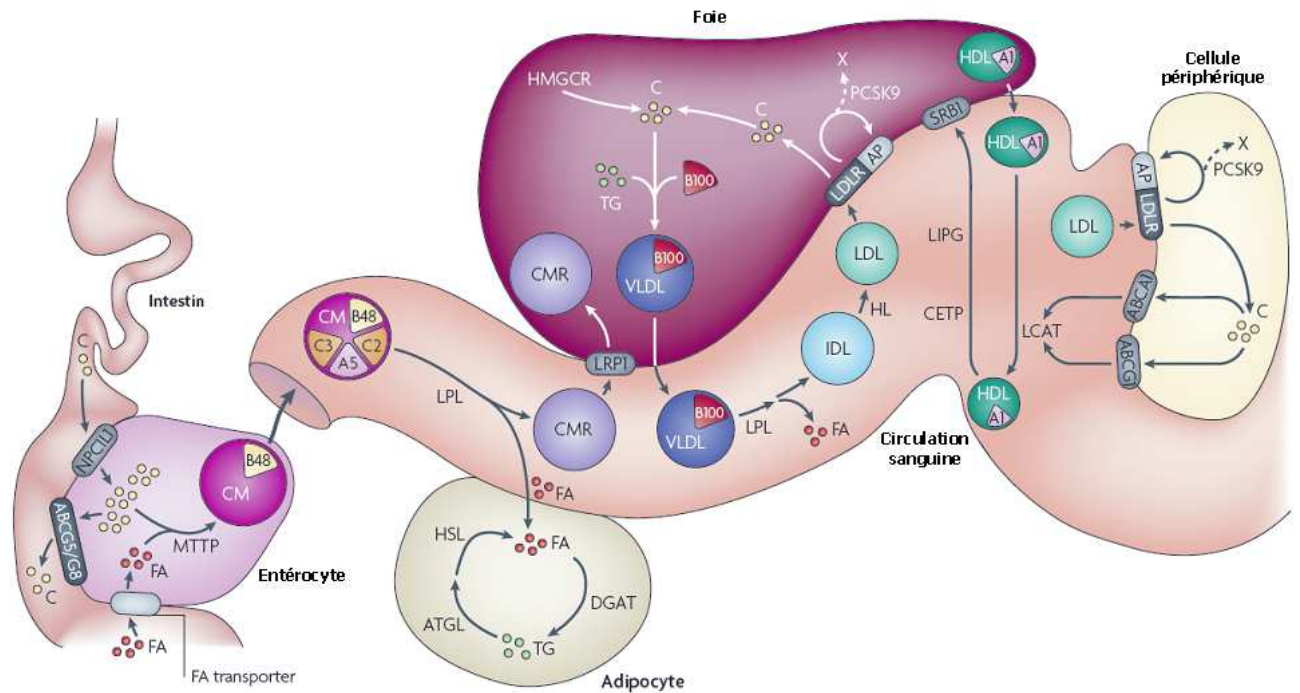
La leptine est sécrétée par le tissu adipeux (TA) et se fixe à son récepteur (LEPR) situé à la surface de 2 types de neurones de l'hypothalamus : un type produit le neuropeptide Y (NPY) et l'*Agouti-related protein* (AGRP) aux propriétés orexigènes et inhibant le récepteur 4 à la mélanocortine (MC4R) (inhibition symbolisée par une flèche rouge), l'autre type de neurones produit les peptides anorexigènes CART (*cocaine and amphetamine related transcript*) et POMC (proopiomélanocortine). Ce dernier, métabolisé en α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) active MC4R conduisant à une diminution de l'appétit.

Figure 6 : Voie de signalisation de l'insuline (d'après Taniguchi *et al.* 2006).



Le réseau de signalisation de l'insuline s'articule autour de nœuds critiques (*node*) en aval du récepteur de l'insuline (IR) (flèches noires) et du récepteur de l'*insulin growth factor-1* (IGF1R) (flèches bleues). Les voies de signalisation activées par les cytokines comme TNF α , IL-6 et la leptine, interfèrent dans la signalisation de l'insuline (flèches oranges et rouges). Trois nœuds sont importants dans la signalisation de l'insuline : le nœud des substrats de l'IR (IRS) 1-4 (Node 1), celui de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K) et de ses nombreuses sous-unités régulatrices et catalytiques (Node 2), et celui des isoformes AKT/protéine kinase B (PKB) (Node 3). Les produits en aval ou effecteurs intermédiaires ou modulateurs incluent l'atypique protéine kinase C (aPKC), le substrat Akt de 160 kDa (AS160), la Cas-Br-M *ecotropic retroviral transforming sequence homologue* (Cbl), la protéine associée à la Cbl (CAP), la *cell-division cycle 42* (CDC42), les kinases régulées par signal extracellulaire (ERK1 et ERK2), la *forkhead box O1* (FOXO1), la kinase de la glycogène synthase (GSK3), la Janus kinase (JAK), la c-Jun-N-terminal kinase (JNK), la cible de rapamycine de mammifère (mTOR), la kinase S6 de protéine ribosomale p90 (p90RSK), les kinases dépendantes du phosphoinositide (PDK1 et 2), l'homologue des phosphatase et tensine (PTEN), la protéine tyrosine phosphatase-1B (PTP1B), Ras, Rac, la protéine Src homologue-2 (Shc), le suppresseur de la signalisation de cytokines (SOCS), le transducteur de signal et activateur de la transcription (STAT), et l'homologue de RasARHQ (TC10).

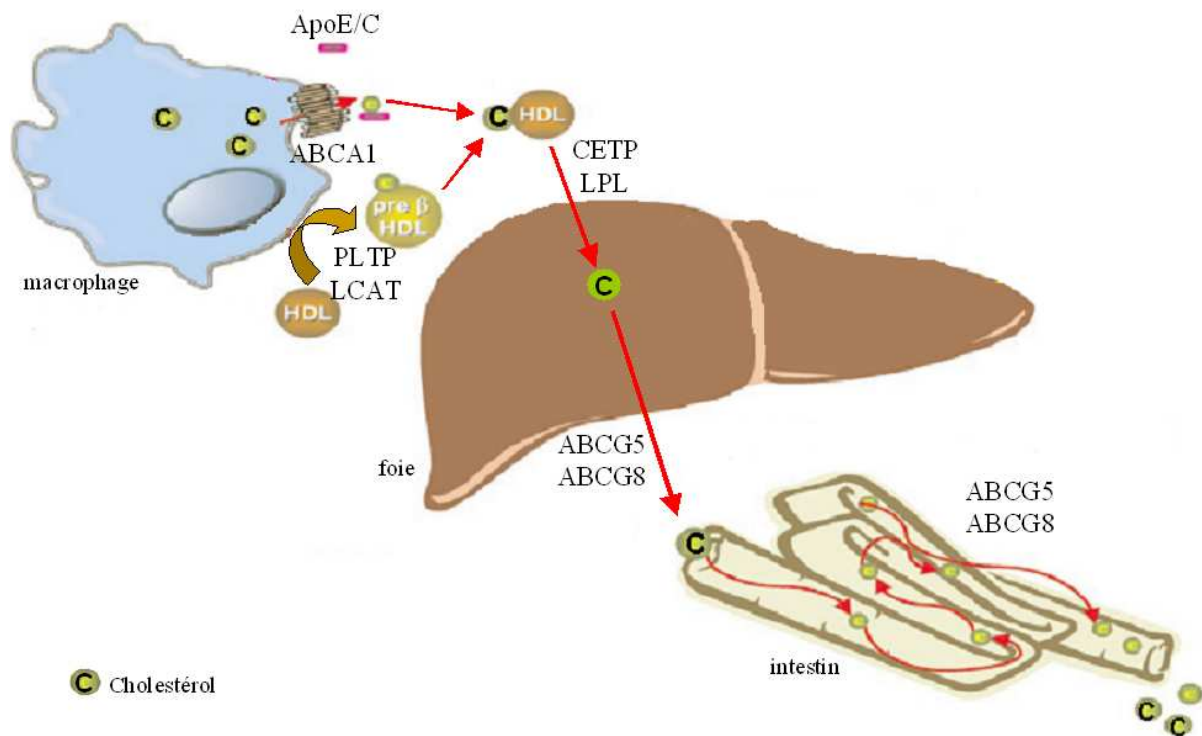
Figure 7 : Vue d'ensemble du métabolisme des TG et du cholestérol (d'après Hegele 2009).



Dans le métabolisme des triglycérides (TG), les graisses alimentaires sont hydrolysées en acides gras (FA) et entrent dans les entérocytes grâce à un transporteur (FA transporter). Les TG y sont alors reconstitués et emballés avec du cholestérol (C) et l'apolipoprotéine B48 dans les chylomicrons (CM) grâce à la protéine de transfert de TG microsomale (MTTP). Les CMs sont sécrétés via le système lymphatique, entrent dans la veine cave et circulent dans le sang. Les CMs contiennent les apolipoprotéines ApoA5 (A5), ApoC2 (C2) et ApoC3 (C3). Lorsqu'ils rencontrent la lipoprotéine lipase (LPL), des acides gras libres sont relargués et entrent en partie dans des cellules périphériques. Dans les adipocytes, des enzymes incluant l'acyltransférase acyl CoA:diacylglycerol (DGAT) re-synthétisent des TG, qui sont à leur tour hydrolysés par la lipase de TG adipocytaire (ATGL) et la lipase hormono-sensible (HSL). Les restes de CM (CMR) sont pris en charge par le récepteur hépatique au LDL (LDLR) ou par la *LDLR-related protein-1* (LRP1). Dans les hépatocytes, les TG sont emballés avec du cholestérol et l'ApoB100 dans les VLDL (*very low-density lipoprotein*). Les TG contenus dans les VLDL sont hydrolysés par la LPL en IDL, eux mêmes hydrolysés par la lipase hépatique (HL) en LDL.

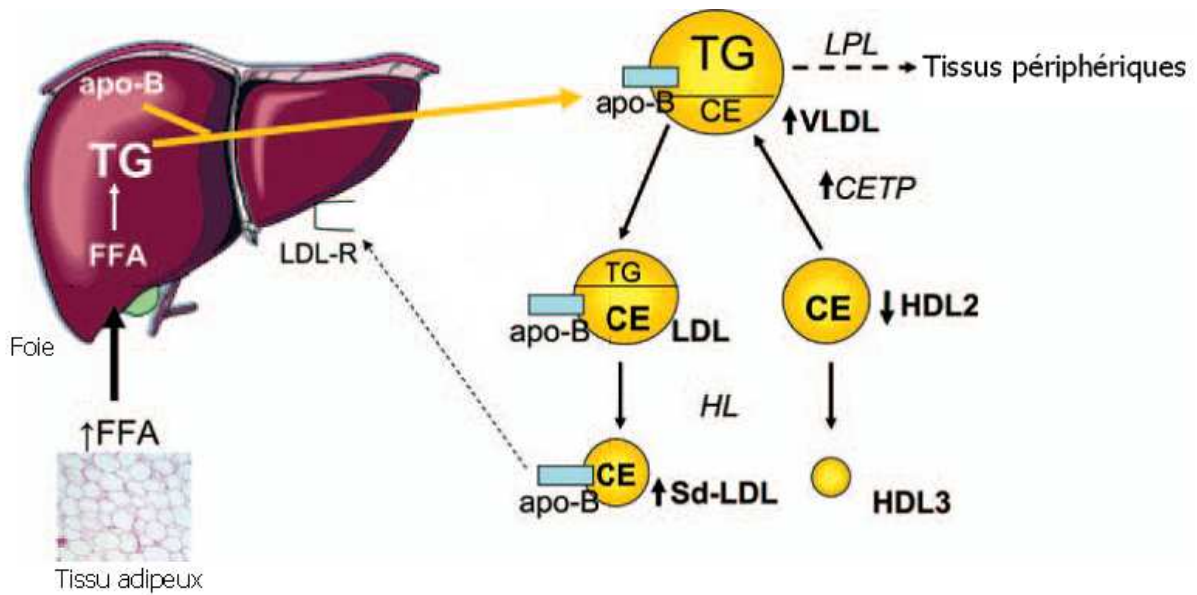
Dans le métabolisme du cholestérol, les stérols de la lumière intestinale sont captés par les entérocytes grâce au transporteur Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), tandis que les transporteurs à *ATP-binding cassette* G5 et G8 (ABCG5/G8) en relarguent. Dans les entérocytes, le cholestérol est emballé avec les TG dans les CMs. Dans les hépatocytes, le cholestérol est recyclé ou synthétisé de novo par la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl coenzyme A réductase (HMGCR). Les LDL transportent le cholestérol du foie à la périphérie. Les LDL sont captés par les cellules périphériques et le foie par le LDLR, assisté d'une protéine adaptatrice (AP). La protéine convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) court-circuite le recyclage du LDLR entraînant sa dégradation (X). Les lipoprotéines HDL permettent le transport inverse du cholestérol en interagissant avec les transporteurs ABCA1 et G1. La lécithine-cholestérol acyltransférase (LCAT) estérifie le cholestérol permettant son incorporation dans les HDL. Les HDL sont remodelés par la protéine de transfert des ester de cholestérol (CETP) et la lipase endothéliale (LIPG) et entrent dans les hépatocytes grâce au *scavenger receptor class B type I* (SRB1).

Figure 8 : Schéma représentant le transport inverse du cholestérol.



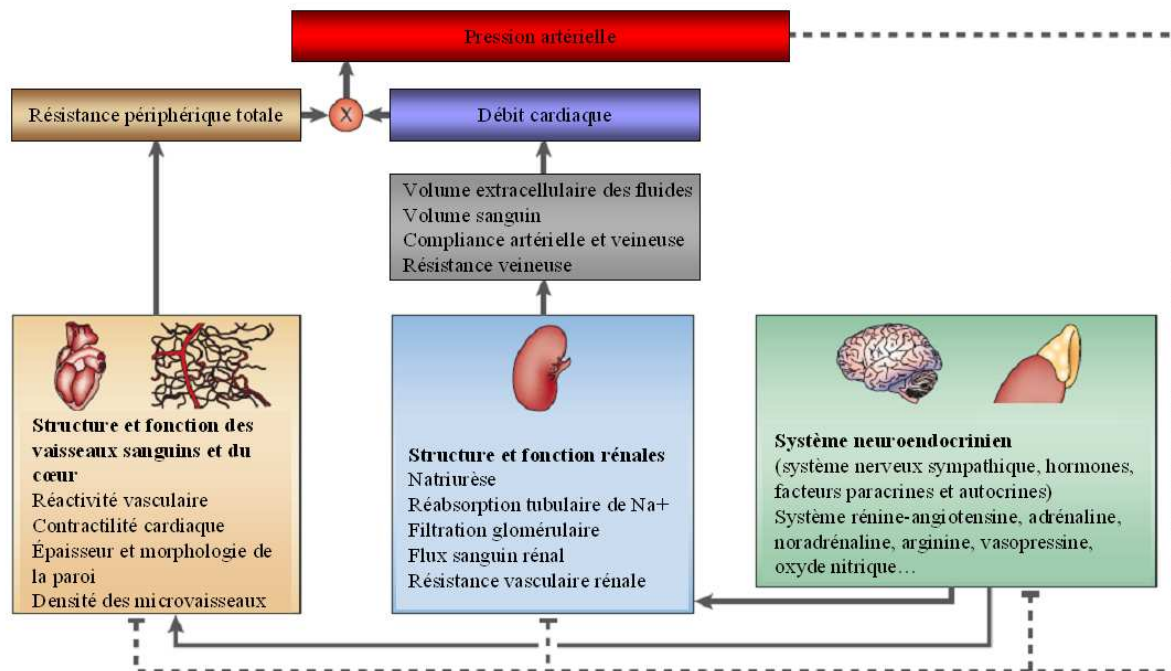
La première étape du transport inverse du cholestérol consiste en l'efflux du cholestérol des cellules périphériques (macrophages). Le transporteur ABCA1 (ATP-binding cassette A1) facilite l'efflux du cholestérol vers les HDL pré-matûres grâce à la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) et la protéine de transfert de phospholipides (PLTP). La protéine de transfert des esters de cholestérol (CETP) et la LPL facilitent l'incorporation du cholestérol dans les cellules hépatiques. Dans le foie, le cholestérol est métabolisé en acides biliaires et excrété dans les intestins où il sera éliminé par le transit.

Figure 9 : Remodelages des lipoprotéines associés au syndrome métabolique (adapté de Aguilera *et al.* 2008).



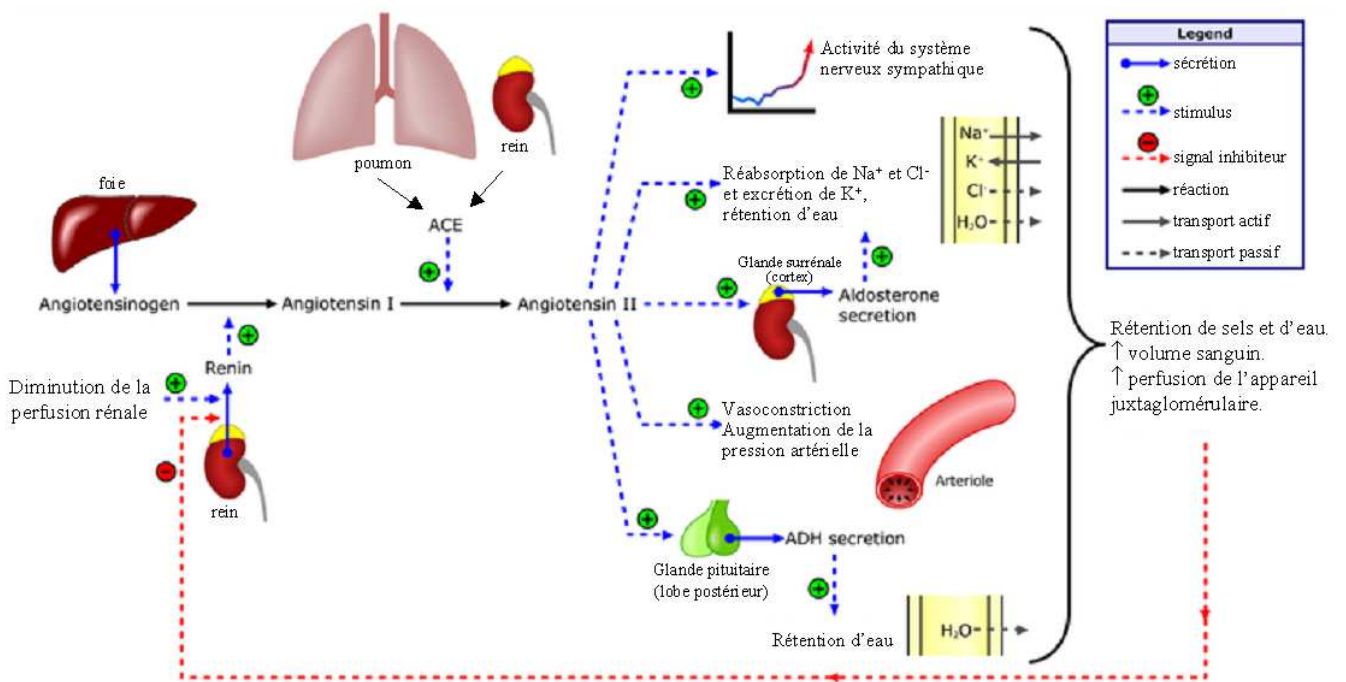
L'augmentation du flux d'acides gras libres (FFA) stimule la synthèse des triglycérides (TG) et d'ApoB dans le foie, et ainsi, l'assemblage et la sécrétion de VLDL. En cas d'insulinorésistance, la clairance des VLDL diminue, entraînant une augmentation du taux de VLDL et de leur taille, ainsi que les échanges de TG vers les LDL et les HDL contre du cholestérol estérifié (CE). Les LDL sont alors hydrolysées par la lipase hépatique (HL), aboutissant à la formation de petites LDL denses (sdLDL). Les HDL sont hydrolysées par la lipase hépatique, entraînant une diminution de la concentration en HDL de grande taille (HDL2).

Figure 10 : Mécanismes de la régulation de la pression artérielle (adapté de Cowley, Jr. 2006).



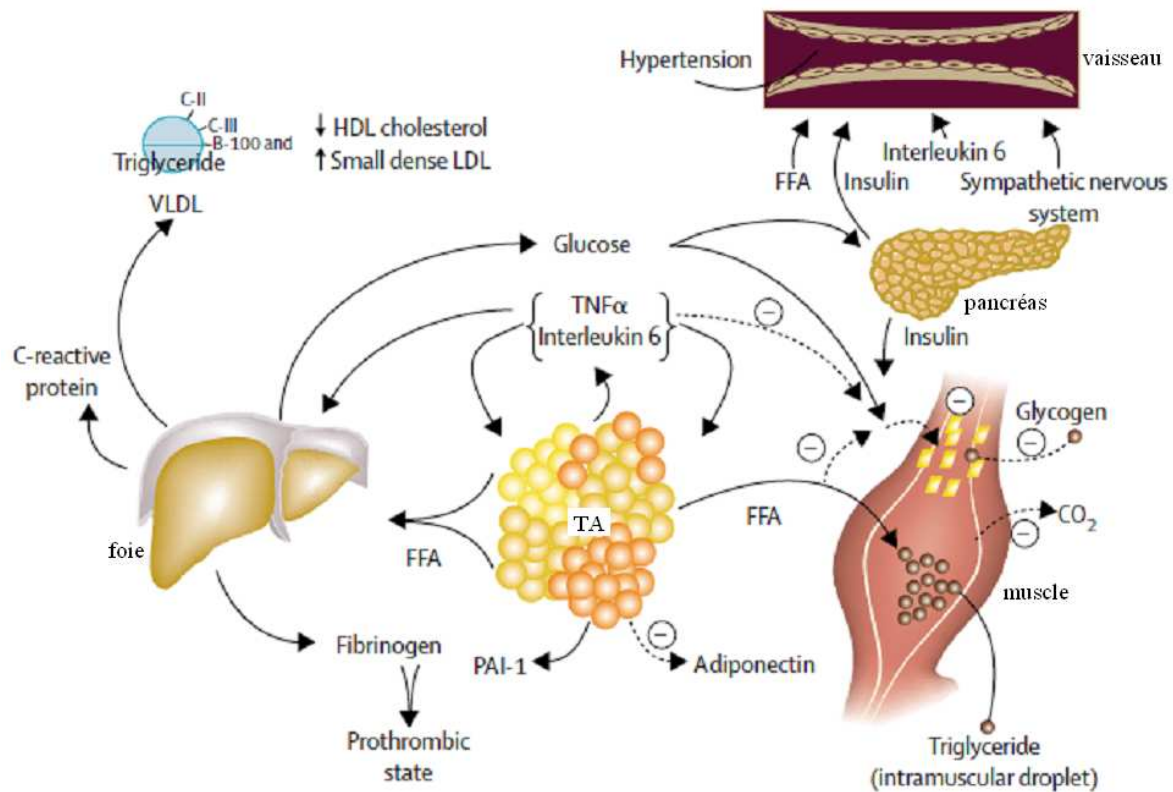
La pression artérielle est le produit du débit cardiaque par la résistance périphérique totale. Le débit cardiaque est déterminé par des relations complexes entre le volume sanguin, la compli-ance et la résistance des vaisseaux. La résistance périphérique totale est déterminée par la structure et les fonctions des vaisseaux. Les facteurs neuroendocriniens ont un impact important sur les fonctions vasculaires et rénales. Il existe une autorégulation (lignes en pointillé) grâce à des détecteurs de la pression artérielle qui envoient des signaux régulant les fonctions neuroendocriniennes, rénales et vasculaires.

Figure 11 : Le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS).



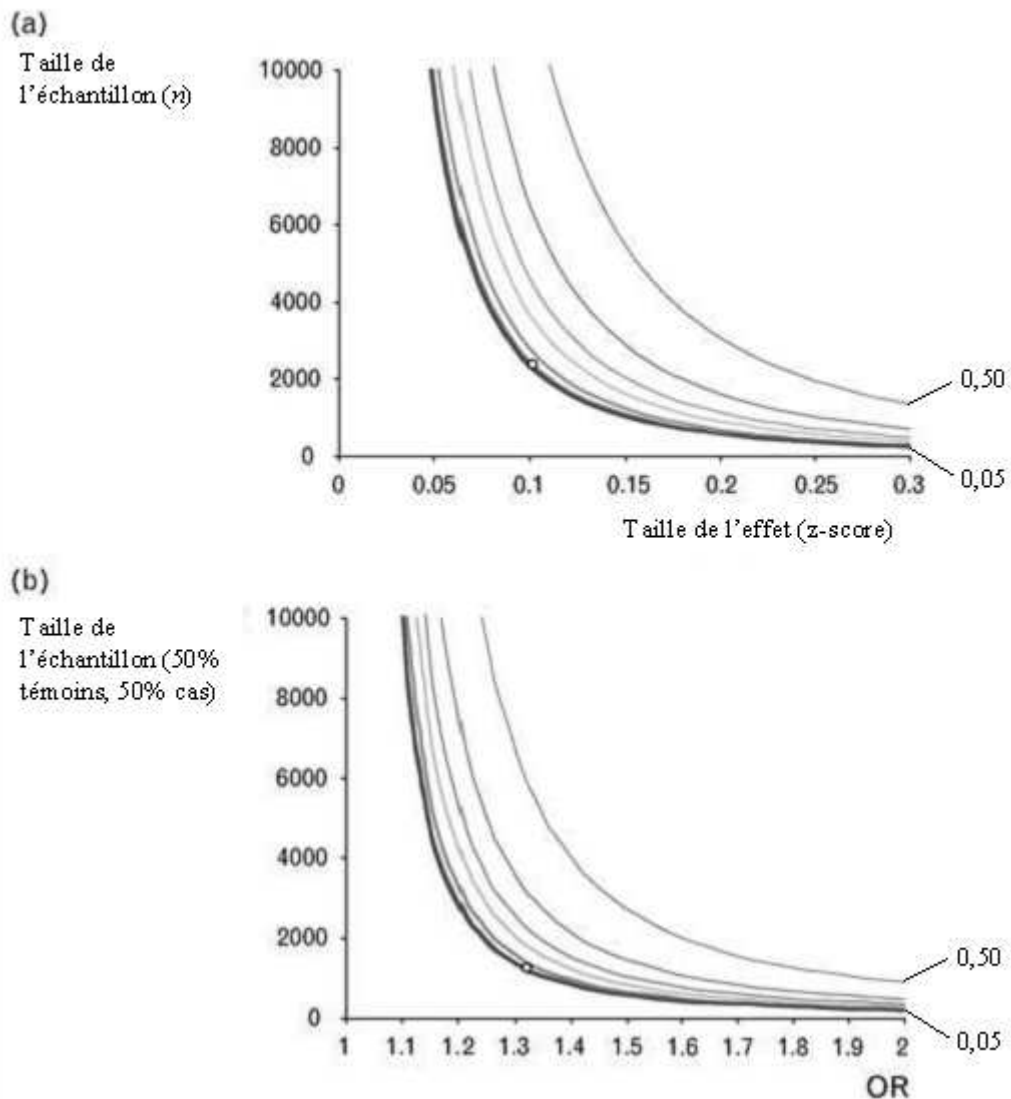
Quand le volume sanguin diminue, les reins sécrètent la rénine qui clive l'angiotensinogène en angiotensine I, qui sera à son tour clivée en angiotensine II par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). L'angiotensine II exerce un effet vasoconstricteur et provoque une augmentation de la pression sanguine en stimulant le système nerveux sympathique et la sécrétion d'aldostérone et de vasopressine (ou *anti-diuretic drug*, ADH), et ainsi la réabsorption de sels et la rétention d'eau.

Figure 12 : Pathophysiologie du syndrome métabolique et de l'insulinorésistance (adapté de Eckel *et al.* 2005).



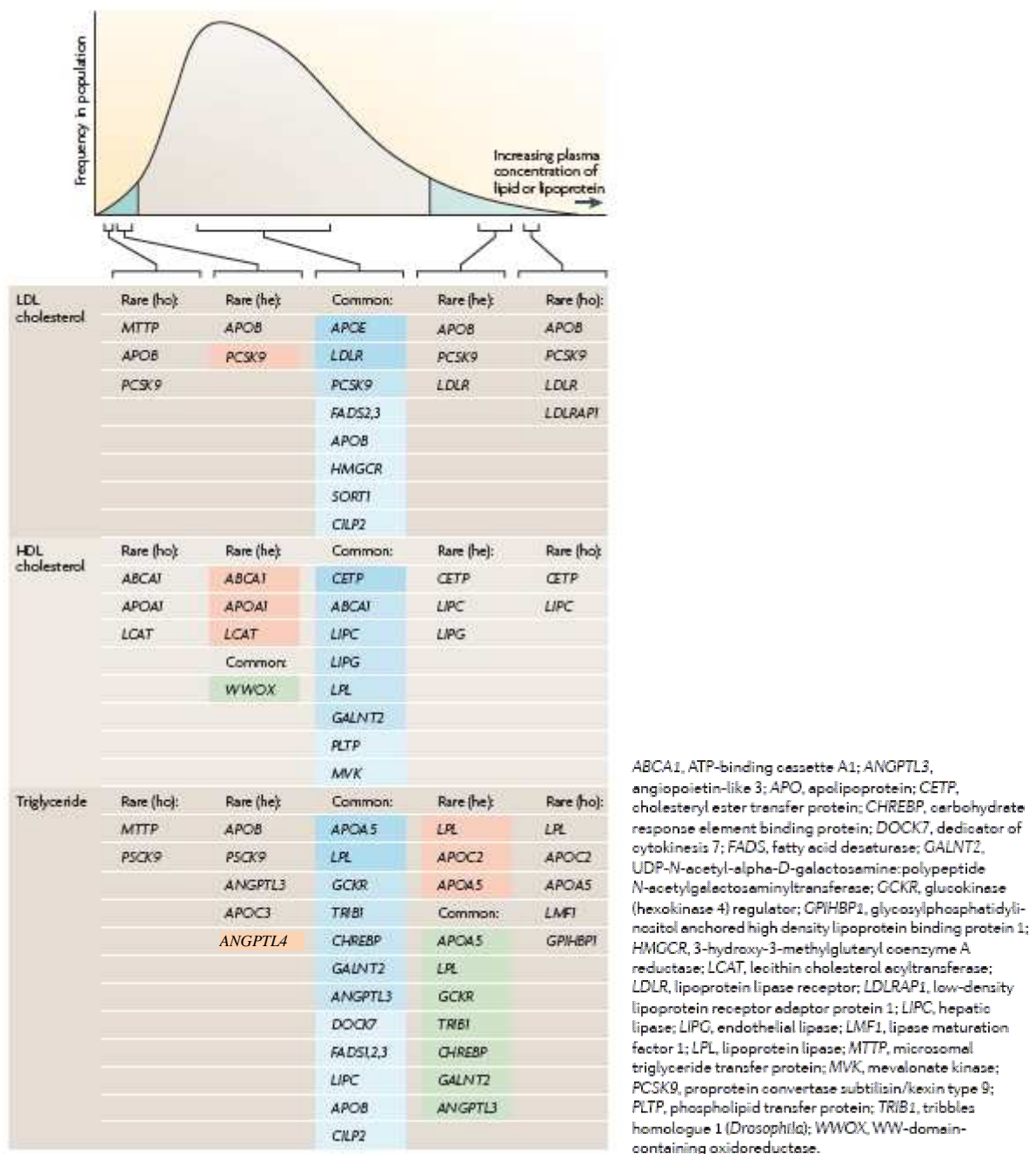
Des AGL (FFA) sont libérés en abondance du tissu adipeux (TA) hypertrophié. Dans le foie, les AGL augmentent la production de glucose et de TG et la sécrétion de VLDL, entraînant une diminution du taux de HDL-cholestérol et une augmentation des LDL denses et de petite taille (sdLDL). Les AGL réduisent la sensibilité à l'insuline dans les muscles et inhibent ainsi l'incorporation cellulaire du glucose. Les perturbations associées à ce processus sont une réduction de la compartimentation du glycogène et une augmentation intramusculaire de lipides (*intramuscular droplet*). L'augmentation de la glycémie et des AGL circulants accroît la sécrétion d'insuline dans le pancréas. L'hyperinsulinémie ainsi engendrée peut stimuler la réabsorption du sodium dans les reins, et augmenter l'activité du système nerveux sympathique, et ainsi contribuer à l'HTA. Les AGL pourraient aussi contribuer à l'HTA de cette manière. De plus, la sécrétion de cytokines comme TNF α et IL-6 par le TA aggrave la résistance à l'insuline et la lipolyse. IL-6 et d'autres cytokines augmentent aussi dans la circulation et pourraient accroître la production de glucose et de VLDL dans le foie et aggraver l'insulinorésistance dans les muscles. Les cytokines et les AGL induisent la production de fibrinogène et de PAI-1 dans le foie, en complément de la surproduction de PAI-1 dans le TA, aboutissant ainsi à un état prothrombotique. Enfin, une diminution de la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'adiponectine est également observée chez les individus ayant un syndrome métabolique ou une insulinorésistance.

Figure 13 : Relation entre taille de l'échantillon et effet escompté (z-score et OR) (adapté de Li *et al.* 2008).



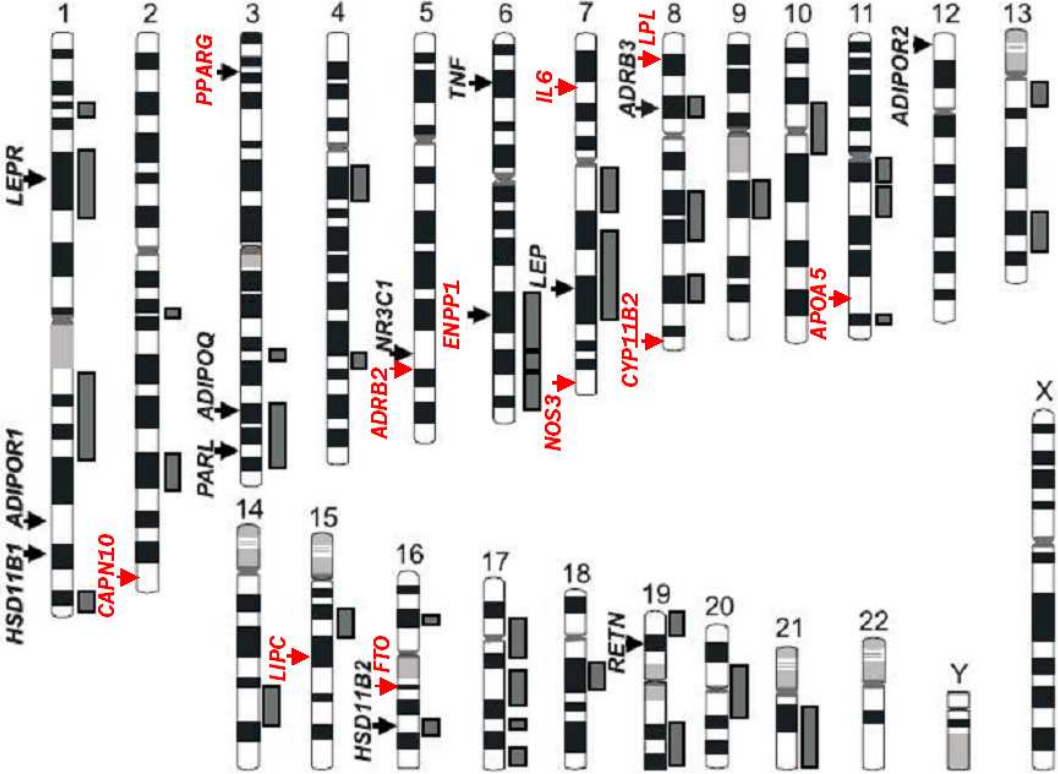
La figure représente la relation entre la taille de l'échantillon et la taille de la déviation par allèle (z-score) en (a), et le risque associé à chaque allèle (OR) en (b), selon une puissance de 80% et un seuil significatif à 1%, en fonction de différentes fréquences alléliques représentées par un gradient de gris (0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 et 0,5). Le petit cercle correspond à une fréquence allélique de 40%, une déviation de 0,10, et un OR de 1,32, comparable au SNP rs9939609 du gène *FTO* associé au BMI et au risque d'obésité [Frayling *et al.* 2007].

Figure 14 : Facteurs génétiques associés au taux plasmatique de lipides (adapté de Hegele 2009).



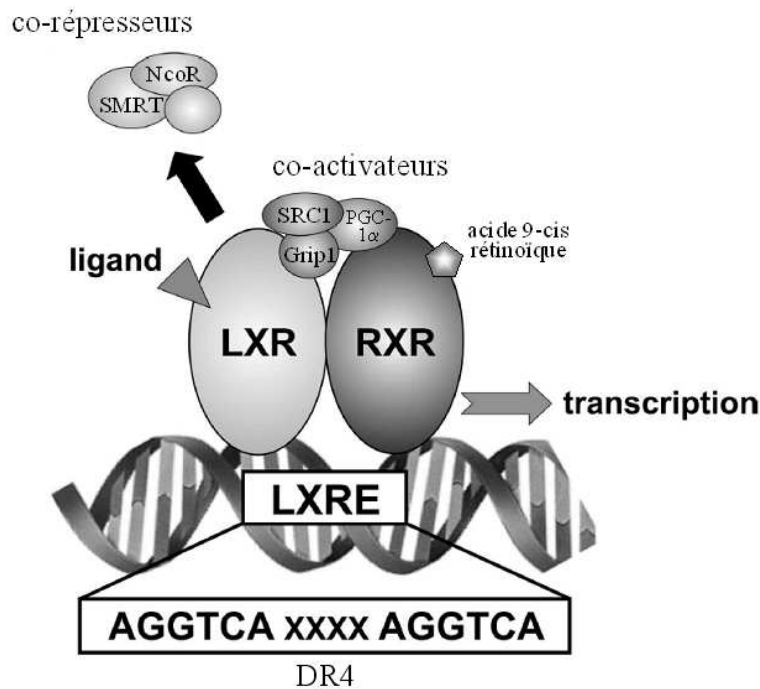
Le graphe représente la distribution des lipides dans la population : le taux plasmatique (x) en fonction de la fréquence (y). En-dessous du graphe sont représentés les gènes déterminant le taux de lipoprotéine pour chaque segment de la distribution. Les gènes non surlignés ont été identifiés par des approches de génétique classique, les gènes identifiés par séquençage sont surlignés en orange, et ceux surlignés en bleu, par les GWAS. ho : homozygote, he : hétérozygote.

Figure 15 : Localisation de gènes et de régions chromosomiques associés au syndrome métabolique (adapté de Teran-Garcia *et al.* 2007).



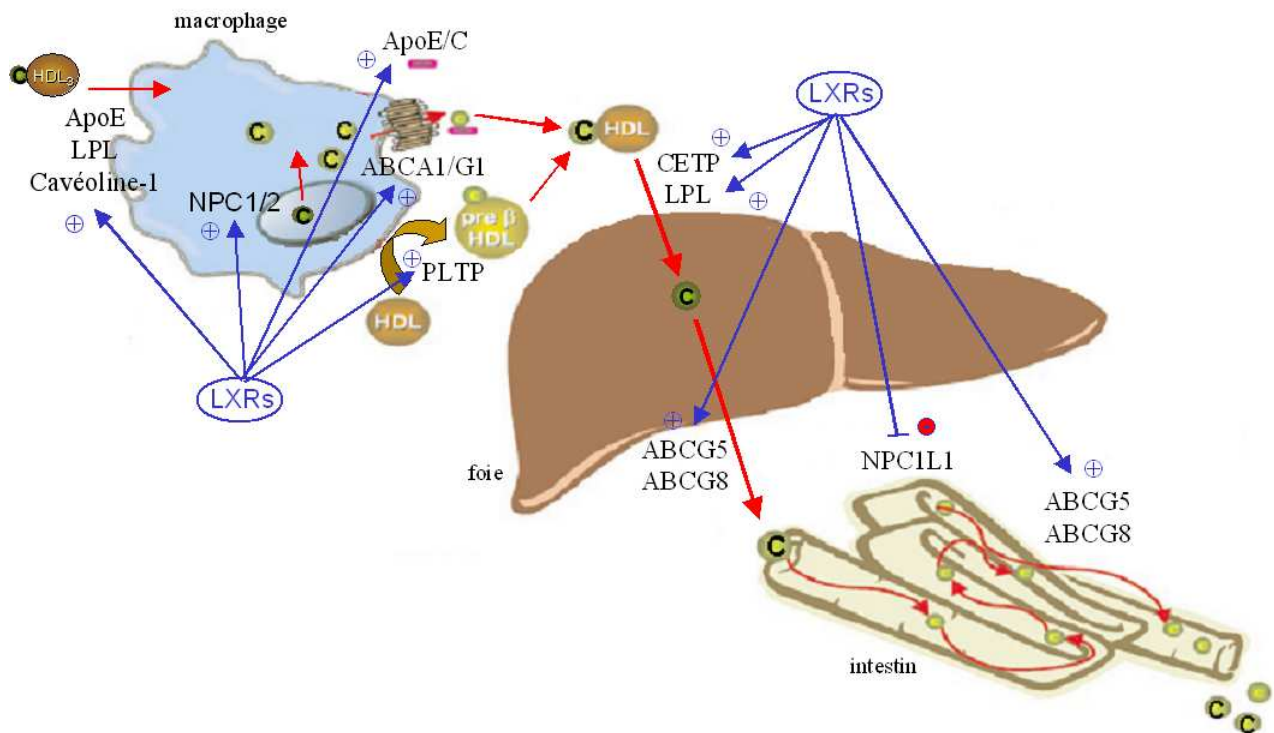
Les rectangles situés à droite de chaque chromosome représentent les QTLs liés au syndrome métabolique (selon Teran-Garcia & Bouchard [Teran-Garcia *et al.* 2007]). Les gènes qui semblent être associés de manière cohérente au syndrome métabolique sont représentés en rouge.

Figure 16 : Mécanismes de régulation transcriptionnelle des LXR (adapté de Baranowski 2008).



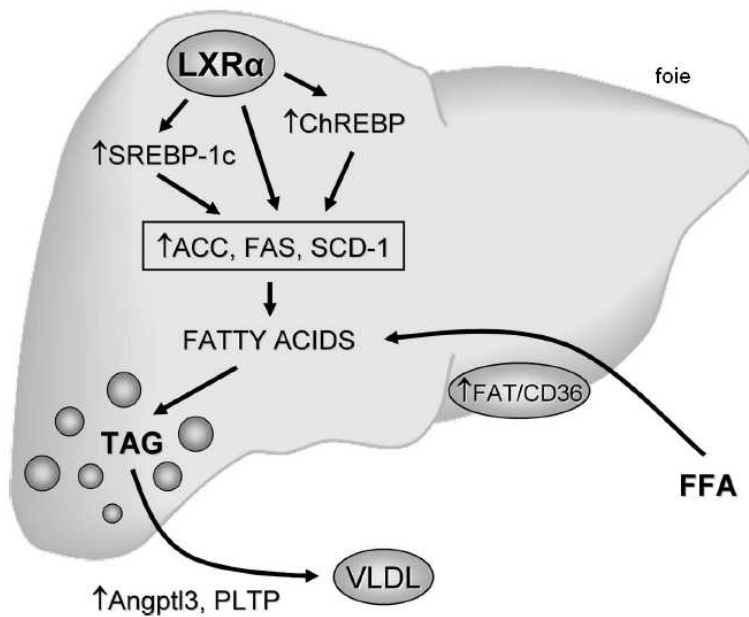
A l'état basal et en l'absence de ligand, les *liver X receptors* (LXR) et le *retinoid X receptor* (RXR) forment un hétérodimère reconnaissant spécifiquement le *LXR-response element* (LXRE) situé dans le promoteur du gène cible. LXR/RXR réprime alors activement la transcription du gène en recrutant des co-répresseurs, tels que le co-répresseur de récepteur nucléaire (NcoR) et le facteur SMRT (*silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptors*). La fixation d'un ligand induit un changement conformationnel de l'hétérodimère, entraînant le remplacement des co-répresseurs par des co-activateurs comme le co-activateur du récepteur stéroïdien (SRC-1), Grip1 (un co-activateur de la famille p160) ou le PPAR γ co-activateur-1 α (PGC1 α) activant ainsi la transcription du gène cible.

Figure 17 : LXRs et transport inverse du cholestérol.



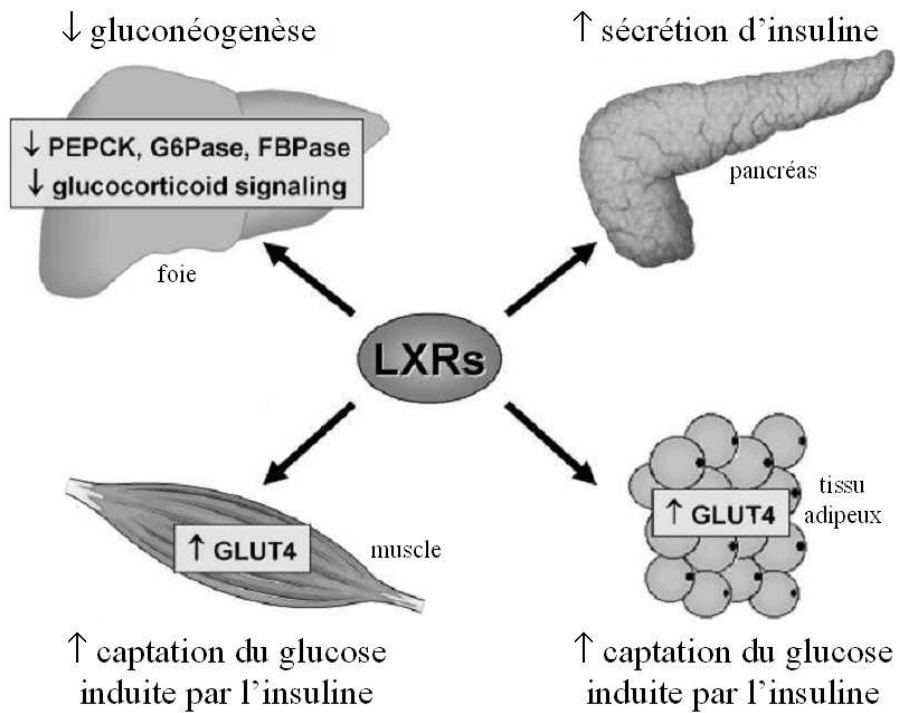
Dans les macrophages, l'activation des LXRs augmente la captation sélective du cholestérol des HDLs, via l'induction de l'expression des gènes de l'apolipoprotéine E (ApoE), de la lipoprotéine lipase (LPL) et de la Cavéoline-1. Les LXRs stimulent l'expression des gènes Niemann Pick C (NPC1 et NPC2), favorisant la mobilisation du cholestérol intracellulaire, et l'expression du transporteur ATP-binding cassette (ABC)-A1 permettant l'efflux du cholestérol vers les HDLs ou les apolipoprotéines E et C. Ils activent également l'expression des gènes codant la protéine de transfert des lipoprotéines (PLTP) et la protéine de transfert d'esters de cholestérol (CETP) facilitant ainsi le remodelage des particules lipoprotéiques et leur entrée dans le foie. Ils induisent l'expression des gènes codant les transporteurs ABCG5 et ABCG8 dans le foie, permettant l'excrétion du cholestérol vers la bile, et dans l'intestin, ce qui, en complément de l'inhibition de l'expression du gène Niemann Pick C1 like 1 (NPC1L1), inhibe l'absorption intestinale de cholestérol et favorise ainsi son élimination par les selles.

Figure 18 : LXR α et lipogénèse hépatique (d'après Baranowski 2008).



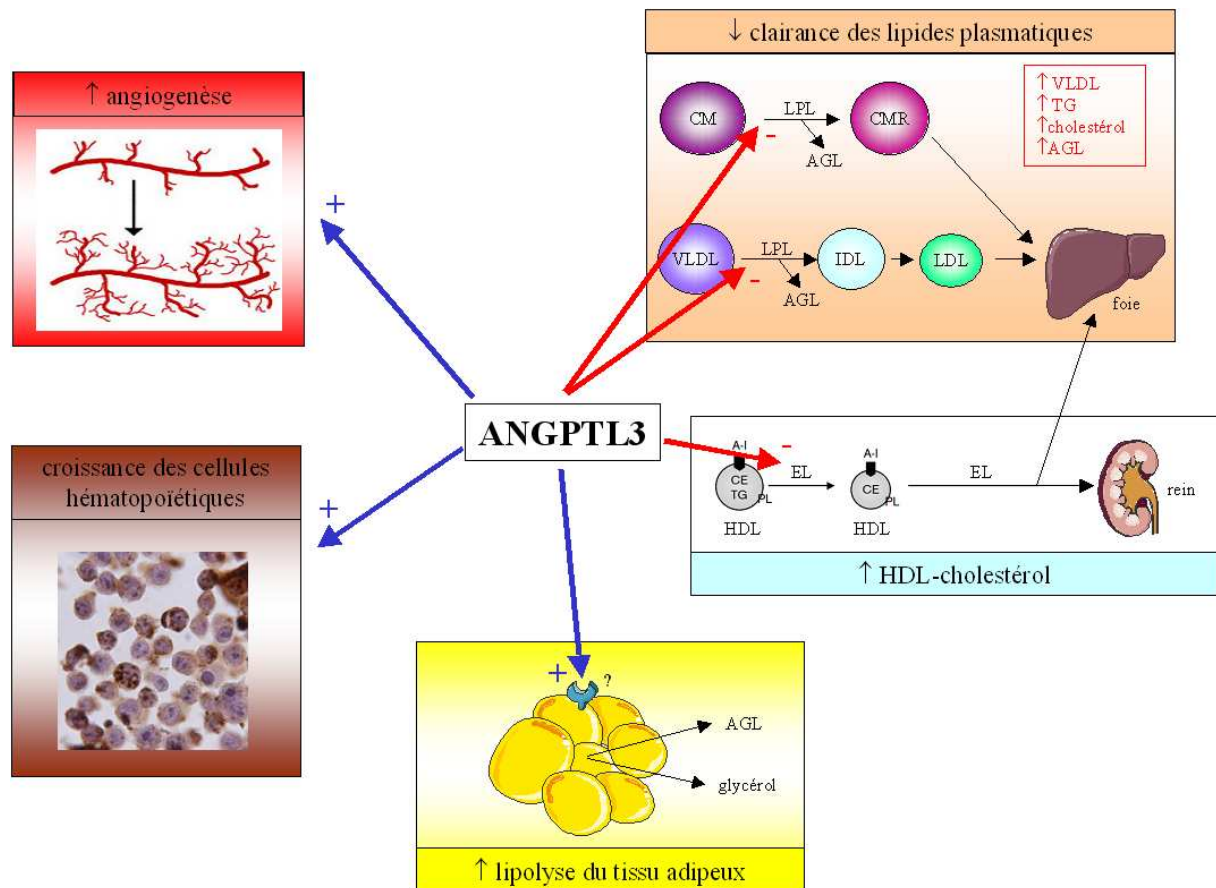
LXR α induit l'expression de la *sterol response element binding protein* (SREBP1c) et de la *carbohydrate response element binding protein* (ChREBP). L'expression des gènes lipogéniques codant l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'enzyme de synthèse des AG (FAS) et la stéaroyl-CoA désaturase (SCD) est activée par LXR α , SREBP1c et ChREBP. Ces 3 enzymes synthétisent les acides gras (*fatty acids*) qui seront assemblés en triglycérides (TAG), sécrétés dans les particules VLDL. LXR α favorise aussi cette sécrétion par l'activation de l'expression des gènes codant la protéine de transfert des lipoprotéines (PLTP) et l'*angiopoietin-like protein 3* (ANGPTL3). LXR α active aussi l'expression du gène FAT/CD36 permettant la captation des acides gras libres (FFA) du plasma vers le foie.

Figure 19 : LXR_s et métabolisme du glucose (d'après Baranowski 2008).



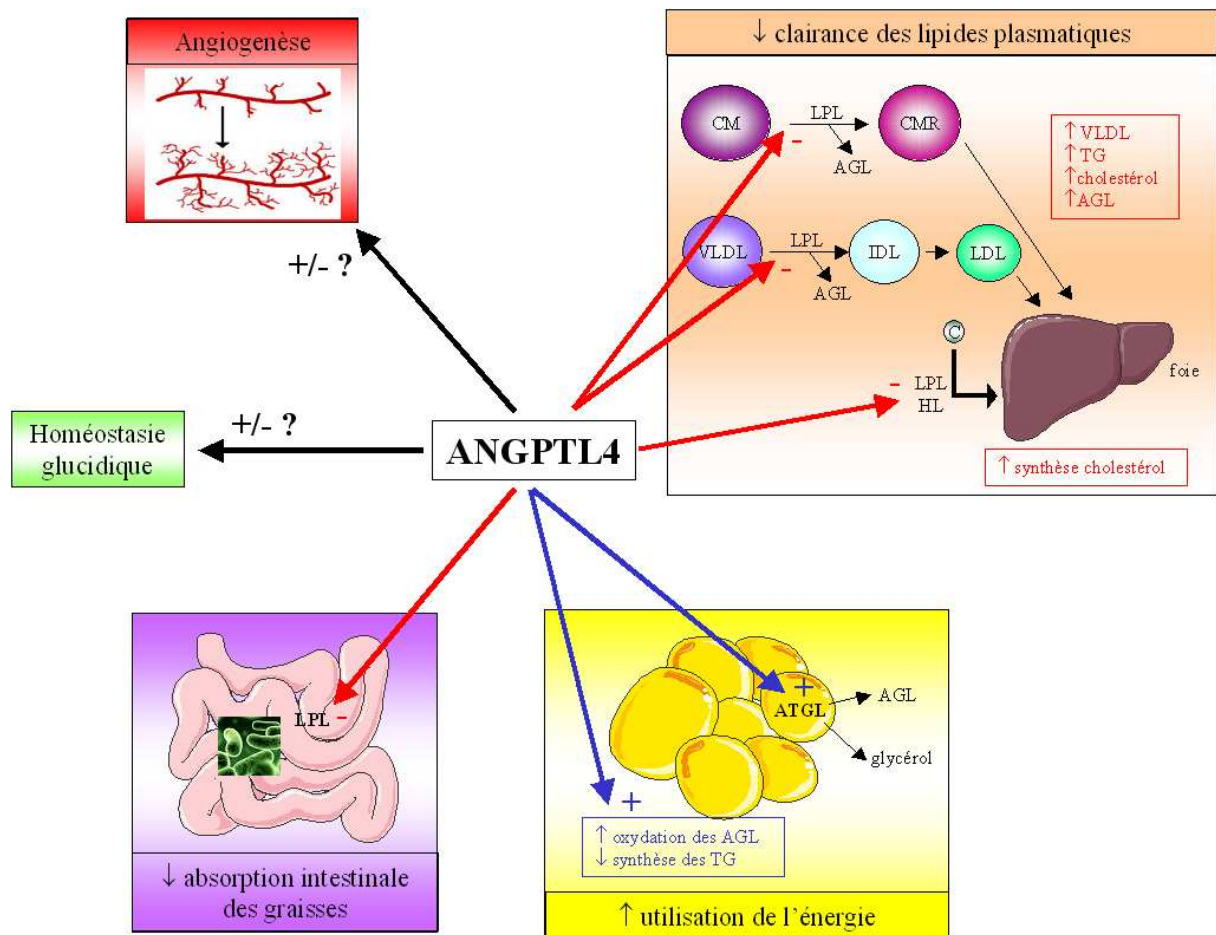
Les LXR_s inhibent la gluconéogenèse hépatique en inhibant l'expression des gènes codant les enzymes phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), la glucose-6-phosphatase (G6Pase) et la fructose-1,6-biphosphatase (FBPase). Cet effet pourrait être médié par l'inhibition de la voie de signalisation des glucocorticoïdes. Les LXR_s pourraient aussi augmenter l'utilisation du glucose en périphérie en augmentant l'expression du transporteur GLUT4 dans les muscles et les adipocytes. Enfin, les LXR_s stimuleraient la sécrétion d'insuline dans la pancréas.

Figure 20 : Fonctions d'ANGPTL3.



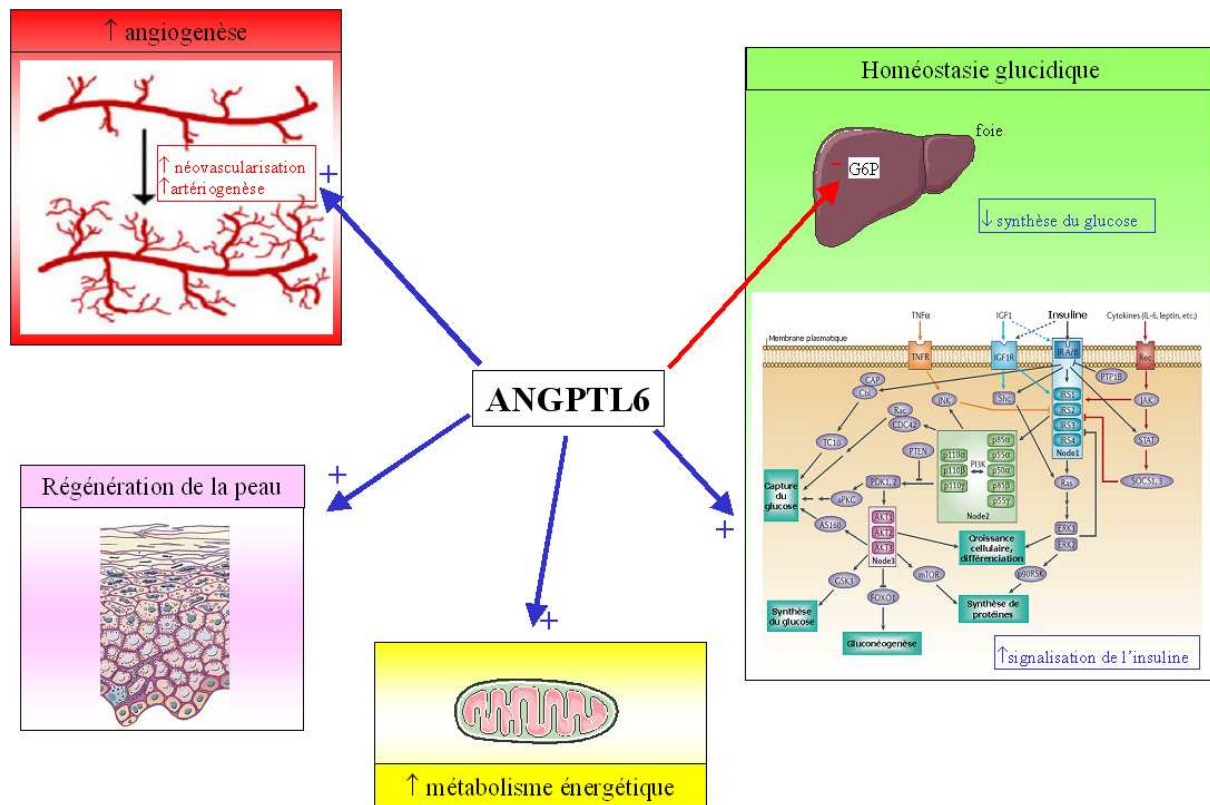
ANGPTL3 induit l'angiogenèse et la croissance des cellules hématopoïétiques. Elle stimule la lipolyse du tissu adipeux entraînant ainsi une libération d'acides gras libres (AGL) et de glycérol. Elle exerce un effet délétère sur le métabolisme des lipides en inhibant la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse, d'une part, les chylomicrons (CM) en *chylomicrons remnants* (CMR), et d'autre part, les VLDL en IDL, conduisant ainsi à une augmentation des taux plasmatiques de VLDL, triglycérides (TG), cholestérol et AGL. ANGPTL3 inhibe la lipase endothéliale (EL) impliquée dans le remodelage des lipoprotéines HDL (CE : cholestéryl ester, PL : phospholipides, A-I : ApoA1) et est ainsi corrélée au taux plasmatique de HDL-cholestérol.

Figure 21 : Fonctions d'ANGPTL4.



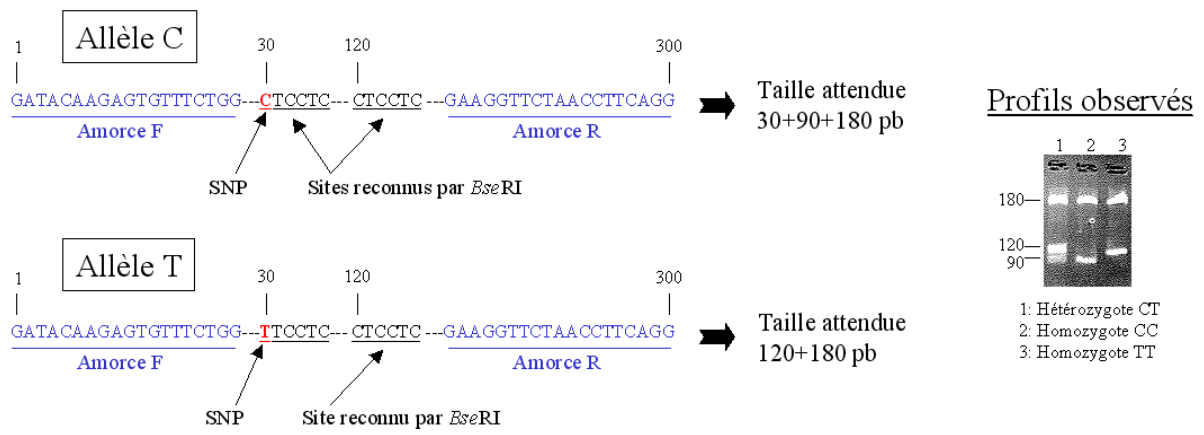
ANGPTL4 exerce un effet délétère sur le métabolisme des lipides en inhibant la lipoprotéine lipase (LPL) qui hydrolyse, d'une part, les chylomicrons (CM) en *chylomicrons remnants* (CMR), et d'autre part, les VLDL en IDL, conduisant ainsi à une augmentation des taux plasmatiques de VLDL, triglycérides (TG), cholestérol et AGL. ANGPTL4 inhibe aussi la lipase hépatique (HL) qui, avec la LPL, permet la capture de cholestérol (C) par le foie, entraînant ainsi une augmentation de la synthèse de cholestérol. Au contraire, ANGPTL4 exerce un effet bénéfique sur l'adiposité puisqu'elle stimule la lipase du tissu adipeux (ATGL), l'oxydation des AGL et inhibe la synthèse des TG, favorisant ainsi l'utilisation de l'énergie. ANGPTL4 inhibe également l'absorption intestinale des lipides en inhibant la LPL de l'intestin. Son rôle dans l'angiogenèse et l'homéostasie glucidique reste à éclaircir.

Figure 22 : Fonctions d'ANGPTL6.



ANGPTL6 exerce des effets pro-angiogéniques en induisant la néovascularisation et l'artériogénèse. Elle favorise la régénération de la peau en stimulant la croissance des kératinocytes et des fibroblastes. Son rôle dans l'homéostasie glucidique est également bénéfique puisqu'elle inhibe la production de la glucose-6-phosphatase, empêchant ainsi la gluconéogenèse, et elle améliore la signalisation de l'insuline (via IRS-1, PI3-K et FoxO1). Elle augmenterait également les dépenses énergétiques.

Figure 23 : Exemple de génotypage par RFLP.



Création d'un site de restriction par amorce dégénérée :

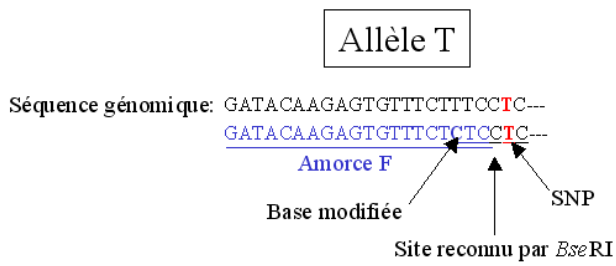
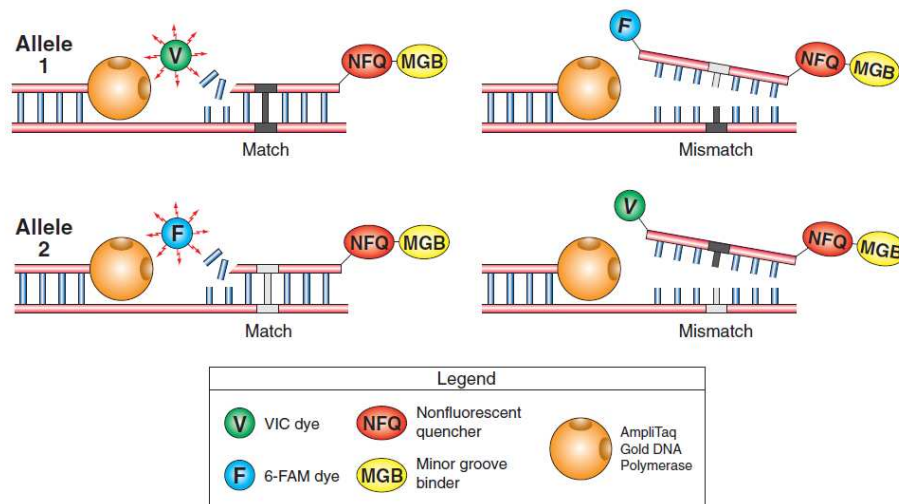


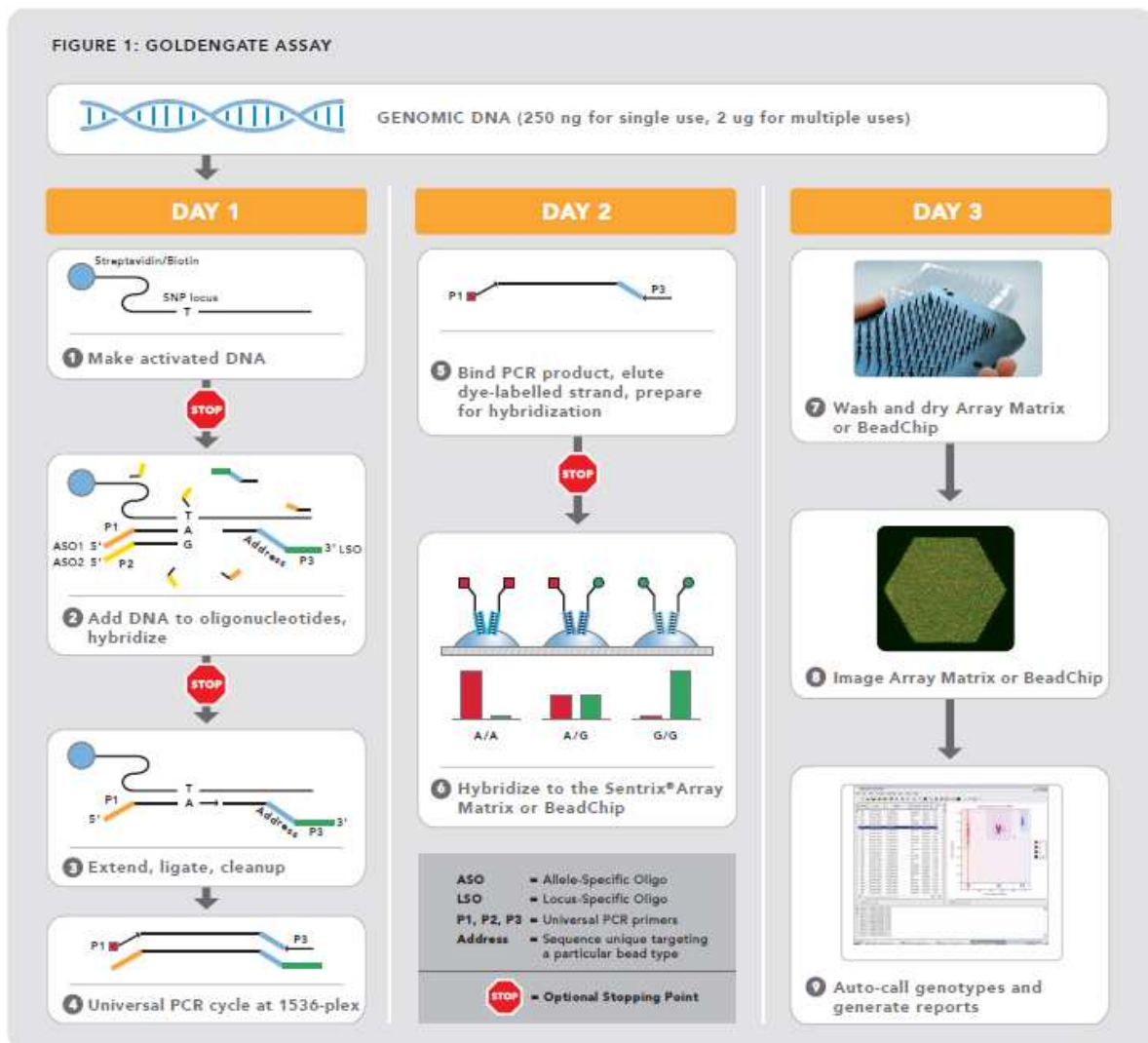
Figure 24 : Génotypage par TaqMan (adapté de *TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol*).



Chaque sonde contient un fluorophore – VIC (V) ou FAM (F) – à son extrémité 5', un *minor groove binder* (MGB) permettant d'augmenter la température de dénaturation pour des sondes courtes et ainsi de discriminer plus facilement les allèles, et un *quencher* non fluorescent (NFQ) en 3'.

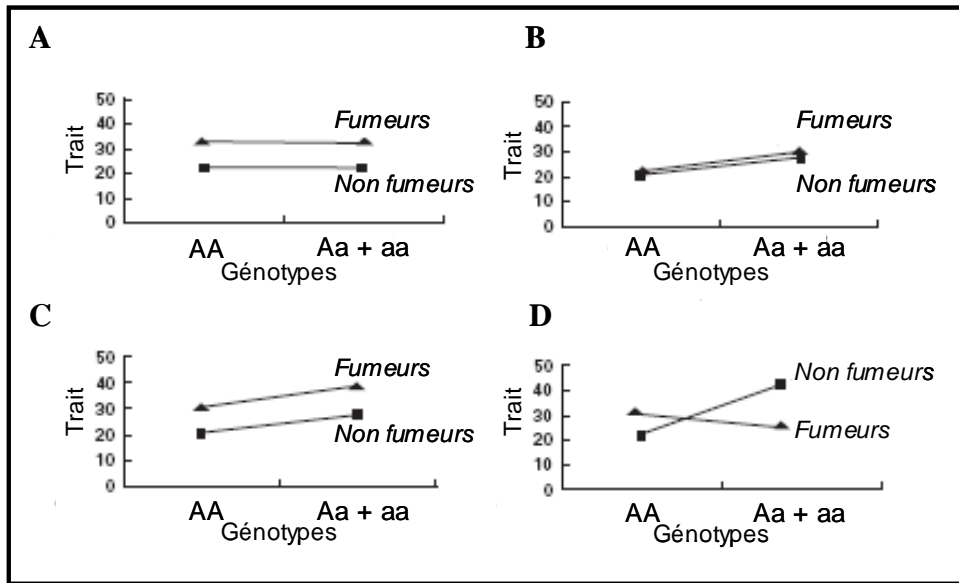
Pendant l'amplification, chaque sonde s'hybride spécifiquement à la séquence située entre les amorces. Quand la sonde est intacte, la proximité du *quencher* au fluorophore empêche sa fluorescence. L'ADN polymérase AmpliTaq Gold® clive uniquement les sondes qui sont hybridées. Ce clivage sépare alors le fluorophore du *quencher* et permet ainsi sa fluorescence.

Figure 25 : Génotypage par GoldenGate (adapté de *Illumina® GoldenGate® Assay Protocol*).



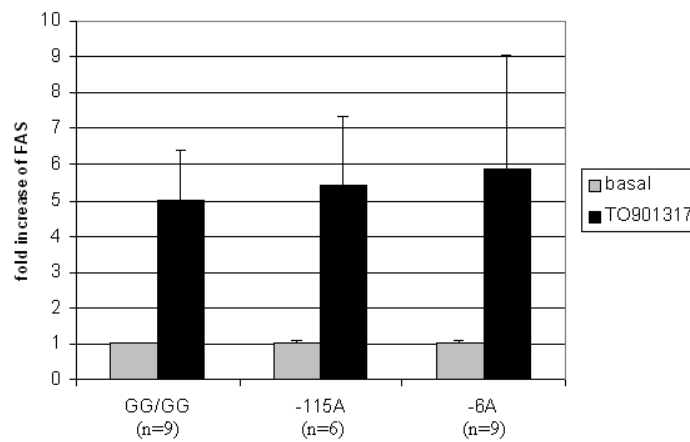
L'échantillon d'ADN est activé par liaison de particules paramagnétiques (1). Trois sondes sont ajoutées pour le génotypage d'un SNP (2): une sonde spécifique de l'allèle 1 (ASO1), une sonde spécifique de l'allèle 2 (ASO2), et une sonde non spécifique des allèles, mais spécifique du locus d'intérêt (LSO). Ces 3 sondes contiennent une séquence spécifique du locus étudié et un site universel de PCR (P). De plus, la LSO contient une séquence d'adressage ciblant un type de bille particulier. Après hybridation de ces sondes/amorces et élimination des oligonucléotides non hybridés (3), suit une étape d'élongation des sondes/amorces (3). Ce produit sert alors de patron pour la PCR (4). Les amorces P1 et P2 sont marquées par les fluorophores Cy3 et Cy5. Les brins marqués sont deshybridés (5) puis sont hybridés à une bille grâce à la séquence d'adressage (6). Les fluorophores sont alors révélés et témoignent de la présence de l'allèle qu'ils marquent.

Figure 26 : Exemple d'interaction gène-environnement (d'après Talmud 2004).



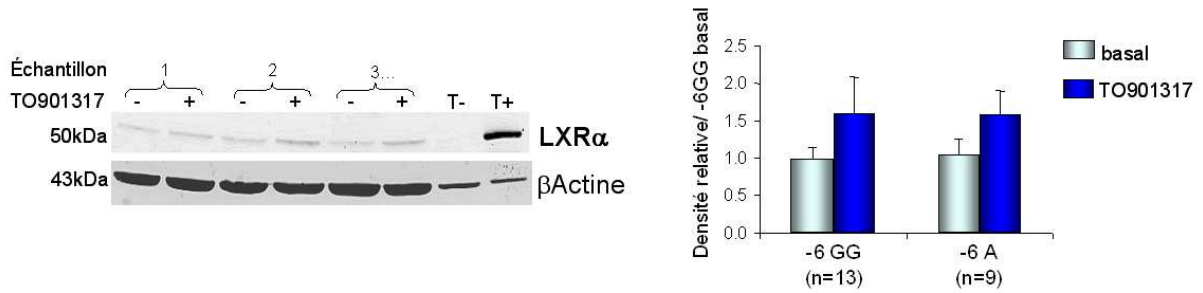
- A) Effet significatif de la consommation de tabac sur le trait quantitatif mesuré, mais pas d'effet du génotype.
 B) Effet significatif du génotype sur le trait quantitatif mesuré mais pas de la consommation de tabac.
 C) Effets significatifs de la consommation de tabac et du génotype sur le trait quantitatif mesuré mais pas d'interaction : l'effet du tabac n'est pas différent entre les deux groupes de génotypes.
 D) Effets significatifs antagonistes de la consommation de tabac et du génotype sur le trait quantitatif mesuré : interaction négative, ou qualitative.

Figure 27: Induction de l'expression du gène FAS (*fatty acid synthase*) par le TO901317 selon les groupes de génotype pour les SNPs -115G>A (rs12221497) et -6G>A (rs11039155) de *NR1H3*.



Les ARN, extraits de cultures primaires de macrophages humains traitées (en noir) ou non (en gris) par le TO901317 (1 $\mu\text{mol/L}$) pendant 24 heures, ont été rétro-transcrits grâce aux amorces spécifiques AACGCCTACCAGGCCATCCA (sens) et CCATTCCCCGCTGTGTCGAA (antisens). La quantité d'ARNm de FAS a été mesurée par PCR quantitative en temps réel et normalisée par rapport à celle de la cyclophiline et est exprimée relativement à celle des cellules non traitées. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne \pm écart moyen des duplicats des différents échantillons dont le nombre est indiqué entre parenthèses.

Figure 28 : Quantification des protéines LXR α dans les cultures primaires de macrophages humains par *western blot*.



Les protéines totales des cultures primaires de macrophages humains, traitées (en bleu foncé) ou non (en bleu clair) par le TO901317 (1 μ mol/L) pendant 24 heures, ont été extraites dans un tampon RIPA. Les protéines LXR α ont été marquées par un anticorps monoclonal de souris anti-hLXR α (AB41902, Abcam). Afin de normaliser la quantité de protéines LXR α , nous avons marqué les protéines actine β grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-actine β (A5441, Sigma). Les résultats sont exprimés sous forme moyenne \pm écart-type de la densité des bandes relativement à celle des échantillons -6GG non traités. Le nombre d'échantillons est indiqué entre parenthèses. T+ : protéines extraites de cellules COS7 transfectées par un vecteur d'expression de LXR α . T- : protéines extraites de cellules COS7 non transfectées.

Figure 29 : Rs12221497 (-115G>A) et site NERF.

Site consensus de fixation de NERF : t/gc/gc/gaGGAAgta

Séquence NR1H3 -115G: taaaaggaggat

↑
-115

Séquence NR1H3 -115A : taaaaggaggat

↓
Site potentiel de fixation de NERF
(similarité de la matrice 0,95)

Figure 30 : Clonage du fragment LXRAprom dans les vecteurs pGL3 *basic*, *enhancer* et *promoter*, et obtention des 4 formes haplotypiques.

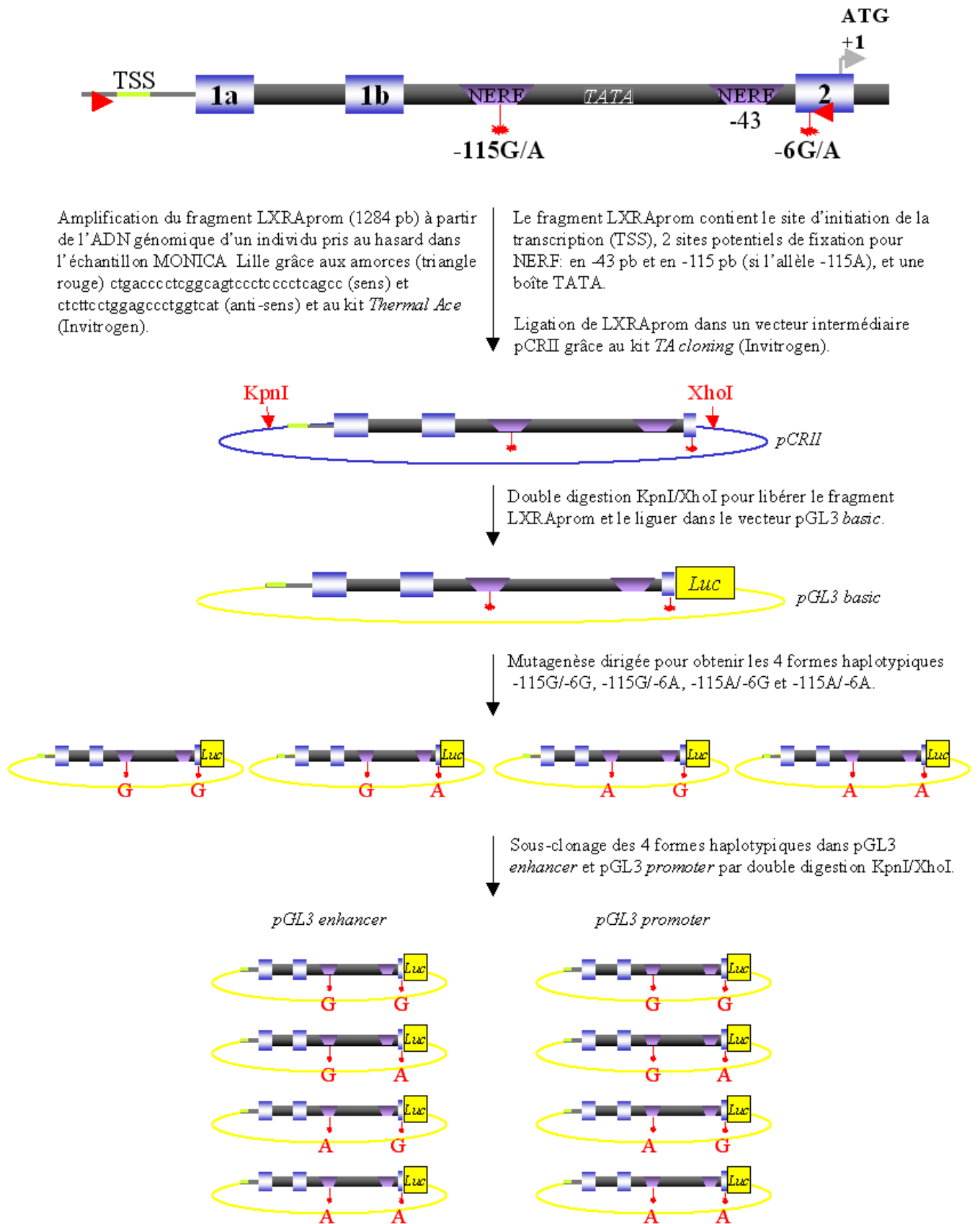
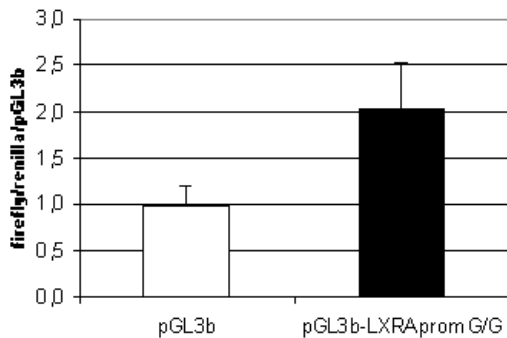


Figure 31 : Résultats de l'activité transcriptionnelle du fragment LXRAprom.

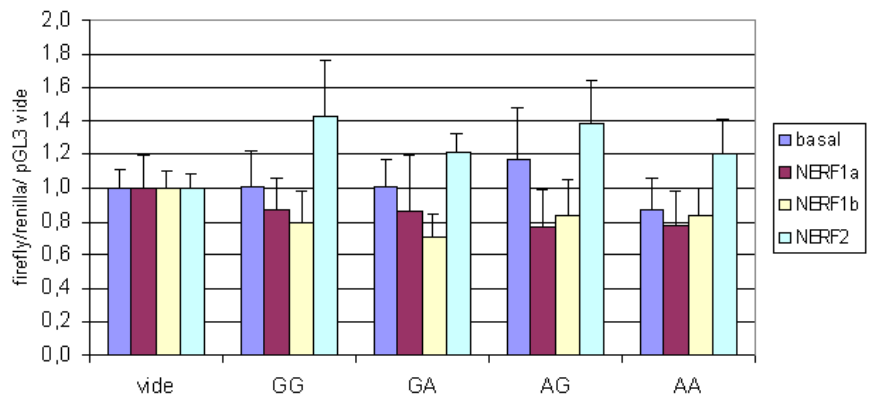
A. Transfection des vecteurs pGL3 *basic* vide et LXRAprom G/G dans les cellules COS-7.



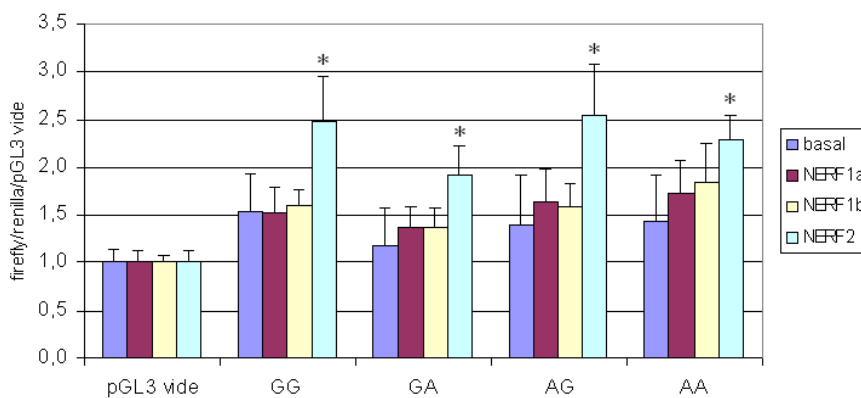
Les cellules COS-7 ont été cultivées dans un milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-glutamine, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Elles ont été transfectées de façon transitoire avec 600 ng de vecteurs pGL3 avec un ratio Fugene (Roche): ADN de 3:1. L'activité luciférase a été dosée 40 heures après la transfection grâce au kit *Dual luciferase assay* (Promega). L'activité firefly luciférase des vecteurs a été normalisée sur l'activité renilla luciférase obtenue par co-transfection de 20 ng de pRL-CMV (Promega). Les résultats sont exprimés sous forme moyenne ± écart-type.

B. Transfection des vecteurs pGL3 *promoter* vide et les 4 formes haplotypiques de LXRAprom dans les cellules HepG2.

Les cellules HepG2 ont été cultivées dans un milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, 2mM de L-glutamine, 1% d'acides aminés non essentiels, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Elles ont été transfectées de façon transitoire avec 600 ng de vecteurs pGL3 ± 300 ng de pCI-NERF, avec un ratio Fugene-HD (Roche): ADN de 3:1. L'activité luciférase a été dosée comme précédemment décrit. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne ± écart-moyen des triplicats de 3 expériences indépendantes.



C. Transfection des vecteurs pGL3 *promoter* vide et les 4 formes haplotypiques de LXRAprom dans les cellules HeLa.



Les cellules HeLa ont été cultivées dans un milieu EMEM avec 10% de sérum de veau fœtal, 50 U/ml de pénicilline et 50 µg/ml de streptomycine, à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂. Elles ont été transfectées de façon transitoire avec 500 ng de vecteurs pGL3 ± 300 ng de pCI-NERF, avec un ratio Fugene-HD (Roche): ADN de 3:1. L'activité luciférase a été dosée comme précédemment décrit. Les résultats sont exprimés sous forme moyenne ± écart-moyen des triplicats de 3 expériences indépendantes. * $p < 0,10$ par rapport à chaque haplotype à l'état basal (test de Student).

Tableau 1 : Critères de diagnostic du syndrome métabolique selon les définitions de l’OMS, de l’EGIR, du NCEP, de l’AHA et de l’IDF.

	OMS [World Health Organization 1999]	EGIR [Balkau <i>et al.</i> 1999]	NCEP [2001]	AHA [Grundty <i>et al.</i> 2005]	IDF [Alberti <i>et al.</i> 2005]
Adiposité	IMC > 30kg/m ² ou RTH > 0,90/0,85 (H/F)	Tour de taille ≥ 94/80 cm (H/F)	Tour de taille > 102/88 cm (H/F)	Tour de taille ≥ 102/88 cm (H/F)	Tour de taille (Europe) ≥ 94/80 cm (H/F)
Hyperglycémie	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mmol/L ou HPO ≥ 7,8 mmol/L ou diabète de type 2	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mais < 7,0 mmol/L	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mmol/L	Glycémie à jeun ≥ 5,6 mmol/L ou traitement hypoglycémiant ou diabète de type 2	Glycémie à jeun ≥ 5,6 mmol/L ou diabète de type 2
Insulino-résistance	Captation du glucose < quartile le plus bas en clamp hyperinsulinique euglycémique	Insulinémie à jeun ≥ 75 ^e percentile	-	-	-
Dyslipidémie	TG ≥ 1,7 mmol/L ou HDL-C < 0,9/1,0 mmol/L (H/F)	TG ≥ 2,0 mmol/L ou HDL-C < 1,0 mmol/L ou traitement hypolipémiant	TG ≥ 1,7 mmol/L HDL-C < 1,04/1,29 mmol/L (H/F)	TG ≥ 1,7 mmol/L ou traitement hypolipémiant HDL-C < 1,04/1,29 mmol/L (H/F) ou traitement hypolipémiant	TG ≥ 1,7 mmol/L ou traitement hypolipémiant HDL-C < 1,03/1,29 mmol/L (H/F) ou traitement hypolipémiant
Pression artérielle élevée	PA ≥ 140/90 mm Hg	PAS ≥ 130 et/ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement hypotenseur	PA ≥ 130/85 mm Hg	PAS ≥ 130 ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement hypotenseur	PAS ≥ 130 ou PAD ≥ 85 mm Hg ou traitement hypotenseur
Autre	Microalbuminurie	-	-	-	-
Principe de la définition	Hyperglycémie ou insulino-résistance plus ≥ 2 des autres critères	Hyperinsulinémie plus ≥ 2 des autres critères	≥ 3 parmi les 5 critères	≥ 3 parmi les 5 critères	Obésité abdominale plus ≥ 2 des autres critères

IMC : indice de masse corporelle ; RTH : rapport taille sur hanche.

TG : triglycérides ; HDL-C : *high-density lipoprotein cholesterol*.

HPO : hyperglycémie provoquée par voie orale.

PAS : pression artérielle systolique ; PAD : pression artérielle diastolique.

H : chez l’homme ; F : chez la femme.

Microalbuminurie : excrétion urinaire d’albumine ≥ 20 µg/min ou rapport albumine/créatinine ≥ 30 mg/g.

Tableau 2 : Exemples de prévalence (%) des principaux phénotypes du syndrome métabolique.

	NHANES III [Ford <i>et al.</i> 2002] Etats-Unis d'Amérique	DECODE [Hu <i>et al.</i> 2004] Europe	DESIR [Balkau <i>et al.</i> 2003] France
Particularités de la population étudiée	Age \geq 20 ans	Age 50-59 ans (8 études européennes)	Age 30-64 ans
Désordre glycémique	12,6	H : 3,5 à 42,6 F : 4,9 à 32,2	H : 14,4 F : 4,7
Obésité (abdominale)	38,6	H : 8,5 à 27,7 F : 14,2 à 36,8	H : 7,9 F : 13,3
Faible taux de HDL-cholestérol	37,1	H : 36,2 à 46,6 F : 13,7 à 37,8	H : 14,2 F : 14,9
Hypertriglycéridémie	30,0		H : 25,6 F : 13,2
Pression artérielle élevée	34,0	H : 20,4 à 71,5 F : 21,3 à 65,9	H : 68,6 F : 44,6

H : hommes.

F : femmes.

Tableau 3 : Exemples de prévalence du syndrome métabolique aux Etats-Unis.

Etude	Age (n)	Critères	Prévalence du syndrome métabolique (%)		
			Hommes	Femmes	Total
NHANES III 1988-1994 [Ford <i>et al.</i> 2003]	≥ 20 (8608)	NCEP / OMS	24,2 / 27,9	23,5 / 22,6	23,9 / 25,1
NHANES 1999-2002 [Ford 2005]	≥ 20 (3601)	NCEP* / IDF	33,7 / 38,9	35,4 / 38,1	34,5 / 39,0
San Antonio Heart Study [Lorenzo <i>et al.</i> 2007]	25-64 (2559)	AHA / IDF / OMS	24,0 / 28,4 / 18,8	16,8 / 24,7 / 12,1	-

Liste non exhaustive des études.

*Critères du NCEP mais avec le seuil d'hyperglycémie abaissé à 5,6 mmol/L.

Tableau 4 : Exemples de prévalence du syndrome métabolique en Europe.

Pays et référence	Age (n)	Critères	Prévalence du syndrome métabolique (%)			
			Hommes	Femmes	Total	
Suède [Nilsson <i>et al.</i> 2007]	46-68 (5047)	AHA / IDF / EGIR	-	-	20,6 / 21,9 / 18,8	
Pays-Bas [Dekker <i>et al.</i> 2005]	50-75 (1364)	NCEP / OMS	19,0 / 26,0	32,0 / 26,0	-	
Angleterre [Tillin <i>et al.</i> 2005]	40-69 (2346)	NCEP / OMS	18,4 / 18,8	14,4 / 9,1	-	
France [Dallongeville <i>et al.</i> 2005a]	35-64 (3359)	NCEP	23,0	16,9	-	
France [Bataille <i>et al.</i> 2006]	50-59 (10592)	NCEP / IDF / OMS	29,7 / 38,9 / 35,5	-	-	
Allemagne [Assmann <i>et al.</i> 2007]	(7131)	AHA / IDF	23,5 / 31,6	17,6 / 22,6	-	
Hongrie [Csaszar <i>et al.</i> 2006]	30-60 (13383)	AHA / IDF	6,7 / 14,9	9,8 / 8,6	-	
Grèce [Athyros <i>et al.</i> 2005]	Adultes (9669)	AHA / IDF	-	-	24,5 / 43,4	
Italie [Bo <i>et al.</i> 2005]	45-65 (1877)	NCEP	24,1	23,1	-	
Espagne [Lorenzo <i>et al.</i> 2006]	35-64 (2540)	AHA / IDF	22,3 / 27,7	30,7 / 33,6	-	
Méta-analyse EGIR [Balkau <i>et al.</i> 2002]	20-40 (2834) 40-55 (7323) ≥ 55 (7404)	OMS / EGIR	14 / 10 23 / 9 41 / 22	4 / 3 13 / 7 26 / 17	-	
Méta-analyse DECODE [Hu <i>et al.</i> 2004]	30-89 (11512)		OMS	15,7	14,2	-

Liste non exhaustive des études.

Tableau 5 : Exemples de définitions du syndrome métabolique chez les jeunes.

	Viner <i>et al</i> [Viner <i>et al.</i> 2005]	Weiss <i>et al</i> [Weiss <i>et al.</i> 2004]	Cook <i>et al</i> [Cook <i>et al.</i> 2003]	De Ferranti <i>et al</i> [de Ferranti <i>et al.</i> 2004]
Adiposité	IMC ≥ 95 ^{ème} percentile selon l'âge et le genre	IMC ≥ 97 ^{ème} percentile selon l'âge et le genre	Tour de taille ≥ 90 ^{ème} percentile selon l'âge et le genre	Tour de taille ≥ 75 ^{ème} percentile selon l'âge et le genre
Hyperglycémie Hyperinsulinémie	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mmol/L ou HPO ≥ 7,8 mmol/L ou insuliniémie à jeun ≥ 15 mU/L pré-pubère ≥ 30 mU/L pubère ≥ 20 mU/L post-pubère	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mmol/L	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mmol/L	Glycémie à jeun ≥ 6,1 mmol/L
Dyslipidémie	TG ≥ 1,75 mmol/L ou HDL-C < 0,9 mmol/L ou cholestérol total ≥ 95 ^{ème} percentile	TG ≥ 1,2 mmol/L HDL-C < 1,1 mmol/L	TG ≥ 1,2 mmol/L HDL-C < 1,1 mmol/L	TG ≥ 1,1 mmol/L HDL-C < 1,2 mmol/L (G), < 1,3 mmol/L (F)
Pression artérielle élevée	PA ≥ 95 ^{ème} percentile	PA ≥ 95 ^{ème} percentile	PA ≥ 90 ^{ème} percentile	PA ≥ 90 ^{ème} percentile
Principe de la définition	≥ 3 parmi les 4 critères	≥ 3 parmi les 5 critères	≥ 3 parmi les 5 critères	≥ 3 parmi les 5 critères

IMC : indice de masse corporelle.

TG : triglycérides.

HDL-C : *high-density lipoprotein cholesterol*.

HPO : hyperglycémie provoquée par voie orale.

PA : pression artérielle.

G : garçons.

F : filles.

Tableau 6 : Composition des lipoprotéines.

	Chylomicrons	VLDL	LDL	HDL
Principales apolipoprotéines	A1, A4, A5, B48, C1, C2, C3, E	B100, E, C1, C2, C3	B100, E	A1, A2, (E)
TG, %	80-95	45-65	4-8	2-7
Phospholipides, %	3-6	15-20	18-24	26-32
Cholestérol libre, %	1-3	4-8	6-8	3-5
Cholestérol estérifié, %	2-4	16-22	45-50	15-20
Protéines, %	1-2	6-10	18-22	45-55

TG : triglycérides

VLDL : lipoprotéine de très basse densité

LDL : lipoprotéine de basse densité

HDL : lipoprotéine de haute densité

Tableau 7 : Gènes associés à l'obésité ou aux phénotypes associés.

Gène	Nom	Chromosome	Fonction
Gènes identifiés par approche gène candidat			
<i>ADIPOQ</i>	Adiponectine	3	Adipokine, impliquée dans la sensibilité à l'insuline ; propriétés anti-inflammatoires
<i>ADRB2</i>	Récepteur β -2 adrénergique	5	Récepteur aux catécholamines impliqué dans la régulation de la lipolyse du TA, du métabolisme des lipoprotéines, l'homéostasie glucidique et le tonus vasculaire
<i>ADRB3</i>	Récepteur β -3 adrénergique	8	Lipolyse et thermogenèse au niveau du TA
<i>GNB3</i>	<i>Guanine nucleotide-binding protein β-3</i>	12	Transduction du signal
<i>HTR2C</i>	5 α -hydroxytryptamine récepteur 2-C	X	Mobilisation du calcium intracellulaire et activation de la protéine kinase C
<i>NR3C1 (GR)</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)</i>	5	Récepteur nucléaire activé par les glucocorticoïdes, impliqué dans le développement, le métabolisme glucidique et le système immunitaire
<i>LEP</i>	Leptine	7	Hormone anorexigène
<i>LEPR</i>	Récepteur de la leptine	1	Signalisation de la leptine
<i>PPARG</i>	Récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxysomes	3	Principal régulateur transcriptionnel de la différenciation adipocytaire
<i>UCP1</i>	<i>Uncoupling protein 1</i>	4	
<i>UCP2</i>	<i>Uncoupling protein 2</i>	11	Transporteurs mitochondriaux impliqués dans la régulation de l'homéostasie énergétique
<i>UCP3</i>	<i>Uncoupling protein 3</i>	11	
Gènes identifiés par les GWAS			
<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity-associated</i>	16	Régulerait la balance énergétique dans l'hypothalamus
<i>MC4R</i>	Récepteur de type 4 à la mélanocortine	18	Inhibition de la prise alimentaire
<i>SH2B1</i>	<i>SH2B adaptator protein 1</i>	16	Signalisation de la leptine dans le SNC
<i>MTCH2</i>	<i>Mitochondrial carrier homolog 2</i>	11	Transporteur mitochondrial impliqué dans l'apoptose
<i>NEGR1</i>	<i>Neuronal growth regulator 1</i>	1	Croissance neuronale
<i>KCTD15</i>	<i>Potassium channel tetramerization domain-containing protein 15</i>	19	Fonction inconnue
<i>TMEM18</i>	<i>Transmembrane protein 18</i>	2	Fonction inconnue
<i>GNPDA2</i>	Glucosamine-6-phosphate désaminase 2	4	Fonction inconnue
<i>NPC1</i>	Niemann-Pick C1	18	Trafic intracellulaire du cholestérol
<i>MAF</i>	c-MAF-inducing protein	16	Développement et différenciation cellulaire dans le système immunitaire, le pancréas et le TA
<i>PTER</i>	<i>Phosphotriesterase-related</i>	10	Exprimé dans le rein, fonction inconnue
<i>PRL</i>	Prolactine	6	Hormone impliquée dans la reproduction, le système immunitaire, le métabolisme énergétique et le cancer (sein, prostate)
<i>BDNF</i>	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>	11	Croissance et survie neuronale
<i>TFAP2B</i>	<i>Transcription factor activating enhancer binding protein 2 beta</i>	6	Facteur de transcription exprimé dans le TA, favorisant l'accumulation de lipides et la sensibilité à l'insuline
<i>MSRA</i>	Méthionine sulfoxide réductase A	8	Réparation de l'oxydation des protéines
<i>LYPLAL1</i>	<i>Lysophospholipase-like 1</i>	1	TG lipase
<i>NRXN3</i>	Neurexine 3	14	Molécule d'adhésion exprimée dans le SNC jouant un rôle dans l'addiction

SNC : système nerveux central

TA : tissu adipeux

TG : triglycérides

Tableau 8 : Gènes associés à l'homéostasie glucidique.

Gène	Nom	Chromosome	Fonction
Gènes identifiés par approche gène candidat			
<i>KCNJ11</i>	<i>Potassium channel inwardly-rectifying J-11</i>	11	Régulation de la sécrétion de l'insuline induite par le glucose
<i>PPARG</i>	Récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxyosomes	3	Principal régulateur transcriptionnel de la différenciation adipocytaire
<i>TCF2/HNF1B</i>	<i>Transcription factor 2 / hepatocyte nuclear factor 1-B</i>	17	Facteur de transcription régulant de nombreux gènes dans le foie et le pancréas
<i>WFS1</i>	Wolfram syndrome 1	4	Protéine transmembranaire du réticulum endoplasmique
Gènes identifiés par étude de liaison			
<i>TCF7L2</i>	<i>Transcription factor 7-like 2</i>	10	Facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation WNT, la prolifération cellulaire, l'embryogenèse, la régulation de la myogenèse et de l'adipogenèse
Gènes identifiés par les GWAS			
<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity-associated</i>	16	Régulerait la balance énergétique dans l'hypothalamus
<i>CDKAL1</i>	<i>CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1</i>	6	Régulateurs de kinases dépendantes de la cycline, exprimées dans les cellules β du pancréas
<i>CDKN2A-2B</i>	CDK inhibiteur 2-A	9	
<i>IGF2BP2</i>	<i>Insuline-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2</i>	3	Développement du pancréas
<i>HHEX/IDE</i>	<i>Haematopoietically expressed homeobox / insulin-degrading enzyme</i>	10	Développement du pancréas
<i>SLC30A8</i>	<i>Solute carrier family 30 A-8</i>	8	Transporteur de zinc
<i>JAZF1</i>	<i>Juxtaposed with another zinc finger gene 1</i>	7	Répresseur transcriptionnel de NR2C2
<i>CDC123</i>	<i>Cell division cycle 123 homolog</i>	10	Régulation du cycle cellulaire
<i>CAMK1D</i>	<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1D</i>		Régulation des fonctions des granulocytes <i>via</i> la transduction du signal de chémokines
<i>TSPAN8</i>	Tétraspamine 8	12	Glycoprotéine membranaire exprimée dans certaines formes de cancer
<i>LGR5</i>	<i>Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5</i>		Marqueur des cellules souches intestinales
<i>THADA</i>	<i>Thyroid adenoma associated</i>	2	Apoptose
<i>ADAMTS9</i>	<i>A disintegrin and metalloprotease with thrombospondin 9</i>	3	Métalloprotéase clivant certains protéoglycanes, exprimée dans le pancréas et le muscle squelettique
<i>NOTCH2</i>	<i>Notch homolog 2</i>	1	Récepteur membranaire impliqué dans l'organogenèse pancréatique
<i>G6PC2</i>	Glucose-6-phosphatase C-2	2	Hydrolyse du glucose-6-phosphate
<i>GCK</i>	Glucokinase	7	Phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate
<i>MTNR1B</i>	<i>Melatonin receptor 1-B</i>	11	Signalisation de la mélatonine, impliquée dans le rythme circadien
<i>PANK1</i>	Pantothénate kinase 1	10	Enzyme clé de la biosynthèse du coenzyme A

SNC : système nerveux central

CDK : *cyclin-dependent kinase*

NR2C2: *nuclear receptor subfamily 2, group C, member 2*

Tableau 9 : Gènes associés au lipides plasmatiques.

Gène	Nom	Chromosome	Fonction
Gènes associés au LDL-cholestérol			
<i>APOE</i>	Apolipoprotéine E	19	Apolipoprotéine des chylomicrons
<i>APOB</i>	Apolipoprotéine B	2	Principale apolipoprotéine des chylomicrons et LDL
<i>PCSK9</i>	<i>Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9</i>	1	Métabolisme du cholestérol
<i>MTTP</i>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>	4	Rôle central dans l'assemblage des lipoprotéines
<i>HMGCR</i>	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase	5	Enzyme catalysant la synthèse du cholestérol
<i>SORT1</i>	Sortiline 1	1	Protéine transmembranaire du réseau trans-Golgi
<i>CILP2</i>	<i>Cartilage intermediate layer protein 2</i>	19	Fonction inconnue
<i>BCAM</i>	<i>Basal cell adhesion molecule</i>	19	Immunoglobuline, rôle potentiel dans le cancer de la peau
<i>TOMM40</i>	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 40</i>	19	Permet l'entrée de protéines dans la mitochondrie
<i>ABCG8</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G-8</i>	2	Excrétion de cholestérol et de stérols dans la bile
<i>MAFB</i>	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B</i>	20	Rôle dans la régulation de l'hématopoïèse
<i>HNF1A</i>	<i>Hepatic nuclear factor 1-α</i>	12	Facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes spécifiques du foie
<i>TIMD4</i>	<i>T-cell immunoglobulin and mucin domain containing 4</i>	5	Récepteur à phosphatidylsérine à la surface des macrophages facilitant la phagocytose des cellules apoptotiques
<i>ABCG5</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G-5</i>	2	Excrétion de stérols dans la bile, limite l'absorption intestinale
<i>DNAH11</i>	<i>Dynein, axonemal, heavy chain 11</i>	7	ATPase impliquée dans le mouvement des cils respiratoires
<i>FADS2-3</i>	<i>Fatty acid desaturase</i>	11	Catalyse la désaturation des AG
Gènes associés au HDL-cholestérol			
<i>CETP</i>	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>	16	Transfert d'esters de cholestérol entre lipoprotéines
<i>ABCA1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A-1</i>	9	Efflux du cholestérol intracellulaire
<i>APOA1</i>	Apolipoprotéine A-1	11	Principale protéine des HDL
<i>LCAT</i>	Lecithin-cholesterol acyltransferase	16	Enzyme d'estérification du cholestérol extracellulaire nécessaire pour le transport du cholestérol
<i>LIPC</i>	Lipase hépatique	15	Hydrolyse les triglycérides et facilite l'incorporation cellulaire des lipoprotéines
<i>LIPG</i>	Lipase endothéliale	18	Phospholipase impliquée dans le métabolisme des lipoprotéines
<i>LPL</i>	Lipoprotéine lipase	8	Hydrolyse les triglycérides et facilite l'incorporation cellulaire des lipoprotéines
<i>GALNT2</i>	Galactosamine:polypeptide N-acétylgalactosaminyl-transférase 2	1	O-glycosylation et transfert de N-acétylgalactosamine sur les résidus sérine ou thréonine des protéines
<i>MVK6</i>	<i>Mevalonate kinase 6</i>	12	Synthèse des isoprénoïdes et stérols
<i>MMAB</i>	<i>Methylmalonic aciduria cobalamin deficiency B</i>		Conversion de la vitamine B12 en adénosylcobalamine
<i>ANGPTL4</i>	<i>Angiopoietin-like protein 4</i>	19	Inhibition de la LPL, lipolyse du TA, homéostasie du glucose
<i>FADS1-2-3</i>	<i>Fatty acid desaturase</i>	11	Catalyse la désaturation des AG
<i>HNF4A</i>	<i>Hepatocyte nuclear factor 4-α</i>	20	Facteur de transcription contrôlant l'expression de nombreux gènes hépatiques
<i>PLTP</i>	<i>Phospholipid transfer protein</i>	20	Transferts de phospholipides des lipoprotéines riches en TG vers les HDL
<i>TTC39B</i>	<i>Tetratricopeptide repeat domain 39B</i>	9	Fonction inconnue
<i>MADD</i>	<i>MAP-kinase activating death domain</i>	11	Transduction du signal apoptotique
<i>FOLH1</i>	<i>Folate hydrolase</i>		Glutamate carboxypeptidase, hydrolyse du folate
<i>NR1H3</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 1, group H, member 3</i>	11	Gène codant LXR α (<i>liver X receptor</i>), récepteur nucléaire impliqué dans le métabolisme gluco-lipidique

Gène	Nom	Chromosome	Fonction
Gènes associés aux TG			
<i>APOA1/C3/A4/A5</i>	Apolipoprotéines A1/C3/A4/A5	11	Apolipoprotéines
<i>LPL</i>	Lipoprotéine lipase	8	Hydrolyse les triglycérides et facilite l'incorporation cellulaire des lipoprotéines
<i>APOC2</i>	Apolipoprotéine C-2	19	Apolipoprotéine des VLDL
<i>MTTP</i>	<i>Microsomal triglyceride transfer protein</i>	4	Rôle central dans l'assemblage des lipoprotéines
<i>ANGPTL4</i>	<i>Angiopoietin-like protein 4</i>	19	Inhibition de la LPL, lipolyse du TA, homéostasie du glucose
<i>LIPC</i>	Lipase hépatique	15	Hydrolyse les triglycérides et facilite l'incorporation cellulaire des lipoprotéines
<i>APOB</i>	Apolipoprotéine B	2	Principale apolipoprotéine des chylomicrons et LDL
<i>CILP2</i>	<i>Cartilage intermediate layer protein 2</i>	19	Fonction inconnue
<i>TRIB1</i>	<i>Tribbles homolog 1</i>	8	Fonction inconnue
<i>GCKR</i>	<i>Glucokinase regulator</i>	2	Inhibe la glucokinase dans le foie et le pancréas
<i>MLXIPL (CHREBP)</i>	<i>MLX interacting protein-like (carbohydrate response element-binding protein)</i>	7	Facteur de transcription activant, de façon glucose-dépendante, l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des TG
<i>GALNT2</i>	Galactosamine:polypeptide N-acétylgalactosaminyl-transférase 2	1	O-glycosylation et transfert de N-acétylgalactosamine sur les résidus sérine ou thréonine des protéines
<i>AMACIL2</i>	<i>Acyl-malonyl condensing enzyme 1-like 2</i>	8	Fonction inconnue
<i>FADS1-2-3</i>	<i>Fatty acid desaturase</i>	11	Catalyse la désaturation des AG
<i>ANGPTL3</i>	<i>Angiopoietin-like protein 3</i>	1	Inhibition de lipases, lipolyse du TA
<i>PLTP</i>	<i>Phospholipid transfer protein</i>	20	Transferts de phospholipides des lipoprotéines riches en TG vers les HDL

TG : triglycérides

Tableau 10 : Gènes associés à l'hypertension artérielle.

Gène	Nom	Chromosome	Fonction
Gènes associés aux formes monogéniques			
<i>HSD11B2</i>	Hydroxystéroïde (11-beta) deshydrogénase 2	16	Enzyme de conversion de la cortisone en cortisol
<i>CYP11B1</i>	Cytochrome P450 11-B-1 (stéroïde 11β hydroxylase)	8	Métabolisme du cortisol dans le cortex adrénargique
<i>CYP11B2</i>	Cytochrome P450 11-B-2 (aldostérone synthase)	8	Synthèse de l'aldostérone, composante du système rénine-angiotensine
<i>NR3C2</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2</i>	4	Récepteur aux minéralocorticoïdes et à l'aldostérone
<i>SCNN1B</i>	<i>Sodium channel, nonvoltage-gated 1 β</i>	16	Pompe à sodium contrôlant le transport de fluides et d'électrolytes à travers l'épithélium
<i>SCNN1G</i>	<i>Sodium channel, nonvoltage-gated 1 γ</i>	16	
<i>WNK1</i>	<i>Lysine deficient protein kinase 1</i>	12	Sérine-thréonine kinase impliquée dans la signalisation cellulaire. WNK4 serait impliqué dans la régulation de la pression artérielle et de la balance potassique
<i>WNK4</i>	<i>Lysine deficient protein kinase 4</i>	17	
<i>PPARG</i>	Récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxyosomes	3	Principal régulateur transcriptionnel de la différenciation adipocytaire
<i>MT-TI</i>	<i>Mitochondrially encoded tRNA isoleucine</i>	mitochondrie	Fonction inconnue
Gènes associés à l'hypertension artérielle essentielle			
<i>AGT</i>	Angiotensinogène	1	Régulation de la pression artérielle
<i>NOS3</i>	<i>Nitric oxide synthase 3 (endothéliale)</i>	7	Synthèse d'oxyde nitrique, important régulateur de la vasodilatation et impliqué dans le métabolisme glucidique
<i>MEX3C (RKHD2)</i>	<i>Mex-3 homolog C</i>	18	Fonction inconnue
<i>CYP17A1</i>	Cytochrome P450 1-A-1 (stéroïde 17-α-hydroxylase)	10	Métabolisme des glucocorticoïdes et des hormones stéroïdiennes
<i>CYP1A2</i>	Cytochrome P450 1-A-2	15	Métabolisme de médicaments (phénacytine)
<i>FGF5</i>	<i>Fibroblast growth factor 5</i>	4	Développement embryonnaire, croissance cellulaire, morphogénèse, réparation de tissus, croissance et invasion tumorale
<i>SH2B3</i>	<i>SH2B adaptor protein 3</i>	12	Signalisation cellulaire impliquée dans l'activation des lymphocytes T
<i>MTHFR</i>	Méthylentétrahydrofolate réductase	1	Méthylation de l'homocystéine en méthionine.
<i>c10orf107</i>	<i>Chromosome 10 open reading frame 107</i>	10	Fonction inconnue
<i>ZNF652</i>	<i>Zinc finger protein 652</i>	17	Fonction inconnue
<i>PLCD3</i>	Phospholipase C, delta 3	17	Signalisation cellulaire, via la production de diacylglycérol et d'inositol trisphosphate
<i>ATP2B1</i>	<i>ATPase, Ca⁺⁺ transporting, plasma membrane 1</i>	12	Rôle dans l'homéostasie du calcium intracellulaire
<i>CACNB2</i>	<i>Calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit</i>	10	Transport du calcium
<i>PLEKHA7</i>	<i>Pleckstrin homology domain containing, family A member 7</i>	11	Fonction inconnue
<i>CSK</i>	<i>c-src tyrosine kinase</i>	15	Kinases
<i>ULK3</i>	<i>Unc-51-like kinase 3</i>		
<i>TBX3/TBX5</i>	<i>T-box 3/T-box 5</i>	12	Facteurs de transcription impliqués dans le développement embryonnaire
<i>ULK4</i>	<i>Unc-51-like kinase 3</i>	3	Kinase
<i>CDH13</i>	<i>Cadherin 13, H-cadherin</i>	16	Protéine d'adhésion favorisant les interactions intercellulaires dans le cœur
<i>STK39</i>	Sérine thréonine kinase 39	2	Réponse au stress cellulaire

Tableau 11 : Gènes associés au syndrome métabolique.

Gène	Nom	Chromosome	Fonction
<i>ADRB2</i>	Récepteur β -2 adrénergique	5	Récepteur aux catécholamines impliqué dans la régulation de la lipolyse du TA, du métabolisme des lipoprotéines, l'homéostasie glucidique et le tonus vasculaire
<i>FTO</i>	<i>Fat mass and obesity associated</i>	16	Régulerait la balance énergétique dans l'hypothalamus
<i>PPARG</i>	Récepteur γ activé par les proliférateurs de peroxyosomes	3	Principal régulateur transcriptionnel de la différenciation adipocytaire
<i>LIPC</i>	Lipase hépatique	15	Hydrolyse les triglycérides et facilite l'incorporation cellulaire des lipoprotéines
<i>LPL</i>	Lipoprotéine lipase	8	Hydrolyse les triglycérides et facilite l'incorporation cellulaire des lipoprotéines
<i>APOA5</i>	Apolipoprotéine A5	11	Composante des HDL, déterminant important du taux plasmatique de TG
<i>NOS3</i>	<i>Nitric oxide synthase 3</i> (endothéliale)	7	Synthèse d'oxyde nitrique, important régulateur de la vasodilatation et impliqué dans le métabolisme glucidique
<i>CYP11B2</i>	Cytochrome P450 11-B-2 (aldostérone synthase)	8	Synthèse de l'aldostérone, composante du système rénine-angiotensine
<i>ENPP1</i>	Ectonucléotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	6	Enzyme clivant une grande variété de substrats, inhibe l'activité du récepteur à l'insuline
<i>CAPN10</i>	Calpaine 10	2	Rôle dans la sécrétion et l'action de l'insuline
<i>IL6</i>	Interleukine 6	7	Cytokine pro-inflammatoire

Tableau 12 : Principales caractéristiques des individus des échantillons MONICA Lille, Strasbourg et Toulouse.

	Lille (n=1195)	Strasbourg (n=1131)	Toulouse (n=1182)
Age, ans	51,3 ± 8,5	51,2 ± 8,7	50,2 ± 8,6
Hommes, %	50,3	49,8	51,9
Poids, kg	74,3 ± 15,5	76,2 ± 14,9	71,0 ± 14,1
IMC, kg/m ²	26,6 ± 5,0	27,0 ± 4,7	25,5 ± 4,2
Tour de taille, cm	91,0 ± 13,9	92,6 ± 13,8	87,3 ± 12,9
RTH	0,885 ± 0,096	0,889 ± 0,098	0,883 ± 0,089
TG, mmol/L	1,41 ± 1,14	1,29 ± 0,97	1,18 ± 0,74
Cholestérol total, mmol/L	5,90 ± 1,08	6,02 ± 1,04	5,78 ± 1,01
HDL-cholestérol, mmol/L	1,50 ± 0,48	1,48 ± 0,42	1,46 ± 0,44
LDL-cholestérol, mmol/L	3,78 ± 1,03	3,95 ± 0,98	3,84 ± 0,96
ApoA1, g/L	1,73 ± 0,31	1,73 ± 0,28	1,65 ± 0,26
ApoB, g/L	1,21 ± 0,30	1,23 ± 0,30	1,20 ± 0,27
Glucose, mmol/L	5,55 ± 1,54	5,38 ± 1,30	5,72 ± 1,28
Insuline, µU/mL	11,93 ± 7,92	11,64 ± 10,95	10,42 ± 8,05
HOMA-IR	3,05 ± 2,57	2,90 ± 3,53	2,74 ± 2,90
PAS, mm Hg	133,7 ± 19,4	133,4 ± 20,92	131,1 ± 17,9
PAD, mm Hg	83,1 ± 11,6	85,1 ± 12,6	79,5 ± 10,5
Obèses (IMC ≥ 30), %	20,0	21,9	12,1
Surpoids (25 ≤ IMC < 30), %	36,6	41,9	38,3
DT2, %	10,9	9,2	10,0
Syndrome métabolique (OMS), %	20,6	21,3	16,5
Syndrome métabolique (EGIR), %	15,3	16,5	10,2
Syndrome métabolique (NCEP), %	22,3	19,3	14,7
Syndrome métabolique (AHA), %	32,2	31,3	26,1
Syndrome métabolique (IDF), %	35,2	35,3	31,0

Moyennes ± écart-type ou %.

RTH : rapport taille sur hanches.

PAS : pression artérielle systolique.

PAD : pression artérielle diastolique.

DT2: diabète de type 2.

Tableau 13 : Principales caractéristiques des individus de l'étude MONEUR.

	Témoins (n=585)	Sujets coronariens (n=585)	<i>p</i> *	Cas d'infarctus (n=350)	<i>p</i> *
Hommes, %	81,4	81,5	ns	84,9	ns
Age, ans	55,2 ± 8,1	55,6 ± 8,2	ns	55,5 ± 8,1	ns
IMC, kg/m ²	27,1 ± 4,8	28,7 ± 5,0	<0,0001	28,7 ± 4,9	<0,0001
Fumeurs et ex-fumeurs, %	63,8	78,1	<0,0001	80,6	<0,0001
Hypercholestérolémie, %	31,8	69,6	<0,0001	73,7	<0,0001
Hypertension, %	55,9	63,4	0,009	58,3	ns
DT2, %	7,0	21,5	<0,0001	22,6	<0,0001

Moyennes ± écart-type ou %.

IMC : indice de masse corporelle.

Hypercholestérolémie (concentration plasmatique de cholestérol total ≥ 6,2 mmol/L).

Hypertension (PAS ≥ 140 mm Hg ou PAD ≥ 90 mm Hg).

DT2: diabète de type 2.

*par rapport aux témoins.

Tableau 14 : Principales caractéristiques des individus de l'étude transversale HELENA (n=1155).

Age, ans	14,8 ± 1,4
Garçons, %	47,8
Poids, kg	58,4 ± 13,0
IMC, kg/m ²	21,3 ± 3,8
Tour de taille, cm	72,3 ± 9,3
RTH	0,794 ± 0,070
Masse grasse, %	23,8 ± 9,8
TG, mmol/L	0,79 ± 0,40
Cholestérol total, mmol/L	4,16 ± 0,71
HDL-cholestérol, mmol/L	1,43 ± 0,28
LDL-cholestérol, mmol/L	2,45 ± 0,65
ApoA1, g/L	1,50 ± 0,22
ApoB, g/L	0,65 ± 0,16
Glycémie, mmol/L	5,00 ± 0,40
Insuline, µU/mL	9,92 ± 5,87
PAS, mm Hg	118,2 ± 13,8
PAD, mm Hg	67,3 ± 9,8
Obèses, %	6,1
Surpoids, %	17,0

Moyennes ± écart-type ou %.

IMC : indice de masse corporelle.

RTH : rapport taille sur hanches.

TG : triglycérides.

PAS : pression artérielle systolique.

PAD : pression artérielle diastolique.

Tableau 15 : Principales caractéristiques des individus de l'étude cas-témoins pour le DT2 nichée dans l'échantillon HUNT 2.

(n)	Témoins (1986)	Cas DT2 (835)	<i>p</i>
Hommes, n (%)	978 (49,2)	407 (48,7)	ns
Age, ans	65,6 ± 14,3	66,9 ± 13,6	0,02
IMC, kg/m ²	26,4 ± 3,9	29,1 ± 5,0	<0,001
Tour de taille, cm	87,9 ± 11,2	96,2 ± 12,5	<0,001
RTH	0,86 ± 0,08	0,90 ± 0,08	<0,001
Glucose*, mmol/L	4,98 ± 0,43	10,20 ± 4,52	<0,001
TG*, mmol/L	1,68 ± 0,92	2,50 ± 1,80	<0,001
Cholestérol total*, mmol/L	6,27 ± 1,25	6,10 ± 1,30	<0,001
HDL-cholestérol*, mmol/L	1,41 ± 0,41	1,20 ± 0,40	<0,001
PAS, mm Hg	144,8 ± 24,2	152,8 ± 25,5	<0,001
PAD, mm Hg	82,3 ± 12,7	83,8 ± 13,7	<0,001

Moyennes ± écart-type ou %.

IMC : indice de masse corporelle.

RTH : rapport tour de taille sur tour de hanches.

TG : triglycérides.

PAS : pression artérielle systolique.

PAD : pression artérielle diastolique.

*non à jeun.

Tableau 16 : Etude d'association des SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) dans l'étude HELENA.

rs12221497 (-115G>A) (n)	GG (879)	GA (252)	AA (20)	<i>p</i>	<i>p</i> GA+AA vs. GG
IMC, kg/m ²	21,3 ± 3,8	21,2 ± 3,8	20,6 ± 3,0	0,28	0,75
Masse grasse, %	24,0 ± 9,8	23,0 ± 9,6	22,3 ± 7,8	0,84	0,97
Triglycérides, mmol/L	68,3 ± 35,3	70,6 ± 33,2	80,1 ± 43,6	0,39	0,35
Cholestérol, mmol/L	4,15 ± 0,71	4,19 ± 0,71	4,10 ± 0,77	0,81	0,52
HDL-cholestérol, mmol/L	1,44 ± 0,27	1,41 ± 0,28	1,28 ± 0,27	0,006	0,02
ApoA1, g/L	1,51 ± 0,22	1,49 ± 0,23	1,44 ± 0,28	0,20	0,19
LDL-cholestérol, mmol/L	0,77 ± 0,37	0,80 ± 0,38	0,91 ± 0,50	0,15	0,06
ApoB, g/L	0,65 ± 0,16	0,67 ± 0,16	0,69 ± 0,16	0,07	0,04

rs11039155 (-6G>A) (n)	GG (847)	GA (264)	AA (29)	<i>p</i>	<i>p</i> GA+AA vs. GG
IMC, kg/m ²	21,3 ± 3,7	21,4 ± 3,9	20,7 ± 3,5	0,40	0,65
Masse grasse, %	24,0 ± 9,7	23,4 ± 9,9	21,2 ± 10,2	0,44	0,54
Triglycérides, mmol/L	0,77 ± 0,37	0,80 ± 0,38	0,91 ± 0,50	0,31	0,16
Cholestérol, mmol/L	4,14 ± 0,71	4,20 ± 0,73	4,27 ± 0,57	0,49	0,34
HDL-cholestérol, mmol/L	1,42 ± 0,27	1,46 ± 0,28	1,56 ± 0,29	0,005	0,006
ApoA1, g/L	1,50 ± 0,22	1,52 ± 0,23	1,55 ± 0,23	0,18	0,09
LDL-cholestérol, mmol/L	2,45 ± 0,62	2,42 ± 0,66	2,40 ± 0,57	0,99	0,87
ApoB, g/L	0,66 ± 0,15	0,65 ± 0,17	0,66 ± 0,14	0,71	0,67

Les valeurs *p* sont ajustées sur l'âge, le genre et le centre (+IMC pour les variables biologiques).

Tableau 17 : Etude d'association des SNPs rs12221497 (-115G>A) et rs11039155 (-6G>A) avec le risque de coronaropathie aiguë dans l'étude MONEUR.

rs12221497 (-115G>A) (n)	GG (887)	GA (251)	AA (27)	<i>p</i> brut	OR ajusté	IC [95%]	<i>p</i> ajusté
Témoins	441 (76,0)	130 (22,4)	9 (1,6)				
Coronaropathie	446 (76,2)	121 (20,7)	18 (3,1)	0,19	0,98	[0,74-1,29]	0,86
Infarctus du myocarde	265 (75,7)	77 (22,0)	8 (2,3)	0,72	0,95	[0,69-1,31]	0,76

rs11039155 (-6G>A) (n)	GG (897)	GA (241)	AA (21)	<i>p</i> brut	OR ajusté	IC [95%]	<i>p</i> ajusté
Témoins	437 (76,0)	125 (21,7)	13 (2,3)				
Coronaropathie	460 (78,7)	116 (19,9)	8 (1,4)	0,36	0,87	[0,66-1,15]	0,33
Infarctus du myocarde	276 (78,9)	68 (19,4)	6 (1,7)	0,58	0,86	[0,62-1,19]	0,37

n (%)

Les OR et valeurs *p* sont ajustés sur l'âge, le genre et l'IMC.

Les OR ont été calculés selon un modèle dominant (AA+GA versus GG).

Résumé

Le concept de syndrome métabolique correspond à une association non fortuite chez un individu d'une obésité abdominale, d'une insulino-résistance, d'une hyperglycémie, d'une dyslipidémie et d'une pression artérielle élevée. Ce syndrome est associé à un risque accru de diabète et de maladies cardiovasculaires. Le syndrome métabolique est un désordre complexe et multifactoriel dont l'origine est due à l'interaction entre facteurs génétiques et environnementaux. Dans le but d'identifier de nouveaux déterminants génétiques du syndrome métabolique et des phénotypes associés, je me suis intéressée à la variabilité génétique commune de plusieurs gènes candidats impliqués dans différentes voies métaboliques. J'ai réalisé des études d'association entre des polymorphismes génétiques de ces gènes et les phénotypes métaboliques dans différentes études de population (MONICA, HELENA et HUNT 2).

D'abord, j'ai pu confirmer l'impact du polymorphisme rs9939609 du gène *FTO* (*fat mass and obesity-associated*) sur le risque d'obésité, de diabète de type 2 et les phénotypes associés (IMC, tour de taille, rapport tour de taille sur tour de hanche) et trouvé des associations avec le taux d'insuline plasmatique, l'insulino-résistance et la pression artérielle systolique dans l'échantillon français MONICA (Legry *et al*, *Metabolism*, 2009).

Par ailleurs, je me suis intéressée aux gènes codant les récepteurs nucléaires LXR α (*liver X receptor*) et j'ai montré que deux polymorphismes (situés dans l'intron 1 et le 5'UTR) du gène codant LXR α étaient associés au taux plasmatique de HDL-cholestérol chez les adolescents et les adultes, ainsi qu'au risque de syndrome métabolique chez les adultes (Legry *et al*, *Int J Obes (Lond)*, 2008). De plus, j'ai trouvé une association entre un polymorphisme du gène codant LXR β et le risque de diabète de type 2 et d'obésité. J'ai réalisé des études *in vitro* de la fonctionnalité des polymorphismes des LXR α et de leurs gènes cibles. Je n'ai pas détecté de différence significative entre les allèles des polymorphismes de LXR α du niveau d'expression de LXR α et de certains de ses gènes cibles dans des cultures primaires de macrophages humains. J'ai également réalisé des transfections cellulaires et des expériences de retard sur gel pour voir si les polymorphismes de LXR α et de LXR β modulaient l'affinité de fixation de facteurs de transcription mais je n'ai pas détecté de différence entre les allèles.

Enfin, j'ai étudié la variabilité génétique commune de trois gènes de la famille de protéines plasmatiques ANGPTLs (*angiopoietin-like proteins*). J'ai montré qu'un polymorphisme du gène *ANGPTL3* est associé à une diminution des taux de HDL-cholestérol et d'ApoA1 et qu'un polymorphisme du gène *ANGPTL4* est associé à une augmentation de l'adiposité, chez les adultes et les adolescents (Legry *et al*, *J Clin Endocrinol Metab*, sous presse). En outre, deux polymorphismes du gène *ANGPTL6* semblent être associés à la glycémie et l'insulino-résistance chez les adultes, mais ces résultats sont à confirmer (Legry *et al*, *Diabetes Metab*, 2009).

En conclusion, ces résultats suggèrent un impact non négligeable de la variabilité génétique des gènes codant *FTO*, les LXR α et les ANGPTLs dans la détermination du profil glucido-lipidique et de la masse grasse ainsi que le risque d'obésité, de diabète de type 2 ou de syndrome métabolique chez l'Homme.