



HAL
open science

Le récepteur 4 aux mélanocortines, un paradigme de la génétique de l'obésité

Fanny Stutzmann

► **To cite this version:**

Fanny Stutzmann. Le récepteur 4 aux mélanocortines, un paradigme de la génétique de l'obésité. Sciences du Vivant [q-bio]. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2009. Français. NNT : . tel-00422165

HAL Id: tel-00422165

<https://theses.hal.science/tel-00422165>

Submitted on 6 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 DE LILLE
FACULTE DE MEDECINE

Ecole Doctorale Biologie Santé de Lille

Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur
en sciences de la vie et de la santé
Spécialité : Génétique humaine

Fanny STUTZMANN

Le récepteur 4 aux mélanocortines,
un paradigme de la génétique de l'obésité

Thèse dirigée par le Professeur Philippe Froguel

Date de soutenance : le 9 septembre 2009

Jury :

M. le Docteur Frédéric Fumeron	Rapporteur
M. le Professeur Christophe Magnan	Rapporteur
Mme le Docteur Nicole Helbecque	Examinatrice
Mme le Professeur Laurence Kessler	Examinatrice
M. le Docteur Francis Vasseur	Examineur
M. le Professeur Philippe Froguel	Directeur de thèse

LISTES DES TABLES.....	4
LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
<i>INTRODUCTION</i>	7
I Introduction générale.....	8
A – Epidémiologie de l’obésité.....	8
1 - Définitions et normes.....	8
2 - Prévalence et évolution de l’obésité dans le monde	9
B – Complications.....	11
1 - Le syndrome métabolique.....	11
2 - Les autres troubles physiologiques.....	11
3 - Les complications psychologiques et sociales.....	12
C – Traitements	12
1 - Les approches comportementales	12
2 - Les régimes.....	13
3 - Les médicaments.....	13
4 –La chirurgie	14
D – Causes	16
1 - Causes environnementales et facteurs de risque	16
2 – Arguments en faveur de la contribution de la génétique dans l’obésité commune.....	18
II Physiologie de la régulation de la prise alimentaire	20
A – Anatomie et physiologie de la voie leptine-mélanocortine : une signalisation principalement hypothalamique	20
1 – Le noyau arqué, centre de premier ordre	21
2 - Le noyau paraventriculaire, centre principal d’expression de <i>MC4R</i>	24
3 - Le noyau ventro médian, intégration des signaux périphériques.....	25
4 – Les autres noyaux principaux et les cibles de <i>MC4R</i>	25
B – Physiologie intégrative de la régulation de la prise alimentaire.....	26
1 - Les signaux périphériques.....	27
2 - La régulation par les nutriments	31
3 - La signalisation indépendante de la leptine.....	33
C – Perturbations génétiques du contrôle de la prise alimentaire	36
1 - Les exemples murins d’obésité	36
2 - Les formes monogéniques d’obésité chez l’homme.....	37
3 - Les formes syndromiques d’obésité chez l’homme.....	39
4 - Les formes polygéniques d’obésité chez l’homme	41
III <i>MC4R</i>	44
A – Le quatrième membre d’une famille de récepteurs couplés aux protéines G	44
1 - Expression.....	44
2 - Les récepteurs couplés aux protéines G	45
3 - Les autres membres de la famille des récepteurs aux mélanocortines.....	47
B - Biologie des mutations de <i>MC4R</i>	48
1 - Modèle murin.....	48
2 – Les autres rôles de <i>MC4R</i>	49
3 - Spectre clinique des mutations chez l’Homme	50
4 - Mode de transmission, pénétrance et prévalence des mutations de <i>MC4R</i>	51
C - Pharmaco-chimie des mutations de <i>MC4R</i>	53
1 – Régionalisation de la protéine <i>MC4R</i>	53
2 - Haplo-insuffisance ou effet dominant négatif ?.....	55

3 - Ligands endogènes et synthétiques : voies thérapeutiques	56
Buts de l'étude	58
<i>PRESENTATION DES TRAVAUX</i>	59
ARTICLE 1.....	60
Caractéristiques et prévalence des mutations de <i>MC4R</i> dans l'obésité monogénique	61
ARTICLE 2.....	68
Contribution de mutations gain-de-fonction de <i>MC4R</i> dans la protection contre l'obésité commune.....	69
ARTICLE 3.....	73
Association du rs17782313 de <i>MC4R</i> avec les comportements alimentaires	74
ARTICLE 4.....	78
Interaction du variant rs17782313 de <i>MC4R</i> avec le polymorphisme de <i>FTO</i> , l'environnement et le sexe.....	79
<i>DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES</i>	87
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	88
A - Les mutations monogéniques de <i>MC4R</i> illustrent l'adage que « les gènes chargent le revolver mais c'est l'environnement qui appuie sur la gâchette » (Olden and Wilson 2000).	88
B - Comment évaluer les comportements alimentaires ?.....	90
C - Evaluation critique de la technologie des GWAS	92
1 - Les limites du protocole des GWAS.....	92
2 - D'autres utilisations des données de GWAS	94
D - Obésité monogénique : nouveaux gènes candidats.....	98
1 - Une continuité dans les différents types génétiques d'obésité.....	98
2 - Dans la voie de signalisation de <i>MC4R</i>	99
E - Utilité de nos travaux ?	100
1 – Intérêt prédictif	100
2 – Intérêt préventif	100
3 – Intérêt curatif.....	102
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	106
<i>RESUME</i>	124
<i>ABSTRACT</i>	126

LISTES DES TABLES

Tableau 1 : seuils de corpulence, définis par l’OMS.....	8
Tableau 2 : les principales procédures de chirurgie bariatrique (d’après Fisher & Schauer 2002 et Livingston 2002)	15
Tableau 3 : résumé des manipulations de la voie de l’AMPK sur les peptides de la régulation de la prise alimentaire (d’après Lam et al.) [+ augmentation ; - diminution ; O sans effet].....	33
Tableau 4 : principaux syndromes associant obésité et retard mental (d’après Delrue et Michaud 2004).....	40
Tableau 5 : comparaison de la prévalence des mutations de MC4R dans différents sous-groupes.....	62
Tableau 6 : distribution de la corpulence par génération.....	63
Tableau 7 : spectre clinique des porteurs de mutations de MC4R en comparaison avec leurs apparentés.....	66
Tableau 8 : résultats des différentes études d’associations entre les SNPs de FTO et le comportement alimentaire	76
Tableau 9 : effets du rs1421085 de FTO sur les phénotypes de corpulence dans les cohortes NFBC1986 et D.E.S.I.R.....	80
Tableau 10 : effets du rs17782313 de MC4R sur les phénotypes de corpulence dans les cohortes NFBC1986 et D.E.S.I.R.....	81
Tableau 11 : effets combinés du rs17782313 de MC4R et du rs1421085 de FTO sur les phénotypes de corpulence dans les cohortes NFBC1986 et D.E.S.I.R.....	83

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : prévalence de l'obésité dans le monde.....	10
Figure 2 : les différentes aires cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire (d'après Adan et al, 2006)	21
Figure 3 : anatomie de la voie leptine-mélanocortine	22
Figure 4 : les étapes de clivage de POMC (d'après Xiang et al. 2006).....	23
Figure 5 : interaction entre stress et prise alimentaire (d'après Nieuwenhuizen et Rutters 2008)	27
Figure 6 : Action de la ghréline sur les neurones hypothalamiques (d'après Luquet 2008).....	29
Figure 7 : les signaux viscéraux de régulation de la prise alimentaire (d'après Cummings et Overduin 2007).....	30
Figure 8 : Chaîne respiratoire et protéine découplante	30
Figure 9 : régulation de la prise alimentaire par les aliments (d'après Lam et al 2005)	32
Figure 10 : la navette lactate astrocytes/neurones (d'après Huder et al)	34
Figure 11 : les différents types de neurones sensibles au glucose (d'après Fioramonti et al 2007).....	35
Figure 12 : gènes associés avec l'obésité par les GWAS récents, (d'après Walley et al, 2009)	43
Figure 13 : signalisation des RCPG (d'après Bockaert et Pin 1999)	46
Figure 14 : désensibilisation des RCPG (d'après Pierce et Lefkowitz 2001)	46
Figure 15 : les mutations de <i>MC4R</i> en Europe et dans le monde	52
Figure 16 : les effets des mutations des RCPG (d'après Tao 2005)	54
Figure 17 : pénétrance des mutations de <i>MC4R</i> chez les adultes à 20 ans et 44 ans.....	64
Figure 18 : prévalence de l'obésité par niveau d'étude et par génotype	65
Figure 19: le locus du rs17782313 (copie d'écran de UCSC Genome browser)	74
Figure 20 : effets combinés des rs1421085 et rs17782313 sur la masse grasse dans la cohorte D.E.S.I.R. au bout de 9 ans.....	82
Figure 21 : interaction entre le rs1421085 et l'activité physique sur le z-score d'IMC chez les enfants finlandais (à gauche) et sur le risque d'obésité chez les adultes français (à droite).....	84
Figure 22 : interaction entre le rs17782313 et le sexe sur le risque d'obésité (à gauche) et sur la masse grasse (à droite) chez les adultes français.....	85
Figure 23 : illustration de l'effet d'un CNV sur la pénétrance des maladies monogéniques (d'après Beckmann et al. 2007).....	96

LISTE DES ABREVIATIONS

ACC	acétylCoA carboxylase
ACS	acylCoA synthase
ACTH	hormone adrénocorticotrophique
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
AGLC	acide gras à longue chaîne
AGRP	Agouti-related peptide
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARC	noyau arqué
ART	agouti related transcript
BBS	syndrome de Bardet-Biedl
BDNF	brain derived neurotrophic factor
CART	cocaïne et amphétamine regulated peptide
CCK	cholécystokinine
CNV	copy number variation
CPT1	carnitine palmitoyltransférase 1
CRH	corticotropin-releasing hormone
D.E.S.I.R.	Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome
DEXA	<i>Dual energy X-ray absorptiometry</i> = absorption bi-photonique à rayons X
DL	déséquilibre de liaison
DMN	noyau dorso-médian
DS	déviation standard
DTM	domaine transmembraine
FAS	fatty acid synthase
FP	fraction préventive
FTO	fat mass ans obesity associated
GHSR1a	Growth hormone secretagogue receptor (récepteur à la ghréline)
GLP-1	glucagon like peptide 1
GWAS	<i>genome-wide association study</i> = étude d'association génome entier
i.c.v. /i.p.	intra cérébro ventriculaire / intra-péritonéale
IMC	indice de masse corporelle
LH	hypothalamus latéral
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MC4R	récepteur 4 aux mélanocortines
MCD	malonylCoA degrading enzyme
MSH	melanocyte-stimulating hormone
MTII	melanotan II
NFBC1986	Northern Finland Birth Cohort 1986
NPY	neuropeptide Y
OMS	organisation mondiale de la santé
PAR	risque attribuable en population
PC1/PCSK1	prohormone convertase 1
POMC	proopiomélanocortine
PVN	noyau paraventriculaire
PWS	syndrome de Prader-Willi
PYY	peptide tyrosine-tyrosine
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
SIM1	single minded homologue 1
SNP	single nucleotide polymorphism
TFEQ	three- factor eating questionnaire
TRH	thyrotropin-releasing hormone
TRKB/NTRK2	Tyrosine kinase receptor B
UCP1	protéine découplante 1
VMN	noyau ventro-médian

INTRODUCTION

I Introduction générale

A – Epidémiologie de l'obésité

1 - Définitions et normes

L'obésité est définie par un excès de masse grasse corporelle, entraînant des problèmes de santé. Elle est considérée comme un problème majeur de santé publique depuis 1997 (James 2008). De nos jours, l'obésité et ses complications associées représentent 0,09% à 0,61% du PIB en Europe et 5 à 7% aux Etats-Unis (Bloom et al. 2008; Muller-Riemenschneider et al. 2008).

La mesure principale de l'obésité est l'indice de masse corporelle (IMC) ou indice de Quetelet, déterminé par le poids (kg) / taille (m)². Les seuils de maigreur, normalité, surpoids et obésité ont été déterminés par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en fonction de la capacité de travail, la sensibilité aux infections et des statistiques de mortalité (2000). Ces seuils sont valables partout dans le monde, à l'exception de l'Asie Pacifique où d'autres normes ont été éditées. Ils sont indiqués dans le tableau 1.

statut	IMC (kg/m ²)
maigreur	<18,5
normalité	18,5 – 25
surpoids	25-30
Obésité modérée ou de classe I	30-35
Obésité sévère ou de classe II	35-40
Obésité morbide ou de classe III	≥40

Tableau 1 : seuils de corpulence, définis par l'OMS

Chez les enfants, les effets du sexe, de l'âge et du statut pubertaire doivent être pris en compte pour déterminer le statut d'obésité. Les seuils sont établis en comparaison à des courbes d'IMC de référence. L'*international obesity task force* a défini des seuils internationaux à partir de 6 populations de référence (Cole et al. 2000). Certaines études utilisent préférentiellement les courbes de référence nationales (celles du carnet de santé en France par exemple). Les courbes de 90^e et 97^e percentiles d'IMC définissent respectivement le surpoids et l'obésité en France (Poskitt 1995). Les valeurs 1 et 2 de Z-score d'IMC sont également utilisées comme seuil.

En complément de l'IMC, on utilise parfois des données plus directes sur l'adiposité des patients. Ces données sont obtenues par densitométrie, absorptiométrie biphotonique à rayons X (DEXA), impédance bioélectrique (Kipping et al. 2008). Malheureusement ces mesures ne peuvent être effectuées sur l'ensemble de la population. La mesure du tour de taille (seuil 102 cm pour les hommes et 88 cm pour les femmes) (1998) et l'épaisseur des plis cutanés sont des mesures indirectes mais qui reflètent la distribution de la graisse sous-cutanée et viscérale (Hensrud and Klein 2006).

2 - Prévalence et évolution de l'obésité dans le monde

L'obésité est parfois considérée comme la première maladie non infectieuse mondiale. Elle touche aussi bien les pays développés que les pays en voie de développement. L'OMS évalue à 1,7 milliard le nombre d'individus en surpoids dans le monde, dont 400 millions d'obèses (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html> - le 26 mars 2009 – figure 1). Aux Etats-Unis, les obèses représentent 33% de la population. En Europe, la prévalence varie de 4,0 à 28,3% chez les hommes et de 6,2 à 36,5% chez les femmes suivant les gradients ouest/est et nord/sud (Berghofer et al. 2008).

Cette condition se développe de plus en plus tôt au cours de la vie : la prévalence de l'obésité a augmenté de 20% chez les enfants depuis les années 1970 (Kipping et al. 2008). Ainsi, une étude a estimé à 110 millions le nombre d'enfants et adolescents en surpoids ou obèses dans le monde, dont 22 millions d'enfants de moins de 5 ans (Kipping et al. 2008). Jusqu'à 50% des enfants obèses restent obèses à l'âge adulte et cette valeur est augmentée à l'adolescence (Singh et al. 2008), de fortes répercussions sont donc attendues pour les prochaines générations. Au cours des dernières décennies, la prévalence, la sévérité et la

distribution géographique de l'obésité ont également subi de profondes mutations. Le phénomène le plus frappant réside dans le constat que dans certains pays d'Afrique, le surpoids a supplanté la malnutrition (Redinger 2008). Après une expansion alarmante entre 1990 et 2000 (+ 200%), l'épidémie d'obésité a maintenant atteint un plateau aux Etats-Unis (un tiers de la population)(Bessesen 2008). Par contre, pendant la même période, l'obésité de classe III a progressé deux fois plus vite (Hensrud and Klein 2006).

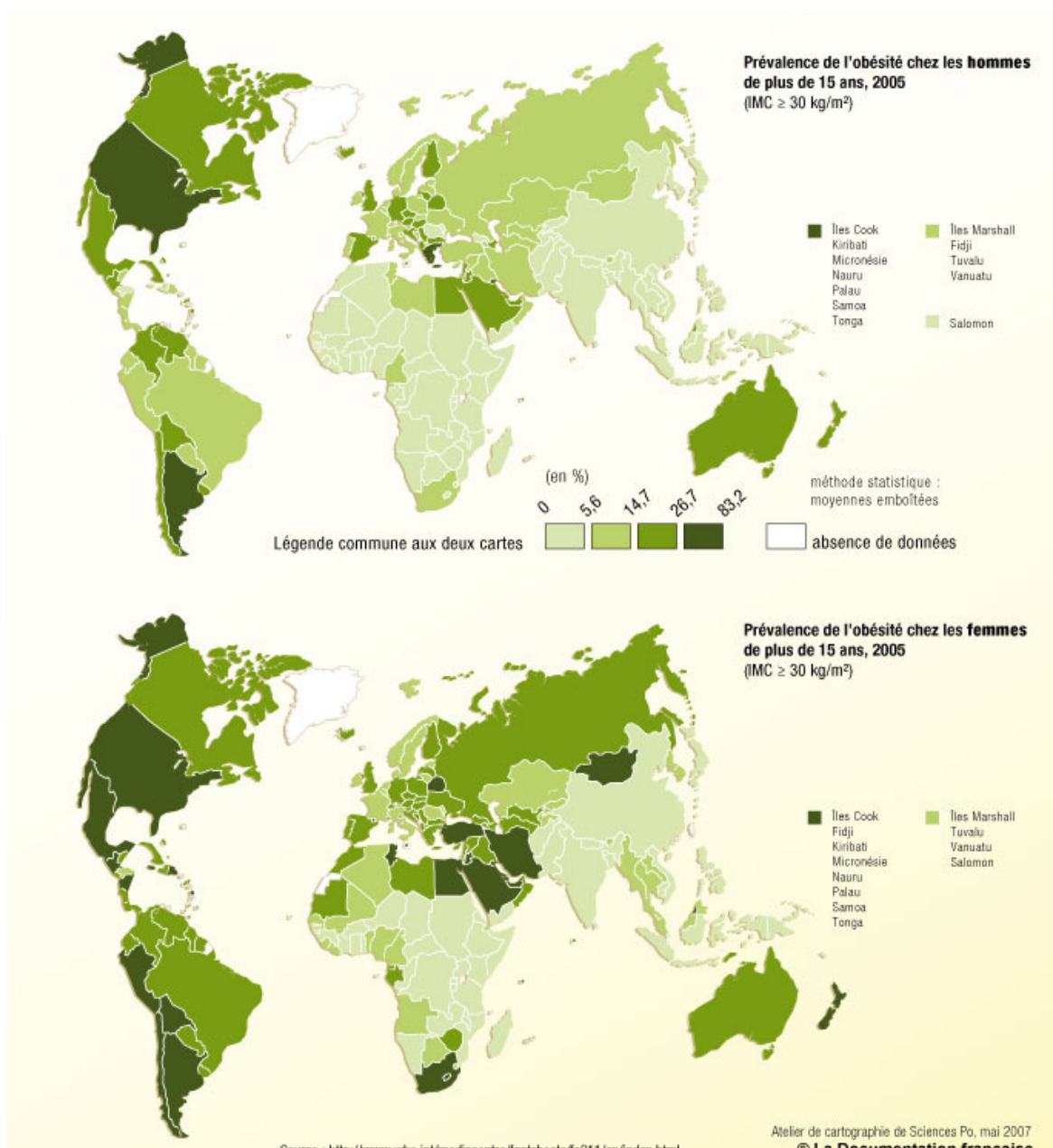


Figure 1 : prévalence de l'obésité dans le monde

B – Complications

1 - Le syndrome métabolique

De manière générale, le risque de mortalité est multiplié par 2 à 3 entre un individu obèse et un individu de poids normal (Adams et al. 2006). L'espérance de vie des obèses morbides est réduite de 5 à 20 ans selon les études (Hensrud and Klein 2006).

Le syndrome métabolique souvent associé à l'obésité, et également connu sous le nom de syndrome X, n'est pas une maladie spécifique, mais désigne plutôt une série de problèmes liés à un défaut métabolique global : hyperinsulinisme/insulino-résistance, dyslipidémie, hypertension artérielle et obésité abdominale en sont les caractéristiques principales (mais pas les seules). Il constitue un stade précoce de plusieurs maladies comme le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires et les accidents vasculaires cérébraux (Wilborn et al. 2005). Par rapport à un individu de poids normal, les obèses ont un risque multiplié par 7 d'avoir un diabète de type 2, par 6 de l'hypertension, par 4 de l'arthrite, par 3 de l'asthme, par 4 des problèmes de santé en général (Hensrud and Klein 2006; Must et al. 1999).

2 - Les autres troubles physiologiques

L'excès de poids se répercute directement sur les articulations. De ce fait, l'obésité induit fréquemment des ostéoarthrites. De plus, l'augmentation de poids s'accompagne d'une augmentation des volumes plasmatiques et sanguins qui a pour conséquence des modifications de la structure et de la fonction cardiaque, provoquant arythmie, défaut périphérique vasculaire, mort subite, athérosclérose (via la favorisation de la production de plaquette), dysfonction endothéliale, apnée du sommeil, et asthme (Wilborn et al. 2005). L'obésité a également un impact sur la composition de la bile et la motilité de la vésicule biliaire, ce qui induit une prévalence accrue de calculs biliaires et de stéatose hépatique non alcoolique (Wilborn et al. 2005). Les altérations hormonales consécutives à l'obésité sont aussi responsables de troubles de la fertilité (Wilborn et al. 2005), ainsi qu'une forte survenue d'ovaires polycystiques et un risque élevé d'éclampsie de grossesse. Enfin, l'obésité est considérée comme le facteur de risque le plus important pour le cancer après la consommation de tabac, notamment pour les cancers du colon, de la prostate, du sein et de l'œsophage (Redinger 2008).

3 - Les complications psychologiques et sociales

L'obésité a des conséquences trop souvent négligées sur la vie quotidienne, et la diminution de la qualité de vie des individus obèses est mesurable chez les adultes (Jia and Lubetkin 2005) et chez les enfants (Hughes et al. 2007). Les complications physiologiques mentionnées ci-dessus (troubles musculo-squelettiques, symptômes digestifs, etc.) et l'image que les sujets obèses ont d'eux-mêmes ont de fortes répercussions psychologiques sur les malades (dépression, anxiété, manque d'estime de soi, somatisation, phobie sociale, hypochondrie, troubles obsessionnels compulsifs) (Rosik 2005) et les individus obèses ont tendance à s'exclure et à s'isoler, une tendance accrue par la discrimination des obèses dans nos sociétés.

C – Traitements

L'évolution mondiale de l'épidémie d'obésité montre à quel point il est important de soigner les individus obèses mais également d'enrayer la progression de la maladie par des interventions préventives à l'échelle gouvernementale (James 2008). Encourager l'allaitement maternel et les bonnes habitudes alimentaires (via l'étiquetage des produits, les prix et la disponibilité), promouvoir l'activité physique, limiter le temps passé devant la télévision sont des mesures préventives évidentes mais qui ont montré leur inefficacité à enrayer l'épidémie, probablement parce qu'elles n'ont pas été assez appliquées au niveau de populations entières (James 2008; Malecka-Tendera and Mazur 2006). Quant aux patients déjà obèses, quatre grandes options thérapeutiques sont possibles pour les aider à perdre du poids.

1 - Les approches comportementales

La méthode la moins agressive repose sur les changements volontaires de comportement. En premier lieu, les patients qui cherchent à perdre du poids sont invités à augmenter leur exercice physique. Il a été mis en évidence que l'exercice physique quel qu'il soit est associé avec une réponse linéaire d'amélioration de la forme physique et les résultats sont visibles même à petite dose d'exercice (Church et al. 2007) mais il ne favorise pas la perte de poids (Harris et al. 2009). Des études sur des jumeaux monozygotes ont même montré que la pratique intensive d'un sport peut réduire la part de la génétique sur

l'IMC (Williams et al. 2005). Malheureusement, l'obésité réduit les capacités fonctionnelles des sujets (Alley and Chang 2007) et rend la pratique du sport presque impossible.

2 - Les régimes

Le présumé selon lequel une calorie est une calorie est faux ! En effet, il faut plus d'énergie à l'organisme pour brûler les protéines que les glucides, puis les lipides, à calories égales. Ainsi il a été recommandé de remplacer partiellement les glucides par des protéines pour promouvoir la perte de poids (Wilborn et al. 2005). De nombreux régimes ont été proposés. Gardner et collègues ont recensés ces régimes dans une étude « de A à Z » (Gardner et al. 2007). Pendant une année, 311 patients obèses ont été soumis aléatoirement à un type de régime, de Atkins (hypoglucidique) à Zone (hyperprotéiné, modéré en gras) en passant par LEARN (modifications générales des comportements), Ornish (hyperglucidique, hypolipidique) ou encore Weight Watchers. D'après cette étude, le régime hypoglucidique est le plus efficace. Mais le facteur-clé de réussite de tout régime, vers lequel toutes les études convergent, reste toujours l'adhésion des patients au régime prescrit (Bessesen 2008; Dansinger et al. 2005). La prise en charge de l'obésité est malheureusement très souvent inefficace à long terme : régimes et modifications du comportement présentent un taux de récurrence de 100% au bout de 5 ans (Sugerman 2000).

3 - Les médicaments

Les patients et les médecins ont nourri de grands espoirs que les avancées en science fondamentale aboutissent à la production de traitements efficaces, mais les progrès en pharmacothérapie dans le domaine de l'obésité sont encore très minces. Les cibles thérapeutiques sont la diminution de l'appétit, l'altération de l'absorption des nutriments et/ou l'augmentation de la dépense énergétique (Fujioka 2002). De nombreux médicaments ont été mis sur le marché. Pourtant aucun ne s'est révélé efficace en termes de perte de poids et tous s'accompagnent de nombreux effets secondaires indésirables, révélant une balance bénéfice/risque défavorable (communiqué de presse de l'AFSSAPS, 10 avril 2009). Les patients qui ont testé la sibutramine, l'orlistat ou le rimonabant n'ont perdu que 5 kg en moyenne et le rimonabant est responsable de dépression dans certains cas, ce qui a poussé l'Europe à le retirer de la vente (autorisé en juin 2006 – retiré en octobre 2008). L'orlistat, vendu sur ordonnance sous le nom commercial de Xenical (Roche), est responsable

d'incontinences fécales. Il est depuis quelques mois (avril 2009) proposé sans prescription sous le nom de Alli (Glaxo-Smith-Kline), avec un dosage diminué de moitié. Une étude menée sur Alli auprès de 391 Américains en surpoids a montré une perte de poids de 3 kg sur 16 semaines pour l'orlistat à 60 mg associé à un régime hypocalorique et de l'exercice physique, par rapport au groupe sous placebo (avec régime et exercice) qui avait perdu environ 2 kg (Anderson et al. 2006), ce qui permet au fabricant de mettre en avant l'argument choc : 50% de perte de poids supplémentaire avec Alli! Toutefois, ce médicament représente une avancée dans les mentalités : destiné à lutter contre le surpoids chez l'adulte, il permet aux individus de se prendre en charge avant l'installation de la maladie et des troubles associés. Quoiqu'il en soit, le traitement médicamenteux est encore à ce jour inefficace contre l'obésité. La recherche pharmacologique s'oriente vers le développement de polytraitements mais les effets secondaires indépendants du traitement de l'obésité ont fait perdre leur motivation aux entreprises pharmaceutiques.

4 –La chirurgie

La chirurgie se présente comme la possibilité de traitement offrant les meilleurs résultats en termes de perte de poids sur le long terme : 14 à 25% de perte de poids suivant les procédures (Sjostrom et al. 2007). Les études sur la cohorte SOS montrent également un réel bénéfice à long terme sur la mortalité (Adams et al. 2007; Sjostrom et al. 2007).

En 1978, le *National Institute of Health* a organisé la première « conférence pour le développement d'un consensus sur la chirurgie gastro-intestinale de l'obésité sévère » mais ce n'est qu'en 1991 qu'un protocole interdisciplinaire a été mis en place. Les critères d'éligibilité à la chirurgie bariatrique ont été déterminés en fonction de l'âge des patients, de leur IMC et des comorbidités dont ils sont atteints (désordres métaboliques, cardiorespiratoires et psychologiques sont pris en compte). Ainsi, pour l'instant, les chirurgiens ne peuvent opérer que des adultes avec un $IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$ ou $IMC \geq 35 \text{ kg/m}^2$ + au moins 1 comorbidité, et pour lesquels les procédures non invasives de perte de poids sont restées sans succès. Les recommandations stipulent que les patients sont également tenus de se soumettre à un suivi médical et chirurgical régulier, mais cette directive n'est pas toujours suivie, notamment dans les cliniques privées.

Aujourd'hui deux types de procédures sont pratiqués : les procédures malabsorptives, qui induisent une diminution de l'absorption des aliments par le tractus digestif, et les

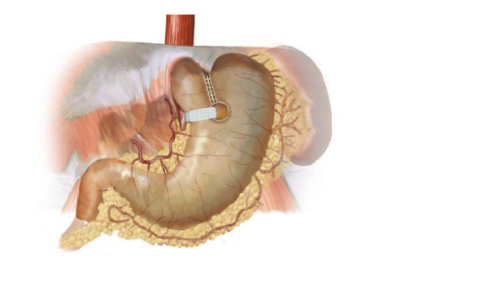
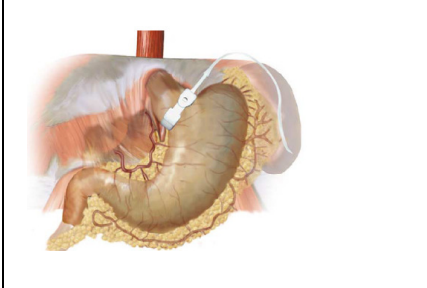
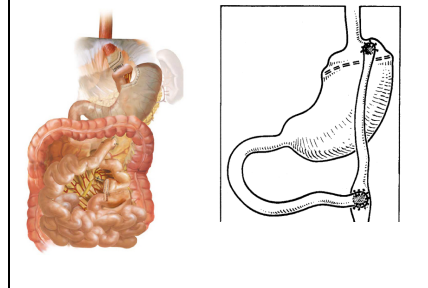
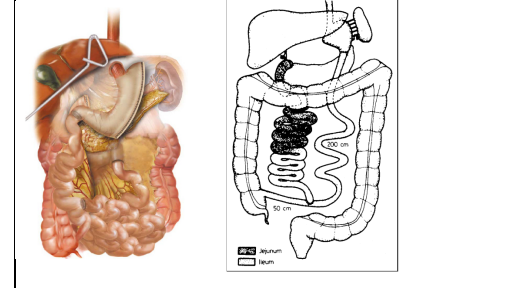
	Restriction gastrique		Méthode intermédiaire combinée	Malabsorption intestinale
	Gastroplastie Verticale avec bande	Laparoscopique Cerclage gastrique avec anneau modulable	Bypass gastrique Roux-en-Y	Diversion Biliopancréatique
Description	Agrafage de l'estomac pour former un petit compartiment gastrique étroit s'évacuant par un petit chenal. Apposition d'un anneau à hauteur de la sortie de la poche gastrique pour ralentir la vidange de l'estomac	Apposition d'un anneau en silicone autour de la partie supérieure de l'estomac, formant une poche gastrique de 15ml environ – approche la moins invasive possible	Couture d'une petite poche gastrique de 15-20ml, le reste de l'estomac est agrafé. La nouvelle poche débouche sur la partie inférieure de l'intestin grêle sectionné au niveau du duodénum	4 étapes successives : hémigastrectomie, cholécystectomie, section de l'intestin grêle, anastomose gastro-jéjunale et entre le petit et le gros intestin. L'intestin grêle est alors divisé en 3 portions : alimentaire, biliopancréatique et commune.
				
Efficacité, commentaire	Méthode rapide à morbidité péri-opératoire réduite, adaptée aux moindres degrés d'obésité. Nécessité une observance soutenue au régime alimentaire- 40% des patients maintiennent leur perte de poids pendant 3 à 5 ans	Mortalité péri-opératoire quasi nulle Perte de 38% du poids en excès, guérison quasi systématique du diabète, Complexité technique	Plutôt réservée aux patients de BMI >= 50 kg/m ² Enorme potentiel en termes de perte de poids à long-terme	Les patients perdent en moyenne 70% de leur excès de poids Mauvaise absorption de certains aliments, surtout des graisses
Complications	- déhiscence des sutures - dilatation de l'orifice de vidange - vomissements fréquents, reflux gastro-œsophagien - intolérance à l'anneau, infection, migration, érosion du matériel nécessitant une réopération	Dilatation œsophagienne, glissement gastrique (23%), prolapsus de l'estomac, obstruction du bol alimentaire intolérance à l'anneau, infection, migration, érosion du matériel nécessitant une réopération, perforation gastro-intestinale	3-20% de complications et mortalité 1% Embolie pulmonaires, hernies, ulcères, obstruction du bol alimentaire mais surtout déficience en vitamine (B12) et en minéraux (Fe) conduisant à la mort (malnutrition), hémorragie gastro-intestinale	20-25% de complications et 1% de décès. Diarrhées et stéathorées intermittentes, malnutrition avec déficience en vitamines (A, D, K, E) et conséquences inhérentes (troubles oculaires, osseux), parfois anémie et déficience en protéines. Hernies, infection et déhiscence, thromboses, embolie pulmonaire, obstruction du bol alimentaire, (poly)arthrites, hyperparathyroïdie

Tableau 2 : les principales procédures de chirurgie bariatrique (d'après Fisher & Schauer 2002 et Livingston 2002)

procédures restrictives, qui limitent l'ingestion des aliments et augmentent la satiété. Les nouvelles techniques, telles que le bypass gastrique Roux-en-Y combinent ces deux effets (Fisher and Schauer 2002). Le tableau 2 présente les techniques principales mais il faut savoir qu'il en existe d'autres telles que la gastrojéjunostomie (abouchement chirurgical de l'estomac au jéjunum), la stimulation gastrique (une sonde de stimulation est connectée à un pacemaker sous-cutané délivrant des impulsions continues) ou encore le ballon intragastrique (Fisher and Schauer 2002; Korenkov and Sauerland 2007; Livingston 2002; O'Brien et al. 2006).

La chirurgie bariatrique, quelque soit la procédure appliquée, s'accompagne de complications dans 10% des cas en moyenne et conduit à la mort dans 1% des cas (Livingston 2002). Toutefois, elle se révèle bénéfique aussi bien en termes de perte de poids à long-terme que d'amélioration des comorbidités : guérison du diabète dans 50-82% des cas, de l'apnée du sommeil dans 93% des cas et de l'hypertension dans 50-66% des cas (Mason et al. 1997; Samuel et al. 2006; Santry et al. 2005).

D – Causes

La chirurgie n'est pourtant pas une solution applicable à tous les patients obèses. De plus, tous les traitements s'attaquent aux symptômes mais pas à la maladie elle-même, car les réelles causes de l'obésité ne sont pas maîtrisées.

1 - Causes environnementales et facteurs de risque

La diminution de la **dépense énergétique quotidienne** (Brownson et al. 2005) et la tendance à la **surconsommation** calorique active (Ravussin 2005; Redinger 2008) ou passive (James 2008) sont les principales causes sociétales proposées de l'épidémie d'obésité. Ravussin a montré qu'un excès de 100 calories par jour suffit à favoriser l'apparition de l'obésité (Ravussin 2005) et les rongeurs placés en régime gras deviennent en général obèses (Masek and Fabry 1959). La composition des plats cuisinés est plus riche en sucre, gras, protéines et/ou sel, de ce fait nous consommons une plus grande quantité d'énergie sans forcément augmenter les portions (James 2008). Inversement des enquêtes au Royaume-Uni attestent que la consommation alimentaire a diminué, comme la taille des portions dans les restaurants (James 2008). S'il est généralement considéré que la robotisation et la mécanisation ont forcément diminué notre dépense énergétique quotidienne domestique et professionnelle (Brownson et al. 2005), une étude récente a montré que les dépenses

énergétiques des Européens et Américains n'ont pas beaucoup diminué et restent comparables à celles des populations du tiers monde et des autres mammifères (Westerberp and Speakman 2008).

La brutale transition nutritionnelle consécutive à l'occidentalisation des pays émergents est également un élément d'explication pour l'épidémie d'obésité, dans les pays d'Amérique latine notamment (Ford and Mokdad 2008). L'ethnie est considérée comme jouant un rôle prédisposant : en effet, aux Etats-Unis, les Afro-Américains, Mexicains et Natifs Américains sont plus susceptibles de devenir obèses que les Caucasiens (Redinger 2008). Christakis et Fowler ont montré le rôle des réseaux sociaux grâce à la cohorte Framingham : le risque de devenir obèse est augmenté de 57% pour les individus ayant un ami obèse (Christakis and Fowler 2007). Le **statut socio-économique** (SSE) est également inversement corrélé au risque d'obésité dans les pays industrialisés et positivement corrélé dans les pays en transition industrielle. Dans les premiers, les aliments à haute qualité nutritionnelle sont plus chers et délaissés par les classes populaires. Et ceci constitue un cercle vicieux : les individus à faible SSE deviennent obèses et les individus obèses obtiennent moins de promotions sociales (Krieger 2003). Au contraire, dans les pays émergents, les familles aisées migrent vers les nouvelles villes et découvrent le mode de vie occidental (Buttenheim et al. 2009). De ce fait, certaines études épidémiologiques considèrent le milieu de vie (rural/urbain) comme un facteur de risque d'obésité (Buttenheim et al. 2009; Maddah and Sharami 2009).

Toutefois, il est important de constater que nombre de ces facteurs sont liés les uns aux autres et ne sont donc pas tous directement causaux. Par exemple, le **facteur ethnique** regroupe de nombreuses composantes (Caprio et al. 2008) : les populations hispaniques des Etats-Unis sont souvent exclues et recluses dans des quartiers ghettos. Victimes de discrimination, elles ont plus de difficulté à prétendre à de meilleurs statuts socio-économiques et éducatifs et sont plus stressées par les critiques raciales, d'après cette même « déclaration consensuelle ». De plus, l'origine ethnique s'accompagne d'un héritage culturel plus ou moins empreint par l'acculturation et qui se répercute aussi bien sur les préférences alimentaires que sur l'image corporelle et les standards de corpulence. Corpulence et processus métaboliques sont par ailleurs dépendants du patrimoine génétique, partiellement propre à chaque ethnie (Caprio et al. 2008). Il est donc particulièrement important de distinguer **association et causalité**. En effet, des

interprétations abusives peuvent conduire à conclure que l'augmentation générale d'IMC de la population humaine est responsable de la pollution par émission de carbone (Edwards and Roberts 2009) ! D'autres explications proposées par les études épidémiologiques ont été confirmées par des expériences en laboratoire. C'est le cas notamment du modèle selon lequel la diminution de la **durée du sommeil** et l'absence de régularité du cycle éveil/sommeil sont des facteurs de risque d'obésité (Van Cauter and Knutson 2008). Enfin, la découverte du rôle de la **flore intestinale** sur le métabolisme de l'hôte est à l'origine d'un nombre croissant d'études dans ce domaine (Ley et al. 2006; Turnbaugh et al. 2006). L'environnement fœtal est également à l'origine de reprogrammations épigénétiques adaptatives (Gluckman and Hanson 2008) : deux hypothèses tentent d'expliquer pourquoi la sous-nutrition fœtale et l'obésité maternelle conduisent à un plus fort risque d'obésité. Dans le premier cas, la voie maladaptative prépare le nourrisson victime de carences à rencontrer le même environnement pauvre après la naissance tandis que cet environnement est plus favorable ; ce scénario cherche à expliquer l'obésité dans les pays en transition. Au contraire, dans des pays tels que les Etats-Unis, où 50% des femmes enceintes sont obèses ou présentent un diabète gestationnel, les taux d'insuline circulante participent à d'autres modifications épigénétiques promouvant l'adiposité. Certains modèles animaux ont validé ces hypothèses (Gluckman and Hanson 2008).

A contrario, l'**allaitement maternel** est reconnu comme un facteur de protection contre l'obésité, au moins chez l'enfant (Arenz et al. 2004).

En définitive, le modèle purement environnemental montre ses limites : en effet, à environnement égal, les différences interindividuelles sont considérables. Une partie de la population présente un poids normal tout en partageant les facteurs de risque mentionnés ci-dessus. Cette différence est expliquée par les facteurs génétiques.

2 – Arguments en faveur de la contribution de la génétique dans l'obésité commune

L'héritabilité désigne la part des gènes dans les différences interindividuelles, c'est-à-dire dans la variance d'un caractère exprimé par un échantillon de sujets. Il s'agit d'une mesure statistique et quantitative, qui définit à un moment donné et sur une population donnée la part respective des gènes et de l'environnement. Plusieurs éléments prouvent que l'obésité peut être une maladie génétique (Maes et al. 1997). Malgré des chiffres très variables (55-90%), il apparaît aux travers des études un consensus sur le rôle non

négligeable de la génétique dans l'obésité. L'IMC, l'épaisseur des plis cutanés, le tour de taille, le rapport taille/hanche, la graisse troncale sont partiellement héritables et présentent une composante génétique propre et une composante commune (Haworth et al. 2008b), chez l'enfant (Haworth et al. 2008b) et chez l'adulte (Ortega-Alonso et al. 2009). De plus, la prise de poids (Ortega-Alonso et al. 2009) et les comportements alimentaires (Carnell et al. 2008) sont également héritables. Une étude récente a montré que dans l'environnement « toxique » ou « obésogénique » actuel, l'héritabilité est même renforcée (Wardle et al. 2008b).

Deux hypothèses proposent une explication à la présence de polymorphismes prédisposant à la production de masse grasse et à la prolifération récente et rapide de l'obésité à l'échelle mondiale. La plus connue est celle du « thrifty gene » ou « gène économe » (Neel 1962). Cette théorie suggère que nos gènes ont évolué pour favoriser la collecte de nourriture et l'accumulation de graisse afin de prévenir les périodes de famines. Aujourd'hui où la nourriture abonde, cette évolution serait devenue désavantageuse et nous devenons obèses par manque de famine... A l'inverse, Speakman propose une autre alternative : « la fuite face aux prédateurs » (Speakman 2007). Selon lui, les famines sont bien trop rares et la mortalité due à la famine trop faible (5%, concernant surtout les enfants et les personnes âgées) pour exercer une pression sélective suffisante sur nos gènes. En revanche, Speakman propose que notre poids serait borné d'une part par le stockage en prévision de privation de courte durée, la nécessité de maintenir un poids raisonnable qui protège des infections, et d'autre part par la nécessité de garder une corpulence permettant de fuir les prédateurs (courir vite, se cacher dans des recoins inaccessibles). Aujourd'hui, les prédateurs des hommes se font rares, mêmes dans les pays d'Afrique. La prédisposition génétique à l'obésité s'interpréterait alors non plus comme le résultat d'une pression de sélection mais comme une absence de sélection. Speakman parle de "scénario non-adaptatif".

II Physiologie de la régulation de la prise alimentaire

Même si la composition et la taille des repas varient chaque jour et entre individus, l'apport énergétique cumulé et la dépense énergétique s'équilibrent presque parfaitement sur quelques jours (Schwartz et al. 2000). Ce processus actif de régulation est appelé homéostasie énergétique. Les expériences d'injections intracérébroventriculaires (i.c.v.) chez le rat ont permis d'affiner la connaissance des voies de signalisation de l'homéostasie énergétique (Schwartz et al. 2000). Le nombre croissant des molécules impliquées (une revue de 1999 recensait déjà 25 neurotransmetteurs impliqués dans la régulation centrale de la prise alimentaire)(Kalra et al. 1999) montre à quel point la régulation de la prise alimentaire est un processus complexe.

A – Anatomie et physiologie de la voie leptine-mélanocortine : une signalisation principalement hypothalamique

L'hypothalamus est communément admis comme le centre de régulation de l'homéostasie énergétique à long terme, recevant en permanence des informations périphériques et centrales sur le statut nutritionnel, énergétique et environnemental du corps (Valassi et al. 2008). La régulation à court terme (initiation et terminaison des repas) est régulée quant à elle par le tronc cérébral (Grill and Kaplan 2002). L'hypothalamus est subdivisé en 40 noyaux, dont les plus importants seront décrits dans ce chapitre.

La signalisation de la satiété démarre principalement du tissu adipeux, tissu de réserve lipidique. Celui-ci libère la **leptine**, proportionnellement aux réserves énergétiques (elle est donc élevée chez les obèses et diminue pendant le jeûne). Cette cytokine joue un rôle à long terme sur l'adiposité et à court terme sur la quantité de nutriments ingérée au cours du repas (Ahima et al. 2000). Elle traverse la barrière hémato-encéphalique par un mécanisme saturable et est perçue par ses récepteurs dans le noyau arqué de l'hypothalamus où elle supprime les peptides orexigènes NPY et AGRP (ligand de MC4R) et augmente les taux de peptides anorexigènes α -MSH (ligand de MC4R) et CART (Ahima et al. 2000).

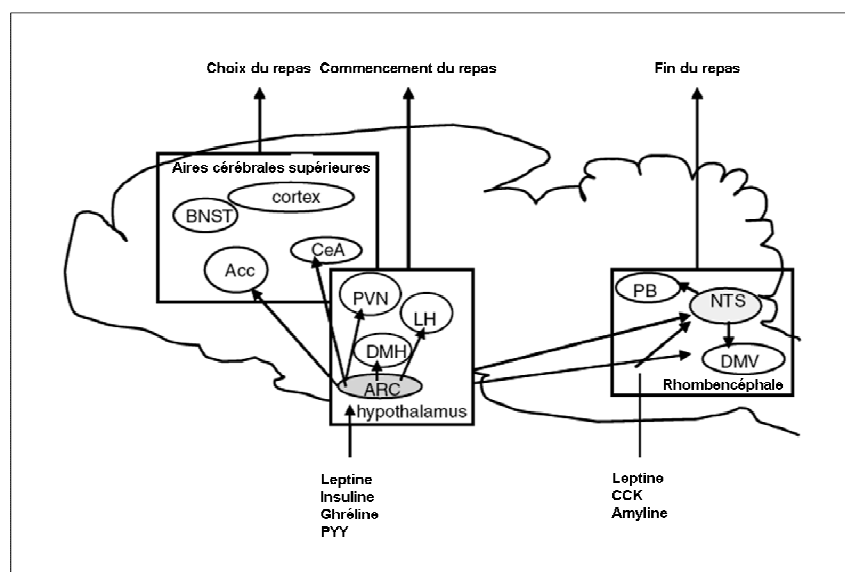


Figure 2 : les différentes aires cérébrales impliquées dans le contrôle de la prise alimentaire (d'après Adan et al, 2006)

1 – Le noyau arqué, centre de premier ordre

Le noyau arqué (ARC) est situé à la base de l'hypothalamus, sous le troisième ventricule. Il est le centre relais principal des effets de la leptine (Adan et al. 2006). Dans cette zone du cerveau, l'absence de barrière hémato-encéphalique fait de l'ARC un noyau stratégique, en communication directe avec les signaux périphériques. L'ARC intègre ainsi de nombreux signaux neuraux et hormonaux (Schwartz et al. 1997) ; on parle de centre de premier ordre. Le noyau arqué renferme les corps cellulaires des neurones à NPY, aux opioïdes, POMC, GABA, AGRP dont les axones projettent vers les noyaux dorsomédian, ventromédian, paraventriculaire et vers l'aire préoptique (Kalra et al. 1999). Or NPY et POMC sont respectivement des antagonistes et agonistes endogènes du récepteur MC4R (*voir plus loin*); cela implique une régulation très précise de la fonction mélanocortine dans le cerveau.

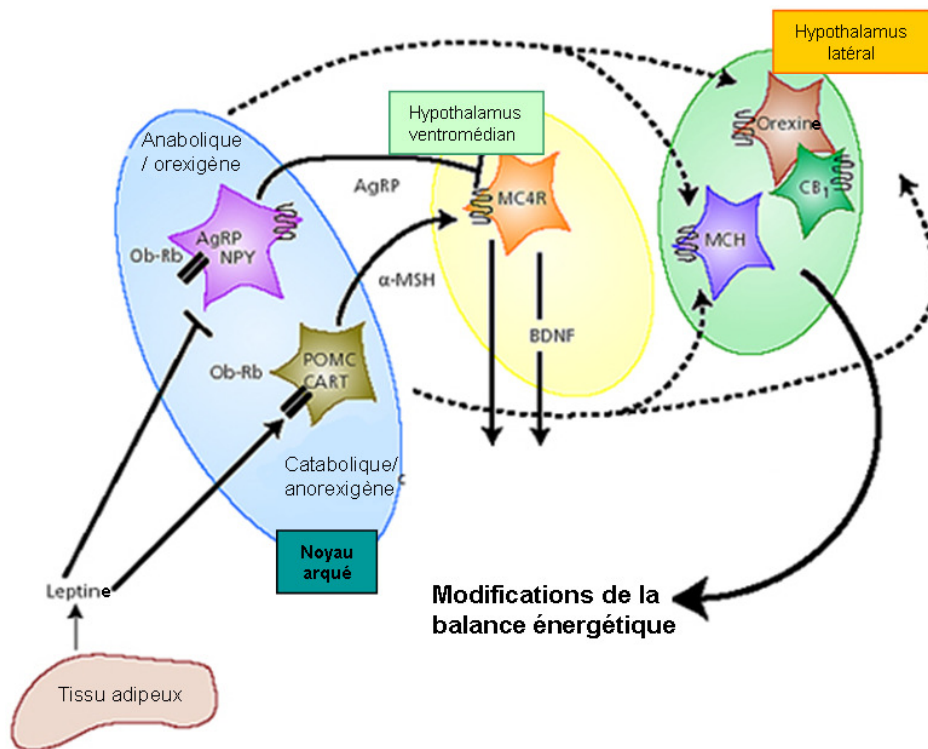


Figure 3 : anatomie de la voie leptine-mélanocortine

1-1- Le neuropeptide Y

Le neuropeptide Y (NPY) appartient à la famille des polypeptides pancréatiques. Il est exprimé principalement dans les neurones du noyau arqué. De faibles taux de leptine et le jeûne prolongé augmentent l'expression et la libération de NPY dans le noyau paraventriculaire *in vivo* et *in vitro* (Dube et al. 1992). Le site d'action principal de NPY réside dans le noyau paraventriculaire mais les neurones à NPY se projettent aussi dans l'hypothalamus latéral, l'aire périfornicale, le noyau ventromédian et le noyau dorsomédian. L'administration centrale de NPY inhibe la thermogénèse et active la prise alimentaire et l'adipogenèse chez le rat (Williams et al. 2004). Il induit aussi les enzymes lipogéniques dans le foie et le tissu adipeux (Billington et al. 1991) et est considéré comme le signal orexigène le plus puissant (Valassi et al. 2008). Les souris *ob/ob* déficientes en NPY présentent un phénotype d'hyperphagie et d'obésité diminué par rapport aux souris *ob/ob*. Par contre, les souris invalidées pour NPY sur un fond génétique normal ont une réponse normale à la leptine, ce qui suggère l'existence de phénomènes compensateurs. Environ 90% des neurones à NPY coexpriment le gène de l'Agouti-related protein (Hahn et al. 1998).

1-2- La protéine Agouti-related (AGRP)

Le gène *ART* (codant la protéine Agouti-related – AGRP) a été cloné chez l'homme par homologie avec le gène *Agouti* responsable du phénotype AY/a (Johnson et al. 1991). *ART* est exprimé exclusivement dans les neurones du noyau arqué exprimant *NPY*, son expression est stimulée par le jeûne et en cas de déficience à la leptine, augmentée chez les souris *ob/ob* et *db/db* et chez les individus obèses, elle est inhibée par infusion de leptine (Katsuki et al. 2001). AGRP est un antagoniste de MC4R, il a une action compétitive sur les agonistes du récepteur et joue également un rôle d'agoniste inverse sur son activité constitutive (Haskell-Luevano and Monck 2001). L'administration intracérébroventriculaire d'AGRP provoque l'hyperphagie. Des peptides synthétiques élaborés à partir de AGRP sont utilisés chez les modèles animaux et sont des pistes thérapeutiques, notamment les peptides AGRP(87-132) et AGRP(110-117).

1-3- La proopiomélanocortine (POMC)

Les neurones à POMC sont principalement anorexigènes, via la production et la libération d' α - et de β -Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) qui activent MC4R et inhibent la prise alimentaire. Toutefois, POMC est le précurseur de nombreux peptides, suite à l'action des proconvertases 1 et 2 (figure 4). Il produit notamment la β -endorphine, un peptide opioïde qui stimule l'ingestion via l'activation des récepteurs mu et kappa. L'expression de *POMC* est modulée par la prise alimentaire (Breen et al. 2005). Elle est diminuée dans le noyau arqué des souris *ob/ob* et *db/db* et supprimée par l'administration de *NPY* (Schwartz et al. 1997).

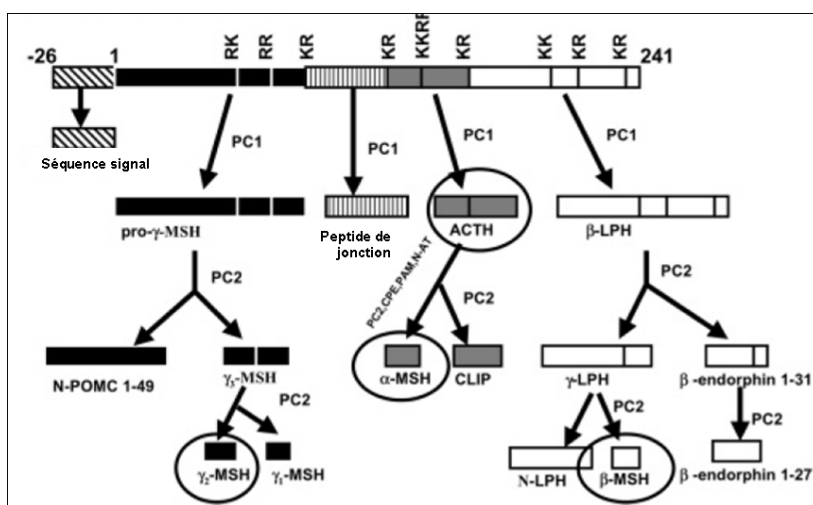


Figure 4 : les étapes de clivage de POMC (d'après Xiang et al. 2006)

De plus, les neurones à POMC expriment le récepteur à la leptine, c'est pourquoi un traitement à la leptine induit une diminution de l'expression de *POMC* (Schwartz et al. 1997).

Les souris déficientes en POMC présentent une obésité hyperphagique et une insuffisance rénale, elles sont hypersensibles aux glucocorticoïdes (Yaswen et al. 1999). Chez l'homme, des mutations ont été publiées et sont responsables d'un phénotype proche du phénotype murin (Krude et al. 1998) (*voir plus loin*).

Les neurones à POMC produisent également le Cocaine- et Amphetamine-regulated transcript (CART), aux effets anorexigènes.

2 - Le noyau paraventriculaire, centre principal d'expression de *MC4R*

Le noyau paraventriculaire (PVN) est également situé sous le toit du troisième ventricule de l'hypothalamus. Il reçoit des projections du noyau arqué et du noyau du tractus solitaire (Sawchenko and Swanson 1983) et régule une large variété de fonctions endocrines et autonomes (Palkovits 1999). Le noyau paraventriculaire est un site crucial dans le contrôle de la prise alimentaire, via la production et la distribution de signaux orexigènes et anorexigènes, notamment en réponse à la leptine (Grill and Kaplan 2002). De plus, les subdivisions dorsale, ventrale et latérale parvocellulaires sont **les principales zones d'expression de *MC4R*** (Kishi et al. 2003). Des lésions du PVN causent une augmentation de la prise alimentaire conduisant à une profonde obésité (Aravich and Sclafani 1983). Des expériences de traçage viral ont également montré que le PVN envoie des informations de régulations au tissu adipeux (Bamshad et al. 1999) et au pancréas (Jansen et al. 1997).

Le noyau paraventriculaire produit notamment la corticotropin-releasing hormone (CRH) et la thyrotropin-releasing hormone (TRH). Une sous-population des neurones à CRH ou à TRH du noyau paraventriculaire contient des récepteurs *MC4R* (Lu et al. 2003). L'expression de la CRH dans le noyau paraventriculaire est stimulée par la leptine et agit en aval de *MC4R* (Lu et al. 2003). Chez l'homme, cette hormone est responsable de l'augmentation de la dépense énergétique et de l'oxydation des graisses (Smith et al. 2001). Elle participe également à la régulation de l'axe pituitaire-surrénal. La CHR stimule la libération d'hormone adrénocorticotrophique (peptide produit par le clivage de POMC) qui stimule à son tour la sécrétion de cortisostérone. L'injection de CRH dans le noyau paraventriculaire uniquement induit une diminution de la prise alimentaire (Morley 1987).

3 - Le noyau ventro médian, intégration des signaux périphériques

Le noyau ventro-médian (VMN) se caractérise par sa grande densité de récepteurs et la faible quantité de neuropeptides qu'il libère. Il intègre les signaux centraux du noyau arqué, du noyau paraventriculaire et du noyau dorsomédian (pour revue (Kalra et al. 1999)). Il transfère alors l'information vers la moelle épinière et le tronc cérébral. Des lésions du VMN induisent une hyperphagie et une prise de poids persistantes, ce qui montre le rôle de ce noyau dans le contrôle de la prise alimentaire (Grill and Kaplan 2002). Des microinjections de NPY, galanine, GABA et β -endorphine dans le noyau ventromédian stimulent la prise alimentaire (pour revue (Kalra et al. 1999)).

4 – Les autres noyaux principaux et les cibles de MC4R

L'**hypothalamus latéral** (LH) consiste en une bande contiguë dorsalement et latéralement au VMN, il s'étend du tegmentum mésencéphalique jusqu'à l'aire préoptique latérale. Le « circuit de la récompense » (en anglais « medial forebrain bundle ») traverse le LH (Kalra et al. 1999). Des lésions de l'hypothalamus latéral provoquent l'aphagie (absence de faim), l'adypsie (absence de soif) et une perte de poids temporaire (Luiten et al. 1987). Les animaux retrouvent ensuite un poids normal, c'est pourquoi le LH est considéré comme le site de l'alimentation d'urgence. Il produit notamment la melanin-concentrating hormone, les orexines et le glutamate et exprime *MC4R* (Kalra et al. 1999).

Le **noyau dorso-médian** (DMN) reçoit les efférences NPY du noyau arqué et projette ses axones vers le noyau paraventriculaire et le noyau ventromédian. Le DMN relaie l'information neuroendocrine autonome et la réponse au stress (Adan et al. 2006). L'activation des neurones du noyau dorsomédian par la leptine inhibe les effets orexigènes de NPY. Des lésions électrolytiques du DMN perturbent faiblement l'alimentation mais des micro-injections de signaux orexigènes provoquent la prise alimentaire (Bernardis and Bellinger 1987). C'est l'un des noyaux cibles de MC4R (Kim et al. 2000).

Le **noyau supra-chiasmatique** est constitué de deux petits noyaux de part et d'autre du troisième ventricule. Il est responsable de la régulation temporelle de la prise alimentaire (Van den Pol and Powley 1979). Ce système de régulation est une explication physiologique de l'association entre le manque de sommeil et l'obésité hyperphagique (*voir I*).

Le **noyau du tractus solitaire** n'appartient pas au cerveau mais au tronc cérébral : il est situé entre le troisième ventricule et l'éminence médiane et reçoit des projections

denses du noyau arqué. Ce noyau exprime *MC4R* et l'injection de melanotan II dans le 4^e ventricule est aussi efficace que dans ventricule latéral (Grill et al. 1998). Le complexe dorsovagal relaie donc l'information *MC4R* vers le contrôle autonome.

Enfin, Kim et coll. ont observé une expression de *MC4R* dans **l'aire préoptique médiane de l'amygdale**, responsable de la perception du goût (Kim et al. 2000). Dans cette région, les agonistes de *MC4R* sont sans effet tandis que ses antagonistes augmentent la prise alimentaire.

B – Physiologie intégrative de la régulation de la prise alimentaire

La voie de la leptine-mélanocortine interagit en permanence avec les environnements intérieur (intestin, estomac, tissu adipeux) et extérieur (nutriments, vue, odorat). L'organisme dispose de moyens de contrôle et de rétrocontrôle sur ces éléments. C'est pourquoi les réductions volontaires de prise alimentaire sont enrayées par les réductions involontaires de dépenses énergétiques (phénomènes compensatoires), ce qui rend la perte de poids plus complexe qu'une simple équation. Par ailleurs, ces contrôles s'effectuent dans de nombreux organes, au niveau périphérique (tissu adipeux, estomac, intestin, pancréas) et cérébral. La physiologie intégrative du corps, et notamment du contrôle de la prise alimentaire, n'est pas seulement maintenue par un système endocrine complexe, mais également par l'interaction bidirectionnelle des organes périphériques avec le système nerveux central autonome, on parle d'**axe viscères-cerveau** (Romijn et al. 2008). Le cerveau (hypothalamus et rhombencéphale en particulier) reçoit les signaux neuraux et hormonaux du tractus digestif et du tissu adipeux en réponse à la prise alimentaire et les intègre avec les signaux d'autres organes pour orchestrer les réponses physiologiques (initiation ou terminaison des repas).

Ces autres signaux peuvent passer par exemple par le nerf optique : en effet, la vue de nourriture disponible est un signal-clé de déclenchement de la prise alimentaire via la libération d'hormones (Nieuwenhuizen and Rutters 2008). Les signaux corticaux émis par l'axe **hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien** (comportements sociaux, émotionnels et acquis) jouent également un rôle. Il a notamment été montré que les hormones des voies des corticoïdes (minéralocorticoïdes et glucocorticoïdes) induisent une alimentation émotionnelle en réponse au stress, particulièrement chez la femme (figure 5) (Nieuwenhuizen and Rutters 2008).

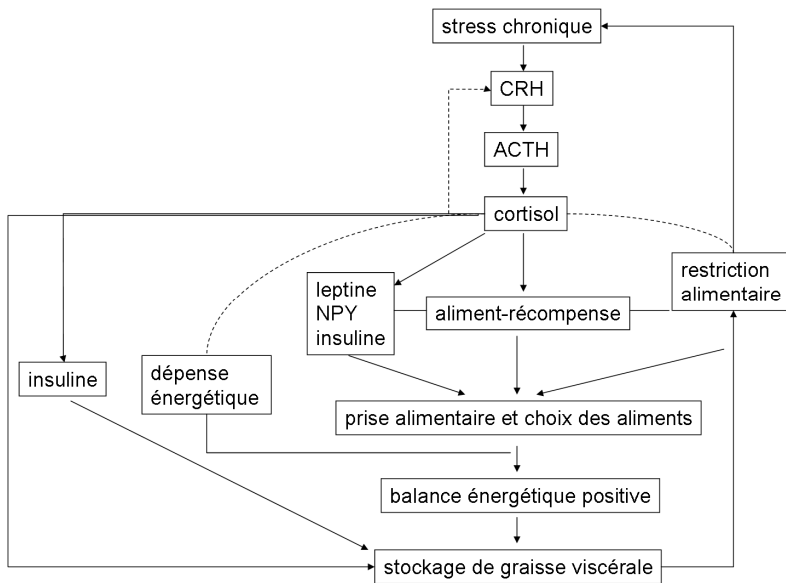


Figure 5 : interaction entre stress et prise alimentaire (d'après Nieuwenhuizen et Rutters 2008)

1 - Les signaux périphériques

1-1- En amont de la voie leptine-mélanocortine

Dans le tissu adipeux

Le stockage des lipides est le reflet d'un apport excessif d'énergie par rapport à la dépense. La plus grande partie des réserves lipidiques du corps humain est stockée dans le tissu adipeux. Longtemps négligé, le tissu adipeux joue un rôle critique dans l'homéostasie énergétique, non seulement en stockant des triglycérides mais également en répondant aux signaux neuraux, aux nutriments et aux hormones, et en sécrétant des cytokines qui contrôlent notamment la prise alimentaire et la thermogénèse (Ahima 2006). Le tissu adipeux blanc participe à l'homéostasie énergétique en sécrétant notamment de la leptine et de l'adiponectine.

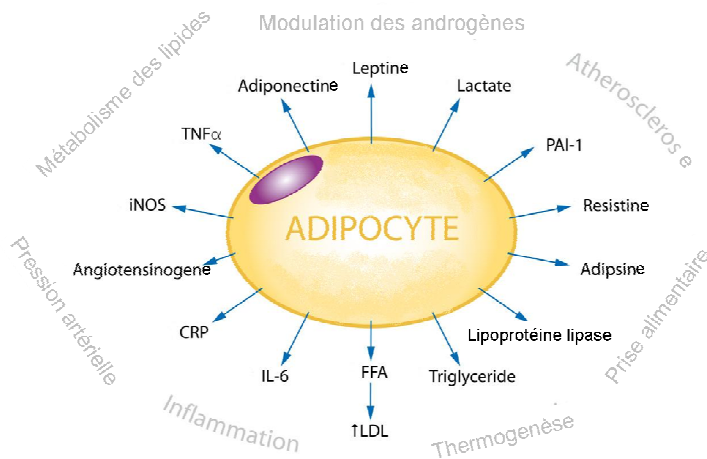


Figure 6 : Les adipokines (d'après Carruthers et al, 2008)

Les signaux gastriques, intestinaux et pancréatiques

L'estomac, les intestins et le pancréas participent également aux rétrocontrôles qui régissent l'homéostasie énergétique. Le premier signal gastrique est un signal mécanique : il s'agit de la **distension de la poche gastrique**. Les animaux dont la nourriture est drainée hors de l'estomac au fur et à mesure de l'ingestion mangent des repas volumineux au delà de leurs besoins (Davis and Smith 1990) tandis que la fermeture provoquée du pylore conduit les animaux à se nourrir en deçà de leurs besoins (Ritter 2004). L'estomac est également un organe exocrine : il produit la seule hormone orexigène circulante connue, la **ghréline**, dont le taux est inversement corrélé à l'adiposité (Cummings and Overduin 2007). Ce ligand endogène du growth hormone secretagogue receptor (GHSR1a) (Kojima et al, Nature 1999, revue Wren and Bloom) agit sur l'homéostasie du glucose, la motilité gastrique, les sécrétions exocrines du pancréas (insuline notamment), la fonction cardiovasculaire, l'immunité et l'inflammation. On observe un pic de sécrétion de ghréline juste avant les repas et cette sécrétion est arrêtée par l'ingestion de nutriments. Les souris déficientes en ghréline ou en GHSR1a sont résistantes à l'obésité (Wortley et al, JCI 2005). L'injection de ghréline dans le noyau arqué stimule la prise alimentaire mais est sans effet chez les souris déficientes en neurones NPY/AGRP : la ghréline active ces neurones (Inui 2001; Luquet 2008).

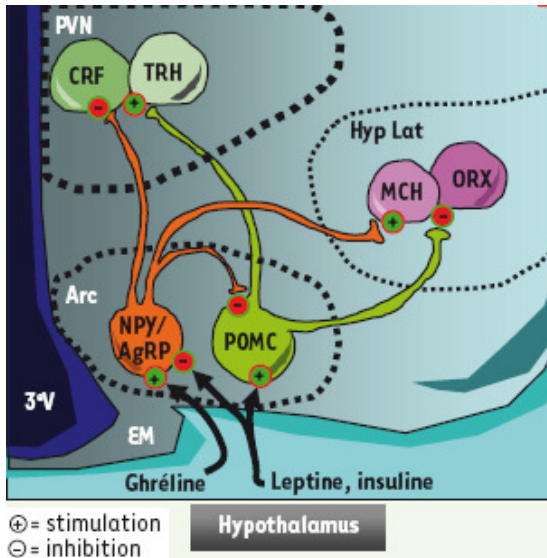


Figure 7 : Action de la ghréline sur les neurones hypothalamiques (d'après Luquet 2008)

La **cholécystokinine (CCK)** produite par l'intestin retarde la vidange gastrique, stimule la sécrétion pancréatique et la contraction de la vésicule biliaire, augmente la stimulation des mécanorécepteurs gastriques, ce qui a pour conséquence une digestion plus efficace du gras et des protéines et une inhibition de la prise alimentaire (Cummings and Overduin 2007). L'administration de CCK inhibe de manière dose-dépendante la prise alimentaire par la réduction de la taille des repas et de leur durée (Cummings and Overduin 2007; Gibbs et al. 1973). Les souris $mc4r^{-/-}$ répondent de manière atténuée à la cholécystokinine, ce qui montre que MC4R est impliqué dans la signalisation de satiété de CCK. Le **glucagon-like peptide (GLP-1)**, l'**oxyntomoduline** et le **peptide tyrosine-tyrosine (PYY)** secrété sous sa forme courte PYY3-36 sont produits après le repas, proportionnellement à l'énergie ingérée. Ils participent au frein iléal (rétroaction négative exercée par l'iléon sur la vidange gastrique et la motilité intestinale) en supprimant la sécrétion de glucose, stimulant la sécrétion d'insuline et retardant la vidange gastrique. L'**insuline** est produite par les cellules β pancréatiques, elle pénètre ensuite dans le cerveau par un mécanisme saturable, comme la leptine. L'insuline est essentielle à l'entrée du glucose dans les cellules et à la lipogenèse. L'administration centrale d'insuline supprime la prise alimentaire de manière dose-dépendante. Elle module l'activité de POMC et AgRP (Valassi et al. 2008).

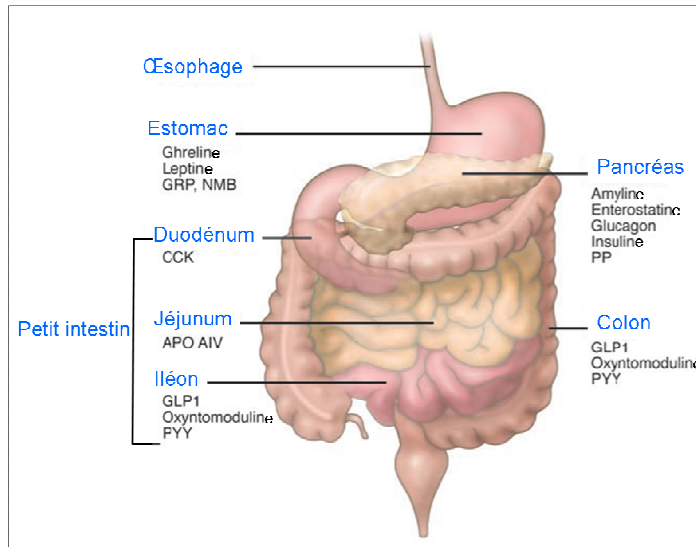


Figure 8 : les signaux viscéraux de régulation de la prise alimentaire (d'après Cummings et Overduin 2007)

1-2- En aval de la voie leptine-mélanocortine

Dans le tissu adipeux

Les adipocytes bruns sont responsables de la thermogénèse adaptative en réponse à la prise alimentaire (Cannon and Nedergaard 2004). Chez les animaux, l'énergie libre provient de l'oxydation des molécules alimentaires dans les mitochondries. L'oxydation est couplée à la réduction de certains coenzymes au niveau de la chaîne mitochondriale : il y a couplage de la respiration à la synthèse d'ATP. Dans les adipocytes bruns, riches en mitochondries, la production de chaleur est rendue possible par découplage de la respiration, notamment sous l'action de la protéine découplante UCP1, qui permet aux protons de se déplacer dans la membrane interne des mitochondries sans synthèse d'ATP (Cannon and Nedergaard 2004).

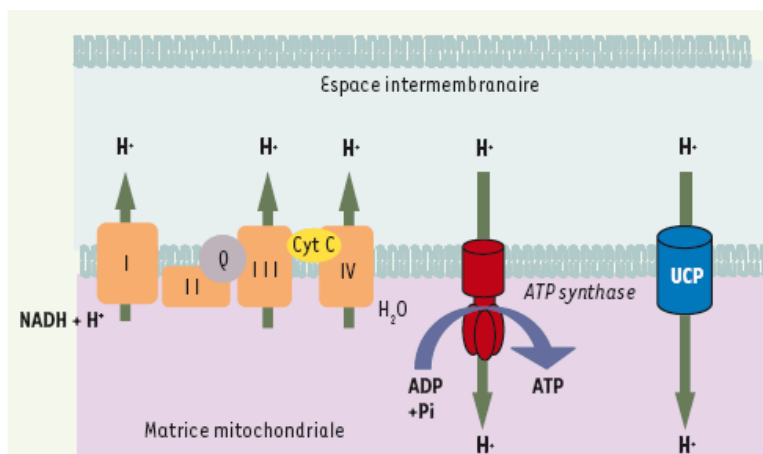


Figure 9 : Chaîne respiratoire et protéine découplante

UCP1 est régulée par la leptine et par MC4R (Glavas et al. 2007). L'α-MSH et AGRP régulent l'expression et la sécrétion de leptine par les adipocytes (Hoggard et al. 2004). L'infusion de CRH chez des sujets volontaires induit l'oxydation des graisses et la thermogénèse (Smith et al. 2001). NPY inhibe la thermogénèse et induit les enzymes lipogéniques du tissu adipeux. Or l'existence d'un tissu adipeux brun humain thermogénique chez l'adulte a été démontrée très récemment (Cypess et al. 2009; van Marken Lichtenbelt et al. 2009; Virtanen et al. 2009).

Les signaux gastriques, intestinaux et pancréatiques

Les rétrocontrôles des signaux digestifs s'opèrent à différents niveaux mais sont bien moins documentés que les signaux afférents. En amont, la leptine et le NPY modulent la sensibilité des neurones du noyau du tractus solitaire aux signaux gastriques (Schwartz and Moran 2002). La leptine régule également l'expression de GHSR1a, le récepteur de la ghréline (Nogueiras et al. 2004), tandis que les taux de ghréline sont diminués par les nutriments, la mécano-sensibilité de l'estomac et la perte de poids (Williams and Cummings 2005). De plus, pancréas, intestin et estomac reçoivent des signaux du système nerveux autonome (Konturek et al. 2003) : NPY et AGRP transmettent le signal leptine/ghréline et régulent la sécrétion pancréatique. Les agonistes de MC4R sont également capables d'inhiber la production d'insuline (Fan et al. 2000).

2 - La régulation par les nutriments

2-1- Signalisation des lipides circulants

Les nutriments circulants peuvent être d'origine endogène (production de glucose par le foie) ou exogène (issus de la prise alimentaire) et les circuits centraux régulent à la fois ces deux types de ressources énergétiques, en exerçant un rétrocontrôle négatif sur la circulation des nutriments (Lam et al. 2005b). En retour, les macronutriments (glucides et lipides) régulent non seulement les taux circulants de leptine et d'insuline, mais agissent aussi directement au niveau du système nerveux central (Obici et al. 2003). En effet, le glucose, les lipoprotéines ou les acides gras à longue chaîne traversent la barrière hématoencéphalique et entraînent une cascade de réaction dans l'hypothalamus, faisant intervenir notamment la voie de l'AMP kinase. Cette cascade de réaction est représentée dans la figure 10. L'implication des éléments de cette voie a été mise en évidence par de

nombreuses équipes, à l'aide d'injections intracérébroventriculaires (i.c.v.) et intrapéritonéales (i.p.). La plupart de ces expériences ont été résumées dans une revue de Lam et collaborateurs (Lam et al. 2005b).

Les lipides circulants (triglycérides, glycérol et acides gras à longue chaîne [AGLC]) constituent des signaux indépendants des variations d'insuline plasmatique et de l'absorption des nutriments au niveau de l'estomac et de l'intestin. Les AGLC issus de la circulation sont transformés en AGLC-Coenzyme A par l'acylCoA synthétase (ACS) dans l'hypothalamus. Cette transformation agit comme un signal « d'indigestion » dans l'hypothalamus et inhibe la prise alimentaire (Lam et al. 2005b).

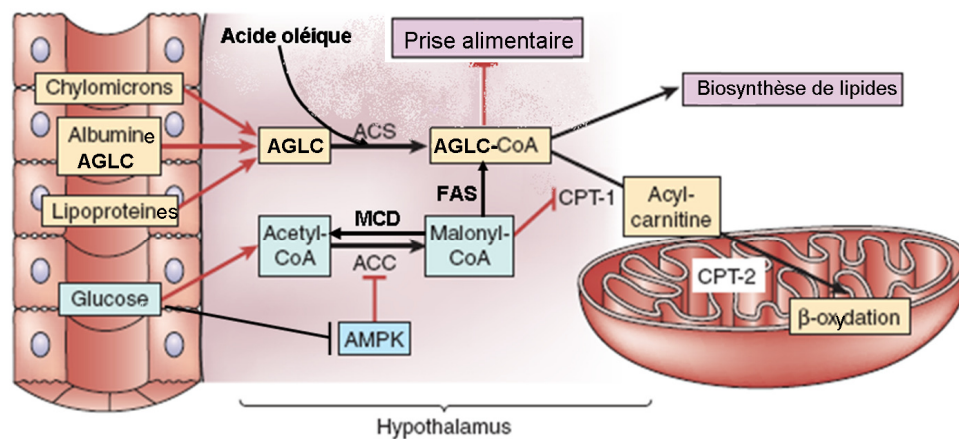


Figure 10 : régulation de la prise alimentaire par les aliments (d'après Lam et al 2005)

L'oxydation des acides gras à longue chaîne dans la mitochondrie est sous le contrôle de la carnitine palmitoyltransférase 1 (CPT1) et l'inhibition de CPT1 par le malonyl-CoenzymeA, produit de la dégradation du glucose circulant, diminue la prise alimentaire via l'accumulation d'AGLC-CoA (Obici et al. 2003). L'équilibre entre l'acétyl-CoA et le malonyl-CoA est réalisé par trois enzymes : l'acétyl Coenzyme A carboxylase (ACC), le malonyl CoA dégradant enzyme (MCD) et la Fatty Acid Synthase (FAS). Deux inhibiteurs des FAS connus, la cerulenin et le C75, induisent une diminution de la prise alimentaire et du poids chez les rongeurs après injections intracérébroventriculaire et intrapéritonéale (Lam et al. 2005b). Et la surexpression de MCD, conduisant à une diminution de la concentration en malonyl-CoA, conduit à l'hyperphagie et à l'obésité (He et al. 2006). La phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase par l'AMPK inhibe son activité (Lam et al. 2005b). L'activité et la régulation de

l'AMPK a fait l'objet de nombreuses études approfondies qui sont résumées dans le tableau 3.

Des rétrocontrôles s'exercent entre cette voie de signalisation et la voie leptine-mélanocortine. Ainsi, l'expression des ARN messagers de NPY, AGRP, POMC, MCH est modulée par les différents traitements (tableau 3). De plus, l'activité de l'AMPK dans le noyau paraventriculaire est régulée par MC4R : alors que l'injection intrapéritonéale de leptine dans des souris à jeun diminue l'activité de la sous-unité $\alpha 2$ de l'AMPK dans le noyau paraventriculaire et le noyau arqué, aucune diminution n'est observée chez les souris invalidées pour MC4R. L'activité de cette sous-unité dans le noyau paraventriculaire est diminuée par le melanotan II et augmentée par AGRP (Gao and Lane 2003).

Traitement	Prise alimentaire	Expression de NPY	Expression de AGRP	Expression de POMC
i.c.v. d'acide oléique	-	-	-	O
Inhibition de CPT1	-	-	-	O
Mutation dominant-négatif de l'AMPK	-	-	-	O
Inhibition de FAS par C75	+	-	-	+
Inhibition de FAS par la cerulenin	-	O	O	O

Tableau 3 : résumé des manipulations de la voie de l'AMPK sur les peptides de la régulation de la prise alimentaire (d'après Lam et al.) [+ augmentation ; - diminution ; O sans effet]

2-2- Le couplage astrocytes-neurones

Des sous-populations de neurones sensibles aux acides gras (AG) ont été identifiées dans l'hypothalamus. Certains neurones sont excités tandis que d'autres sont inhibés par les variations de concentration en acides gras dans l'hypothalamus (Migrenne et al. 2007). L'acyl-CoA issu du métabolisme des AG serait le réel signal de satiété (*voir plus haut*) (Lam et al. 2005b; Migrenne et al. 2007; Obici et al. 2003). Le fonctionnement des neurones sensibles aux AG varie selon la concentration en glucose du milieu (Migrenne et al. 2007). De plus, le malonyl-CoA issu de la glycolyse inhibe la β -oxydation des AG (figure 10), ce qui en fait un site potentiel d'interaction entre les signalisations du glucose et des acides gras (Migrenne et al. 2007; Song and Routh 2005)

Certains neurones sont également des capteurs des variations de glucose. Cinq types de neurones ont été définis en fonction de leur sensibilité : les neurones excités ou inhibés

par l'augmentation du taux de glucose en deçà de 5mM (GE et GI) ou au dessus de 5mM (HGE et HGI) et les neurones non-glucosensibles (pour revue (Penicaud et al. 2006)) (voir figure 12). Les neurones GE sont comparés aux cellules β car leur fonctionnement fait intervenir Glut2, la glucokinase et les canaux K^+ dépendants de l'ATP (K_{ATP}) (Penicaud et al. 2006). Plus récemment, il a été montré que la réponse des neurones GI se traduit par la fermeture de canaux Cl^- de type CFTR (impliqué dans la mucoviscidose) (Fioramonti et al. 2007). Dans le cerveau, Glut2 est principalement exprimé dans les astrocytes et diverses expériences ont conduit à l'hypothèse d'un dialogue entre neurones et astrocytes, appelé **navette lactate astrocytes/neurones** (Penicaud et al. 2006). En fait, l'effet du glucose nécessite sa conversion en lactate dans les astrocytes (Lam et al. 2005a). La glycolyse dans les astrocytes est induite par le glutamate largué par les neurones dans la fente synaptique (Pellerin et al. 2007). Le lactate est libéré dans le milieu extracellulaire et perçu par les neurones qui le métabolisent en pyruvate. Ce dernier entre dans le cycle de l'acide tricarboxylique, pour générer de l'ATP.

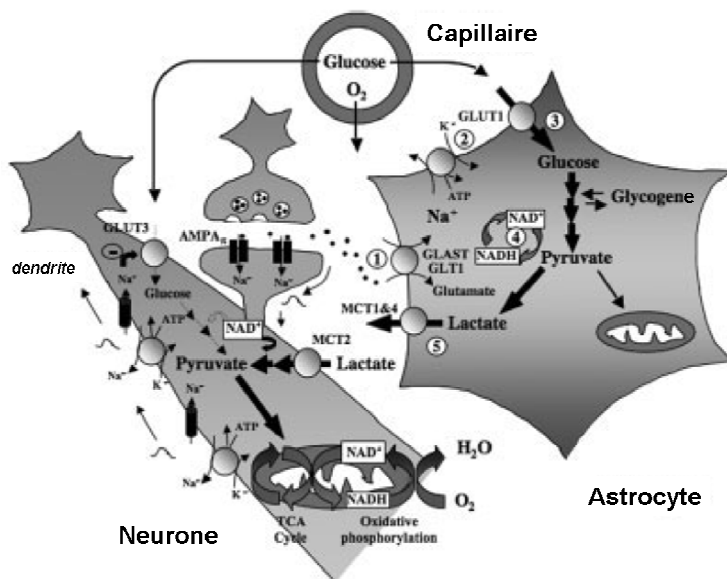


Figure 11 : la navette lactate astrocytes/neurones (d'après Pellerin et al, 2007)

La signalisation des nutriments intervient en amont direct des composants de la voie leptine-mélanocortine. En effet, il a été récemment mis en évidence que 40% des neurones NPY sont inhibés par le glucose (Fioramonti et al. 2007) ; l'implication des neurones à POMC a été également proposée mais reste débattue.

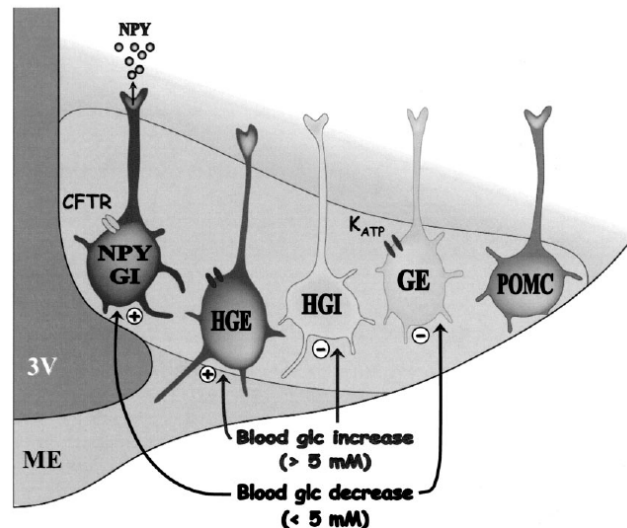


Figure 12 : les différents types de neurones sensibles au glucose (d'après Fioramonti et al 2007)

3 - La signalisation indépendante de la leptine

Plusieurs études ont mis en avant des arguments en faveur d'une action de la voie mélanocortine indépendamment de la signalisation par la leptine. Tout d'abord, l'équipe de Franck Lee a réalisé en 1997 l'invalidation du gène *MC4R* chez la souris et comparé le phénotype des souris déficientes en *MC4R* à celui des souris *ob/ob* (déficientes en leptine) et des souris *db/db* (déficientes en récepteur à la leptine) (Huszar et al. 1997). Ainsi, alors qu'une élévation du taux de corticostérone est observée chez les *ob/ob* et *db/db* et une réversion de leur obésité par adrénalectomie (Huszar et al. 1997), la déficience en *MC4R* n'a aucun effet sur le taux de corticostérone. Par ailleurs, les souris *ob/ob* et *db/db* sont plus petites que les souris sauvages, tandis que les souris déficientes en *MC4R* présentent une augmentation de la croissance linéaire. De plus, les souris doubles mutantes *lethal yellow obese* ($A^Y/a \text{ lep}^{ob}/\text{lep}^{ob}$) présentent un phénotype d'obésité exacerbé, ce qui indique que l'induction de l'obésité due à une signalisation POMC-*MC4R* défectueuse est indépendante de la leptine et présente des effets additifs (Boston et al. 1997). Enfin, l'invalidation

simultanée des gènes de la leptine et de MC4R provoque un effet additif sur la masse grasse (Trevaskis and Butler 2005).

C – Perturbations génétiques du contrôle de la prise alimentaire

Des exemples de mutations responsables d'obésité monogénique chez le rongeur et chez l'homme ont été décrits dans des gènes impliqués dans la voie de régulation leptine-mélanocortine. Cela a permis de mettre en évidence que la régulation de la prise alimentaire est effectuée par les mêmes composants chez les rongeurs et chez l'homme et est essentielle dans la genèse de l'obésité.

1 - Les exemples murins d'obésité

Le premier exemple d'obésité génétique chez la souris a été soupçonné dès 1905 quand Cuenot a publié pour la première fois que les souris au pelage jaune deviennent obèses (Echwald 1999). Ces souris au pelage jaune, ou **Agouti Yellow Ay/a**, présentent deux types de mutations naturelles dans le gène Agouti (lethal yellow et viable yellow) (Ellacott and Cone 2006). Elles sont hyperphagiques, hyperinsulinémiques, présentent un hypométabolisme et une croissance linéaire accrue (Wolff et al. 1999). Par la suite, les souris **ob/ob** et **db/db** ont été décrites mais il a fallu près de 50 ans pour faire le lien entre le phénotype d'obésité et la déficience en leptine et en son récepteur (pour revue (Speakman et al. 2007)). Ces deux lignées de souris ont été particulièrement utiles dans la compréhension de la génétique et la physiologie de ce phénomène : dosages hormonaux et lésions cérébrales ont permis de caractériser la voie physiologique de la satiété ou voie leptine-mélanocortine (Johnson et al. 1991). D'autres exemples d'obésité génétique naturelle chez la souris (Tubby [protéine de signalisation de l'insuline sans homologue connu chez l'homme], Fat [carboxipeptidase E] et Mahogany [attractine]) et chez le rat (Zucker fatty, Koletsky et Corpulent, mutations dans le gène du récepteur à la leptine) ont contribué à la compréhension de la voie de signalisation du contrôle de la prise alimentaire (Echwald 1999).

De plus, la manipulation génétique du modèle murin a permis de mettre en évidence le rôle de près de 250 gènes dans l'homéostasie énergétique, leur invalidation ou la transgénèse des homologues humains conduisant à des souris minces ou obèses (Rankinen et al. 2006).

2 - Les formes monogéniques d'obésité chez l'homme

Des mutations causales de formes isolées héritées d'obésité humaine ont été identifiées dans huit gènes principaux. De manière intéressante, ces gènes codent des protéines de la voie de signalisation leptine-mélanocortine.

En 1997, O'Rahilly et son équipe ont identifié la première mutation dans le gène de la **leptine**. Les deux premiers individus porteurs étaient issus d'une famille pakistanaise consanguine et présentaient un taux de leptine inférieur au seuil de détection (Montague et al. 1997). Cette délétion (delG133) a été retrouvée chez 6 patients à l'état homozygote. Une autre mutation ponctuelle a été rapportée chez une famille turque (Ozata et al. 1999). La déficience génétique en leptine s'accompagne d'anomalies au niveau des cellules T, ce qui provoque un taux accru d'infection chez les patients (Farooqi et al. 2002). Des anomalies de la fonction nerveuse sympathique ont également été rapportées (Ozata et al. 1999) ainsi qu'un hypogonadisme. Ces patients ont pu être traités à l'aide de leptine recombinante. Ce traitement conduit à la normalisation de l'hyperphagie, et permet par conséquent la diminution de l'IMC et de la masse grasse (Farooqi et al. 2002). Le traitement rétablit également la structure des cellules T et permet le développement pubertaire chez les enfants (à un âge approprié) et chez les adultes (qui rattrapent le retard). Toutefois, ce traitement ne concerne qu'un nombre très limité de malades : à ce jour seuls 12 cas de patients homozygotes pour la déficience à la leptine ont été rapportés dans le monde (effectif dénombré par (Ranadive and Vaisse 2008)). Des patients hétérozygotes ont également été dépistés. Ils présentent des taux de leptine diminués et une augmentation de la masse grasse (Farooqi et al. 2001).

Des mutations dans le gène codant le **récepteur à la leptine** (LEPR) ont été mises en évidence. Froguel et son équipe ont observé une mutation dans une famille kabyle consanguine, conduisant à une protéine tronquée avant le domaine transmembranaire (Clement et al. 1998). Le récepteur muté se lie à la leptine mais reste dans la circulation et inhibe ainsi la signalisation. Il en résulte un phénotype proche de celui des patients déficients en leptine, à la différence que les patients déficients en LEPR présentent des taux normaux de leptine circulante. Au total, 11 porteurs ont été recensés dans le monde en 2008 (Ranadive and Vaisse 2008).

La **proopiomélanocortine** (POMC) subit une régulation post-traductionnelle tissu-spécifique pour produire les peptides mélanocortines : α , β et γ -Melanocyte Stimulating Hormone (MSH) et l'hormone adrénocorticotrophique (ACTH) notamment. Tous les porteurs décrits à ce jour sont hyperphagiques. Lorsque la mutation impacte la production d'ACTH, les patients présentent des crises surrénales néonatales ; les patients ont également souvent la peau claire et les cheveux roux du fait de la déficience en MSH au niveau des récepteurs MC1R de la peau bien que cela ne soit pas une caractéristique obligatoire (Challis et al. 2002; Clement et al. 2008; Creemers et al. 2008; Dubern et al. 2008; Farooqi et al. 2006; Krude et al. 1998; Krude et al. 2003).

Le clivage de POMC est réalisé par les **prohormones convertases (PC)1 et 2**. Or la description d'une femme de 47 ans avec obésité sévère depuis l'enfance, troubles de l'homéostasie du glucose, faible taux d'insuline mais taux élevé de proinsuline, hypogonadisme hypogonadotrophique, hypocortisolémie et taux élevés de POMC a permis la découverte de deux mutations (état hétérozygote composite) dans le gène *PC1* (ou *PCSK1*). Outre POMC, PC1 clive également le GLP-1, ce qui peut expliquer les dysfonctions absorptives intestinales rapportées chez les trois seuls porteurs de mutations de *PCSK1* (Jackson et al. 2003).

Enfin, le 5^e gène fait l'objet de cette thèse : il code le **récepteur 4 aux mélanocortines**. Plus de 90 mutations ont été rapportées à ce jour et la liste ne cesse de croître. Découvert en 1998 simultanément par les équipes de Froguel et O'Rahilly (Vaisse et al. 1998; Yeo et al. 1998), il est considéré comme la cause d'obésité monogénique la plus fréquente. Ce gène et les conséquences de ses mutations seront détaillés plus loin dans le manuscrit.

Outre ces cinq gènes, il en existe trois autres dont les mutations sont causales d'obésité dite monogénique. Il s'agit du **brain derived neurotrophic factor** (BDNF) et de son récepteur **TRKB** codé par le gène *NTRK2*, ainsi que de l'homologue au gène Single Minded de la Drosophile (*SIM1*). Une mutation *de novo* de *NTRK2* a été décrite chez un garçon de 8 ans présentant non seulement une obésité sévère mais également un retard mental, retard de développement, des anomalies neurologiques telles que des troubles de la mémoire à court terme, d'apprentissage et de nociception (Yeo et al. 2004). Le premier cas humain d'obésité sévère due à une haploinsuffisance en BDNF a été rapporté en 2006 (Gray et al. 2006) : une fillette de 8 ans avec obésité hyperphagique, troubles de la mémoire et de la nociception,

présentait une inversion *de novo* d'une partie du chromosome 11 qui inclue *BDNF* mais également d'autres gènes. A ce jour, aucune mutation n'a été identifiée dans ce gène, toutefois considéré comme un nouveau gène de l'obésité monogénique du fait de son implication dans le phénotype d'obésité du syndrome WAGR (Han et al. 2008), au même titre que *SIM1* pour lequel de nombreuses délétions ont été rapportées et associées à une obésité et des traits du syndrome Prader-Willi-like (Bonaglia et al. 2008). Une translocation équilibrée entre les locus 6q16 et 1p22 a été également observée chez une fillette présentant une obésité hyperphagique mais aucun retard mental ou trouble de développement (Holder et al. 2000).

Ainsi, très peu de cas d'obésité familiale ont été élucidés pour l'instant (environ 2%). Les prédictions et modèles animaux indiquent qu'il reste encore un énorme travail de recherche de nouveaux gènes dans la voie leptine-mélanocortine mais également et surtout de recherche de nouvelles voies de signalisation.

3 - Les formes syndromiques d'obésité chez l'homme

A l'exemple de *SIM1* ou *TRKB*, il existe des formes syndromiques avec obésité. La plupart sont caractérisées par la présence de retard mental. Les caractéristiques des différents syndromes se superposent partiellement mais il existe jusqu'à 50 formes syndromiques (Delrue and Michaud 2004).

Avec une incidence de 1/25 000, le **syndrome de Prader-Willi** (PWS) est la forme syndromique d'obésité la plus commune. Ce syndrome est causé par la perte de l'expression des gènes paternels de la région chromosomique 15q11-q13, soit par microdélétion (dans 70% des cas), disomie uniparentale maternelle (25%) ou défaut d'empreinte génétique (5%) (Delrue and Michaud 2004). La perte du cluster *HBII-85C/D* box small nucleolar RNA est la principale explication de l'obésité dans cette forme syndromique (de Smith et al. 2009; Sahoo et al. 2008). Les enfants atteints de PWS présentent une hypotonie néonatale et des difficultés de succion. Plus tard, ils deviennent hyperphagiques et consécutivement obèses. Ce syndrome est également caractérisé par un retard mental variable, des troubles du comportement, un hypogonadisme et une petite stature. La délétion interstitielle de la région chromosomique 6q16.2 conduit à une forme syndromique appelée « **syndrome de Prader-Willi-like** », qui récapitule les caractéristiques du PWS. Les défauts cognitifs des patients avec délétion au 6q sont toutefois plus sévères que ceux des patients PWS, du fait de défauts structurels cardiaques et cérébraux.

Le **syndrome de Bardet-Biedl** (BBS) est caractérisé par 6 traits principaux qui s'expriment de manière variable entre et au sein des familles : dystrophie des cônes rouges, polydactylie, hypogonadisme chez les garçons, difficultés d'apprentissage, anomalies rénales et obésité (Delrue and Michaud 2004). L'obésité se développe au cours des premières années de la vie et s'accompagne de résistance à l'insuline dans 45% des cas. Comparés à des obèses appariés, les patients atteints du BBS ne présentent pas de différence de métabolisme énergétique ou de composition corporelle. A ce jour, 12 gènes de BBS ont été identifiés, avec des caractéristiques d'héritabilité variable. La plupart des protéines BBS sont impliquées dans la fonction ciliée (Mykytyn and Sheffield 2004). Or la suppression de la fonction ciliée dans les neurones à POMC conduit à une obésité hyperphagique (Davenport et al. 2007) et les protéines BBS sont nécessaires à la signalisation de la leptine (Seo et al. 2009), ce qui montre le lien entre la signalisation des protéines BBS et la voie de la leptine-mélanocortine. Ainsi les formes syndromiques d'obésité sont également causées principalement par une perturbation du contrôle de la prise alimentaire.

D'autres formes syndromiques sont présentées dans le tableau 4.

	Syndrome	Défaut génétique	Manifestation phénotypique
Maladies autosomales avec effet monoallélique	Prader-Willi	15q11-13 paternel (délétion, empreinte, disomie uniparentale maternelle)	Hypotonie- défaut de succion-hyperphagie-retard mental-trouble du comportement-hypogonadisme-petite stature
	Angelman	UBE3A maternel (délétion, disomie uniparentale paternelle, mutation, empreinte)	Retard de développement-troubles sévères de la parole-mouvements désordonnés-caractère joyeux et rire inapproprié
	Ostéodystrophie héréditaire de Albright	GNAS1	Petite stature-ossification sous-cutanée-troubles cognitifs-brachydactylie
	Disomie uniparentale maternelle	Du chromosome 14 (PREF1/DLK1)	Retard de croissance intra-utérin-problème d'alimentation-petite stature-retard moteur
Maladies autosomales récessives	Bardet-Biedl	12 gènes	Rétinopathie-polydactylie-difficultés d'apprentissage-hypogonadisme chez les garçons-troubles rénaux
	Alström	ALMS1	Dystrophie des cônes rouges-surdité sensorineurale-résistance à l'insuline
	Cohen	8q22	Retard psychomoteur-microcéphalie-dysmorphisme facial-granulocytopenie
Défaut du chromosome X	MEHMO	Xp21.1p22.13	Epilepsie-hypogonadisme-hypogénitalisme-microcéphalie
	Börjeson-Forsman-Lehmann	Xq26 : PHF6	Epilepsie-petite stature-microcéphalie-problèmes génitaux
Syndrome de Down et myxoploïdies			Retard de croissance-caractéristiques dysmorphiques

Tableau 4 : principaux syndromes associant obésité et retard mental (d'après Delrue et Michaud 2004)

4 - Les formes polygéniques d'obésité chez l'homme

Quelle que soit l'hypothèse retenue, du gène économe ou de la prédation, il a été récemment reconnu, grâce aux études pan-génomiques, que l'accumulation de polymorphismes à risque augmente la prédisposition à l'obésité et ce d'autant plus que les mariages par ressemblance sont fréquents entre obèses et favorisent l'agrégation de facteurs de risque.

Les études de **liaison génétique** familiale sur l'ensemble du génome ont permis de localiser des régions responsables de maladies monogéniques et ont été étendues aux maladies complexes. Le gène *ENPP1* se situe dans une région de liaison pour l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) (Meyre et al. 2004). Plusieurs polymorphismes, et notamment l'haplotype Q-delT-G, de *ENPP1* ont été associés avec l'obésité familiale sévère infantile ou adulte (Meyre et al. 2005) et cette association avec l'obésité a été répliquée de manière hétérogène en Europe mais également dans le reste du monde (El Achhab et al. 2009; Morandi et al. 2009; Peeters et al. 2009; Tanyolac et al. 2008). Le gène *PCSK1* est également situé dans une large région de liaison génétique et représente le meilleur gène candidat du locus du fait des cas d'obésité monogénique causés par des mutations dans ce gène (Jackson et al. 1997). Des polymorphismes de *PCSK1* sont associés avec une modulation de l'IMC et une augmentation du risque d'obésité. Ceci s'explique par le fait que ces polymorphismes activent l'activité catalytique de la protéine. Toutefois, ces polymorphismes ne contribuent pas à la liaison (Benzinou et al. 2008b).

Des études de **clonage positionnel** de gènes d'obésité à partir d'études de liaison génome entier ont mis en évidence le rôle de polymorphismes de *SLC6A14* (Suviolahti et al. 2003) et *TBC1D1* (Stone et al. 2006). *SLC6A14* est un transporteur d'acides aminés qui régule la disponibilité en sérotonine (Sloan and Mager 1999). Il diminue la satiété chez les jeunes filles et augmentent désinhibition et faim chez les femmes adultes (Durand et al. 2004). L'association de ce gène avec l'obésité est difficile à mettre en évidence par des stratégies génome entier car il est situé sur le chromosome X. De même l'association de *TBC1D1* avec l'obésité a été répliquée (Meyre et al. 2008). Dans les deux études, le variant R1252W est associé avec l'obésité seulement chez les femmes. Le rôle de *TBC1D1* dans l'obésité est confirmé par le modèle murin : l'inactivation de ce gène conduit à un phénotype de maigreur chez la souris (Chadt et al. 2008).

Les études d'association de **gènes candidats** ont également montré que des polymorphismes dans des gènes responsables d'obésité monogénique peuvent être associés avec l'obésité : c'est le cas du variant V103I de *MC4R* (Geller et al. 2004), de plusieurs variants de *SIM1* (Traurig et al. 2009), de POMC (Lee et al. 2006) et du récepteur aux cannabinoïdes 1 (Benzinou et al. 2008a; Russo et al. 2007). Parmi les gènes candidats de l'obésité syndromique, trois gènes du syndrome de Bardet-Biedl présentent des polymorphismes associés avec un risque accru d'obésité (Benzinou et al. 2006).

Beaucoup plus récemment, une nouvelle technologie a révolutionné la découverte de polymorphismes associés à l'obésité. Il s'agit des **puces à ADN génome-entier**, qui couvrent les polymorphismes décrits par HapMap. Deux populations cas et contrôles sont comparées sur l'ensemble du génome sans a priori sur les régions génomiques (*hypothesis-free*). Plusieurs polymorphismes dans la région du gène *FTO* (*fat mass and obesity associated*) ont été associés dans des études indépendantes avec le risque d'obésité chez l'adulte et chez l'enfant, le tour de taille (Dina et al. 2007; Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007). La fonction exacte de ce gène est encore inconnue, mais des études *in silico* ont prédit que *FTO* appartient à la superfamille des dioxygénases Fe II et 2-oxoglutarate-dépendantes (Gerken et al. 2007; Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro 2007) qui catalyse la déméthylation de 3-méthylthymine de l'ADN simple brin. Toutefois, il est exprimé dans les noyaux hypothalamiques (<http://symatlas.gnf.org/deprecated/>), zones de contrôle de la prise alimentaire, tandis qu'un allèle à risque est également associé avec une diminution d'activité lipolytique des adipocytes (Wahlen et al. 2008). L'inactivation du gène *FTO* chez la souris protège de l'obésité (Fischer et al. 2009). Le second signal le plus important est situé 188kb en aval de la séquence codante de *MC4R* et est associé avec le risque d'obésité, l'augmentation de l'IMC et du tour de taille (Chambers et al. 2008; Loos et al. 2008). Un troisième gène a été identifié par association génome entier : des polymorphismes de *CTNBL1* sont associés avec l'augmentation de l'IMC et de la masse grasse (Liu et al. 2008). Les fonctions biologiques de *CTNBL1* sont encore inconnues, toutefois la protéine présente des similarités avec la β -caténine. La voie de signalisation Wnt/ β -caténine est impliquée dans la régulation de la différenciation des préadipocytes (Ross et al. 2000).

Quinze nouveaux locus ont été publiés cette année (2009, pour revue (Walley et al. 2009)) dans trois papiers majeurs (Meyre et al. 2009; Thorleifsson et al. 2009; Willer et al. 2009) (figure 13). Leur association a été répliquée par des études cas-contrôles

supplémentaires (phase II). Ces gènes ont un effet additif mais la variation génétique observée à ce jour n'explique que 1% de la variation génétique estimée de la population générale (Willer et al. 2009).

Même dans l'obésité commune, les polymorphismes identifiés appartiennent principalement à des gènes de la régulation de la prise alimentaire. L'obésité est donc vraiment une maladie de l'appétit qui touche les éléments de la dépense énergétique (stockage dans les adipocytes, diminution du métabolisme de repos) dans une moindre mesure.

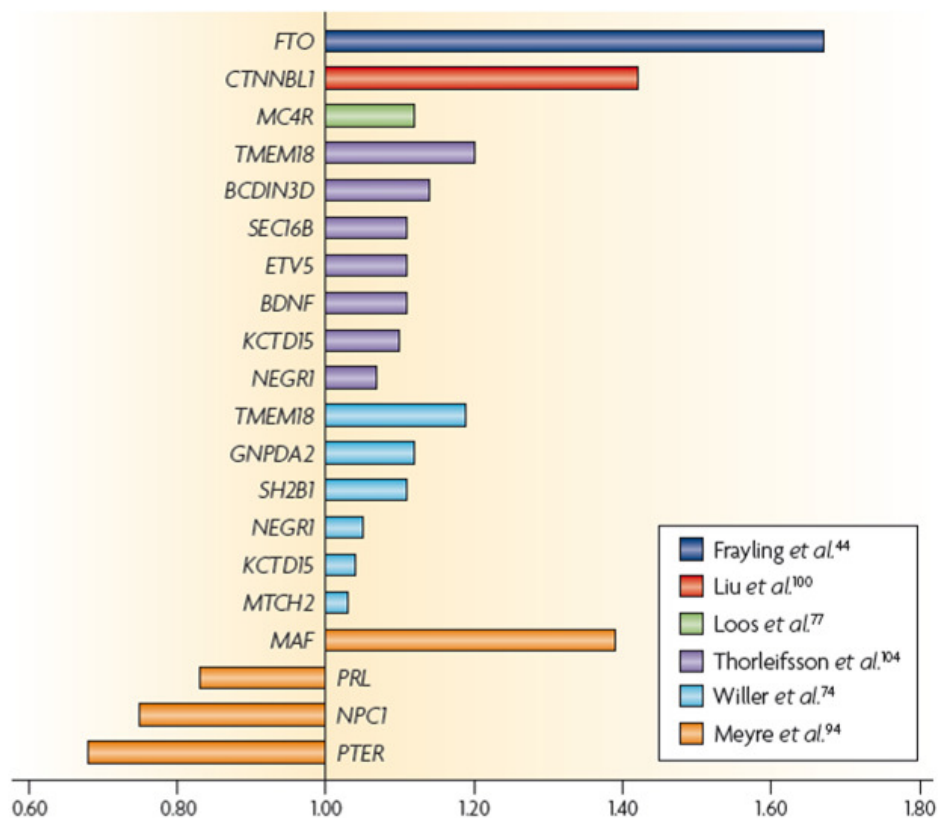


Figure 13 : gènes associés avec l'obésité par les GWAS récents (d'après Walley et al, 2009)

III MC4R

A – Le quatrième membre d’une famille de récepteurs couplés aux protéines G

1 - Expression

Le récepteur 4 aux mélanocortines humain a été cloné en 1993 par l’équipe de Yamada et est localisé sur le chromosome 18 en position q21.3 (Gantz et al. 1993). Un exon unique code 333 acides aminés. MC4R répond de manière équipotente à l’ α -MSH (ligand majeur de MC1R) et ACTH (ligand majeur de MC2R) mais aussi à la β -MSH. *MC4R* est exprimé dans de nombreux organes chez le rat adulte et le fœtus (Mountjoy et al. 2003; Mountjoy et al. 1994; Mountjoy and Wild 1998), notamment le cœur, le poumon, les muscles, le rein, les corps caverneux et les testicules, ce qui indique un rôle de MC4R au cours du développement embryonnaire. Par contre, son expression est notamment absente des mélanocytes, du cortex adrénal et du placenta (principales zones d’expression des 3 premiers récepteurs). *MC4R* est également exprimé dans la langue, les muscles faciaux et de la mâchoire, des organes impliqués dans les comportements alimentaires (Mountjoy et al. 2003). Zhong et collègues ont également observé une expression de *MC4R* dans les cellules osseuses (Zhong et al. 2005). Mais le site majeur d’expression de *MC4R* est le cerveau : il est exprimé dans la quasi-totalité des noyaux, incluant le noyau paraventriculaire, le noyau dorsomédian, les zones olfactives et l’hypothalamus latéral, ainsi que dans des noyaux du cortex cérébral, cerebellum, striatum, septum, hippocampe, amygdale, thalamus, mésencéphale et dans la moelle épinière (Kishi et al. 2003; Liu et al. 2003; Mountjoy et al. 1994). MC4R est impliqué non seulement dans le contrôle de l’homéostasie énergétique,

mais aussi dans la régulation de nombreux processus neuroendocrines et autonomes tels que les fonctions cardiovasculaire et érectile (*voir plus loin*).

Une séquence promotrice de 1kb (+ 426 bp 5' UTR) serait suffisante pour reproduire la spécificité tissulaire de l'expression de *MC4R* dans des souris transgéniques (Daniel et al. 2005) mais la régulation plus précise de l'expression et de l'activité de *MC4R* est méconnue. Les facteurs de transcription Sp1 et Sp3 participent au contrôle de l'expression (et de l'activité constitutive) de *MC4R* chez l'homme (Blondet et al. 2005). Ces facteurs de transcription sont ubiquitaires et jouent un rôle dans l'expression de nombreux gènes et notamment de enzymes métaboliques ; Sp1 est abondamment exprimé dans l'hypothalamus. Plus récemment, les MRAP (MC2R accessory protein) ont été impliquées dans la capacité de réponse des récepteurs aux mélanocortines à la NDP-MSH et dans leur expression à la surface cellulaire (Chan et al. 2009). L'expression de *MC4R* est également induite dans les neurones lésés chez la souris mais pas chez le rat (Tanabe et al. 2007). Cette étude montre que le contrôle de l'expression de *MC4R* varie d'une espèce à l'autre, même au sein des rongeurs, et illustre la difficulté de comprendre les processus chez l'homme. Enfin, l'association récente de polymorphismes à 188kb en aval de *MC4R* avec l'obésité suggère un site de régulation à ce locus (Chambers et al. 2008; Loos et al. 2008).

2 - Les récepteurs couplés aux protéines G

Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) constituent le groupe de récepteurs de surface le plus important chez les êtres vivants (Bockaert and Pin 1999) : la plupart des processus physiologiques font intervenir des RCPG. Plus de mille membres ont été recensés chez l'homme (Tao 2006), notamment les récepteurs nicotiques, des acides biliaires, des ions calcium et certains récepteurs olfactifs. Les RCPG sont exprimés à la surface cellulaire et présentent une structure à 7 domaines transmembranaires, un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire, avec une conformation active et une conformation inactive (Bockaert and Pin 1999) (figure 14).

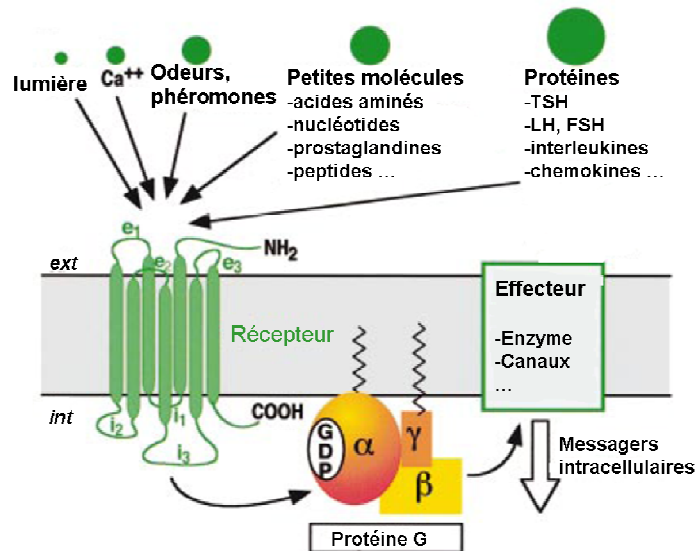


Figure 14 : signalisation des RCPG (d'après Bockaert et Pin 1999)

Ils sont impliqués dans la détection sélective de signaux chimiques très variés. La dimérisation des récepteurs au niveau du réticulum endoplasmique constitue une étape obligatoire à l'expression de surface (Bulenger et al. 2005; Hill 2006). La liaison d'agonistes au récepteur est ensuite transduite en synthèse d'AMP cyclique par l'adénylate cyclase (Hill 2006). Pour la majorité des RCPG, cette signalisation est rapidement atténuée après quelques minutes d'exposition à l'agoniste, on parle de désensibilisation : après la dissociation de $G\alpha/G\beta\text{-}\gamma$, la phosphorylation de résidus de la 3^e boucle intracellulaire (ICL3) ou du domaine C-terminal par les *G protein-coupled receptor kinases* permet le recrutement de la β -arrestine, qui cible les vésicules tapissées de clathrine (figure 15) (Pierce and Lefkowitz 2001). Le récepteur est alors internalisé pour être resensibilisé et reconduit à la membrane ou dégradé dans le lysosome (Tao 2006).

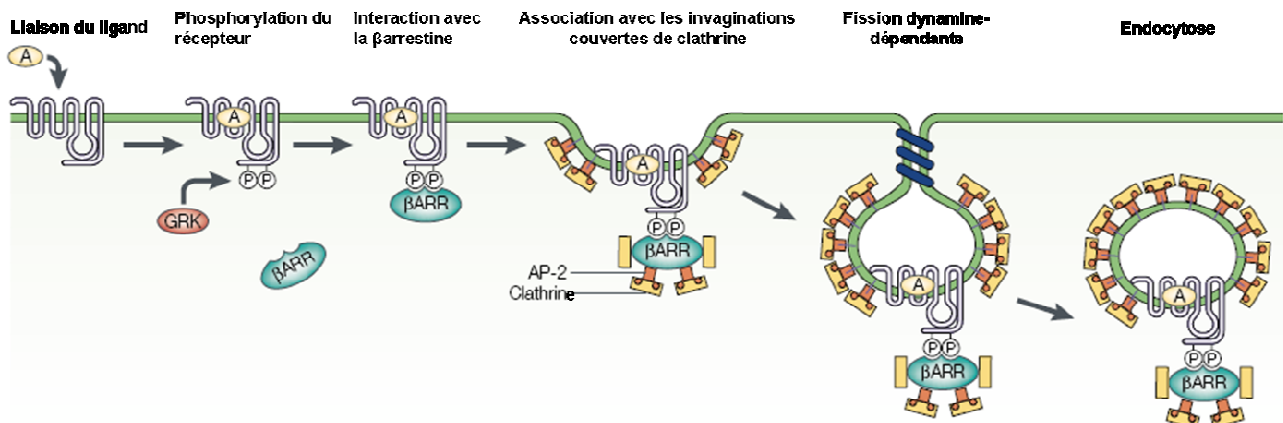


Figure 15 : désensibilisation des RCPG (d'après Pierce et Lefkowitz 2001)

De nombreux RCPG présentent également une activité constitutive avec une production d'AMPC significative en l'absence de ligand. Cette activité a conduit à la notion d'agoniste inverse pour caractériser les antagonistes responsables de la dissociation récepteur/protéines G, qui diminuent l'activité constitutive du récepteur.

Les RCPG sont répartis en 3 grandes familles. MC4R appartient à la famille 1 ou classe A, encore appelée famille de la rhodopsine, qui fixe ses ligands au cœur des domaines transmembranaires (Bockaert and Pin 1999). Ce récepteur est couplé à des protéines G stimulatrices.

3 - Les autres membres de la famille des récepteurs aux mélanocortines

La famille des récepteurs aux mélanocortines possède cinq membres qui partagent les mêmes ligands (les mélanocortines, peptides issus du clivage de POMC). Ces récepteurs sont exprimés dans des régions distinctes et impliqués dans divers processus physiologiques.

MC1R (ou récepteur à l' α -MSH) est exprimé dans les mélanocytes de la peau et des cheveux. La liaison d' α -MSH au récepteur augmente le rapport eumélanine (noir/brun) sur phéomélanine (rouge/jaune), responsable d'une pigmentation plus foncée. La protéine endogène Agouti bloque l'action de α -MSH sur MC1R, ce qui augmente l'expression de phéomélanine. L'expression ectopique de Agouti chez les souris Ay est responsable de la couleur jaune de leur pelage (*voir I et II*) (Echwald 1999).

MC2R (ou récepteur à l'ACTH) est exprimé dans la glande surrénale et présente une pharmacologie particulière : il se lie à l'ACTH mais pas aux peptides MSH, et joue un rôle critique pour la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien. En effet, le rôle principal de l'ACTH est la synthèse des corticostéroïdes et leur sécrétion par la glande surrénale. L'ACTH est également cruciale pour le développement du cortex adrénal lui-même (Ellacott and Cone 2006).

MC3R est exprimé dans le cerveau, le placenta, les viscères, le cœur, le tissu adipeux, le muscle squelettique et le rein. Ses ligands principaux sont l' α et la β -MSH. Il intervient dans la régulation cardiovasculaire et l'homéostasie énergétique. Les souris déficientes en MC3R ont un phénotype complexe d'obésité sans hyperphagie mais avec augmentation de la masse grasse (Butler et al. 2000).

MC5R est exprimé dans les glandes exocrines telles que les glandes surrénales, lacrymales et sébacées. Les souris déficientes en MC5R présentent un défaut de production

de nombreuses substances, telles que les phéromones, porphyrine et lipides sébacés, ce qui leur confère un comportement agressif et défensif (Morgan et al. 2004).

B - Biologie des mutations de MC4R

1 - Modèle murin

L'inactivation de *MC4R* dans le génome murin a été réalisée peu après le clonage du gène humain (Huszar et al. 1997). Le phénotype des souris $mc4r^{-/-}$ 129/Sv ; B6 récapitule le phénotype agouti de référence sur le plan métabolique : le syndrome mélanocortine d'obésité inclut obésité à apparition tardive, hyperphagie, hypométabolisme, hyperinsulinémie et croissance linéaire accrue (Huszar et al. 1997). Les souris déficientes en *mc4r* montrent une augmentation du taux de leptine et un taux de corticostérone normal, les mâles sont hyperglycémiques. Huszar et coll. n'ont détecté aucun défaut neuro-anatomique majeur dans le cerveau (Huszar et al. 1997). L'administration centrale de MTH (agoniste de MC4R) dans des souris sauvages conduit à une augmentation de la pression artérielle (Kuo et al. 2003) alors que SHU9119 (antagoniste) augmente le rythme cardiaque sans modifier la pression artérielle. Pourtant les souris $mc4r^{-/-}$ présentent une diminution significative du rythme cardiaque et pas de modification de la pression artérielle basale (Tallam et al. 2005). Les souris adultes obèses $mc4r^{-/-}$ sont résistantes à la leptine alors que l'efficacité de la leptine est diminuée mais non nulle chez les jeunes souris $mc4r^{-/-}$ non encore obèses, ce qui sous-tend une voie de la leptine indépendante de MC4R (Marsh et al. 1999). De plus, ces souris sont incapables de répondre à un traitement à la cholécystokinine ou aux agonistes non spécifiques tels que le mélanotan II (le rôle joué par MC3R est donc mineur), tandis que la réponse au PYY persiste (Butler 2006). Enfin, les souris $mc4r^{+/-}$ présentent un phénotype intermédiaire d'obésité.

Lorsque l'alimentation des souris invalidée est limitée à la quantité ingérée par leurs congénères sauvages, seules les femelles $mc4r^{-/-}$ présentent une augmentation de l'adiposité. Ainsi l'hyperphagie contribue probablement à l'augmentation de la masse maigre et du tissu adipeux, chez les souris mâles notamment, mais un stockage préférentiel des nutriments sous forme de triglycérides en l'absence de signalisation MC4R et une interaction de celle-ci avec les stéroïdes sexuels semblent intervenir (Ste Marie et al. 2000). Toutefois, les résultats varient en fonction du fond génétique des souris utilisées par différentes équipes. En effet, les mâles $mc4r^{-/-}$ B6 ne sont pas hyperphagiques sous régime standard

(Butler 2006) contrairement aux souris $mc4r^{-/-}$ 129/Sv ;B6 (Butler et al. 2001). En conditions physiologiques normales, l'hyperphagie due à un régime riche est associée avec une augmentation compensatoire de la dépense énergétique ou thermogénèse induite par l'alimentation. Les jeunes souris $mc4r^{-/-}$ présentent une activité physique réduite et pas d'augmentation de la consommation d'oxygène consécutive à l'hyperphagie (Weide et al. 2003). Il s'ensuit la diminution de l'oxydation des acides gras et la modification de l'expression des gènes dans le foie (FAS, ACC, voir II) (Albarado et al. 2004; Chen et al. 2000). Le défaut de thermogénèse s'observe également dans le tissu adipeux brun où les souris $mc4r^{-/-}$ sont incapables d'induire UCP1 en réponse à la leptine (Ste Marie et al. 2000). Pourtant, les souris déficientes en MC4R sont capables de maintenir leur température corporelle (Ste Marie et al. 2000).

2 – Les autres rôles de MC4R

L'existence de voies de signalisation complémentaires dans la plupart des processus physiologiques masquent certains rôles de MC4R chez les souris $mc4r^{-/-}$. Toutefois, l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes de MC4R a permis de mettre en évidence l'implication de ce récepteur dans l'action des mélanocortines dans d'autres processus que la régulation de l'homéostasie énergétique. En effet, l'infusion intracérébroventriculaire d'un agoniste cyclique spécifique de MC4R diminue la consommation d'éthanol chez des souris B6, tandis que cette consommation est augmentée par l'infusion intracérébroventriculaire d'AGRP(83-132), sans modification du métabolisme de l'éthanol (Navarro et al. 2005). Les auteurs suggèrent que cette régulation s'effectue par le biais de la voie de régulation de la prise alimentaire. MC4R joue également un rôle dans le contrôle de l'homéostasie du glucose : Fan et collègues ont observé que les souris $mc4r^{-/-}$ jeunes non encore obèses ou hyperphagiques présentent déjà une intolérance à l'insuline et l'administration d'agonistes de MC4R inhibe la libération basale d'insuline, ce qui conduit à la diminution du taux de glucose sanguin (Fan et al. 2000). MC4R intervient aussi dans le métabolisme des lipides (Nogueiras et al. 2007). Il relaie le signal α -MSH dans l'axe hypothalamo-hypophyso-corticosurrénalien, via l'induction de la transcription de CRH (Lu et al. 2003) et certains antagonistes de MC4R ont des effets anxiolytiques et antidépresseurs chez différents rongeurs, sans effets secondaires sur le sommeil (Chaki et al. 2003). MC4R relaie également le signal β -MSH inhibiteur de l'inflammation cérébrale (Muceniece et al. 2005) et

l'expression de *MC4R* participe à la nociception dans la moelle épinière (Vrinten et al. 2000) et à la neuroprotection dans le cerveau (Giuliani et al. 2006). Une étude récente sur des individus volontaires obèses non porteurs de mutations de *MC4R* auxquels a été administré un agoniste de MC4R montre l'effet du récepteur dans le contrôle de la pression artérielle (Greenfield et al. 2009). Enfin, en marge de son rôle dans l'homéostasie énergétique, MC4R est surtout étudié pour son rôle stimulateur dans la fonction sexuelle (Van der Ploeg et al. 2002), via la fixation de l' α -MSH et ACTH (Argiolas 1999).

3 - Spectre clinique des mutations chez l'homme

A ce jour, plus de 90 mutations différentes ont été identifiées dans la séquence codante du gène *MC4R* humain et sont responsables d'une obésité hyperphagique sévère. Le spectre clinique des porteurs de mutations pathogéniques de *MC4R* est proche du phénotype murin mais présente certaines différences.

Les premières mutations dans la séquence de *MC4R* ont été mises en évidence simultanément par Froguel et O'Rahilly en 1998 (Vaisse et al. 1998; Yeo et al. 1998). Les deux patients présentaient une obésité sévère survenue dans l'enfance, un poids de naissance normal, des taux de lipides, de glucose et de leptine normaux. En 2003, Farooqi et son équipe ont défini le « syndrome MC4R » par une obésité à apparition précoce, une croissance linéaire accrue, une augmentation des masses grasses et maigres, une augmentation de la densité minérale osseuse, une hyperphagie, un métabolisme énergétique de repos en accord avec les prédictions pour l'âge et le sexe, et une hyperinsulinémie (Farooqi et al. 2003). Pourtant, l'augmentation des taux d'insuline et de triglycérides sont le reflet de l'obésité et non de la déficience en MC4R : les individus obèses non porteurs présentent une augmentation similaire des taux plasmatiques (Greenfield et al. 2009; Vaisse et al. 2000). De même, les taux de leptine des patients sont en accord avec leur corpulence (Santini et al. 2004). Enfin, les patients ne présentent pas de problème thyroïdien ou corticostéroïdien (Lubrano-Bertheliet et al. 2004) mais une diminution de la pression artérielle (Greenfield et al. 2009). Toutefois, de nombreuses équipes n'ont pas observé ces caractéristiques (Dubern et al. 2007; Greenfield et al. 2009; Hainerova et al. 2007; Lubrano-Bertheliet et al. 2006; Mergen et al. 2001; Vaisse et al. 2000) : l'augmentation de la croissance linéaire, de la masse maigre et de la densité de masse osseuse ne sont pas obligatoires et ces divergences restent inexpliquées. L'élément de débat principal concerne

le comportement alimentaire : la conclusion de Branson et coll. selon laquelle le « binge eating » est un phénotype associé à la déficience en MC4R (Branson et al. 2003) a été contredite à de nombreuses reprises (Gotoda et al. 1997; Herpertz et al. 2003; Lubrano-Berthelier et al. 2006; Vaisse et al. 2000) et Farooqi et collègues ont proposé que l'hyperphagie diminue avec l'âge (Farooqi et al. 2003).

MC4R présente peu de variations fréquentes et certains polymorphismes semblent propres à une population donnée. Ainsi les variants R165Q et insA100, exclusifs des Indiens Pima, sont associés avec une diminution de la dépense énergétique chez les porteurs (Krakoff et al. 2008) et le variant V103I est associé négativement avec l'obésité dans une population caucasienne (Geller et al. 2004).

4 - Mode de transmission, pénétrance et fréquence des mutations de *MC4R*

Les premiers patients décrits étaient porteurs de mutations de *MC4R* à l'état hétérozygote et avaient reçu la mutation d'un parent obèse (Vaisse et al. 1998; Yeo et al. 1998). Ainsi, le mode de **transmission autosomique** dominant est établi dès 1998 et répliqué dans de nombreuses études. En 2000, Farooqi et coll. ont décrit la première porteuse homozygote (Farooqi et al. 2000). Les deux parents de cette femme étaient porteurs hétérozygotes et en faible surpoids (IMC = 26 kg/m²). A cette époque, on n'envisageait pas encore la possibilité de pénétrance incomplète et les auteurs concluent que le mode de transmission est dominant ou récessif suivant les mutations. Depuis, les exemples se sont multipliés de porteurs de mutations de *MC4R* pathogéniques non obèses (Hainerova et al. 2007; Hinney et al. 2006; Lubrano-Berthelier et al. 2003a; MacKenzie 2006; Santini et al. 2004) et la notion de **pénétrance incomplète** est communément admise aujourd'hui. De plus, lorsque tous les porteurs d'une famille sont obèses, McKenzie observe un autre degré de pénétrance variable : la sévérité de l'obésité et l'âge d'apparition de la maladie peuvent varier pour une même mutation (MacKenzie 2006). L'étude de nouveaux porteurs homozygotes ou hétérozygotes composites a permis de constater que ceux-ci présentent une obésité plus précoce et/ou plus sévère (Dubern et al. 2007) ainsi qu'une prise alimentaire accrue en condition *ad libitum* (Farooqi et al. 2003). Ainsi, la transmission des mutations de *MC4R* suit un **mode codominant** (Dubern et al. 2007; Farooqi et al. 2003).

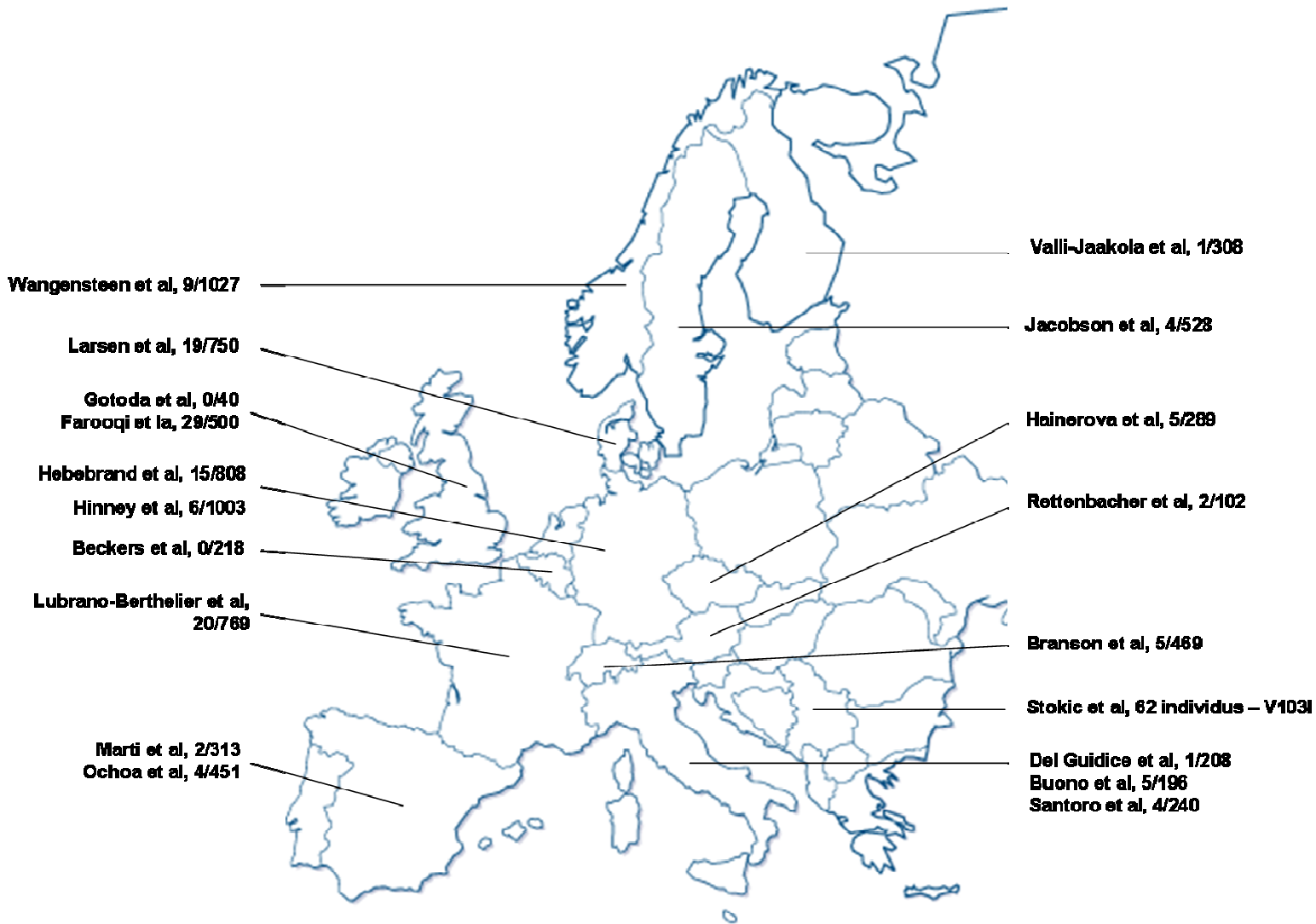


Figure 16 : les mutations de *MC4R* en Europe et dans le monde

Suivant les études, les mutations de *MC4R* sont trouvées dans 0,5% à 5,6% des patients obèses. Les mutations de *MC4R* n'ont pas été systématiquement recherchées chez des individus contrôles ; en population générale allemande, leur fréquence est de 0,2% (Hinney et al. 2006). Lubrano-Berthelier et coll. ont constaté que la **fréquence** des mutations de *MC4R* était équivalente dans deux cohortes distinguées par l'apparition tardive ou précoce de l'obésité (2,35-2,83%) (Lubrano-Berthelier et al. 2006) ce qui est en désaccord avec la définition d'obésité de l'enfant initialement associée aux mutations de *MC4R*. La plupart des études ont concerné des populations européennes (figure 16). Quelques rares publications attestent de la rareté des mutations de *MC4R* en Asie [(Kobayashi et al. 2002; Ohshiro et al. 1999) au Japon, (Rong et al. 2006) en Chine] contrairement au rôle important qui leur est accordé en Europe (*MC4R* est la première cause d'obésité monogénique en Europe). Aux Etats-Unis, les résultats sont plus variables mais très dépendants de la composition ethnique de la population considérée (Calton et al. 2009; Donohoue et al. 2003; Gu et al. 1999; Jacobson et al. 2002). Les mutations de *MC4R* sont également très rares dans la population des Indiens Pima (Krakoff et al. 2008; Ma et al. 2004). Dans ces régions, les observations sont toutefois biaisées par les faibles effectifs des cohortes. Un effet fondateur est responsable localement de la plus forte fréquence de certaines mutations. C'est le cas pour Y35X (0.6%) chez les Danois (Larsen et al. 2005), I226T en Finlande (Valli-Jaakola et al. 2004), -176A/C et Y35C en Chine (Rong et al. 2006) et insA100 et R165Q chez les Indiens Pima (Krakoff et al. 2008; Ma et al. 2004). De plus, le variant non synonyme V103I, responsable d'un gain de fonction du récepteur (Xiang et al. 2006), est présent dans la plupart des populations contrôles et obèses (Beckers et al. 2006).

C - Pharmaco-chimie des mutations de *MC4R*

Déterminer les conséquences des mutations dans les différents domaines de la protéine permet de mieux comprendre le rôle de chacun d'eux et pourrait être utile à la conception de ligands synthétiques thérapeutiques.

1 – Régionalisation de la protéine *MC4R*

Comme dans tous les RCPG, les mutations ponctuelles peuvent agir à plusieurs niveaux du fonctionnement du récepteur (figure 17) (Tao 2005).

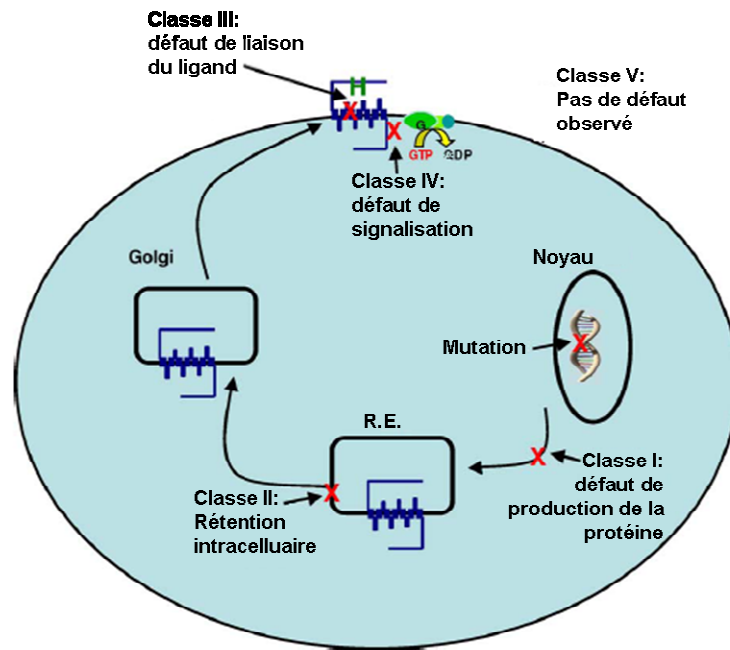


Figure 17 : les effets des mutations des RCPG (d'après Tao 2005)

La plupart des mutations décrites sont situées dans les boucles intra- et extracellulaire et dans les domaines transmembranaires. Il y a peu de mutations dans les domaines C- et N- terminaux. Toutefois, certaines études ont ciblé les propriétés d'acides aminés particuliers non concernés par des mutations naturelles (Ho and MacKenzie 1999). Le récepteur 4 aux mélanocortines est un RCPG de classe A1 : les ligands endogènes se lient à la cavité formée au sein du fagot de domaines transmembranaires (DTM) : tous les DTM jouent un rôle, ce qui explique pourquoi les différentes équipes qui ont cherché à déterminer les domaines importants ont obtenu des résultats si divergents (Ho and MacKenzie 1999; Oosterom et al. 2001; Schioth et al. 1997; Tan et al. 2009; Yang et al. 2003; Yang et al. 2000). Certaines mutations conduisent à la stabilisation de la protéine dans une conformation inactive mais on ne distingue pas de domaine privilégié (G55V, G55D, S136F, A303T) (Tan et al. 2009). La 3^e boucle intracellulaire lie les protéines Gs et relaie la signalisation (Yang et al. 2005).

Vaisse et son équipe ont montré que la partie N-terminale de MC4R, très peu conservée par rapport au reste de la séquence (Schioth et al. 1997), agit comme un ligand « attaché au récepteur », responsable de son activité constitutive (Srinivasan et al. 2004). Les mutations dans le domaine N-terminal entraînent une diminution significative de l'activité constitutive mais n'ont pas d'effet sur la réponse à l' α -MSH, sur la liaison d'AGRP

ou sur l'expression à la surface cellulaire (Srinivasan et al. 2004). La séquence C-terminale de la protéine est responsable du trafic intracellulaire. Des expériences de délétions de ce domaine conduisent à la rétention intracellulaire du récepteur (Ho and MacKenzie 1999; VanLeeuwen et al. 2003). Les mutations dans cette région ont des effets variables (VanLeeuwen et al. 2003; Yeo et al. 2003) tandis que 81% des mutations de MC4R, situées sur l'ensemble de la protéine, conduisent à la rétention intracellulaire du récepteur muté et diminuent l'expression à la surface cellulaire, sans doute par le biais d'un défaut de structure tertiaire de la protéine (Ho and MacKenzie 1999; Lubrano-Bertheliet et al. 2003b; Nijenhuis et al. 2003; VanLeeuwen et al. 2003).

L'activation de MC4R provoque aussi la phosphorylation des MAPK ERK1/2 (ou p44/42 MAPK) par un processus indépendant de protéine kinase A (Daniels et al. 2003; Patten et al. 2007; Vongs et al. 2004). L'activation de la voie MAPK semble nécessaire à la régulation de la prise alimentaire par MC4R (Vongs et al. 2004). Des éléments de structure de MC4R sont nécessaires à cette signalisation, notamment la queue cytoplasmique. Certaines mutations sans effet sur la production d'AMPc abolissent l'activation de p44/42 MAPK (Patten et al. 2007).

2 - Haplo-insuffisance ou effet dominant négatif ?

L'homo-dimérisation naturelle de MC4R a été observée par *Bioluminescence Resonance Energy Transfer* (Nickolls and Maki 2006) et la présence des ligands agonistes ou antagonistes n'altère pas le statut de dimérisation des récepteurs MC4R. Dans le but d'optimiser la recherche de ligands synthétiques curatifs, il est important de déterminer si les mutations de *MC4R* ont un effet dominant-négatif sur cette dimérisation. D'après Biebermann et coll., la mutation S90N (DTM2) dimérise avec le récepteur sauvage à la membrane et induit une diminution dose-dépendante de la production d'AMPc (Biebermann et al. 2003). Pourtant, toutes les autres mutations testées sont sans effet sur la dimérisation du récepteur (Ho and MacKenzie 1999; Srinivasan et al. 2004; Yeo et al. 2003). De ce fait, l'haplo-insuffisance est donc la cause privilégiée d'obésité associée aux mutations de MC4R bien que le débat ne soit pas totalement clos (Hainerova et al. 2007; MacKenzie 2006).

3 - Ligands endogènes et synthétiques : voies thérapeutiques

MC4R module le système cardiovasculaire, le système immunitaire et le système nerveux central ; il active le système nerveux sympathique et sa surexpression est responsable d'hypertension (Wikberg and Mutulis 2008). Ainsi, les ligands de MC4R peuvent être utiles dans diverses maladies ou responsables d'effets secondaires indésirables (Getting 2006). L'administration centrale d'agoniste spécifique évite les nausées provoquées par des agonistes non spécifiques (Butler 2006) mais la synthèse d'agonistes spécifiques efficaces est compliquée par la forte homologie des récepteurs aux mélanocortines (Getting 2006). L'action inhibitrice des ligands endogènes ACTH(1-24) et α -MSH sur la prise alimentaire a été mise en évidence à la fin des années 80 (Poggioli et al. 1986). L'administration intra-nasale d'ACTH(4-10) chez des sujets normaux diminue la prise alimentaire, mais elle n'est pas efficace chez des patients en surpoids (Smolnik et al. 1999). Les recherches sont en cours pour expliquer ce phénomène. Inversement, l'administration centrale de AGRP(83-132) induit la prise alimentaire et interagit potentiellement avec le système opioïde, ce qui en fait un traitement intéressant de l'anorexie et la cachexie (Irani and Haskell-Luevano 2005). Ces ligands endogènes sont rapidement dégradés *in vivo* (Nargund et al. 2006), c'est pourquoi les chercheurs travaillent sur la conception de peptides analogues, cycliques ou linéaires, à partir de la séquence-cœur des ligands endogènes (His-Phe-Arg-Trp) (Nargund et al. 2006).

Le NDP-MSH (Nle4-D-Phe7- α MSH, issu de l'incorporation d'une D-Phe à la place de la L-Phe en position 7 de l' α -MSH) et le peptide cyclique melanotan II (MTII) sont les anorexigènes synthétiques les plus couramment utilisés en recherche chez les rongeurs (Getting 2006). Ces agonistes de MC4R sont des cibles thérapeutiques contre les troubles sexuels, l'alcoolisme et l'hyperphagie. Les substitutions d'ACTH(4-10) et ACTH(1-39) ont conduit à la synthèse de SHU9119, qui a la propriété de bloquer MTII (Getting 2006; Hruby et al. 1995) et d'analogues disulfites circulaires HS014 et HS024, qui bloquent l' α -MSH (Getting 2006; Schioth et al. 1998). Les antagonistes de MC4R sont non seulement utiles pour mieux comprendre la signalisation MC4R mais aussi pour soigner l'anorexie, la cachexie (suite aux traitements anti-cancéreux notamment), les douleurs neuropathiques et la dépression. La plupart des exemples de traitement à l'aide de ligands de MC4R concernent à ce jour leur action sur la fonction érectile (Wikberg and Mutulis 2008). Le bremelanomide, un peptide dérivé de MTII, est en phase II de test clinique pour soigner la dysfonction érectile et les troubles sexuels féminins, et provoque des effets secondaires mineurs tels que

somnolence, maux de tête et perturbation du goût (Wikberg and Mutulis 2008). L'équipe de O'Rahilly a testé l'effet d'un agoniste (LY2112688) sur des volontaires en surpoids : ce dernier induit bâillements, raideur musculaire, érections, maux de tête, nausées, diarrhées, vomissements et asthénies et augmente la pression artérielle (Greenfield et al. 2009).

Selkirk et collègues ont mis en garde contre les tests *ex vivo* des molécules à visée thérapeutique : en effet, ils ont observé une réponse différentielle de MC4R aux THIQ, NBI-702 et MB243 (autres agonistes synthétiques) d'une part et MTII et ACTH (antagonistes) d'autre part, dans les astrocytes par rapport aux cellules HEK exprimant un MC4R recombinant (Selkirk et al. 2007).

Buts de l'étude

Malgré les progrès récents de la génétique humaine et les 16 locus identifiés ces deux dernières années et associés avec le risque d'obésité, les variations et mutations connues à ce jour expliquent une très faible part de la variance génétique dans cette maladie. Pourtant, au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes concentrés presque exclusivement sur un seul gène. Le rôle du gène du récepteur 4 aux mélanocortines dans l'obésité monogénique est connu depuis dix ans et ses mutations sont les plus fréquentes à ce jour. Pourtant, le caractère incomplet de la pénétrance de ces mutations ou l'effet de ses polymorphismes n'est pas encore clairement élucidé.

A l'aide d'un séquençage extensif et de l'étude de familles tri-générationnelles, nous avons cherché à mieux évaluer la fréquence et la pénétrance des mutations de *MC4R*. Nous nous sommes surtout interrogés sur les facteurs expliquant la pénétrance incomplète et sur les effets des mutations de *MC4R* chez les sujets les plus âgés.

Le rôle protecteur du variant V103I est connu depuis plusieurs années mais un gène qui présente tant de mutations possède-t-il d'autres variants de prédisposition ? Les polymorphismes rares identifiés par séquençage ont été génotypés sur un plus grand effectif afin de déterminer leur effet sur le risque d'obésité.

Les nouvelles études d'association génome-entier ont participé à répondre à cette dernière question en identifiant des polymorphismes à 188 kb en aval de *MC4R* associés avec le risque d'obésité. Mais ces variants modulent-ils effectivement l'expression de *MC4R* ? Nous avons cherché à répondre à cette question de manière indirecte, en évaluant l'effet du polymorphisme le plus associé à l'obésité sur la prise alimentaire.

Enfin, ce polymorphisme de *MC4R* interagit-il avec les polymorphismes de l'autre gène majeur de l'obésité polygénique, *FTO* ? Interagit-il avec l'activité physique ou le sexe ?

PRESENTATION DES TRAVAUX

ARTICLE 1

Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees.

Stutzmann E, Tan K, Vatin V, Dina C, Jouret B, Tichet J, Balkau B, Potoczna N, Horber F, O'Rahilly S, Farooqi IS, Froguel P, Meyre D.

Diabetes. 2008 Sep;57(9):2511-8.

Prevalence of Melanocortin-4 Receptor Deficiency in Europeans and Their Age-Dependent Penetrance in Multigenerational Pedigrees

Fanny Stutzmann,¹ Karen Tan,² Vincent Vatin,¹ Christian Dina,¹ Béatrice Jouret,³ Jean Tichet,⁴ Beverley Balkau,⁵ Natascha Potoczna,⁶ Fritz Horber,⁶ Stephen O'Rahilly,² I. Sadaf Farooqi,² Philippe Froguel,^{1,7} and David Meyre¹

OBJECTIVE—Melanocortin-4 receptor (MC4R) deficiency is the most frequent genetic cause of obesity. However, there is uncertainty regarding the degree of penetrance of this condition, and the putative impact of the environment on the development of obesity in *MC4R* mutation carriers is unknown.

RESEARCH DESIGN AND METHODS—We determined the *MC4R* sequence in 2,257 obese individuals and 2,677 nonobese control subjects of European origin and established the likely functional impact of all variants detected. We then included relatives of probands carriers and studied 25 pedigrees, including 97 carriers and 94 noncarriers from three generations.

RESULTS—Of the *MC4R* nonsynonymous mutations found in obese subjects, 68% resulted in a loss of function in vitro. They were found in 1.72% of obese versus 0.15% of nonobese subjects ($P = 6.9 \times 10^{-10}$). Among the families, abnormal eating behavior was more frequent in both MC4R-deficient children and adults than in noncarriers. Although BMI was inversely associated with educational status in noncarrier adults, no such relationship was seen in *MC4R* mutation carriers. We observed a generational effect, with a penetrance of 40% in MC4R-deficient adults aged >52 years, 60% in 18- to 52-year-old adults, and 79% in children. The longitudinal study of adult carriers showed an increasing age-dependent penetrance (37% at 20 years versus 60% at >40 years).

CONCLUSIONS—We have established a robust estimate of age-related penetrance for MC4R deficiency and demonstrated a generational effect on penetrance, which may relate to the development of an “obesogenic” environment. It remains to be seen whether appropriate manipulation of environmental factors may contribute to preventing the development of obesity even in those strongly genetically predisposed to it. *Diabetes* 57:2511–2518, 2008

From the ¹Centre National de la Recherche Scientifique-8090, Institute of Biology, Pasteur Institute, Lille, France; the ²University of Cambridge Metabolic Research Laboratories, Institute of Metabolic Science, Addenbrooke's Hospital, Cambridge, U.K.; ³Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U563, Children's Hospital, Toulouse, France; ⁴Institut inter Régional pour la Santé, La Riche, France; ⁵Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U780-IFR69, Villejuif, Université Paris-Sud, Orsay, France; ⁶Klinik Lindberg, Winterthur, and University of Berne, Berne, Switzerland; and the ⁷Department of Genomic Medicine, Hammersmith Hospital, Imperial College London, London, U.K.

Corresponding author: Philippe Froguel, p.froguel@imperial.ac.uk.

Received 3 February 2008 and accepted 5 June 2008.

Published ahead of print at <http://diabetes.diabetesjournals.org> on 16 June 2008. DOI: 10.2337/db08-0153.

© 2008 by the American Diabetes Association. Readers may use this article as long as the work is properly cited, the use is educational and not for profit, and the work is not altered. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

The leptin-melanocortin axis controls human energy homeostasis, and the melanocortin-4 receptor (MC4R) is a key player in its central regulation (1). Loss-of-function mutations in *MC4R* cause severe familial forms of obesity (2,3), and infrequent gain-of-function polymorphisms have been associated with protection against obesity (4,5). At least 72 nonsynonymous mutations have been discovered so far, but some have no obvious functional consequences (6,7), highlighting the importance of functional characterization of *MC4R* mutations in the determination of potential pathogenicity. MC4R is a membrane-bound G-protein-coupled receptor that activates adenylate cyclase. Loss-of-function mutations result in a partial or complete loss of function as measured by cAMP production. The majority of missense mutations in *MC4R* result in intracellular retention of the mutated protein, whereas some primarily affect ligand binding or ligand/receptor activation (8,9). In some cases, the alteration of the basal activity of the receptor (8,10) has been reported.

The prevalence of loss-of-function *MC4R* mutations ranges from 0.5 to 5.8% in childhood-onset obesity (11–14). The contribution of *MC4R* mutations to late-onset obesity is still debated (13,15–18). Obesity due to *MC4R* mutations has been extensively studied, and although heterozygous loss-of-function mutations can clearly cause familial obesity, they can be found in individuals who are not obese (19). There is a need for reliable estimates of penetrance. Furthermore, no study has thoroughly assessed the effect of loss-of-function *MC4R* mutations in elderly subjects. Previous studies using part of our French cohort evidenced the first mutation in MC4R and demonstrated that most of them lead to an intracellular retention of the receptor (2,13,18).

Although hyperphagia is a key feature of MC4R deficiency, with increased food intake at an ad libitum test meal reported in severely obese MC4R-deficient children (10), an apparent amelioration of obesity and food intake disturbances has been suggested in adulthood in some studies (6,11). Obesity is a complex trait, and *MC4R* mutations offer a unique opportunity to analyze the effects of both aging and shared environment on the evolution of body mass in this paradigm. In this extensive study of 2,257 unrelated obese subjects, 2,677 control subjects of European descent, and 25 multigenerational pedigrees with several *MC4R* mutation carriers, we provide a comprehensive picture of the prevalence of this condition and of factors that determine the expression of the obesity

TABLE 1
Phenotypic description of the studied cohorts and results of the mutation screening

	<i>n</i> (% male)	Mean age (SD)	Mean BMI (SD)	Mutations	Synonymous	Nonsynonymous	Nonsynonymous loss of function
Control subjects	2,677 (41)	48 (11)	22.6 (2.7)	0.75 (20)	0.22 (6)	0.52 (14)	0.15 (4)
Children	526 (47)	10 (4)	—	2.66 (14)	0.38 (1)	2.47 (13)	1.81 (11)
Lille	433 (49)	11 (3)	—	2.30 (10)	0.00 (0)	2.31 (10)	2.31 (10)
Toulouse	93 (36)	5 (2)	—	4.30 (4)	1.08 (1)	3.23 (3)	1.08 (1)
French adults	863 (30)	44 (14)	41.8 (8.8)	3.24 (28)	0.23 (2)	3.01 (26)	2.32 (20)
Class I-II	160 (36)	48 (15)	36.8 (2.9)	2.50 (4)	0.00 (0)	2.50 (4)	1.25 (2)
Class III	703 (24)	44 (12)	47.0 (7.2)	3.41 (24)	0.28 (2)	3.13 (22)	2.56 (18)
Swiss adults	868 (23)	43 (11)	43.2 (7.3)	1.61 (14)	0.23 (2)	1.38 (12)	0.92 (8)
Class I-II	297 (23)	42 (11)	36.3 (3.2)	0.67 (2)	0.34 (1)	0.34 (1)	0.34 (1)
Class III	571 (23)	43 (10)	46.8 (6.2)	2.10 (12)	0.18 (1)	1.93 (11)	1.23 (7)
All adults	1,731 (28)	46 (13)	42.3 (8.4)	2.43 (42)	0.23 (4)	2.19 (38)	1.61 (28)
Class I-II	457 (33)	47 (14)	34.9 (3.1)	1.31 (6)	0.21 (1)	1.09 (5)	0.65 (3)
Class III	1,274 (24)	45 (12)	47.4 (6.9)	2.82 (36)	0.26 (3)	2.59 (33)	1.96 (25)
All obese	2,257	—	—	2.48 (56)	0.22 (5)	2.26 (51)	1.72 (39)

Data are percent of carriers in the cohort (*n* of carriers) unless otherwise indicated. BMI of the Swiss individuals was documented before surgery.

phenotype and support previous observations reported in a German familial study (20).

RESEARCH DESIGN AND METHODS

The study protocol was approved by all local ethics committees, and informed consent was obtained from each subject before participation in the study, in accordance with the Declaration of Helsinki principles. For children younger than 18 years, oral consent was obtained, and parents provided written informed consent.

We used the 90th and 97th BMI percentiles as thresholds for childhood overweight and obesity, respectively, according to the recommendations of the European Childhood Obesity Group study (21) in a French reference population (22). The classes of adiposity in adult subjects were defined as lean (BMI <27 kg/m²), overweight (BMI ≥27 and <30 kg/m²), class I-II obese (BMI ≥30 and <40 kg/m²), and class III obese (BMI ≥40 kg/m²). Populations are described in Table 1.

A total of 433 unrelated obese children were recruited through a multimedia campaign run by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)-Unité Mixte de Recherche (UMR) 8090, and 93 obese children were patients of Toulouse Children's Hospital. French obese adults were recruited by the CNRS UMR8090 and the Department of Nutrition of Paris Hotel Dieu Hospital. The cohort includes 160 class I-II and 703 class III unrelated obese individuals. Some of them have been used in previous studies (18), and the others were recruited under the same criteria between 1999 and 2003. We also sequenced 868 Swiss obese subjects, recruited after gastric surgery in Zurich (15). Their BMI was documented before surgery.

From the D.E.S.I.R. general prospective study, 2,302 control subjects were selected (23). Selection criteria were BMI <27 kg/m² and fasting glucose <5.6 mmol/l at baseline and during the 9-year study follow-up; 375 unrelated white French adults with BMI <27 kg/m² and normal glucose tolerance after an oral glucose tolerance test recruited at the CNRS UMR8090 were also used as control subjects. Case and control subjects were not matched for age and sex. Their mean age at inclusion was 48 years (22.6 kg/m²; 41% men).

Sequencing. We amplified the coding sequence of the *MC4R* gene from a patient's genomic DNA in three overlapping fragments. PCR conditions and primers sequences are available on request. Sequencing was performed using the automated ABI Prism 3730xl DNA sequencer in combination with the Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 3.1 (Applied Biosystems). Sequences were assembled and analyzed with Sequencher software.

Functional characterization of the new mutations. All mutant receptors were generated from the wild type as previously described (24). Wild-type and mutant MC4Rs were transiently transfected into HEK293 cells using Lipofectamine 2000 (Stratagene), according to the manufacturer's instructions. One hundred nanograms of wild-type or mutant receptors was cotransfected with 100 ng Bos-β-galactosidase construct as a control of transfection efficiency.

The response of cells transfected with wild-type and mutant MC4Rs to the addition of α-melanocyte-stimulating hormone (MSH) was measured as previously described (9). β-Galactosidase assay was performed with remaining lysate from cAMP enzyme immunosorbent assay (EIA) as previously

described. The amount of cAMP produced per well was calculated on the standard curve derived from EIA using GraphPad Prism 4.0 and corrected by β-galactosidase absorbance to correct for transfection efficiency. The data were fitted to the sigmoidal dose-response curve using GraphPad Prism 4.0. Each experiment was conducted in duplicate at least four times. Mutations detected in this study were classed as loss of function if they showed evidence of impaired cAMP generation either in reported studies or in our investigations.

Familial study. We sequenced *MC4R* in the voluntary relatives of all individuals carrying loss-of-function mutations. Pedigrees were available only for patients recruited by the CNRS UMR8090 unit. This first recruitment already included parents of obese individuals. Proband carriers and children who were too young to be legally included the previous times were then contacted until 2006 for the extension of the study to other family members.

Generation determination. To compare the effects of loss-of-function *MC4R* mutations between generations, we classified the relatives of obese MC4R-deficient probands according to the following thresholds: The end of childhood was determined as age 18 years, and a generational criterion was defined by the average age when people became grandparents in our cohort. Thus, we classified adult parents as aged 18–52 years and grandparents as aged >52 years.

Body composition and growth. Proband and relatives have been similarly phenotyped and genotyped. Weight and height were measured during medical consultation, and BMI was calculated as weight in kilograms divided by the square of height in meters. The weights and heights of the children at different ages from birth to the recruitment were obtained from each child's health notebook when available. We then estimated the age of the rebound as previously described (25). The adiposity rebound corresponds to the second rise in BMI curve that usually occurs between ages 5 and 7 years. Age of the obesity onset was defined as the age when BMI first exceeded the 97th percentile for sex and age.

Eating behavior. In obese adults, eating behavior was assessed by the three-factor eating questionnaire (TFEQ) (26), which evaluates the cognitive restraint of eating, disinhibition, and hunger. The range of scores for hunger was 1–14; for disinhibition, 1–18; and for restraint, 1–21. We transformed the criteria of Stunkard into binary traits using the mean of each criterion for the thresholds (7, 9, and 10.5, respectively).

Because the TFEQ has not been validated in obese children, we used an in-house questionnaire administered by a trained physician (27,28). Three questions related to eating behavior during or between meals identified binge eating, eating large amounts of food during meals, and snacking as binary phenotypes (yes or no).

Statistical analysis. Comparison of means was done with unpaired Student's *t* test and contingency table χ^2 analysis using SPSS 14.0 for Windows. When the sample size was <30, the statistical significance of the difference between groups was assessed by the Mann-Whitney *U* test and the Kolmogorov-Smirnov *Z* test for nonparametric results. The comparison of prevalence has been tested with the Fisher's exact test because of theoretical sample size <5. Quantitative traits were also analyzed by a linear regression adjusted for age, sex, and BMI. All reported *P* values are two sided. *P* values of <0.05 were

TABLE 2
Summary of the mutations, name, carriers, and functional characterization

Mutation	Obese carriers	Nonobese carriers	Functional characterization	Ref.
Known				
T11A	1 (45.61)		Like wild type	(36)
R18C	1 (52.59)		Partial	(33)
R18H	1 (40.65)		Partial	(33)
S30F		4 (21.92; 20.10; 20.80; 20.40)	Like wild type	(36)
Y35X + D37V	2 (32.42; 53.67)		No activity	(29)
InsG48	1 (41.52)		No activity	(18)
F51L	2 (42.52; 50.68)		Like wild type	(15)
I69M	1 (45.51)		No activity	(17)
Y80X	2 (32.51; 49.68 compound htz I301T)		No activity	(17)
V95I	1 (42.78)		No activity	(33)
I102T	2 (35.25; 41.09)		Partial	(17)
T112M	7 (37.17; 20.34; 33.21; 47.58; 31.35; 39.97; 53.93)	1 (24.70)	Partial	(10)
S127L	2 (36.35; 27.22)		Partial	(13)
T150I	2 (47.87; 49.94)		Partial	(10)
A154D	2 (42.62; 39.51)		Like wild type	(19)
R165W	2 (50.86; 66.95)	1 (24.00)	Partial	(10)
I170V	3 (33.67; 49.53; 21.90)		Partial	(10)
M200V	2 (47.62; 45.00)		Like wild type	(6)
F202L		1 (22.90)	Like wild type	(34)
G231S	1 (41.62)		Partial	(17)
A244E	1 (26.28)		Like wild type	(36)
L250Q	1 (58.82)		Partial	(13)
G252S	1 (49.78)		Partial	(36)
V253I	1 (34.47)		Like wild type	(10)
C271R	1 (28.03)		Like wild type	(11)
N274S	1 (40.34)		Like wild type	(36)
S295P	1 (42.19)	2 (25.50; 24.80)	Like wild type	(17)
P299H	3 (23.30; 26.45; 36.8)		No activity	(13)
I301T	3 (42.91 hnz; 40.47 hnz; 31.78 htz)		Partial	(13)
New				
H76R	1 (30.84)		Like wild type	—
S94N	1 (67.86)		Partial	—
D126Y	1 (42.65)		No activity	—
D146N	1 (19.20)		Like wild type	—
Del170V	1 (22.22)		Not tested	—
F201L		1 (22.30)	Partial	—
G231V		1 (24.70)	Like wild type	—
P260Q	2 (23.30; 25.88)		Partial	—
I289L		1 (20.30)	No activity	—
R305S	1 (34.31)		Partial	—
Y332C		1 (20.13)	Like wild type	—
Y332H		1 (23.00)	Like wild type	—

Data are n (BMI of the carriers, expressed as weight in kilograms divided by the square of height in meters). hnz, homozygous; htz, heterozygous.

considered to indicate statistical significance. Generalized estimating equations with an exchangeable correlation matrix were used with STATA software to take familial relationships into account when testing the effects of the mutations.

We used allelic frequencies in case and control subjects from the initial screening to estimate penetrances, i.e., the probability (PG_i), of a given genotype (Gi) being affected, where $G1$ is the wild type, $G2$ is the heterozygote, and $G3$ is the mutant homozygote. From Bayes' theorem, PG_i can be written as $P(A|Gi) = P(Gi|A) \times P(A) / [P(Gi|A) \times P(A) + P(Gi|U) \times P(U)]$, where A stands for affected (obese), U for unaffected, and $P(A)$ is the prevalence of being obese, here identified as 15% in the European population.

RESULTS

Initial screening of loss-of-function MC4R mutations
Mutation detection. The baseline characteristics of the 1,731 obese adults, 526 obese children, and 2,677 nonobese control subjects, all of European descent, are reported in

Table 1. We considered as a mutation any rare variant (frequency <1%) found in the coding sequence. In this regard, T112M was thus considered as a mutation (12,29), whereas the more frequent V103I and I251L were excluded (4,5,30). Among the 2,257 obese subjects, we identified 36 different mutations (4 synonymous, 31 missense [6 new], and 1 frameshift) in 56 carriers (2.48%) (Tables 1 and 2; Fig. 1). Two adults were homozygous carriers for I301T, and one patient was a compound heterozygous carrier for Y80X and I301T. In the control group, we identified 20 carriers of 15 different mutations (0.75%; 5 synonymous and 10 [5 new] missense). The prevalence rates are given in Table 1. The enrichment of nonsynonymous mutations in the obese group compared with the control subjects is statistically significant (Fisher's exact test, 2.26 vs. 0.52%, $P = 9.8 \times 10^{-8}$), but there was no difference in the

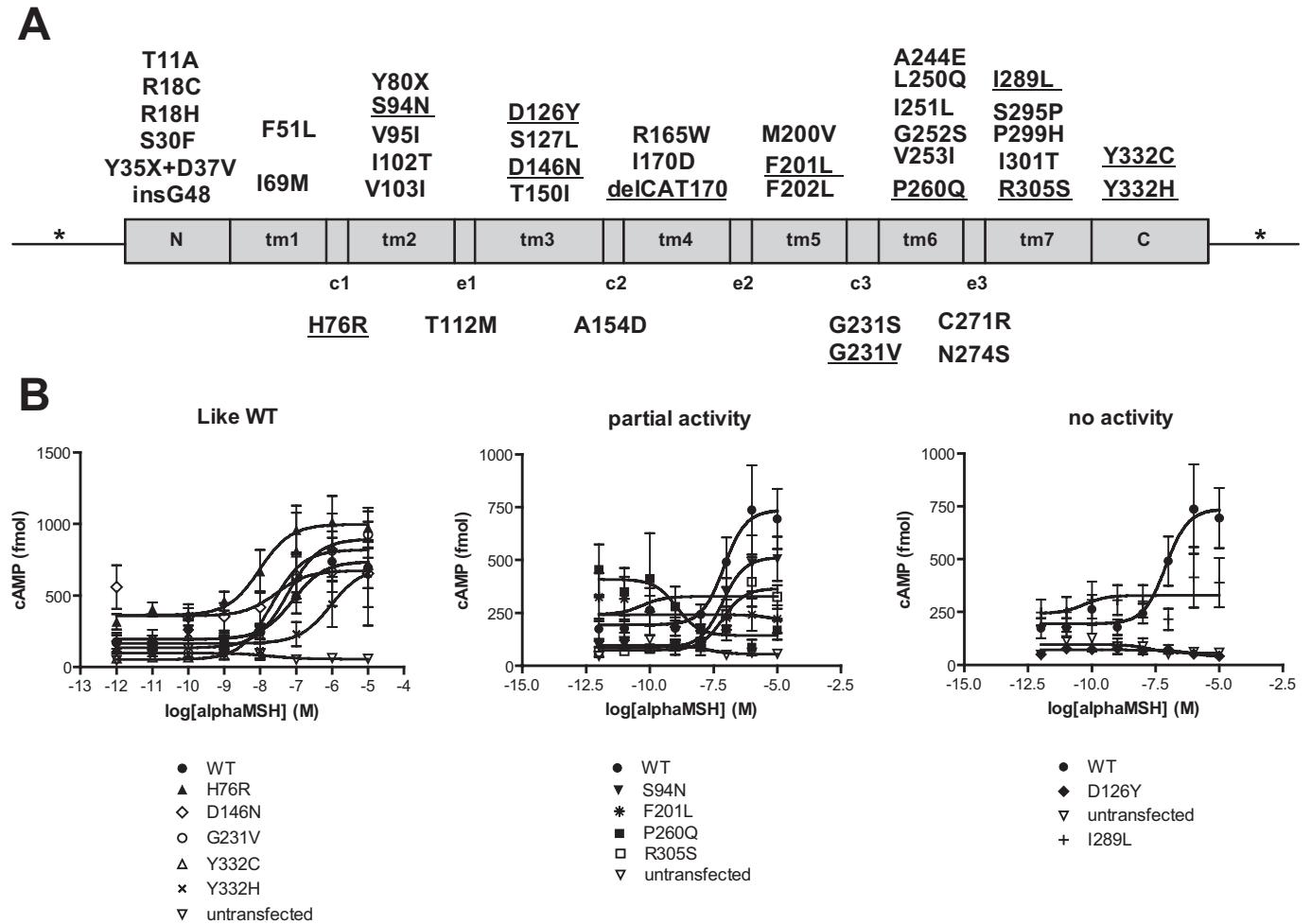


FIG. 1. Mutations identified in *MC4R* in the screening of 5,620 subjects. **A:** Localization of the identified mutation according to *MC4R* conformation. The transmembrane domains are indicated as tm1–7, cytoplasmic loops c1–3, and extracellular loops e1–3. Mutations identified are listed according to the domain in which they are located. Underlined mutations are new. **B:** Functional characterization of the new nonsynonymous mutations: cAMP EIA. The graphs indicate the response of mutant and wild-type *MC4R* to the addition of a logarithmic increase of α -MSH. Each point represents the mean \pm SE of at least four independent experiments performed in duplicate.

prevalence of synonymous mutations between the two groups (0.22 vs. 0.22%, $P = 1$).

Functional characterization. We characterized all newly identified missense mutations by testing the ability of mutated receptors to generate cAMP in response to increasing concentrations of α -MSH. Results are reported in Fig. 1 and Table 2 (E_{\max} and half-maximal effective concentration are given in supplementary Table 1, available in an online appendix at <http://dx.doi.org/10.2337/db08-0153>): S94N, F201L, P260Q, and R305S showed a partial cAMP response to α -MSH. D126Y and I289L showed a complete inability to signal to cAMP. We observed no effect on the cAMP response to increasing concentrations of α -MSH for H76R, D146N, G231V, Y332C, and Y332H. The other 30 mutations have been characterized previously in *in vitro* assays (references in Table 2). Of the 34 mutations observed in obese subjects, only 23 (68%) result in a loss of function *in vitro*. From this stage, we only analyzed carriers of loss-of-function *MC4R* mutations.

Prevalence of loss-of-function *MC4R* mutations. We calculated the prevalence of loss-of-function *MC4R* mutations in our European population. In obese children, the prevalence was doubled in case of family history of obesity compared with sporadic obesity (2.31 vs. 1.08%,

respectively). But the difference was not significant, which showed the relative homogeneity of the cohorts and allowed the calculation of a general prevalence in children: altogether, 1.81% of obese children carried loss-of-function *MC4R* mutations. In adults, likewise, the prevalence was higher in probands of obese families compared with obese subjects in whom there was no family history of obesity (2.32 vs. 0.92%, $P = 0.02$). Moreover 1.96% of class III obese subjects harbored loss-of-function *MC4R* mutations compared with 0.65% in class I-II, but the difference was not significant ($P = 0.08$). The mean prevalence of loss-of-function *MC4R* mutations in adult obesity was then 1.61%. Altogether, the prevalence in obese children and adults was 1.72%, whereas 0.15% of nonobese individuals (mean age 44 years; mean BMI 22.8 compared with 22.6 kg/m² in the whole control population; one man and three women) carried a loss-of-function mutation (11-fold increase; $P = 6.9 \times 10^{-10}$; Table 1).

Penetrance and mode of inheritance. We evaluated the penetrance of the loss-of-function *MC4R* mutations in two ways. First, we calculated the proportion of carriers of loss-of-function mutations with obesity in our entire population: 63.5% for heterozygous and 94.6% for homozygous/compound heterozygous carriers, respectively, according to the Bayes' theorem. We also assessed the penetrance of

loss-of-function *MC4R* mutations in 25 French multigenerational nonconsanguineous pedigrees where the proband was obese and carried a loss-of-function *MC4R* mutation (supplementary Fig. 1). The familial penetrance was 60% for heterozygous carriers. It was 100% in homozygous and compound heterozygous carriers.

For mutation I301T, we observed a codominant mode of inheritance: two homozygous unrelated individuals presented a BMI of 40.5 and 42.9 kg/m² compared with a BMI of 31.78 kg/m² for a I301T heterozygous carrier. Moreover, this heterozygous individual was the father of two compound heterozygous carriers of I301T plus Y80X with BMIs of 49.68 and 54.43 kg/m², respectively (supplementary Fig. 1). The mother carrying mutation Y80X had a BMI of 33.05 kg/m². The third generation of this family included two overweight children of 10 and 14 years (BMI 19.0 and 22.3 kg/m², respectively; BMI ≥90th percentile) carrying either the I301T or the Y80X mutations. The increase in the BMI in homozygous/compound heterozygous compared with heterozygous carriers was significant ($P = 0.008$).

We observed no impact of the severity of the mutations (Table 2, partial activity vs. no activity) on the severity of the phenotype of the carriers. Mean BMI for carriers of mutations leading to a receptor with a partial activity was 33.62 vs. 31.45 kg/m² for carriers of one nonfunctional receptor ($P = 0.413$).

Effects of age on obesity phenotype in *MC4R* deficiency. We compared obesity-related phenotypes between carriers and their relatives for children ($n = 19$ vs. 13) and adults ($n = 78$ vs. 81). Within the 25 pedigrees, as expected, in each generation, the mean BMI was higher in mutation carriers compared with relatives with a normal *MC4R* genotype (supplementary Table 2). We observed a gender effect in the whole family sample (+4.3 kg/m² in men and +8.7 kg/m² in women; ref. 20) but the difference is not significant ($P = 0.19$). Children probands were not bigger than their siblings carrying loss-of-function mutations (26.2 vs. 22.6 kg/m², $P = 0.19$), but the difference was significant in adults (45.02 vs. 31.93 kg/m², $P = 0.007$).

Onset of obesity and evolution of BMI with age. We obtained heights and weights of children at different ages from the individual health record. Although there was a trend toward earlier development of obesity in *MC4R* mutation carriers compared with obese subjects with a normal *MC4R* genotype (3.2 vs. 6.0 years), this was not statistically significant ($P = 0.11$). The adiposity rebound (a strong predictor of the development of childhood obesity) occurred 3 years earlier in children with *MC4R* mutations (2.0 vs. 5.2 years; $P = 0.006$).

In adults, we calculated BMI at 20 years of age from self-reported heights and weights and compared this with measured BMI at the age at examination (mean 44 years). The mean reported BMI of loss-of-function *MC4R* mutation carriers at 20 years of age (BMI₂₀) was 26.8 kg/m². Probands were all obese at 20 years; among the carrier-relatives, 22 subjects were normal weight at this age (BMI <90th percentile, 43%), 10 were overweight (BMI ≥90th percentile <97th percentile, 20%), and 19 were obese (BMI ≥97th percentile, 37%). The BMI₂₀ was slightly but significantly lower in relatives with a normal *MC4R* genotype (24.21 kg/m², $P = 0.04$). The BMI of carriers of loss-of-function *MC4R* mutations increased significantly during this time frame compared with nonmutation carrier relatives (13.75 vs. 6.18 kg/m², $P = 1.66 \times 10^{-5}$). Seven of the 22 (32%) carriers that were nonobese at 20 years showed

late-onset obesity, and 8 of the 10 individuals (80%) who were overweight became obese.

Effect of generation on BMI and obesity penetrance. Comparing the carriers of loss-of-function mutations to their relatives with a normal *MC4R* genotype in the 25 pedigrees, we observed a significant BMI increase of 6.78 kg/m² (26.37 vs. 33.15 kg/m², $P = 5.95 \times 10^{-6}$).

Adult carriers <52 years were 3 kg/m² heavier at 20 years of age than the previous generation at the same age (data not shown). The disease penetrance was 78% in children, 60% in adults <52 years old, and 40% in adults >52 years old for obesity (supplementary Table 3). The decrease in penetrance was significant between children and adults >52 years old ($P = 0.038$). In noncarriers, the prevalence of obesity was the same in each generation (23%; supplementary Table 3).

Although carrying a *MC4R* mutation was consistently associated with obesity in every generation, the risk of obesity in carriers was multiplied by 3.4 for children ($P = 10^{-100}$, Fisher's exact test), by 2.9 for adults <52 years old ($P = 10^{-84}$), and by only 1.7 for adults >52 years old ($P = 10^{-11}$) compared with noncarrier individuals. This decrease in risk was significant between adults >52 and <52 years old ($P = 3.0 \times 10^{-5}$) and between children and adults >52 years old ($P = 9.6 \times 10^{-4}$; Fig. 2).

We looked at the genotype distribution of *FTO* rs1421085 (31) among the generations and found no differences between carriers and noncarriers or among children, adults <52 years old, and adults >52 years old (data not shown).

Eating behavior. An in-house questionnaire distributed to children assessed three abnormal food intake behaviors. There were twice as many children who ate large amounts of food during meals in the carrier group compared with their noncarrier relatives (61.1 vs. 37.5%; $P = 0.25$). No obese child was a binge eater, and snacking was equally frequent in the two groups.

In adults, we used the well-established TFEQ questionnaire (26) and observed a significant increase of the disinhibition score in *MC4R* mutation carriers compared with noncarrier relatives (7.2 vs. 5.1, $P = 0.007$; supplementary Table 2). Moreover, the proportion of carriers harboring a disinhibition rating above the mean score was 37 vs. 12% in noncarrier relatives ($P = 0.01$). The same was true for the hunger score: 31.0% of carriers above the mean vs. 10% in noncarrier subjects ($P = 0.047$). Using these methods, eating behavior was not impaired in adult nonobese carriers compared with their noncarrier relatives, suggesting that the effects of *MC4R* on eating behavior may exhibit incomplete penetrance.

We observed a negative relationship between educational level and BMI in noncarrier adults ($P = 0.045$) within the families ($n = 81$), as previously reported (32), but no such correlation was observed for the 78 adult carriers of loss-of-function *MC4R* mutations ($P = 0.42$; data not shown). Apart from BMI and reported eating behavior, we observed no consistent difference for the other analyzed clinical traits between carriers and noncarriers (supplementary Table 2) in this study.

Exclusion of the probands. To exclude any recruitment bias, we performed the analyses of the same phenotypes without the probands. Effects of the mutations on BMI remained significant (+5.17 kg/m², $P = 1.37 \times 10^{-3}$); effects on the other clinical features seemed to remain as trends, but we were no longer able to observe the generational effect on penetrance (supplementary Table 4).

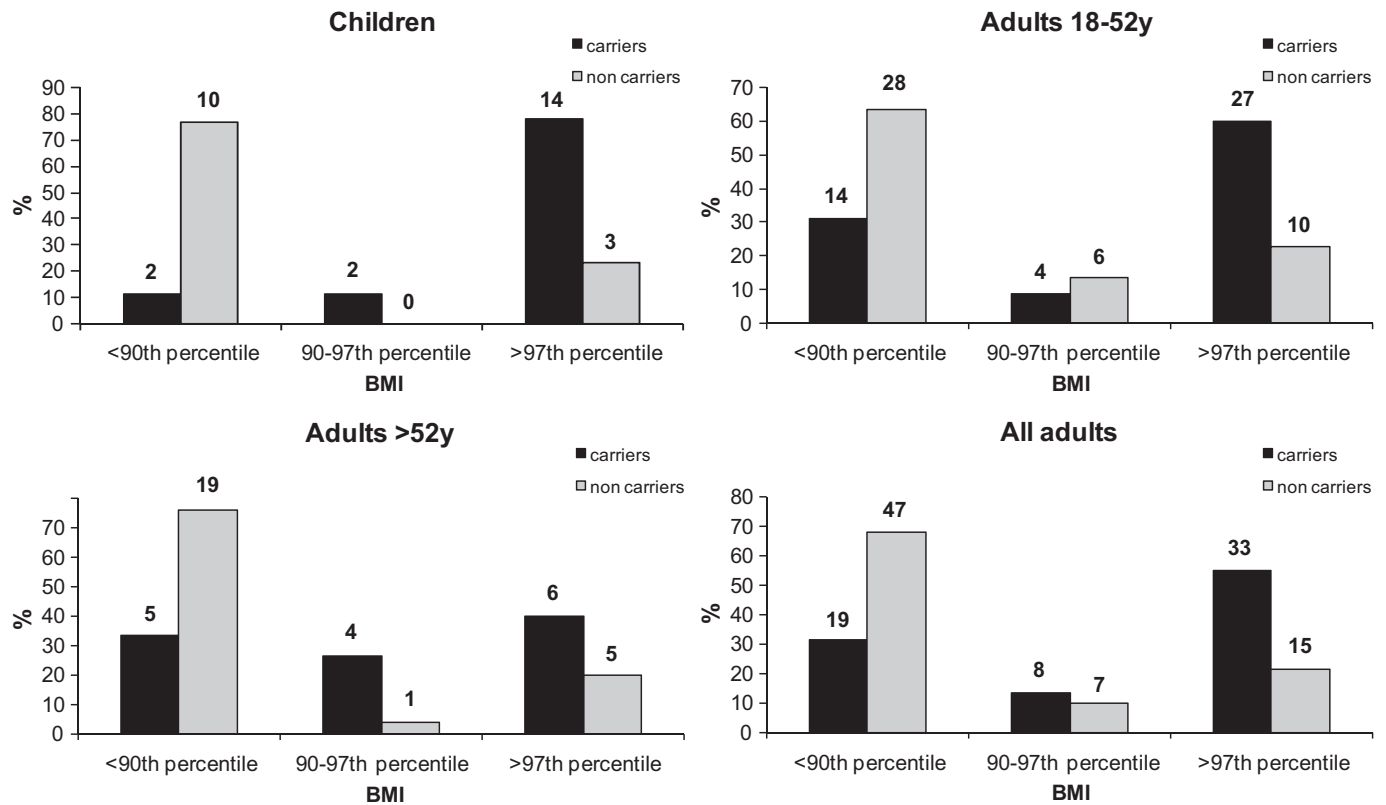


FIG. 2. Distribution of individuals according to BMI. We used the official threshold of BMI, percentiles 90 and 97, to discriminate between lean, overweight, and obese subjects (21) within the 97 carriers and 81 noncarrier relatives from intrafamilial study. The absolute sample sizes of each subgroup are given above the bars.

DISCUSSION

Mutations in *MC4R* associated with obesity have been extensively reported, but the true prevalence of this condition has been obscured by several factors. First, the fundamental difference among loss-of-function, neutral, and gain-of-function mutations in their major implication on weight has been ignored by several groups and has led to conflicting and/or inconclusive results regarding the prevalence of *MC4R* mutations in different ethnic groups (14,15). In this study, we highlighted that only 68% of nonsynonymous mutations in *MC4R* result in a loss-of-function in vitro in obese subjects. Thus, the prevalence of loss-of-function *MC4R* mutations in our large sample set of obese subjects of European origin is 1.72%. Although our mode of recruitment of obese patients may have tended to overestimate the proportion of severe phenotypes, the prevalence is consistent with that previously published in other obese cohorts (14,18,33–35). Our findings in the control cohort are consistent with other large, population-based cohorts (6), such as the KORA-S4 study, where the prevalence of *MC4R* mutations was also 0.15%. It remains also possible that more subtle mutation effects, such as alteration of the response to other agonists or antagonists, have not been evidenced by us or by others (36) and that the prevalence of loss-of-function *MC4R* is slightly higher.

By studying 2,257 obese individuals and their family members (25 multigenerational pedigrees) and 2,677 nonobese control subjects, we identified 108 subjects who harbored loss-of-function *MC4R* mutations. This represents the largest group of *MC4R* mutation carriers studied up to now. Our family cosegregation data are consistent with a codominant mode of inheritance as reported previ-

ously (11). We found that *MC4R* loss-of-function mutations result in obesity in 63.5% of mutation carriers, and this value is similar using two different ways of calculation (case-control study and pedigrees). Thus, the obesity phenotype associated with loss-of-function *MC4R* mutations exhibits variable penetrance.

On the contrary, some noncarrier relatives exhibit obesity. This may arise from the so-called phenomenon of “assortive mating” (i.e., obese people more often get married with other obese people).

This study establishes the first robust estimates of age-related penetrance for this condition. However, loss-of-function *MC4R* mutation adult carriers at 20 years of age displayed a low penetrance of obesity (37%). One explanation could be the difference in the environmental pressure between France, Switzerland, and the U.K. during the 1980s and an underreported weight at 20 years in self-administered questionnaires, a recognized phenomenon especially in overweight/obese people (37). In some subjects, there was evidence for the development of obesity caused by *MC4R* mutations in adult life. Longitudinal familial analysis also provides evidence that the current obesogenic lifestyle may worsen the effect of loss-of-function *MC4R* mutations on childhood and adult energy, but educational level does not positively impact on obesity risk among carriers. Nonobese carriers used as control subjects can develop obesity later in life, even if our control subjects have been selecting for stable weight <27 kg/m² during 9 years; their mean age was 44 years at inclusion, so they are unlikely to become obese in the near future.

We also find that the penetrance of obesity in those carrying loss-of-function *MC4R* mutations seems to have

increased when comparing grandparents, parents, and children in multigenerational pedigrees. Of note, the prevalence of obesity was similar in each generation in wild-type carriers of the 25 pedigrees, showing that the environment alone cannot explain such an effect.

We demonstrated that a common *FTO* variant does not influence severity or penetrance of obesity in our sample (data not shown). However, sex, age, and generation impact penetrance and severity of obesity, which confirms previous observations made by Dempfle et al. (20). *MC4R* mutation carriers born around the time of the second World War were much less likely to be obese in childhood, compared with their offspring born in the 1960s and 1970s and especially with the 1990s–2000s generation. It is plausible that the food constraints imposed in France during and after the second World War (there was ticketing limited access to food until 1947) have delayed obesity, as suggested by the difference in BMI at 20 years among mutation carriers of different generations. Our results agree both with an oligogenic (20) and a codominant (11) mode of inheritance. We cannot exclude that the increasing distant relationships between the family members could be a cause of the observed impact of age and generation on penetrance, but direct effects of relationship distance and other genetic and environmental factors remain to be tested to confirm this assumption.

Given the age- and generation-related penetrance of obesity in carriers of functionally significant *MC4R* mutations, we show that environmental factors contribute to the development of obesity even in those strongly genetically predisposed to it. It remains to be seen whether timely manipulation of environmental factors may be able to prevent or delay the development of obesity or reduce its severity in subjects carrying loss-of-function *MC4R* mutations.

In conclusion, we have established the first robust estimates of age-related penetrance for this condition and demonstrated a generational effect on penetrance that may relate to the development of an obesogenic environment. In addition, educational level does not impact on obesity risk among carriers. *MC4R* deficiency may sometimes present as obesity developing in adult life. Our study also highlighted the importance of functional analysis in genetic diagnosis of this condition.

ACKNOWLEDGMENTS

S.O. has received support from the Wellcome Trust and Medical Research Council (MRC). I.S.F. has received support from the Wellcome Trust and MRC. P.F. has received support from the Wellcome Trust and MRC. This work was supported in part by Conseil Régional Nord-Pas de Calais/Fonds Européen de Développement Régional and Association Française des Diabétiques funding.

We thank the patients and families that participated in this study. We also thank S. Gaget, C. Lecoeur, M. Deweinder, and F. Allegaert for technical assistance.

REFERENCES

- Cone RD: Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 8:571–578, 2005
- Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, Froguel P: A frameshift mutation in human *MC4R* is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20:113–114, 1998
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, Halsall DJ, Stanhope RG, O'Rahilly S: A frameshift mutation in *MC4R* associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20:111–112, 1998
- Geller F, Reichwald K, Dempfle A, Illig T, Vollmert C, Herpertz S, Siffert W, Platzer M, Hess C, Gudermann T, Biebermann H, Wichmann HE, Schafer H, Hinney A, Hebebrand J: Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet* 74:572–581, 2004
- Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, Tounian P, Levy-Marchal C, Buzzetti R, Pinelli L, Balkau B, Horber F, Bougneres P, Froguel P, Meyre D: Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet* 16:1837–1844, 2007
- Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P, Scherag A, Nguyen TT, Schlumberger P, Rief W, Vollmert C, Illig T, Wichmann HE, Schafer H, Platzer M, Biebermann H, Meitinger T, Hebebrand J: Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1761–1769, 2006
- MacKenzie RG: Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides* 27:395–403, 2006
- Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Le Stunff C, Haas K, Shapiro A, Zhang S, Bougneres P, Vaisse C: The human *MC4R* promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes* 52:2996–3000, 2003
- Yeo GS, Lank EJ, Farooqi IS, Keogh J, Challis BG, O'Rahilly S: Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet* 12:561–574, 2003
- Nijenhuis WA, Garner KM, van Rozen RJ, Adan RA: Poor cell surface expression of human melanocortin-4 receptor mutations associated with obesity. *J Biol Chem* 278:22939–22945, 2003
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S: Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348:1085–1095, 2003
- Gu W, Tu Z, Kleyn PW, Kissebah A, Duprat L, Lee J, Chin W, Maruti S, Deng N, Fisher SL, Franco LS, Burn P, Yagaloff KA, Nathan J, Heymsfield S, Albu J, Pi-Sunyer FX, Allison DB: Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 48:635–639, 1999
- Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J, Ferron C, Froguel P, Vaisse C: Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated *MC4R* mutations. *Hum Mol Genet* 12:145–153, 2003
- Miraglia Del Giudice E, Cirillo G, Nigro V, Santoro N, D'Urso L, Raimondo P, Cozzolino D, Scafato D, Perrone L: Low frequency of melanocortin-4 receptor (*MC4R*) mutations in a Mediterranean population with early-onset obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26:647–651, 2002
- Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentjes KU, Hoehe MR, Horber FF: Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 348:1096–1103, 2003
- Hebebrand J, Geller F, Dempfle A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Gerber G, Wermter AK, Horro FF, Blundell J, Schafer H, Remschmidt H, Herpertz S, Hinney A: Binge-eating episodes are not characteristic of carriers of melanocortin-4 receptor gene mutations. *Mol Psychiatry* 9:796–800, 2004
- Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S, Bertrais S, Hercberg S, Basdevant A, Clement K, Vaisse C: Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1811–1818, 2006
- Vaisse C, Clement K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P: Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106:253–262, 2000
- Tao YX, Segaloff DL: Functional analyses of melanocortin-4 receptor mutations identified from patients with binge eating disorder and non-obese or obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 90:5632–5638, 2005
- Dempfle A, Hinney A, Heinzl-Gutenbrunner M, Raab M, Geller F, Gudermann T, Schafer H, Hebebrand J: Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J Med Genet* 41:795–800, 2004
- Poskitt EM: Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). European Childhood Obesity Group. *Acta Paediatr* 84:961–963, 1995
- Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A: Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 45:13–21, 1991
- Balkau B: [An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres, (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 44:373–375, 1996
- Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, Aminian S, Jebb SA, Butler G, Cheetham T, O'Rahilly S: Dominant and recessive inheritance of morbid obesity asso-

- ciated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106:271–279, 2000
25. Meyre D, Lecoœur C, Delplanque J, Francke S, Vatin V, Durand E, Weill J, Dina C, Froguel P: A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31–q23.2. *Diabetes* 53:803–811, 2004
 26. Stunkard AJ, Messick S: The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* 29:71–83, 1985
 27. Durand E, Boutin P, Meyre D, Charles MA, Clement K, Dina C, Froguel P: Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 53:2483–2486, 2004
 28. Ghossaini M, Vatin V, Lecoœur C, Abkevich V, Younus A, Samson C, Wachter C, Heude B, Tauber M, Tounian P, Hercberg S, Weill J, Levy-Marchal C, Le Stunff C, Bougneres P, Froguel P, Meyre D: Genetic study of the melanin-concentrating hormone receptor 2 (MCHR2) in childhood and adulthood severe obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 92:4403–4409, 2007
 29. Hinney A, Schmidt A, Nottebom K, Heibult O, Becker I, Ziegler A, Gerber G, Sina M, Gorg T, Mayer H, Siegfried W, Fichter M, Remschmidt H, Hebebrand J: Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1483–1486, 1999
 30. Young EH, Wareham NJ, Farooqi S, Hinney A, Hebebrand J, Scherag A, O'Rahilly S, Barroso I, Sandhu MS: The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int J Obes* 31:1437–1441, 2007
 31. Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P, Carlsson LM, Kiess W, Vatin V, Lecoœur C, Delplanque J, Vaillant E, Pattou F, Ruiz J, Weill J, Levy-Marchal C, Horber F, Potoczna N, Hercberg S, Le Stunff C, Bougneres P, Kovacs P, Marre M, Balkau B, Cauchi S, Chevre JC, Froguel P: Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39:724–726, 2007
 32. Burke V, Beilin LJ, Dunbar D: Family lifestyle and parental body mass index as predictors of body mass index in Australian children: a longitudinal study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25:147–157, 2001
 33. Hinney A, Hohmann S, Geller F, Vogel C, Hess C, Wermter AK, Brokamp B, Goldschmidt H, Siegfried W, Remschmidt H, Schafer H, Gudermann T, Hebebrand J: Melanocortin-4 receptor gene: case-control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4258–4267, 2003
 34. Jacobson P, Ukkola O, Rankinen T, Snyder EE, Leon AS, Rao DC, Skinner JS, Wilmore JH, Lonn L, Cowan GS Jr, Sjostrom L, Bouchard C: Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4442–4446, 2002
 35. Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, Andersen T, Wulff BS, Pedersen O: Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90:219–224, 2005
 36. Xiang Z, Litherland SA, Sorensen NB, Proneth B, Wood MS, Shaw AM, Millard WJ, Haskell-Luevano C: Pharmacological characterization of 40 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists and the agouti-related protein (AGRP) antagonist. *Biochemistry* 45:7277–7288, 2006
 37. Tanofsky-Kraff M, Cohen ML, Yanovski SZ, Cox C, Theim KR, Keil M, Reynolds JC, Yanovski JA: A prospective study of psychological predictors of body fat gain among children at high risk for adult obesity. *Pediatrics* 117:1203–1209, 2006

Caractéristiques et fréquence des mutations de *MC4R* dans l'obésité monogénique

Ces dix dernières années, depuis l'identification des premières mutations dans le gène *MC4R* (Vaisse et al. 1998; Yeo et al. 1998), près de cinquante études ont décrit des patients déficients en *MC4R* (voir introduction, figure 16). Cependant aucune conclusion définitive n'a pu être donnée, aussi bien en ce qui concerne la pénétrance et la fréquence des mutations que l'âge d'apparition et l'évolution de la maladie avec l'âge (voir introduction III). La relation entre sévérité du génotype et sévérité de l'obésité était encore débattue. Certaines caractéristiques du spectre clinique proposé par Farooqi et coll. (Farooqi et al. 2003) n'ont pas été retrouvées par la plupart des autres équipes et l'effet des mutations de *MC4R* sur l'IMC et les troubles du comportements alimentaires chez les personnes plus âgées devait encore être démontré.

Pour répondre à ces questions, nous avons séquencé l'exon unique de *MC4R* chez 2677 adultes français de poids normal (IMC < 27 kg/m², anciennes normes OMS), 526 enfants obèses et 1731 adultes sévèrement obèses.

Caractérisation fonctionnelle des mutations de MC4R

Les nouvelles mutations non synonymes ont été testées par la mesure de la production d'AMPC en réponse à une quantité croissante de ligand α -MSH dans des cellules HEK transfectées. Nos études fonctionnelles combinées aux données de la littérature ont montré que seuls 68% des mutations non synonymes de *MC4R* aboutissent à une perte de production d'AMPC après activation du récepteur.

Un tel résultat montre l'importance de la caractérisation fonctionnelle des mutations préalablement à toute analyse phénotypique des sujets porteurs. Le papier de Branson et coll. sur le « binge eating » des porteurs de mutations de *MC4R* en était une illustration (Branson et al. 2003) : cette équipe a considéré pêle-mêle les individus porteurs de toutes les variations non synonymes, sans tenir compte de leur effet fonctionnel et a déclaré que le « binge eating » est caractéristique des adultes déficients en *MC4R*. Leur résultat est en contradiction avec au moins quatre études (Gotoda et al. 1997; Herpertz et al. 2003; Lubrano-Berthelier et al. 2006; Vaisse et al. 2000).

La majorité des articles publiés sur les mutations de *MC4R* inclut une caractérisation fonctionnelle depuis trois ans. De plus, nous avons évalué l'effet fonctionnel par quelques

analyses *in silico* et avons constaté que les prédictions d'effet fonctionnel étaient fausses dans la majorité des cas (résultats non publiés). Toutefois certaines études continuent de fonder leur caractérisation fonctionnelle sur les seuls résultats d'analyses *in silico* (Wangensteen et al. 2009).

Evaluation de la fréquence

Nous avons comparé la fréquence des mutations de *MC4R* suivant l'âge d'apparition, la sévérité et le caractère héréditaire de l'obésité, ces fréquences sont indiquées dans le tableau 5. Chez les enfants, comme chez les adultes, la fréquence des mutations pathogéniques est plus élevée parmi les patients avec une obésité familiale que chez les patients sans sélection sur ce critère. La fréquence est également supérieure parmi les adultes obèses de classe III par rapport aux sujets obèses de classes I-II. Les mutations de *MC4R* sont aussi fréquentes chez les enfants (obésité précoce) et chez les adultes (pas de sélection sur l'âge d'apparition). De plus, 0,15% des individus de la population contrôle étaient porteurs d'une mutation pathogénique de *MC4R*, ce qui suggère une pénétrance incomplète des mutations de *MC4R*.

Fréquence	Obésité familiale	Familialité non renseignée		Obésité de classe I-II	Obésité de classe III
Enfants	2,31%	1,08%			
Adultes	2,32%	0,92%		0,65%	1,96%

Tableau 5 : comparaison de la fréquence des mutations de *MC4R* dans différents sous-groupes

Nos observations sont en accord avec celles réalisées par Lubrano-Bertheliet et coll. : la fréquence des mutations de *MC4R* est similaire dans leur cohorte d'enfants obèses et dans leur cohorte de sujets devenus obèses à l'âge adulte (Lubrano-Bertheliet et al. 2006). La fréquence de mutations de *MC4R* que nous avons obtenu dans notre population contrôle est également similaire à celle observée dans la population KORA S4 (Hinney et al. 2006) ; en effet nos contrôles sont issus de la population générale D.E.S.I.R. et sous-sélectionnés sur le critère unique de la corpulence (Balkau 1996). La sévérité variable de l'obésité des porteurs de mutations de *MC4R* (âge d'apparition et obésité de classe I à III) est une illustration de la pénétrance variable de celles-ci (MacKenzie 2006).

Effets de l'environnement (sexe, âge, génération, niveau d'études)

Nous avons accès aux données génétiques et phénotypiques de membres de la famille de 25 cas index, ce qui nous a permis de déterminer par deux méthodes différentes et indépendantes la pénétrance des mutations de *MC4R*. Les deux modes de calcul donnent des résultats similaires : 60-63,5% de pénétrance à l'état hétérozygote, 94,6-100% à l'état homozygote. La pénétrance incomplète peut s'expliquer par un effet de l'environnement sur l'expressivité du génotype.

Effets du sexe sur l'IMC:

Nous avons dans un premier temps constaté que les femmes étaient plus sévèrement obèses que les hommes (+4,3 kg/m² chez les hommes porteurs par rapport aux apparentés, +8,7 kg/m² chez les femmes).

Ce résultat confirme les observations de Dempfle et coll. sur une population d'obèses sévères familiaux (Dempfle et al. 2004).

Effets de l'âge et de la génération sur l'obésité :

De plus, parmi nos 78 porteurs familiaux, nous avons observé que la pénétrance des mutations augmentait avec les générations : elle était de 40% chez les grands-parents mais atteignait 78% chez les enfants (tableau 6- *Supplemental table 3*). Par ailleurs 70% des adultes non obèses à 20 ans le sont devenus à 44 ans (figure 18).

		Minces	En surpoids	Obèses	%Obésité	%Surpoids et obésité
	Total	21	10	47	60%	73%
	Enfants	2	2	14	78%	89%
Porteurs	Adultes<52ans	14	4	27	60%	69%
	Adultes>52ans	5	4	6	40%	67%
	Tous adultes	19	8	33	55%	68%
	Enfants	10	0	3	23%	23%
Non	Adultes<52ans	28	6	10	23%	36%
porteurs	Adultes>52ans	19	1	5	20%	24%
	Tous adultes	47	7	15	22%	32%

Tableau 6 : distribution de la corpulence par génération

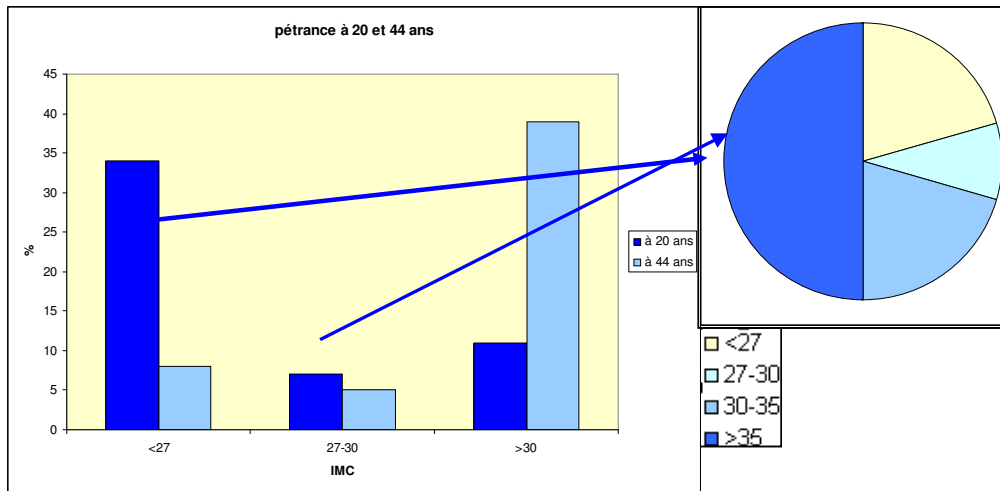


Figure 18 : pénétrance des mutations de MC4R chez les adultes à 20 ans et 44 ans

Les familles tri-générationnelles porteuses de mutations de *MC4R* sont rares dans la littérature. La mutation T150I a été identifiée chez une femme obèse issue d'une cohorte de 32 femmes obèses chiliennes. Des apparentés de cette femme étaient disponibles sur 3 générations et les auteurs ont conclu comme nous à une pénétrance variable au sein de cette famille (Santos et al. 2008).

Effets de l'âge sur le comportement alimentaire :

Le comportement alimentaire des enfants a été évalué à partir de questions adressées à leurs parents. Nous avons observé que les enfants porteurs de mutations de *MC4R* sont deux fois plus souvent « gros-mangeurs pendant les repas ». Le comportement alimentaire des adultes a été évalué à l'aide du TFEQ de Stunkard (Stunkard and Messick 1985). Tous les adultes (parents et grands-parents) ont été analysés ensemble. Parmi les adultes déficients en *MC4R*, le score de désinhibition est supérieur à celui de leurs apparentés non porteurs de mutation. En établissant un trait binaire pour les scores de Stunkard, nous avons également constaté que les adultes déficients sont trois fois plus nombreux à avoir un score de faim au dessus de la moyenne.

Ce résultat apporte un élément de plus au débat selon lequel les troubles alimentaires dus à la déficience en *MC4R* disparaissent avec l'âge (Farooqi et al. 2003). Nos conclusions vont à l'encontre de cette hypothèse initialement fondée sur la différence entre les enfants et les adolescents au cours d'un repas-test et non sur la comparaison entre enfants et adultes.

Effets du niveau éducatif sur l'obésité :

Pour la plupart des participants à cette étude familiale (N=160), nous disposons de données relatives au niveau d'études. Les individus ont été séparés en quatre groupes : arrêt

des études au BEPC, après le baccalauréat, a fait des études supérieures ou n'a pas fait d'études. Nous avons observé une corrélation négative entre la prévalence de l'obésité et le niveau d'études parmi les apparentés non porteurs ($p=0,045$). Par contre, il n'y a aucune corrélation parmi les sujets déficients en MC4R (figure 19).

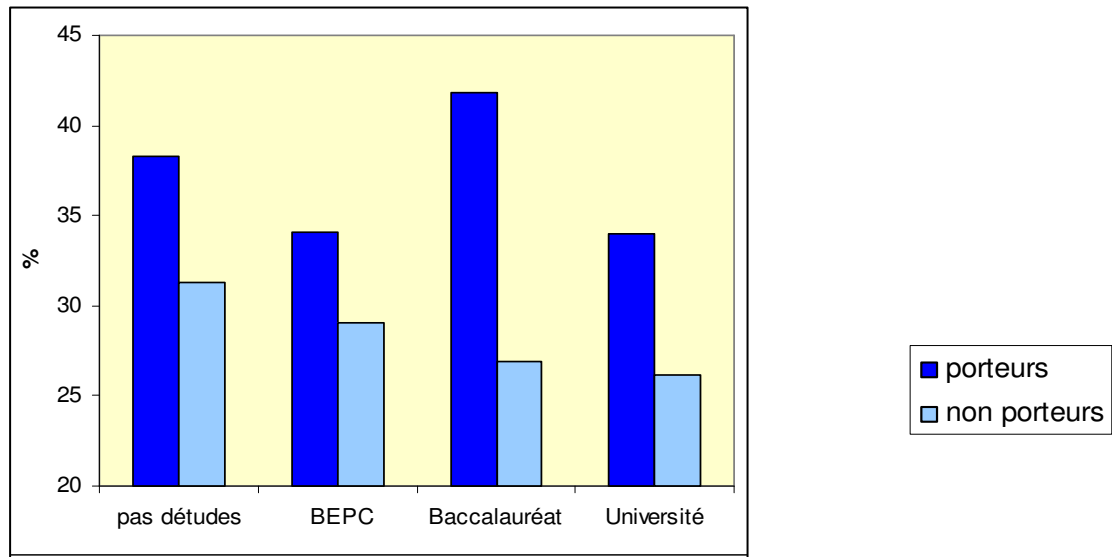


Figure 19 : prévalence de l'obésité par niveau d'étude et par génotype

Une étude épidémiologique de population générale a montré la corrélation négative entre le niveau d'éducation et l'IMC (Burke et al. 2001). Dans notre étude, nous étendons ce résultat à un contexte d'obésité familiale : cette relation est vérifiée pour les individus non porteurs de mutations de MC4R. Par contre, les mutations de MC4R suffisent à effacer cette corrélation.

Aspects particuliers du spectre clinique

Nous avons analysé les phénotypes du « syndrome MC4R » de Farooqi au sein de nos 25 familles tri-générationnelles, en séparant adultes et enfants (tableau 7 - *supplemental table 2*).

Effets de la déficience en MC4R sur la composition corporelle

Chez les adultes de notre cohorte, la masse grasse est significativement augmentée chez les porteurs de mutations de *MC4R* par rapport à leurs apparentés non porteurs. De plus, le pourcentage de masse grasse est significativement augmenté et le pourcentage de masse maigre est significativement diminué. La masse osseuse est inchangée mais nous ne

a.	carriers	Non-carriers	p val	N carriers	N non-carriers	b.	carriers	Non-carriers	p val	N carriers	N non-carriers
Birth weight (kg)	2.90	3.35	0.65	1	3	Birth weight (kg)	3.43	3.29	0.41	36	37
Age (y)	10.0	10.0	0.87	18	13	Age (y)	43.6	46.5	0.23	60	71
Height (cm)	146.4	141.0	0.44	18	13	Height (cm)	166.3	166.9	0.67	60	69
BMI (kg/m ²)	24.7	19.0	0.005	18	13	bmi20 (kg/m ²)	26.8	24.2	0.04	41	42
						Bmi (kg/m ²)	35.9	27.8	1.18 10 ⁻⁷	60	69
						Δbmi (kg/m ²)	13.75	6.18	1.66 10 ⁻⁵	41	42
						Bmimax (kg/m ²)	38.3	28.7	2.67 10 ⁻⁸	60	69
						whr	0.95	0.90	0.038	42	40
Arterial hypertension*	0	0	-	1	3	Arterial hypertension*	28.10%	25.90%	0.84	53	54
SBP(mmHg)	108.6	100.3	0.19	15	7	SBP(mmHg)	137.7	133.4	0.23	43	47
DBP(mmHg)	62.5	60.4	0.66	15	7	DBP(mmHg)	79.0	77.1	0.39	42	47
Total cholesterol(mM)	4.36	4.50	0.7	16	12	Total cholesterol(mM)	5.52	5.44	0.7	58	67
HDL(mM)	1.26	1.40	0.18	16	12	HDL(mM)	1.26	1.39	0.05	58	67
triglycerides(mM)	0.84	0.87	0.83	17	13	triglycerides(mM)	1.62	1.47	0.42	57	67
Leptine(ng/mL)	19.5	7.5	0.024	9	7	leptine(ng/mL)	34.9	19.7	0.002	36	36
apoA1(g/L)	1.31	1.40	0.17	17	13	apoA1(g/L)	1.49	1.54	0.27	56	61
apoB(g/L)	0.83	0.78	0.58	16	12	apoB(g/L)	1.17	1.10	0.16	55	61
Creatinine(μmol/L)	75.62	69.00	0.55	3	1	Creatinine(μmol/L)	78.77	81.78	0.51	21	27
Age of rebond (y)	2.0	5.2	0.006	11	7	Vascular accidents*	19%	13%	0.45	53	54
Age of obesity (y)	3.25	6.00	0.11	10	2	Alcohol*	70.0%	69.2%	1	10	13
Lean mass(g)	40801	29862	0.34	6	2	Tobacco*	50.0%	46.2%	1	10	13
Fat mass(g)	27698	17230	0.45	6	2	Lean mass(g)	55524	52693	0.66	13	8
Bone mass(g)	221	1587	0.55	6	2	Fat mass(g)	46544	26548	0.027	13	8
%Lean mass	59.7	66.1	0.42	6	2	Bone mass(g)	3244	2749	0.128	13	8
%Fat mass	37.4	30.7	0.41	6	2	%Lean mass	54.7	64.1	0.027	13	8
%Bone mass	2.9	3.2	0.18	6	2	%Fat mass	42.2	32.5	0.026	13	8
ins0(pmol/L)	12.8	5.7	0.09	18	12	%Bone mass	3.2	3.4	0.306	13	8
ins120(pmol/L)	53.5	62.4	0.85	7	5	ins0(pmol/L)	13.6	11.3	0.53	54	64
gly0 (mmol/L)	5.0	4.8	0.26	18	13	ins120(pmol/L)	44.3	42.2	0.88	37	33
gly120(mmol/L)	5.7	5.0	0.37	10	5	gly0(mmol/L)	5.5	5.2	0.003	59	69
homaB ^s	165.7	105.1	0.23	18	12	gly120(mmol/L)	6.0	5.4	0.163	40	34
homaR ^s	2.9	1.2	0.08	18	12	homaB ^s	135.9	139.1	0.94	53	64
isi ^s	645	1076	0.29	5	4	homaR ^s	3.3	2.7	0.5	53	64
insulinogenic index ^s	27.1	30.0	0.87	7	4	isi ^s	519	533	0.93	6	10
Diabetes*	0	0		18	13	insulinogenic index ^s	37.1	12.9	0.28	8	11
Eating large amounts*	61.1%	37.5%	0.25	17	8	Diabetes*	18.60%	14.10%	0.28	60	71
Snacking*	33.3%	50.0%	0.66	17	8	Restrained ^s	7.36	7.81	0.7	37	32
Binge eating*	0	0	-	16	8	Disinhibition ^s	7.21	5.12	0.007	38	33
						Hunger ^s	4.84	3.73	0.131	36	30
						Binary restraint*	23.4%	31.3%	0.45	37	32
						Binary disinhibition*	37.5%	12.1%	0.012	38	33
						Binary hunger*	31.0%	10.0%	0.047	36	30

Tableau 7 : spectre clinique des porteurs de mutations de MC4R en comparaison avec leurs apparentés

disposons malheureusement pas d'évaluation de la densité minérale osseuse sur un nombre suffisant de sujets.

Notre résultat s'oppose aux observations de Farooqi et coll. (Farooqi et al. 2003). Selon cette équipe, les sujets déficients en MC4R présentent à la fois une augmentation de la proportion de masse grasse et de la proportion de masse maigre. Chez nos sujets, la déficience en MC4R n'a pas d'effet sur la masse maigre.

Effets de la déficience en MC4R sur la pression artérielle

Chez nos sujets adultes, comme chez les enfants, la pression artérielle diastolique et systolique est légèrement augmentée parmi les individus porteurs de mutation, mais cette augmentation n'est pas significative. De ce fait, nous avons conclu que MC4R ne module pas la pression artérielle.

Cette observation s'oppose à celle de Greenfield et coll. réalisée un peu plus tard sur un échantillon de taille équivalente (Greenfield et al. 2009). Dans leur étude, la déficience en MC4R conduit à une diminution de la pression artérielle. Leur analyse est complétée et validée par l'administration d'un agoniste de MC4R qui augmente la pression artérielle chez des sujets sains volontaires. La différence de conclusions pourrait s'expliquer par la prise de médicaments agissant sur la pression artérielle dans notre population, nous ne disposons malheureusement pas des informations permettant de répondre à cette question.

En résumé, le « syndrome MC4R » de Farooqi est partiellement retrouvé chez nos 78 porteurs français. Notre étude apporte un élément de réponse au débat sur le phénotype des porteurs les plus âgés. Dans notre population, les troubles du comportement alimentaire se retrouvent à l'âge adulte et contribuent au maintien ou à l'apparition de l'obésité tandis que l'existence d'adultes non obèses ou à obésité tardive s'explique en partie par une forte influence de l'environnement, illustrée ici par l'aspect générationnel et le sexe. Les pulsions alimentaires sont suffisantes pour conduire les individus les plus instruits à manger de manière excessive, la déficience en MC4R est bel et bien une maladie cérébrale du contrôle de la prise alimentaire.

ARTICLE 2

Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene

Stutzmann E, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O, Tounian P, Levy-Marchal C, Buzzetti R, Pinelli L, Balkau B, Horber F, Bougnères P, Froguel P, Meyre D.

Hum Mol Genet. 2007 Aug 1;16(15):1837-44.

Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene

Fanny Stutzmann¹, Vincent Vatin¹, Stéphane Cauchi¹, Anita Morandi², Béatrice Jouret³, Olfert Landt⁴, Patrick Tounian⁵, Claire Levy-Marchal⁶, Raffaella Buzzetti⁷, Leonardo Pinelli², Beverley Balkau⁸, Fritz Horber⁹, Pierre Bougnères¹⁰, Philippe Froguel^{1,11,*} and David Meyre¹

¹CNRS-8090-Institute of Biology, Pasteur Institute, Lille, France, ²Department of Pediatrics, Regional Center for Juvenile Diabetes, University of Verona, Italy, ³INSERM U563, Children's Hospital, Toulouse, France, ⁴TIB MOLBIOL GmbH, Berlin, Germany, ⁵Department of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, Trousseau Hospital, Paris, France, ⁶INSERM U457, Robert Debré Hospital, Paris, France, ⁷Endocrinology, Department of Clinical science, La Sapienza University, Roma, Italy, ⁸INSERM U780-IFR69, University Paris Sud, Villejuif, France, ⁹Klinik Lindberg, Winterthur, Switzerland, ¹⁰INSERM Pediatrics Endocrinology and U561, Saint Vincent de Paul Hospital, Paris V University, Paris, France and ¹¹Department of Genomic Medicine, Hammersmith Hospital, Imperial College London, London, UK

Received April 2, 2007; Revised May 3, 2007; Accepted May 10, 2007

The melanocortin-4 receptor (*MC4R*) gene pathogenic mutations are the most prevalent forms of monogenic obesity, responsible for ~2% of obesity cases, but its role in common obesity is still elusive. We analyzed the contribution of non-synonymous mutations V103I (rs2229616, c.307G>A) and I251L (no rs, c.751A>C) to obesity in 16 797 individuals of European origin from nine independent case–control, population-based and familial cohorts. We observed a consistent negative association of I251L variant (prevalence ranging 0.41–1.21%) with both childhood and adult class III obesity [odds ratio (OR) ranging from 0.25 to 0.76, 0.001 < *P*-value < 0.05] and with modulation of body mass index (BMI) in general populations, in eight out of nine studies, whereas only one study showed an association between V103I and BMI. Meta-analyses of previous published data with the current ones provided strong evidence of the protective effect of I251L toward obesity (OR = 0.52, *P* = 3.58 10⁻⁵), together with a modest negative association between V103I and obesity (OR = 0.80, *P* = 0.002). Taken together, gain-of-function mutations I251L and V103I may be responsible for a preventive fraction of obesity of 2%, which mirrors the prevalence of monogenic obesity due to *MC4R* haploinsufficiency. These results also emphasize the importance of the *MC4R* signalling tonus to prevent obesity, even in the context of our current obesogenic environment.

INTRODUCTION

Three rather infrequent, potentially functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been reported in *MC4R* (1–3) but their physiological role on the energy balance is unknown. A meta-analysis of 14 case–control studies suggested that V103I may confer a protective effect against obesity [odds ratio (OR) = 0.69, *P* = 0.03] (4). These findings were recently confirmed in a meta-analysis of 29 563 individuals

(OR = 0.82, *P* = 0.01) (5), but remain controversial in several cohorts (5–7). Several *in vitro* studies failed to show that this isoleucine at position 103 makes any functional difference in basal *MC4R* signaling compared with the wild-type (8–11). However, V103I mutation decreases 2-fold the potency of the *MC4R* antagonist hAGRP(87–132) (11). Another missense mutation, I251L SNP (3), was first considered as potentially 'neutral' (9,12) but recently this I251L substitution was shown to increase *MC4R* basal activity (11),

*To whom correspondence should be addressed at: Department of Genomic Medicine, Hammersmith Hospital, Imperial College London, Du Cane Road, London W12 0NN, UK. Tel: +44 02083833989; Email: p.froguel@imperial.ac.uk

by alteration of downstream intracellular events associated with GPCR cAMP signal transduction. In addition, an infrequent 5' c.-178 A>C SNP did not associate with obesity in small-sized European populations (1,13). Therefore we decided a staged approach to assess the effects of these variants on obesity in 16 797 European Caucasian individuals.

RESULTS

The genotypic distributions of all three SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.01$). The c.-178 A>C, V103I and I251L minor allele frequencies ranged, respectively, 1.49–2.24%, 1.37–1.49% and 0.41–1.21% in the cases and controls, in agreement with previously reported data from other European populations. Moreover, there was no linkage disequilibrium between -178 A>C, V103I and I251L ($r^2 = 0$ for each of the three possible combinations, estimated from the whole sample set, $n = 16\ 797$). We found only six, seven and five compound heterozygous carriers for -178A>C/V103I, -178A>C/I251L and V103I/I251L, respectively. Our first case–control analysis of 1631 severely obese children and adults and 2378 controls showed that the I251L is a variant protective against severe obesity in the French population [allelic OR = 0.42 (95% CI 0.25–0.73), $P = 0.001$]. Interestingly, if the 748 unrelated obese children and the 883 unrelated class III obese adults are analyzed apart, a similar result is found [allelic OR = 0.33 (95% CI 0.14–0.76), $P = 0.006$ for children and OR = 0.51 (95% CI 0.27–0.97), $P = 0.037$ for adults]. Neither the c.-178A>C nor the V103I polymorphisms showed an association with obesity in our study populations (Table 1). To test the validity of our observation, we performed the Bonferroni correction, taking into account the three SNPs and the three tests (nine tests). We obtained a corrected P -value of 0.009, which remains significant.

We then genotyped the three SNPs in 1109 French Caucasian pedigrees with obese children or adults (5326 individuals). We used the 90th and 97th BMI percentiles as thresholds for childhood overweight and obesity, respectively, according to the recommendations of the European Childhood Obesity Group study (14) in a French reference population (15), and the BMI Z-score as a quantitative measure of corpulence in both children and adults. Because of a partial overlap of individuals in case–control and family studies, the TDT and QTDT tests cannot be considered as an independent replication of association, but rather as a procedure to rule out the risk of stratification bias. The variant I251L was undertransmitted to overweight and obese subjects, defined by the 90th and 97th percentiles (% allele I251L transmitted: 23.5 and 23.3, $P = 0.001$ and 0.003, respectively), and the variant I251L was associated with a 0.76 SD decrease in the BMI Z-score ($P = 0.01$) (Table 2). No significant familial association ($0.38 < P < 0.64$) of either c.-178C or V103I alleles were observed for the same traits (Table 2).

We also tested for familial association of MC4R SNPs with body corpulence (using the BMI Z-score) in families from the general population of Northern France (294 pedigrees, 1175 individuals). We observed that children who were carriers of the I251L allele showed a reduction of 0.35 SD of their

Table 1. Association of the three SNPs in MC4R with childhood or late-onset obesity in our cohorts and in replication samples

	c.-178A>C			V103I = c.307G>A			I251L = c.751A>C			P-value	Allelic OR	HW
	AA	AC	CC	GG	GA	AA	AA	AA	AA			
Control set [a]	2284	89	0	2311	67	0	2320	58	0			1.00
Obese children [b]	692	29	1	728	17	1	742	6	0	0.90 (0.54–1.51)	0.70	0.11
Morbid obese adults [c]	849	24	1	852	22	1	872	11	0	0.97 (0.61–1.56)	0.91	0.15
Both sets	1541	53	2	1580	39	2	1614	17	0	0.94 (0.64–1.38)	0.76	0.03
French control set [f]	526	15	0	576	14	0	560	17	0	0.41 (0.13–1.24)	0.10	1.00
French obese children [e]	450	13	1	408	4	0	479	5	0	0.70 (0.20–2.41)	0.78	0.96
Italian control set [h]	619	19	0	626	16	0	660	10	0	0.99 (0.38–25.85)	0.99	1.00
Italian obese children [g]	177	2	0	169	3	0	177	1	0			1.00
Swiss control set [j]	296	1	0	476	8	0	494	15	0			1.00
Swiss morbid obese adults [i]	538	12	1	539	9	0	524	4	0	0.35 (0.13–0.95)	0.030	1.00
										0.33 (0.14–0.76)	0.006	1.00
										0.51 (0.27–0.97)	0.037	1.00
										0.42 (0.25–0.73)	0.001	1.00
										0.36 (0.05–2.94)	0.508	1.00
										0.25 (0.08–0.77)	0.009	1.00

We performed case–control studies for the three SNPs 178A>C, V103I and I251L, using genotype counts under an allelic model. Cohorts are detailed in the Discussion section. We have reported the OR and P -values for each test. HW indicates the P -value for Hardy–Weinberg equilibrium test, used as internal test to validate allele frequency. The alphabets in square brackets refer to population described in Table 3.

Table 2. Transmission disequilibrium test

	Pedigrees with obesity								Population-based pedigrees			
	90th percentile				97th percentile				BMI Z-score		BMI Z-score	
	T	NT	%T	P-value	T	NT	%T	P-value	Mean	P-value	Mean	P-value
c.-178A>C	–	–	–	0.55	–	–	–	0.55	–	0.43	–	0.46
A	38	33	53.5	–	37	32	53.6	–	2.39	–	0.02	–
C	33	38	46.5	–	32	37	46.4	–	2.64	–	–0.50	–
V103I = c.307G>A	–	–	–	0.38	–	–	–	0.64	–	0.63	–	0.97
G	26	20	56.5	–	28	19	53.7	–	2.44	–	0.08	–
A	20	26	43.5	–	19	28	46.3	–	2.47	–	–0.12	–
I251L = c.751A>C	–	–	–	0.001	–	–	–	0.003	–	0.01	–	0.05
A	26	8	76.5	–	23	7	76.7	–	2.43	–	0.06	–
C	8	26	23.5	–	7	23	23.3	–	1.67	–	–0.29	–

Familial association of the I251L variant with obesity in 1009 pedigrees and in population-based pedigrees. T, number of transmitted alleles; NT, number of untransmitted alleles; %T, percentage of transmitted alleles. *P*-values were calculated with TDTphase for percentiles and with QPDT phase for ZBMI in UNPHASED software.

BMI Z-score ($P = 0.05$). Again, c.-178 A>C and V103I polymorphisms did not show any significant association with the BMI Z-score ($0.46 < P < 0.97$).

To further support the effect of the I251L allele in other studies of individuals of European origin, we then genotyped the three SNPs in an independently ascertained cohort of 484 obese French children who were compared with 590 young adult French controls (Table 1). We replicated the negative association between the I251L allele and childhood obesity [allelic OR = 0.35 (95% CI 0.13–0.95), $P = 0.03$], although we again did not find any association between –c.-178 A>C or V103I and childhood obesity. We also genotyped a small cohort of 179 obese and 670 lean Italian children. Case–control analyses showed the same trend toward a protective effect of the I251L allele against obesity [OR = 0.36 (95% CI 0.05–2.94), $P = 0.5$], although non-significant, owing to the modest sample size of obese children. No association was observed with V103I, nor with c.-178A>C (Table 1).

Finally, we studied 551 class III obese Swiss adults and compared them with 509 Swiss adults unselected on BMI. We observed once more the association between the I251L and class III adult obesity [allelic OR = 0.25 (95% CI 0.08–0.77), $P = 0.009$]. No association was observed with V103I, nor with c.-178A>C (Table 1).

To evaluate the contribution of the three MC4R polymorphisms to BMI variation in a general population, we genotyped the middle-aged general French population D.E.S.I.R. cohort (16) ($n = 5195$). Taking into account the low allele frequency of the studied polymorphisms, we focused on the analysis of BMI in the whole population set at baseline ($n = 5195$) rather than doing prospective analyses with low statistical power. Indeed, after 9 years of follow-up, only 74% of subjects were documented for BMI ($n = 3861$). We found a trend toward an association between I251L and BMI ($P = 0.05$) leading to a decrease in BMI of 0.7 kg/m². The V103I variant was also associated with a decrease in BMI 0.8 kg/m² ($P = 0.03$, Table 2). The c.-178C allele showed no association with BMI ($P = 0.73$).

We combined our current results with all the available information in a meta-analysis. We used only published case–control data from 29 ($n = 39\,879$) and 12 studies

($n = 11\,435$) for V103I and I251L, respectively. No heterogeneity between studies was detected for any of the two meta-analyses (P -value for χ^2 test = 0.77 and 0.35 for V103I and I251L, respectively). We confirmed the modest effect of the V103I allele after pooling the 29 studies, with an OR of 0.80 (0.70–0.92) and a P -value of 0.002. In contrast, we found much stronger evidence for an association between the I251L allele and obesity (OR = 0.52, 95% CI 0.38–0.71, P -value = 3.58×10^{-5}) (Fig. 1) (17). The consistency of these results is underlined by the fact that all 95% CI values overlap and contain the OR estimate of the meta-analysis. Moreover, we used QUANTO software, as described in the Materials and Methods section, to calculate the statistical power of this test. Calculations indicated a power of 95 and 99% to observe the mentioned effects (OR = 0.80 and 0.52) for V103I and I251L, respectively. Because the variants are protective, we did not calculate the population-attributable risk but rather the preventive fraction (18). It predicts the additional frequency of affected people in the same population, in the absence of the protective variant. We observed a preventive fraction of 0.84 and 1.05% for V103I and I251L, respectively, in the population of the meta-analyses.

DISCUSSION

The frequent disease, frequent allele theory postulates that the genetic risk for common diseases should be mainly driven by prevalent DNA polymorphism. Even if data confirm this hypothesis (19–21), our data show that infrequent coding functional SNPs in MC4R, the only gene frequently involved in monogenic early onset severe obesity, also contribute to common obesity phenotypes. Similar effects, although weaker, were previously found for POMC rare variation (22). Apart from decreasing the risk for obesity to nearly 50%, the I251L amino acid substitution decreases BMI in both obese/general and childhood/middle-aged adult populations of European descent. In eight studies out of nine, this MC4R I251L polymorphism is reproducibly associated with protection against obesity. The recently reported increased basal activity of the I251L mutant receptor (11) is consistent with a food intake reduction, leading to protection against

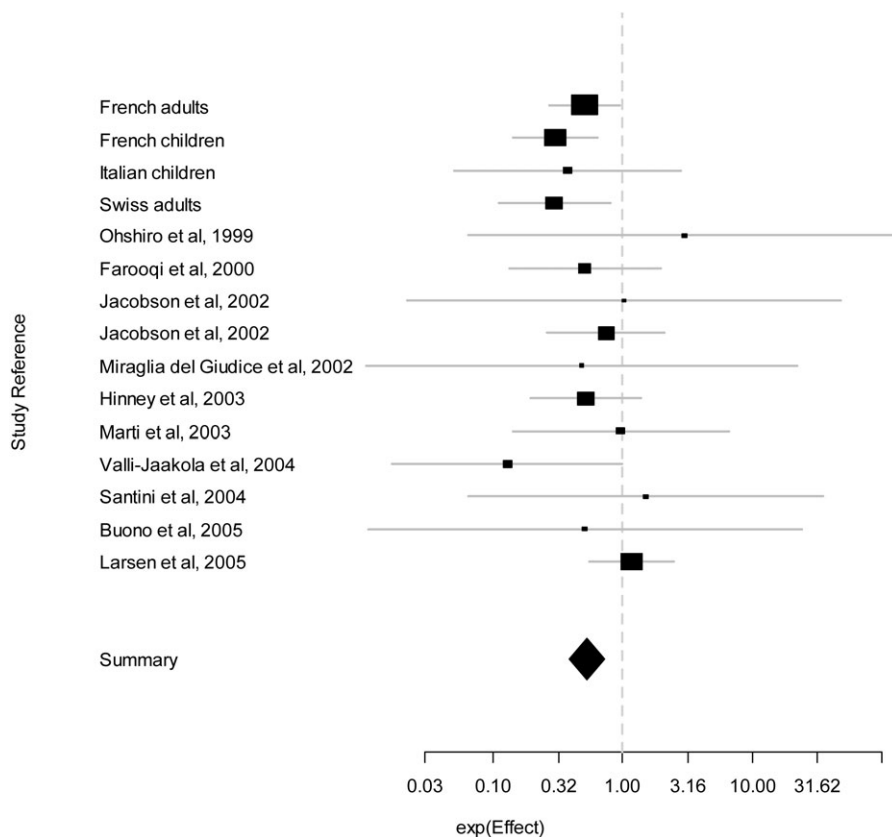


Figure 1. Meta-analysis of I251L polymorphism. The meta-analysis has been performed with 5972 controls and 5463 cases. Summary illustrates the final OR; 95% CI is included in the pictogram. Swiss adults, our study and Peterli *et al.* (17), 2006; Jacobson *et al.* (1), white cohort only; Miraglia del Giudice and Ohshiro, personal data communication.

obesity. The V103I variant showed a less reproducible pattern of association, although our updated meta-analysis still detects a modest protective effect against obesity (OR = 0.80, $P = 0.002$, $n = 39\ 879$).

Recently, we and others identified a major obesity gene: *FTO* reproducibly accounts for 22% of the attributable risk of obesity in both populations (23,24). However, despite lower population-attributable risk of MC4R I251L compared with *FTO* variant, we feel that this result presents two major interests. First, we found a rare variant with an important effect (OR = 2) implicated in genetic determination of obesity. To our knowledge, except for a POMC variant (22), this has not been clearly evidenced so far. Moreover, our discovery highlights all the more the importance of MC4R in the homeostasis of body corpulence because we found an obesity-protective variant in a gene well-known for rare pathogenic mutations causing obesity.

False-positive associations can be observed because of population stratification. However, the weak and homogeneous frequency of the protective alleles within the different cohorts is a first reason to exclude that stratification could explain our result. Moreover, the effect of the variant I251L is homogeneous among all case-control designs (OR ranging from 0.25 to 0.51), and replication populations come from small region recruitment area, decreasing also the potential bias. Finally, both independent familial analyses confirmed the

association and we observed an even stronger effect with this test (OR = 0.34 in 1109 pedigrees with obesity). This suggests that potential stratification, if there is one, would decrease the effect instead of overestimating it. Multiple case-control studies alone have successfully identified the association with *FTO*, which we confirmed by TDT in two independent obesity-selected pedigrees (24), meaning that this method is powerful enough (23,24).

It is to note that the conclusion of the meta-analysis is limited by the lack of homogeneity of ascertainment for obesity and even for leanness between the studies. Even if we tested the absence of publication bias, it remains possible that the effect of the variant can be modulated by the severity of obesity.

Interestingly, both associated variants are protective against obesity, meaning that the obesity susceptibility is carried by the ancestral alleles that are highly conserved in most mammals, including chimpanzee and macaque (24). The low allele frequency (MAF = 0.41–2.24%) of the two obesity-protective MC4R variants is in accordance with recent data, demonstrating that most of the rare missense variants are deleterious (26). This was likely to be the case for both MC4R variants during chronic starvation episodes and before the recent shift in human environment and lifestyle.

On the basis of previous and current results, we can evaluate the 'weight' of MC4R on the risk of obesity: whereas loss-of-function mutations have been shown to be associated

with ~2% of the cases of severe obesity (27–29), gain-of-function I251L (and possibly V103I) may be responsible for 2% of population-preventive fraction against obesity. If true, it is the first time to our knowledge that a gene has such a balanced effect on a metabolic trait. Altogether, MC4R should be considered as a Janus (double-faced) key modulator of body corpulence. Moreover, this report suggests that the stimulation of the leptin–melanocortin tonus is beneficial in humans to limit weight gain. In this regard, MC4R agonists that are currently under development may be useful to fight obesity in the near future (30).

MATERIAL AND METHODS

The phenotypic characteristics of the studied cohorts are summarized in Tables 3.

The study protocol was approved by all local ethic committees and an informed consent was obtained from each subject before participating in the study.

Study I: initial case–control design

Our sample included 2378 control subjects, 748 children ascertained for severe obesity and 883 class III (BMI > 40 kg/m²) obese adults, all unrelated and French Caucasians. Childhood overweight and obesity have been defined as BMI exceeding, respectively, the 90th and 97th percentile for gender and age in a French reference population (14) according to the recommendation of the ECOG study (15). Control subjects were participants of the D.E.S.I.R. prospective study in a general population (16). Selection criteria were BMI < 27 kg/m² and normal glucose tolerance at baseline and during the 9 year study follow-up. Two hundred and seventy unrelated adult French Caucasians recruited at the CNRS UMR8090 were also used as control subjects (BMI < 27 kg/m² and normal glucose tolerance). Obese children were selected through a multimedia campaign run by the CNRS UMR8090 (*n* = 580) as well as in the Toulouse Children's Hospital (*n* = 82) and in the Paris Trousseau Hospital (*n* = 86). Obese adults were recruited through a multimedia campaign run by the CNRS UMR8090 and the Department of Nutrition of the Paris Hotel Dieu Hospital.

Study II: familial population-based cohorts selected for childhood/adult obesity

We tested familial association with obesity using (i) 674 pedigrees with at least one obese child and one obese relative, including 3427 individuals: 971 obese children, 288 non-obese children, 1282 parents and 640 grandparents, and (ii) 435 pedigrees with severe adult obesity (at least one person with BMI ≥ 35 kg/m² and a first degree related with BMI ≥ 30 kg/m²), including a total of 1899 individuals: 174 lean, 353 overweighted, 749 class I and class II obese and 623 class III obese.

We also tested familial association in population-based pedigrees, in participants from the Fleurbaix–Laventie Ville Santé II study. The purpose of the study was to investigate cross-sectional and longitudinal associations between weight and fat mass and genetic, metabolic, and environmental

factors in children and adults. This community-based cohort was recruited in 1999 on a voluntary basis and included 1175 participants, aged 8 years and over, from families living in the towns of Fleurbaix and Laventie and surroundings. This cohort included 294 families: 431 children and adolescents, 206 fathers, 244 mothers.

Study III: childhood obesity: French and Italian replication cohorts

Two independent cohorts were genotyped to confirm the findings of studies I and II. We first genotyped 484 French children ascertained for childhood obesity, from St Vincent de Paul Hospital (31), and 590 young adult French control subjects (mean age = 21 years, BMI < 25 kg/m²) from the Haguenu study (32). We then genotyped 179 obese Italian children from Rome (33) and 670 lean children from Verona.

Study IV: class III obesity: swiss replication cohort

To confirm the association between class III obesity and MC4R genetic variation, we genotyped 551 Swiss adults from Zurich with class III obesity (BMI ≥ 40 kg/m²) unrelated (34), 94 Swiss lean (BMI < 25 kg/m²) from Zurich and 415 Swiss from anonymous healthy blood donors from CHUV of Lausanne (for which we do not have phenotypical data; Swiss obesity prevalence 7.7%).

Study V: population-based prospective cohort

The D.E.S.I.R. cohort is a population of volunteers (*n* = 5195) recruited from 10 health examination centers in the western-central part of France who were examined every 3 years, over 9 years, with the aim of clarifying the development of the insulin resistance syndrome.

Phenotypes

Weight, height and waist circumference were measured by trained personnel, and BMI was calculated. The BMI Z-score was determined according to the Cole's method (35).

Genotypes

Genomic DNA was extracted from peripheral blood cells using a Pure-Gene D50K isolation kit (Gentra Systems) according to the manufacturer's instructions.

Three pairs of primers were designed by Primer3 to amplify overlapping fragments covering 2.3 kb, including the entire MC4R gene and minimal promoter. (They were also used to perform direct sequencing.) Each fragment contains one SNP. Primers were the following:

- (i) 1F GAACCTGGCTGCCTGAAGATA
- (ii) 1R CTGTAAGTCTGCGGTTCCA
- (iii) 2F ACTGAGACGACTCCCTGACCC
- (iv) 2R AATCGCTCCCTTCATATTGGC
- (v) 3F TTGATAATGTCATTGACTCGGTGA
- (vi) 3R TCAACCAGTACCCTACACGGAAG

Table 3. Characteristics of the different cohorts

	Analysis	Study	Sample size (% men)	Mean age (SD)	Mean BMI (SD)	Mean BMI Z-score (SD)
Control population	Case/control study [a]	I	356 (40)	57.05 (13.31)	22.96 (2.30)	-0.38 (0.65)
D.E.S.I.R. control population	Case/control study [a]	I	2373 (70)	55.86 (9.98)	22.81 (2.29)	-
Toulouse obese children	Case/control study [b]	I	93 (37)	5.05 (1.49)	23.20 (3.19)	4.68 (1.55)
Trousseau obese children	Case/control study [b]	I	87 (42)	11.51 (3.00)	32.92 (7.16)	1.83 (1.17)
Class I obese adults	Case/control study	I	721 (43)	45.24 (19.06)	34.62 (3.95)	2.25 (0.82)
Morbid obese adults	Case/control study [c] + TDT	I & II	896 (23)	44.33 (11.88)	47.46 (7.49)	3.60 (0.89)
Fleurbaix control cohort	TDT	II	222 (38)	42.44 (4.51)	22.97 (2.20)	-0.24 (0.68)
Fleurbaix children	TDT	II	540 (52)	14.73 (3.55)	19.37 (3.48)	0.07 (1.25)
Fleurbaix adults	TDT	II	450 (46)	43.14 (4.91)	25.35 (4.47)	0.29 (1.02)
French obese children (pedigrees)	Case/control study [b, one/ pedigree] + TDT	I & II	971 (49) <i>611 unrelated</i>	11.14 (3.22)	28.21 (6.57)	3.72 (1.50)
Parents (childhood obese pedigrees)	TDT	II	1,282 (45)	41.11 (6.73)	30.33 (7.26)	1.20 (1.36)
Grand-parents (childhood obese pedigrees)	TDT	II	640 (38)	66.64 (7.23)	29.11 (5.38)	0.82 (1.05)
Non-obese relative children	TDT	II	288 (50)	21.83 (10.45)	25.93 (8.03)	1.18 (1.64)
French obese children replication cohort	Case/control study [e]	III	510 (39)	11.75 (3.06)	29.75 (5.77)	4.02 (1.02)
Haguenau French control population	Case/control study [f]	III	590 (54)	21.95 (3.74)	21.11 (2.02)	-0.041 (0.52)
Italian obese children	Case/control study [g]	III	192 (44)	10.43 (2.66)	26.73 (4.54)	3.76 (1.34)
Italian control sample	Case/control study [h]	III	650 (55)	10.78 (1.54)	18.83 (3.11)	0.78 (1.38)
Swiss morbid adults	Case/control study [i]	IV	551 (77)	43.03 (10.44)	46.84 (6.16)	-
D.E.S.I.R. total population	General population study	V	5195 (50)	56.40 (9.83)	24.73 (3.82)	-

We detailed the mean age, sample size, sex ratio, mean and SD of BMI/ z-score of BMI in the different studied cohort. Roman numbers refer to the paragraph in the Subjects and Methods section. Phenotypic data are not available for the Swiss control population[j].

PCR condition was 94°C 4 min for HotStart, denaturing at 94°C 15 s, annealing at 60°C 15 s, extension at 72°C 30 s and incubation at 72°C 10 min.

SNPs were genotyped with the LightCycler480 (Roche Diagnostics) assay on the basis of hybridization probes and fluorescent resonance energy transfer between fluorescein and LCRed 640. Probes were synthesized by TIB Molbiol Syntheselabor. The conditions are available upon request.

Quality controls

Hardy–Weinberg equilibrium has been tested in each cohort (Table 1). Looking for rare mutations in MC4R, we sequenced 1079 individuals and compared the results with genotyping by LightCycler480: we observed concordance rates of 99.8, 100 and 100% for c.-178 A>C, V103I and I251L, respectively. Genotyping was also controlled in familial designs, using the PedCheck program (36). In pedigrees with adult obesity, we observed one incompatibility out of 435 pedigrees. The Pedcheck analysis of 674 pedigrees with childhood obesity showed 3, 3 and 0 incompatibilities for c.-178A>C, V103I and I251L, respectively.

Statistical analyses

Tests for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium used the DeFinetti program (<http://linkage.rockefeller.edu/soft/>). Case–control analyses used the χ^2 test, and *P*-values were empirically computed with the CLUMP program (37). Transmission disequilibrium test and QPDT (Quantitative trait Pedigree Disequilibrium Test) were implemented in UNPHASED software. Familial association of the SNPs with quantitative traits, such as the BMI *Z*-score, was tested using the QPDTphase subprogram of UNPHASED software. In this test, the covariance is estimated within each family and the estimates combined across the dataset by the central limit theorem (<http://portal.litbio.org/Registered/Help/unphased/>). The meta-analysis by Mantel–Haentzel used the R program. We then used reported and updated (as much as possible) raw genotype counts to calculate OR under the allelic model. The statistical power of this test has been calculated for each variant with QUANTO software, using the total number of cases and controls, prevalence of obesity of 20% in European population (as suggested by the International Obesity Task Force) and the allele frequency and OR of the variants, resulting from the meta-analysis. We used 29 studies including 15 820 controls and 24 797 cases for V103I and 12 studies including 5972 controls and 5463 cases for I251L.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients and families that participated in this study. This work was supported in part by Conseil Regional Nord-Pas de Calais and Association Française des Diabétiques funding and by Roche and ALFEDIAM/Roche Diagnostics research prizes. Genotyping was supported by TibMol Biol. We also thank S. Gaget, M. Deweirder and F. Allegaert for technical assistance. We are particularly grateful to

Cécile Lecoeur and David Serre for analytical help, and Drs Barbara Heude, Catherine Le Stunff, Juan Ruiz, Natascha Potoczna, Jean Tichet, Michel Marre and Jacques Weill for providing DNA.

Conflict of Interest statement. The authors declare that they have no competing financial interests.

REFERENCES

- Jacobson, P., Ukkola, O., Rankinen, T., Snyder, E.E., Leon, A.S., Rao, D.C., Skinner, J.S., Wilmore, J.H., Lonn, L., Cowan, G.S., Jr. *et al.* (2002) Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 4442–4446.
- Gotoda, T., Scott, J. and Aitman, T.J. (1997) Molecular screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia*, **40**, 976–979.
- Hinney, A., Schmidt, A., Nottebom, K., Heibult, O., Becker, I., Ziegler, A., Gerber, G., Sina, M., Gorg, T., Mayer, H. *et al.* (1999) Several mutations in the melanocortin-4 receptor gene including a nonsense and a frameshift mutation associated with dominantly inherited obesity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 1483–1486.
- Geller, F., Reichwald, K., Dempfle, A., Illig, T., Vollmert, C., Herpertz, S., Siffert, W., Platzer, M., Hess, C., Gudermaun, T. *et al.* (2004) Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 572–581.
- Young, E.H., Wareham, N.J., Farooqi, S., Hinney, A., Hebebrand, J., Scherag, A., O'Rahilly, S., Barroso, I. and Sandhu, M.S. (2007) The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int. J. Obes (Lond)*.
- Heid, I.M., Vollmert, C., Hinney, A., Doring, A., Geller, F., Lowel, H., Wichmann, H.E., Illig, T., Hebebrand, J. and Kronenberg, F. (2005) Association of the 103I MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. *J. Med. Genet.*, **42**, e21.
- Alharbi, K.K., Spanakis, E., Tan, K., Smith, M.J., Aldahmesh, M.A., O'Dell, S.D., Sayer, A.A., Lawlor, D.A., Ebrahim, S., Smith, G.D. *et al.* (2006) Prevalence and functionality of paucimorphic and private MC4R mutations in a large, unselected European British population, scanned by meltMADGE. *Hum. Mutat.*, **28**, 294–302.
- Gu, W., Tu, Z., Kleyn, P.W., Kissebah, A., Duprat, L., Lee, J., Chin, W., Maruti, S., Deng, N., Fisher, S.L. *et al.* (1999) Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes*, **48**, 635–639.
- Vaisse, C., Clement, K., Durand, E., Hercberg, S., Guy-Grand, B. and Froguel, P. (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J. Clin. Invest.*, **106**, 253–262.
- Hinney, A., Hohmann, S., Geller, F., Vogel, C., Hess, C., Wermter, A.K., Brokamp, B., Goldschmidt, H., Siegfried, W., Remschmidt, H. *et al.* (2003) Melanocortin-4 receptor gene: case–control study and transmission disequilibrium test confirm that functionally relevant mutations are compatible with a major gene effect for extreme obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **88**, 4258–4267.
- Xiang, Z., Litherland, S.A., Sorensen, N.B., Proneth, B., Wood, M.S., Shaw, A.M., Millard, W.J. and Haskell-Luevano, C. (2006) Pharmacological characterization of 40 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists and the agouti-related protein (AGRP) antagonist. *Biochemistry*, **45**, 7277–7288.
- Farooqi, I.S., Yeo, G.S., Keogh, J.M., Aminian, S., Jebb, S.A., Butler, G., Cheetham, T. and O'Rahilly, S. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J. Clin. Invest.*, **106**, 271–279.
- Lubrano-Berthelie, C., Cavazos, M., Le Stunff, C., Haas, K., Shapiro, A., Zhang, S., Bougneres, P. and Vaisse, C. (2003) The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes*, **52**, 2996–3000.
- Rolland-Cachera, M.F., Cole, T.J., Sempe, M., Tichet, J., Rossignol, C. and Charraud, A. (1991) Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur. J. Clin. Nutr.*, **45**, 13–21.

15. Poskitt, E.M. (1995) Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). European Childhood Obesity group. *Acta Paediatr.*, **84**, 961–963.
16. Balkau, B. (1996) An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome. *Rev. Epidemiol. Sante Publique*, **44**, 373–375.
17. Peterli, R., Peters, T., von Flue, M., Hoch, M. and Eberle, A.N. (2006). Melanocortin-4 receptor gene and complications after gastric banding. *Obes. Surg.*, **16**, 189–195.
18. Miettinen, O.S. (1974) Proportion of disease caused or prevented by a given exposure, trait or intervention. *Am. J. Epidemiol.*, **99**, 325–332.
19. Helgason, A., Palsson, S., Thorleifsson, G., Grant, S.F., Emilsson, V., Gunnarsdottir, S., Adeyemo, A., Chen, Y., Chen, G., Reynisdottir, I. *et al.* (2007) Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat. Genet.*, **39**, 218–225.
20. Meyre, D., Bouatia-Naji, N., Tounian, A., Samson, C., Lecoeur, C., Vatin, V., Ghossaini, M., Wachter, C., Hercberg, S., Charpentier, G. *et al.* (2005) Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat. Genet.*, **37**, 863–867.
21. Botcher, Y., Korner, A., Reinehr, T., Enigk, B., Kiess, W., Stumvoll, M. and Kovacs, P. (2006) ENPP1 variants and haplotypes predispose to early onset obesity and impaired glucose and insulin metabolism in German obese children. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 4948–4952.
22. Challis, B.G., Pritchard, L.E., Creemers, J.W., Delplanque, J., Keogh, J.M., Luan, J., Wareham, N.J., Yeo, G.S., Bhattacharyya, S., Froguel, P. *et al.* (2002) A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 1997–2004.
23. Frayling, T.M., Timpson, N.J., Weedon, M.N., Zeggini, E., Freathy, R.M., Lindgren, C.M., Perry, J.R., Elliott, K.S., Lango, H., Rayner, N.W. *et al.* (2007) A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, **316**, 889–894.
24. Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Körner, A., Jacobson, P., Carlsson, L.M.S., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C. *et al.* (2007) Variation in *FTO* (fat mass and obesity associated) contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.*, in press.
25. Di Rienzo, A. and Hudson, R.R. (2005) An evolutionary framework for common diseases: the ancestral-susceptibility model. *Trends Genet.*, **21**, 596–601.
26. Kryukov, G.V., Pennacchio, L.A. and Sunyaev, S.R. (2007) Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *Am. J. Hum. Genet.*, **80**, 727–739.
27. Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Yeo, G.S., Lank, E.J., Cheetham, T. and O'Rahilly, S. (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1085–1095.
28. Hinney, A., Bettecken, T., Tarnow, P., Brumm, H., Reichwald, K., Lichtner, P., Scherag, A., Nguyen, T.T., Schlumberger, P., Rief, W. *et al.* (2006) Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 1761–1769.
29. Lubrano-Berthelie, C., Dubern, B., Lacorte, J.M., Picard, F., Shapiro, A., Zhang, S., Bertrais, S., Hercberg, S., Basdevant, A., Clement, K. *et al.* (2006) Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 1811–1818.
30. Nargund, R.P., Strack, A.M. and Fong, T.M. (2006) Melanocortin-4 receptor (MC4R) agonists for the treatment of obesity. *J. Med. Chem.*, **49**, 4035–4043.
31. Bougneres, P. (2002) Genetics of obesity and type 2 diabetes: tracking pathogenic traits during the predisease period. *Diabetes*, **51** (Suppl. 3), S295–S303.
32. Vu-Hong, T.A., Durand, E., Deghmoun, S., Boutin, P., Meyre, D., Chevenne, D., Czernichow, P., Froguel, P. and Levy-Marchal, C. (2006) The *INS VNTR* locus does not associate with smallness for gestational age (SGA) but interacts with SGA to increase insulin resistance in young adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **91**, 2437–2440.
33. Buzzetti, R., Petrone, A., Caiazzo, A.M., Alemanno, I., Zavarella, S., Capizzi, M., Mein, C.A., Osborn, J.A., Vania, A. and di Mario, U. (2005) PPAR-gamma2 Pro12Ala variant is associated with greater insulin sensitivity in childhood obesity. *Pediatr. Res.*, **57**, 138–140.
34. Branson, R., Potoczna, N., Kral, J.G., Lentos, K.U., Hoehe, M.R. and Horber, F.F. (2003) Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1096–1103.
35. Cole, T.J., Freeman, J.V. and Preece, M.A. (1995) Body mass index reference curves for the UK, 1990. *Arch. Dis. Child.*, **73**, 25–29.
36. O'Connell, J.R. and Weeks, D.E. (1998) PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 259–266.
37. Sham, P.C. and Curtis, D. (1995) Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.*, **59**, 97–105.

Contribution de mutations gain-de-fonction de *MC4R* dans la protection contre l'obésité commune

Seules trois variations dans la séquence du gène *MC4R* ont une fréquence allélique >1%: -178 ATG A>C, V103I (rs2229616, c.307G>A) et I251L (c.751A>C). Certaines équipes considèrent également la mutation T112M comme un « polymorphisme » (et non une mutation rare) car elle a été identifiée chez des individus non obèses dans plusieurs études (Alharbi et al. 2006; Farooqi et al. 2003; Gu et al. 1999; Larsen et al. 2005) mais sa fréquence est inférieure à 1%. Par ailleurs, d'autres polymorphismes ont été décrits spécifiquement chez les Indiens Pima et dans une population du Québec (Krakoff et al. 2008; Loos et al. 2005). L'effet fonctionnel des variations V103I, T112M et I251L a été caractérisé en détail (Xiang et al. 2006). La mutation V103I conduit à une diminution de la réponse du récepteur à son antagoniste AGRP, le variant I251L est responsable d'une augmentation de l'activité basale du récepteur et le récepteur porteur de la mutation T112M se comporte comme le récepteur sauvage (Gu et al. 1999; Valli-Jaakola et al. 2004; Xiang et al. 2006). L'effet fonctionnel du variant -178 ATG A>C n'a jamais été testé.

En 2001, Rosmond et coll. ont constaté que le variant V103I était faiblement associé avec une diminution de l'IMC ($p=0,054$) et du rapport taille/hanches ($p=0,023$) dans une étude de petite taille portant sur 284 Suédois de sexe masculin (Rosmond et al. 2001). Ce résultat a été cependant validé en 2004 par une large étude allemande sur 520 trios d'obésité, deux analyses cas-témoins et une méta-analyse de 7713 individus (Geller et al. 2004) : le variant V103I était responsable d'une diminution du risque d'obésité de 31% (odds ratio= 0,69). La même équipe a également montré que ce variant était associé avec une diminution de l'IMC (Heid et al. 2005) et des taux de triglycérides sériques (Bronner et al. 2006). Pourtant une autre étude suédoise n'a pas trouvé d'association entre le V103I et l'IMC et a constaté au contraire que ce variant était associé à un plus fort gain de poids sur 3,5 ans (Rutanen et al. 2004). Aucun effet potentiel des variants I251L ou -178A>C n'avait été rapporté dans la littérature.

Nous nous sommes donc intéressés à ces trois variants dans neuf cohortes distinctes. La fréquence des variants -178 ATG A>C, I251L et V103I était respectivement comprise entre 1,49 et 2,24%, 0,41 et 1,21% et 1,37 et 1,49%.

Etude cas-contrôle initiale

Les trois variants ont tout d'abord été séquencés chez 748 enfants obèses français, 883 adultes français obèses de classe III et 2378 individus français de poids normal. Nous avons réalisé deux premières études cas-témoins, en comparant d'une part la fréquence des variants chez les enfants obèses avec celle des contrôles, et d'autre part la fréquence chez les adultes obèses avec celle des contrôles. Afin d'améliorer la puissance statistique du test et dans la mesure où la population était homogène, nous avons groupé les enfants et les adultes obèses et confronté la fréquence générale des variants parmi les sujets obèses à la fréquence des variants dans la population contrôle. Nous avons alors montré que le variant I251L avait un effet protecteur contre l'obésité (OR=0,42 ; 95CI 0,25-0,73 ; p=0,001). Les variants -178 ATG A>C et V103I n'étaient pas associés avec l'obésité dans cette première étude.

Etudes cas-contrôle de répliation

Nous avons confirmé l'association du variant I251L avec une diminution du risque d'obésité dans une seconde étude cas-contrôle d'enfants français (OR=0,35 ; p=0,03). Notre étude cas-contrôle d'enfants italiens manquait de puissance statistique pour montrer une association.

Nous avons également confirmé l'association de ce variant avec une protection contre l'obésité adulte à l'aide d'une étude cas-témoin d'adultes suisses (OR=0,25 ; p=0,009). Les variants -178 ATG A>C et V103I n'étaient pas non plus associés avec l'obésité dans ces trois études.

Transmission des variants rares

Les trois variants ont ensuite été génotypés dans 1109 familles françaises avec obésité. Nous avons analysé d'une part le déséquilibre de transmission des variants avec l'obésité (Transmission Disequilibrium Test) et d'autre part leur association avec une modification éventuelle du z-score de l'IMC (Quantitative Pedigree Disequilibrium Test).

Le variant I251L était sous transmis aux sujets obèses ou en surpoids (23,3% au lieu de 50% attendus) et associé avec une diminution de 0,76 déviation standard (DS) du z-score d'IMC.

Le variant I251L diminuait également significativement le z score de l'IMC de 0,35 DS des enfants porteurs dans une étude de transmission familiale QPDT réalisée au sein des 294 familles de la cohorte Fleurbaix Laventie Ville Santé Study.

Effets des variants en population générale

Afin de valider le rôle protecteur du variant I251L dans un contexte plus large que des populations obèses, nous avons génotypé les trois variants dans la population générale D.E.S.I.R. Le variant I251L présentait une tendance d'association avec une diminution de l'IMC (diminution de 0,7 kg/m², p=0,05). Cette cohorte est la seule à présenter une association entre le V103I et une diminution d'IMC, pourtant du même ordre de grandeur que I251L (0,8 kg/m², p=0,03).

Méta-analyse

Finalement, nos résultats ont été complétés par les résultats de la littérature dans une méta-analyse. Celle-ci regroupait les données de 29 études concernant le variant V103I. L'analyse du génotype de 39 879 individus a permis de confirmer le résultat de Geller et coll. : le variant V103I diminuait de 20% le risque d'obésité (OR=0,80 (0,70-0,92); p=0,002). Seules 12 études rapportaient des comptes de génotype pour le variant I251L, soit 11 435 individus. Nous avons confirmé que ce variant diminuait de 48% le risque d'obésité (OR=0,52 (0,38-0,71); p=3x10⁻⁵). Le variant -178 ATG A>C n'a pas été étudié en méta-analyses, faute de données dans la littérature.

Fraction préventive des variants V103I et I251L

La fraction préventive (FP) d'un polymorphisme dans une maladie commune en population générale est une combinaison de son odds ratio et de sa fréquence. Elle prédit la fréquence additionnelle d'obèses qu'il y aurait dans la population générale en l'absence de ce polymorphisme. Or le variant I251L avait un effet plus fort et une fréquence plus faible que le variant V103I. Dans notre étude, nous avons évalué les FP de I251L et V103I à 1,05% et 0,84% respectivement. Cela signifie qu'à l'échelle de la population, le variant I251L serait aussi bénéfique que le variant V103I.

Réplication de nos résultats dans la littérature

Le variant -178 ATG A>C n'était pas non plus associé avec l'obésité dans une étude antérieure (Alharbi et al. 2006).

Le variant I251L est associé de manière reproductible avec une protection contre l'obésité dans nos cohortes et présente une fraction préventive de 1,05%. Malgré une tendance d'association qui pouvait attirer l'attention à la lumière des fréquences des populations cas-contrôles utilisées dans notre méta-analyse, une seule étude s'y était intéressée avant nous. Beckers et coll. avaient réalisé une méta-analyse sur 4510 cas et 2637

contrôles et n'avaient obtenu aucune association significative (Beckers et al. 2006). Bien que ce résultat soulève un débat, aucune étude n'a poursuivi l'investigation des effets de ce variant depuis la publication de nos travaux.

Inversement, l'allèle I103, protecteur dans de nombreuses études allemandes, ne montre pas une association très forte dans nos populations et seule la méta-analyse a permis de confirmer l'association dans les populations européennes. Récemment d'autres équipes ont continué d'étudier les différents effets du variant V103I : il est associé avec un moindre poids de manière continue sur neuf ans chez les femmes blanches et chez les Afro-Américaines issues de la population générale ARIC (13400 participantes) (Hart Sailors et al. 2007) mais pas chez les hommes. De plus, deux études ont montré que le V103I est associé avec une augmentation de l'ingestion de glucides (Heid et al. 2008; Pichler et al. 2008). Une méta-analyse parue en même temps que la nôtre a obtenu des résultats similaires : aucune association n'a été observée entre le variant V103I et l'IMC dans la population Ely mais ces valeurs cumulées à la littérature atteignaient une valeur significative en méta-analyse et montraient une diminution de 18% du risque d'obésité (Young et al. 2007). Une étude de phase II de GWAS a également confirmé cette association (Meyre et al. 2009).

Un faible effet gain de fonction est capable d'améliorer la signalisation de MC4R et de diminuer de 48% le risque d'obésité. Les deux polymorphismes rares V103I et I251L de MC4R diminuent de 1,89% la prévalence de l'obésité dans nos populations. Dans les mêmes populations nous avons montré que les mutations de MC4R responsables d'obésité monogénique ont une fréquence de 1,76%. Ceci suggère un rôle régulateur-clé de ce récepteur sur la prise alimentaire.

ARTICLE 3

Common genetic variation near MC4R is associated with eating behaviour patterns in European populations.

Stutzmann F, Cauchi S, Durand E, Calvacanti-Proença C, Pigeyre M, Hartikainen AL, Sovio U, Tichet J, Marre M, Weill J, Balkau B, Potoczna N, Laitinen J, Elliott P, Järvelin MR, Horber F, Meyre D, Froguel P.

Int J Obes (Lond). 2009 Mar;33(3):373-8.

SHORT COMMUNICATION

Common genetic variation near *MC4R* is associated with eating behaviour patterns in European populations

F Stutzmann¹, S Cauchi¹, E Durand¹, C Calvacanti-Proença¹, M Pigeyre², A-L Hartikainen³, U Sovio⁴, J Tichet⁵, M Marre⁶, J Weill⁷, B Balkau⁸, N Potoczna⁹, J Laitinen¹⁰, P Elliott^{11,12}, M-R Järvelin^{4,11,12}, F Horber⁹, D Meyre¹ and P Froguel^{1,13}

¹CNRS-8090-Institute of Biology, Pasteur Institute, Lille, France; ²Department of Nutrition, Hospital University, Lille, France; ³Department of Obstetrics and Gynaecology, University of Oulu, Oulu, Finland; ⁴Department of epidemiology and public health, Imperial College London, London, UK; ⁵IRSA, La Riche, France; ⁶INSERM U695, Bichat Hospital, Paris, France; ⁷Pediatric Endocrine Unit, Jeanne de Flandre Hospital, Lille, France; ⁸INSERM U780-IFR69, Paris Sud University, Villejuif, France; ⁹Klinik Lindberg, Winterthur, Switzerland; ¹⁰National Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland; ¹¹Institute of Health Sciences, University of Oulu, Oulu, Finland; ¹²Department of Child and Adolescent Health, National Public Health Institute, Helsinki, Finland and ¹³Department of Genomic Medicine, Hammersmith Hospital, Imperial College London, London, UK

Both rs17782313 (near *MC4R*) and rs1421085 (*FTO*) polymorphisms have been consistently associated with increased risk of obesity and with body mass index (BMI) variation. An effect of both polymorphisms on satiety has recently been suggested. We genotyped rs17782313 and rs1421085 in 5764 relatives from 1109 French pedigrees with familial obesity, 1274 Swiss class III obese adults as well as in 4877 French adults and 5612 Finnish teenagers from two randomly selected population cohorts. In all subjects, eating behaviour traits were documented through questionnaires. We first assessed the association of both single nucleotide polymorphisms with BMI and then studied eating behaviour. Under an additive model, the rs17782313-C *MC4R* allele showed a trend towards higher percentages of snacking in both French obese children ($P=0.01$) and Swiss obese adults ($P=0.04$) as well as in adolescents from the Finnish general population ($P=0.04$). In French adults with familial obesity, this allele tended to be also associated with a higher Stunkard hunger score ($P=0.02$) and in obese children with a higher prevalence of eating large amounts of food ($P=0.04$). However, no consistent association of the *FTO* rs1421085-C allele and available eating behaviour trait was found in our studied populations. The rs17782313-C allele nearby *MC4R* may modulate eating behaviour-related phenotypes in European obese and randomly selected populations, in both children and adults, supporting a regulatory role of this genetic variant on eating behaviour, as previously shown for *MC4R* non-synonymous loss-of-function mutations. The potential effect of the obesity-associated *FTO* gene on eating behaviour deserves additional investigation.

International Journal of Obesity advance online publication, 20 January 2009; doi:10.1038/ijo.2008.279

Keywords: *FTO*; *MC4R*; eating behaviour; polymorphism

Introduction

Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the fat mass and obesity (*FTO*) gene have been reproducibly associated with higher risk of obesity.^{1–4} Although the

function of *FTO*^{5,6} remains poorly understood, its putative contribution to food intake regulation has been suggested.^{7–9} Recently, genome-wide association studies identified SNPs located 150–188 kb downstream the *melanocortin 4 receptor* (*MC4R*) gene, modulating body mass index (BMI) in populations of European ancestry,¹⁰ waist circumference in an Asian population^{10,11} and increasing risk for severe obesity.¹⁰ This intergenic locus may participate in the regulation of *MC4R* expression but its putative effect is difficult to assess with biological tests, given that *MC4R* is specifically expressed in the brain and erectile tissues.¹² *MC4R* pathogenic coding mutations cause monogenic

Correspondence: Dr D Meyre, Génomique et Physiologie Moléculaire des Maladies Métaboliques, CNRS UMR 8090 - Institut de Biologie de Lille, 1, rue du Professeur Calmette -BP245- 59019 Lille Cedex, France.
E-mail: meyre@good.ibl.fr

Received 20 July 2008; revised 4 December 2008; accepted 10 December 2008

early-onset obesity through appetite deregulation,¹³ that is why we supposed that the potential effect of rs17782313 locus on *MC4R* expression could influence eating behaviour as well. This view is supported by a recent report of Qi *et al.*,¹⁴ who observed that *MC4R* rs17782313 is associated with higher intake of total energy and dietary fat.

After having assessed BMI association in the cohorts, we analysed the effects of *MC4R* rs17782313 and *FTO* rs1421085 SNPs on eating behaviour patterns in both severely obese and randomly selected European populations.

Methods

Subjects

The clinical characteristics of the studied cohorts are reported in Table 1. The study protocol was approved by local ethics committees and an informed consent was signed before participation in the study. We used the 97th BMI age- and sex-specific percentiles from a French reference population^{15,16} as a threshold for childhood obesity and the BMI z-score as a quantitative measure of body corpulence. Obesity status in adults was defined by BMI \geq 30 kg/m², class III obesity by BMI \geq 40 kg/m². Carriers of ascertained monogenic pathogenic *MC4R* mutations were excluded from the obese populations (89 French and 23 Swiss subjects).

Furthermore, 1109 French Caucasian pedigrees with childhood or adult obesity were recruited by the Centre National de la Recherche Scientifique and the Hotel-Dieu hospital: they included 1004 obese children, 313 non-obese children, 2009 non-obese adults and 2438 obese adults.

In obese adults, eating behaviour was assessed by the validated three factors eating questionnaire (TFEQ),¹⁷ which evaluates cognitive and behavioural components of eating: restraint (range of scores 1–21), disinhibition (1–18) and hunger (1–14). As the TFEQ has not been validated in obese children, we used an in-house questionnaire administrated by a trained physician.¹⁸ Three questions related to eating behaviour were addressed: craving, eating large amounts of food during meals and snacking; answers were 'yes' or 'no',

leading to binary traits. Details of the questionnaire are available on request.

We also studied 1274 unrelated Swiss adults from Zurich with class III obesity,¹⁹ all of Caucasian origin. They were recruited after referred to the clinic for refractory obesity. Among phenotypic data, each subject completed a questionnaire based on the fully validated eating behaviour disorder questionnaire of Spitzer *et al.*²⁰ Questionnaire data were confirmed by semistructured and structured interviews conducted by dietician, psychologist and physician. Even if this questionnaire focuses specifically on the psychological construct of binge eating disorder, we extracted data concerning the tendency to eat large amounts of food and to snack, as binary traits.

The NFBC 1986 (Northern Finland Birth Cohort 1986) is a cohort of 5612 Caucasian children born in Oulu and Lapland with expected dates of birth between 1 July 1985, and 30 June 1986 (that is, premature babies, born before 1 July were included). Data on the cohort were collected from multiple interchangeable sources (families and physicians) at birth, 7 years and 16 years. An in-house eating behaviour questionnaire was answered at 16 years, from which we analysed the snacking during the weekends and the tendency to eat large quantities of food (yes or no). Details of the questionnaire are available on request.

The 2405 men and 2472 women of the D.E.S.I.R. (Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome) cohort were analysed. Participants were volunteers insured by the French social security system. These people were aged between 30 and 65 at inclusion.²¹ We previously estimated the proportion of participants having non-European ancestry to be 0.30% in the D.E.S.I.R. cohort.²² Biological and metabolic parameters were assessed at inclusion and at 3-, 6- and 9-year visits, as previously described.²³ Eating behaviour was assessed at baseline and we studied self-reported snacking and bulimia (affected or not).

Genotyping and quality controls

The rs17782313 and rs1421085 were the replicated SNPs with the best *P* value in their discovery studies.^{1,10} They were

Table 1 Phenotypical characteristics of the different cohorts

	French obese children	French non-obese children	French obese adults	French non-obese adults	Class III obese Swiss adults	NFBC1986	D.E.S.I.R.
Sample size (% male)	1004 (48.0)	313 (52.1)	2438 (32.9)	2009 (47.2)	1274 (24.8)	5612 (49.3)	4877 (49.3)
Mean age (years)	11.1 (2.0–17.0)	11.5 (4.0–17.0)	47.2 (18.0–89.0)	47.7 (18.0–94.0)	42.3 (16.0–73.0)	16.0 (14.6–17.0)	47.3 (30.1–65.8)
Mean BMI (kg/m ²)	—	—	39.9 (30.0–87.2)	25.4 (10.0–30.0)	46.8 (40.0–91.0)	—	24.7 (15.4–53.6)
Mean BMI z-score	3.99 (1.97–10.97)	0.49 (–3.46–1.88)	—	—	—	0.02 (–2.49–10.91)	—
rs17782313 MAF			27.9%		29.7%	17.7%	23.7%
rs1421085 MAF			49.2%		51.4%	40.8%	41.5%

Abbreviations: BMI, body mass index; D.E.S.I.R., Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome; NFBC 1986, Northern Finland Birth Cohort 1986; MAF, minor allele frequency. Data are given with minimum and maximum.

genotyped using an Assay-On-Demand kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Taqman conditions are available on request. In all studied populations, both genotypes were in Hardy–Weinberg equilibrium ($P > 0.01$). Call rates were 97.8% (range: 96.9–99.5%). Concordance rates were 100% for both rs17782313 and rs1421085, with 1043 DNA genotyped twice. Genotyping quality was also verified in the families using the Pedcheck program.²⁴ We observed 1 and 6 Mendelian incompatibilities out of 1109 pedigrees, for rs17782313 and rs1421085, respectively.

Statistical analyses

All the questionnaires were submitted to differential item functioning, using the linear or logistic regression approach, to test the impact of age, sex and BMI on eating behaviour.

After simple Bonferroni correction for multiple comparisons (26 tests), P values < 0.002 were considered significant and P values < 0.05 as trend estimates. Additive models were used to study the association between these polymorphisms and the eating phenotypes.^{1,10} All P values were two-sided. The transmission disequilibrium and the quantitative trait pedigree disequilibrium tests (TDT and QPDT) in the UNPHASED software (<http://portal.litbio.org/Registered/Help/unphased/>) were used for the French families. The TDT measures the overtransmission of an allele from heterozygous parents to affected offspring;²⁵ the QPDT tests familial association of the SNPs with quantitative traits, such as the z-score of BMI, by estimating the covariance within each family, the estimates are combined across the dataset by central limit theorem (<http://portal.litbio.org/Registered/Help/unphased/>).²⁶

To take familial relationships within the French population into account, we tested the association of both SNPs with eating behaviour-related phenotypes by binomial and Gaussian models of generalized estimated equations (GEE) using STATA software.²⁷ In the Swiss population, comparisons between means used ANOVA tests and percentages, contingency table logistic regression, with SPSS 14.0. Eating behaviour-related phenotypes in the population-based cohorts were binary traits. Polymorphism effects on these traits were calculated by logistic regression models without any adjustment. The genotype variable was included in all models as a linear effect of the number of risk alleles. Analyses used R 2.6.1 software.²⁸

As expected, differential item functioning showed that age, sex and BMI influenced the results of the questionnaires (data not shown). Associations between SNPs and eating behaviour-related traits were thus corrected for those traits. We obtained similar results (data not shown).

Results

Minor allele frequencies (MAF) of rs17782313 and rs1421085 are reported in Table 1. As expected, MAF of rs17782313 and

rs1421085 in populations selected for obesity (French and Swiss populations; Table 1) was higher than in the randomly selected populations (NFBC 1986 and D.E.S.I.R.; P values ranging from 0.03 to 1×10^{-5}).

We first studied 1109 French pedigrees with a family background of obesity. TDT and QPDT analyses were performed for both SNPs. To gain statistical power, we considered together the three available generations (children, parents and grandparents) to test for overtransmission with obesity (97th percentile) and association with the z-score of the BMI. Both the *MC4R* rs17782313-C and *FTO* rs1421085-C alleles were overtransmitted to obese subjects (53.8%, $P = 0.012$ and 53.9%, $P = 1.3 \times 10^{-6}$, respectively). We also investigated family association of the two SNPs with body corpulence, by the QPDT test. The rs17782313-C and rs1421085-C alleles were associated with a higher z-score of the BMI ($+0.17$ standard deviation (s.d.) of BMI, $P = 0.03$ and $+0.11$ s.d., $P = 1.8 \times 10^{-4}$, respectively).

As available eating behaviour-related phenotypes were different in children and adults, we studied both subgroups separately. In children, the *MC4R* rs17782313-C allele was associated with trends towards higher prevalence of eating large amounts of food during meals (GEE binomial test, TT: 45.3%, CT: 54.0%, CC: 50.9%, $P = 0.036$; Table 2) and of frequent snacking (TT: 46.7%, CT: 52.7%, CC: 58.5%; $P = 0.010$) whereas no such association was detected for the *FTO* rs1421085-C allele. In adults, the rs17782313-C allele was associated with a trend towards higher mean hunger Stunkard score (GEE Gaussian test, TT: 4.45, CT: 4.67, CC: 5.21, $P = 0.015$; Table 2). However, the *FTO* rs1421085-C allele was not associated with any Stunkard score.

We then tested the association between rs1421085 and rs17782313 and eating behaviour in an independent cohort of 1274 Swiss class III obese adults, in whom the same phenotypes were available. In this extremely obese population (range BMI = 40–91 kg/m²), neither *MC4R* nor *FTO* polymorphisms were associated with BMI variations ($P = 0.27$ and 0.47 for rs17782313 and rs1421085, respectively; Table 2). However, we observed an association of the *MC4R* rs17782313-C allele with a higher prevalence of snacking (TT: 33.8%, CT: 38.9%, CC: 45.5%, $P = 0.036$) although the rs1421085-C allele had no obvious effect on this phenotype (Table 2).

After studying three cohorts selected for severe obesity, we wanted to analyse randomly selected populations of European origin. Both SNPs were associated with BMI increase at 16 years in the Finnish population ($P = 0.002$ and 2×10^{-8})²⁹ and at baseline in the French middle-aged population ($P = 0.05$ and 0.006).²⁹ We then analysed the associations of rs17782313 and rs1421085 with snacking and bulimia/eating large amounts of food in these cohorts. Among the Finnish young population, we observed a tendency to snack more during weekends for individuals carrying the *MC4R* rs17782313-C allele (TT: 78.0%, CT: 79.5%, CC: 85.3%, $P = 0.040$; Table 2) but not for the *FTO* rs1421085-C carriers.

Table 2 Association of both SNPs with eating behaviour-related phenotypes

Eating behaviour	FTO rs1421085				MC4R rs17782313			
	TT	CT	CC	P-value	TT	CT	CC	P-value
<i>(a) Initial study</i>								
French children								
Large quantities	49.6	54.8	57.2	0.08	45.3	54.0	50.9	0.04
Snacking	55.6	52.0	61.1	0.21	46.7	52.7	58.5	0.01
Craving	11.2	8.5	9.2	0.40	8.8	8.9	9.4	0.82
French adults								
Restriction	8.42 ± 4.91	8.62 ± 4.91	8.88 ± 4.85	0.34	8.58 ± 4.91	8.80 ± 4.95	8.30 ± 4.83	0.93
Disinhibition	6.55 ± 3.63	6.60 ± 3.53	6.79 ± 3.67	0.74	6.50 ± 3.53	6.63 ± 3.63	7.19 ± 3.64	0.32
Hunger	4.56 ± 3.26	4.66 ± 3.28	4.65 ± 3.38	0.60	4.45 ± 3.20	4.67 ± 3.27	5.21 ± 3.57	0.02
<i>(b) Replication studies</i>								
Swiss								
BMI	46.44 ± 5.67	46.92 ± 6.40	46.77 ± 5.39	0.47	46.59 ± 5.60	47.00 ± 5.73	46.96 ± 6.59	0.27
Snacking	39.1	36.7	37.3	0.79	33.8	38.9	45.5	0.04
Large quantities	50.7	52.7	55.7	0.44	52.3	54.8	57.6	0.50
NFBC 1986								
Large quantities	40.5	40.6	37.6	0.20	40.6	38.6	34.8	0.07
Snacking during weekends	80.4	77.3	79.7	0.30	78.0	79.5	85.3	0.04
D.E.S.I.R.								
Bulimia	1.58	1.59	2.39	0.20	1.50	1.94	2.51	0.20
Snacking	12.38	13.05	14.82	0.10	13.38	13.26	15.90	0.50

Abbreviations: BMI, body mass index; D.E.S.I.R., data from an epidemiological study on the insulin resistance syndrome; NFBC 1986, Northern Finland Birth Cohort 1986. (a) In French family members: Large quantities, snacking and craving are binary traits—data are given as percent of affected individuals—*P* values use a GEE binomial test. Restriction, disinhibition and hunger are continuous traits—data are the means of the trait for each genotype ± standard deviation—*P* values use a GEE Gaussian test. (b) In a Swiss obese population, the Finnish and French general populations: Phenotypes are binary traits—data are given as percent of affected individuals. Statistical test is a logistic regression without any adjustment.

In the French middle-aged cohort, no SNP was significantly associated with eating behaviour patterns.

Using a linear regression approach, we tested the combined effects of SNPs and eating behaviour on BMI. We observed that *FTO* rs1421085 and eating behaviour influence separately and interactively the z-score of BMI in the French obese children (data not shown). We observed no other interaction for any SNP with any eating behaviour in all studied populations.

Discussion

Our data are consistent and support an effect of rs17782313 on specific eating behaviour patterns in severely obese French and Swiss subjects and in Finnish teenagers. Loss-of-function coding mutations in *MC4R* are responsible for monogenic hyperphagic obesity.³⁰ We thus assume that a phenotype mimicking (to a lesser extent) the effect of mutations in a monogenic context may be a sign of the effect of a SNP on the gene expression or activity as pathogenic mutations do with a more stringent effect. Therefore our results indirectly support the view that the recently identified obesity-associated locus located 188 kb downstream the *MC4R* gene¹⁰ may have a regulatory role on *MC4R* expression or translation. Further functional analyses remain to be performed to assess the physiological effect of this SNP and confirm our assumption.

Measurement of eating behaviour through self-reported questionnaires remains somehow subjective³¹ and may therefore lead to detect inconsistent associations between genetic variants and everyday-life eating behaviour. Documented estimation of daily calorie intake and *ad libitum*

meal tests are indeed more reliable ways to quantify energy intake¹³ but difficult to perform in large samples.

Given these limitations, we used at least one questionnaire validated in obese populations (Spitzer *et al.*²⁰) and the extended version of TFEQ.¹⁷ We detected consistent associations towards higher snack consumption/hunger in French families and Swiss obese subjects, as in the young Finnish cohort and the French obese children, although documented by self-reported criteria. These associations were reproducible, using different eating pattern indicators both meaning excessive appetite. Given the effect of *MC4R* mutations on appetite^{30,32,33} the risk of cumulating four false positive associations between *MC4R* rs17782313 and eating behaviour pattern out of five studies (using five different questionnaires) is unlikely. However our results need to be replicated in additional populations.

More challenging are our negative results for *FTO* rs1421085. The association between *FTO* SNPs and energy balance has been previously investigated in two medium-size studies. Do *et al.*⁷ concluded that *FTO* variant has an impact on energy expenditure but not on energy intake in the Quebec family study population (*n*=908) whereas Speakman *et al.*⁸ reached opposite conclusions in a Scottish population (*n*=150). Recently, it was proposed that *FTO* SNP interacts with energy expenditure and physical activity^{34,35} making more difficult the assessment of *FTO* effects on energy metabolism. *FTO* may regulate energy balance independently of appetite regulation, as previously hypothesized.^{2,34} As an eating behaviour pattern is not a surrogate of the actual daily food intake pattern, effects on eating behaviour pattern and food intake can be different in that sense. Thus, we cannot exclude that *FTO* may have a

strong effect on BMI and a more subtle effect on quantitative daily food consumption when limited to a specific sub-population. Recently, an association between *FTO* SNP and decreased satiety ($P=0.008$) was observed.⁹ In this powerful study, as in other analyses^{7–9} the best-fitted model for food intake was recessive although *FTO* SNP was associated with an additive increase in BMI. The recessive model may be more likely to detect slight effects. In our initial cohort of French children, *FTO* rs1421085-C allele is associated with increased snacking using a recessive model only (TT+CT: 49.6% vs CC: 58.5%, $P=0.032$) but this finding was not replicated in other cohorts. This discrepancy between our results and others may also be due to differences in eating attitudes and behaviours in countries such as UK, Quebec, France and Switzerland. In summary, rs17782313-C allele may modulate appetite-related phenotypes in both obese and randomly selected European populations, in both children and adults, supporting a regulatory role of this genetic variant on the nearby *MC4R* gene. The effect of the obesity-associated *FTO* gene on eating behaviour deserves additional investigation.

Acknowledgements

We thank the patients and families who participated in this study. This work was supported in part by Conseil Regional Nord-Pas de Calais and 'Association Française des Diabétiques' funding. The NFBC study was conducted with the support of the Academy of Finland and the European Commission (Framework 5 award QL1-CT-2000-01643). We thank Professor Leena Peltonen-Palotie for her contribution in DNA extraction and distribution.

Competing interest statement

The authors declare that they have no competing financial interests.

References

- 1 Dina C, Meyre D, Gallina S, Durand E, Korner A, Jacobson P *et al*. Variation in *FTO* contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 2007; **39**: 724–726.
- 2 Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM *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.
- 3 Hinney A, Nguyen TT, Scherag A, Friedel S, Bronner G, Muller TD *et al*. Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (*FTO*) variants. *PLoS ONE* 2007; **2**: e1361.
- 4 Scuteri A, Sanna S, Chen WM, Uda M, Albai G, Strait J *et al*. Genome-wide association scan shows genetic variants in the *FTO* gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 2007; **3**: e115.
- 5 Fredriksson R, Hagglund M, Olszewski PK, Stephansson O, Jacobsson JA, Olszewska AM *et al*. The obesity gene, *FTO*, is of ancient origin, upregulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology* 2008; **149**: 2062–2071.
- 6 Gerken T, Girard CA, Tung YC, Webby CJ, Saudek V, Hewitson KS *et al*. The obesity-associated *FTO* gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 2007; **318**: 1469–1472.
- 7 Do R, Bailey SD, Desbiens K, Belisle A, Montpetit A, Bouchard C *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.
- 8 Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM. Polymorphisms of the *FTO* gene are associated with variation in energy intake, but not energy expenditure. *Obesity (Silver Spring)* 2008; **16**: 1961–1965.
- 9 Wardle J, Carnell S, Haworth CM, Faraoui IS, O'Rahilly S, Plomin R. Obesity-associated genetic variation in *FTO* is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 3640–3643.
- 10 Loos RJ, Lindgren CM, Li S, Wheeler E, Zhao JH, Prokopenko I *et al*. Common variants near *MC4R* are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 2008; **40**: 768–775.
- 11 Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, Zhang W, Li Y, Froguel P *et al*. Common genetic variation near *MC4R* is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet* 2008; **40**: 716–718.
- 12 Gantz I, Miwa H, Konda Y, Shimoto Y, Tashiro T, Watson SJ *et al*. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 1993; **268**: 15174–15179.
- 13 Faraoui IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1085–1095.
- 14 Qi L, Kraft P, Hunter DJ, Hu FB. The common obesity variant near *MC4R* gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change, and diabetes risk in women. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: 3502–3508.
- 15 Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991; **45**: 13–21.
- 16 Poskitt EM. Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). European Childhood Obesity group. *Acta Paediatr* 1995; **84**: 961–963.
- 17 Stunkard AJ, Messick S. The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* 1985; **29**: 71–83.
- 18 Durand E, Boutin P, Meyre D, Charles MA, Clement K, Dina C *et al*. Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 2004; **53**: 2483–2486.
- 19 Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentos KU, Hoehe MR, Horber FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 2003; **348**: 1096–1103.
- 20 Spitzer RL, Yanovski S, Wadden T, Wing R, Marcus MD, Stunkard A *et al*. Binge eating disorder: its further validation in a multisite study. *Int J Eat Disord* 1993; **13**: 137–153.
- 21 Balkau B. An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres, (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome. *Rev Epidemiol Sante Publique* 1996; **44**: 373–375.
- 22 Meyre D, Bouatia-Naji N, Vatin V, Veslot J, Samson C, Tichet J *et al*. ENPP1 K121Q polymorphism and obesity, hyperglycaemia and type 2 diabetes in the prospective DESIR Study. *Diabetologia* 2007; **50**: 2090–2096.
- 23 Balkau B, Eschwege E, Tichet J, Marre M. Proposed criteria for the diagnosis of diabetes: evidence from a French epidemiological study (D.E.S.I.R.). *Diabetes Metab* 1997; **23**: 428–434.

- 24 O'Connell JR, Weeks DE. PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 259–266.
- 25 Spielman RS, Ewens WJ. A sibship test for linkage in the presence of association: the sib transmission/disequilibrium test. *Am J Hum Genet* 1998; **62**: 450–458.
- 26 Zhang S, Zhang K, Li J, Sun F, Zhao H. Test of association for quantitative traits in general pedigrees: the quantitative pedigree disequilibrium test. *Genet Epidemiol* 2001; **21** (Suppl 1): S370–S375.
- 27 Hardin JW, Hilbe JM. Generalized Estimating Equations. <http://www.stata.com/help.cgi?xtgee> (Chapman & Hall/CRC, 2003).
- 28 R-Development-Core-Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, <http://www.R-project.org> 2007.
- 29 Cauchi S, Stutzmann F, Proença C, Durand E, Meyre D, Pouta A *et al*. Combined effects of MC4R and FTO genetic variants on obesity in European general populations. *Plos Genetics* 2008. Submitted.
- 30 Farooqi S, O'Rahilly S. Genetics of obesity in humans. *Endocr Rev* 2006; **27**: 710–718.
- 31 Jakes RW, Day NE, Luben R, Welch A, Bingham S, Mitchell J *et al*. Adjusting for energy intake—what measure to use in nutritional epidemiological studies? *Int J Epidemiol* 2004; **33**: 1382–1386.
- 32 Heid IM, Vollmert C, Hinney A, Doring A, Geller F, Lowel H *et al*. Association of the 103I MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. *J Med Genet* 2005; **42**: e21.
- 33 Stutzmann F, Vatin V, Cauchi S, Morandi A, Jouret B, Landt O *et al*. Non-synonymous polymorphisms in melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet* 2007; **16**: 1837–1844.
- 34 Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, Torekov SS, Wegner L, Andersen G *et al*. Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 2008; **57**: 95–101.
- 35 Berentzen T, Kring SI, Holst C, Zimmermann E, Jess T, Hansen T *et al*. Lack of association of fatness-related FTO gene variants with energy expenditure or physical activity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; **93**: 2904–2908.

Association du rs17782313 de MC4R avec les comportements alimentaires

La nouvelle technologie des puces à ADN génome-entier (GWAS) permet une couverture de tout le génome par des polymorphismes issus du projet HapMap. Cette technologie a permis d'impliquer un nouveau gène dans l'obésité. Des SNPs du gène *FTO* (*fat mass and obesity associated*) sont associés avec un plus fort risque d'obésité et une augmentation de l'IMC de manière reproductible (Dina et al. 2007; Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007). A l'époque où cette association a été mise en évidence, la fonction et le rôle de *FTO* étaient totalement inconnus. Chez l'homme, la duplication du locus 16q12.2 (incluant *FTO*) conduit à une forme syndromique de retard mental, dysmorphisme facial, malformations digitales et obésité (Stratakis et al. 2000). Il a depuis été montré que *FTO* appartient à la superfamille des dioxygénases Fe II et 2-oxoglutarate-dépendantes (Gerken et al. 2007; Sanchez-Pulido and Andrade-Navarro 2007) et catalyse la déméthylation de 3-méthylthymine de l'ADN simple brin. Son rôle exact dans la régulation de la balance énergétique étant encore inconnu, il était donc intéressant de tester l'effet de ses polymorphismes sur les comportements alimentaires.

Le second meilleur « *hit* » des GWAS d'obésité se situe dans un « désert génique » sur le chromosome 18. Sur le locus étendu se trouvent plusieurs prédictions de gènes, ainsi que *PMAIP1* à 280 kb et *MC4R* à 188kb de part et d'autre des polymorphismes associés avec une augmentation du risque d'obésité, de l'IMC ou du tour de taille (Chambers et al. 2008; Loos et al. 2008)(figure 20). Dans ce contexte, *MC4R* constitue le meilleur gène candidat.

Un moyen indirect de vérifier si le bloc de déséquilibre de liaison incluant le variant rs17782313 intervient dans la régulation de *MC4R* plutôt que des autres gènes du locus consiste à tester l'effet de ce polymorphisme sur la prise alimentaire, conséquence caractéristique d'un défaut d'expression ou d'activité de *MC4R*.

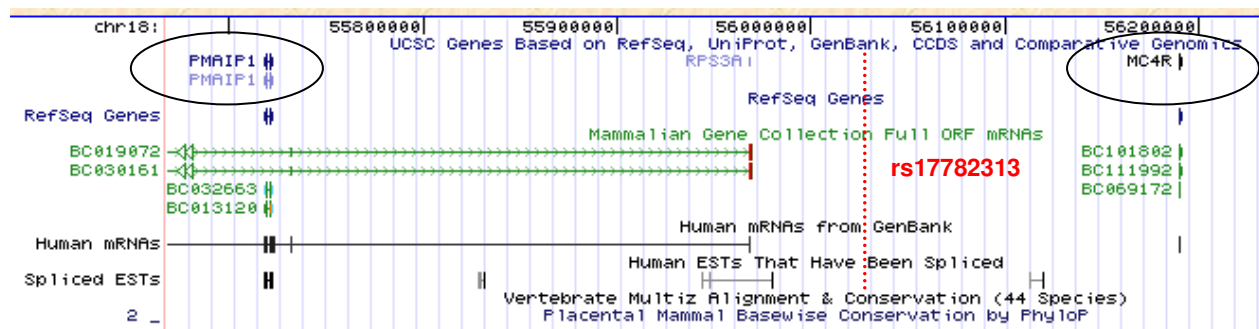


Figure 20: le locus du rs17782313 (copie d'écran de UCSC Genome browser)

L'analyse du comportement alimentaire s'intéresse non seulement à la quantité ingérée mais également aux sensations, l'attitude pendant le repas, la vitesse de consommation, la durée du repas, le contexte ; et l'évaluation repose sur différents types de questionnaires : les questionnaires de préférences alimentaires (salé, sucré, riche en graisses...), l'évaluation quantitative et qualitative des repas ou l'analyse des aspects plus comportementaux. Par ailleurs, il existe des questionnaires qui ciblent plus particulièrement les troubles du comportement alimentaire. Parmi ces troubles :

- l'anorexie se caractérise par un refus d'alimentation conduisant à un amaigrissement massif, provoqué par la peur obsessionnelle de grossir,
- la boulimie est caractérisée par des crises compulsives d'ingestion de grandes quantités de nourriture suivies de vomissements spontanés ou provoqués,
- le « Binge eating » a été défini par Spitzer comme une répétition d'épisodes d'hyperphagie sans contrôle de soi (Spitzer et al. 1993),
- le grignotage est plus une mauvaise habitude et un phénomène de société moderne qu'un trouble du comportement alimentaire, il définit la consommation répétitive sans faim de petites quantités d'aliments facilement accessibles, entre les repas ou en substitution de ceux-ci.

Des études ont montré l'héritabilité des comportements alimentaires (Carnell et al. 2008) et le lien causal des comportements alimentaires sur l'obésité (Carnell and Wardle 2008). C'est pourquoi nous avons génotypé le rs1421085 de *FTO* et le rs17782313 attribué à *MC4R* dans différentes populations d'individus obèses ou générales renseignées pour des traits du comportement alimentaire, afin d'expliquer leur association avec l'obésité. Dans 1109 familles françaises avec obésité familiale, les adultes ont répondu au questionnaire de Stunkard, qui s'intéresse aux composantes cognitives et comportementales de l'alimentation au travers de trois variables (restriction, désinhibition et faim) (Stunkard and Messick 1985) et les parents ont répondu à trois questions concernant leurs enfants : Ont-ils tendance à grignoter ? A consommer de larges quantités de nourriture pendant les repas ? Mangent-ils de façon brutale et rapide des aliments caloriquement denses entre les repas ? De plus, 1274 patients suisses morbides obèses ont répondu au questionnaire de Spitzer avant de subir une opération de chirurgie bariatrique (Spitzer et al. 1993). Parmi les traits de ce questionnaire, nous avons retenu la tendance à ingérer de grandes quantités pendant les repas et le grignotage. Ces mêmes phénotypes étaient disponibles dans les populations

générales d'adolescents finlandais de la cohorte NFBC1986 et d'adultes français d'âge moyen de la cohorte D.E.S.I.R., mais issus de questionnaires internes non validés, dont l'usage est par conséquent plus contestable.

Dans ces populations, le polymorphisme rs1421085 de *FTO* n'a pas été associé avec les troubles du comportement alimentaire. En revanche, le variant rs17782313 est associé avec une augmentation de la tendance à ingérer de grandes quantités de nourriture et une augmentation du grignotage chez les enfants obèses français. Il est également associé avec une augmentation du score de faim de Stunkard chez les adultes français obèses. Ce résultat est répliqué chez les adultes suisses obèses et les enfants finlandais mais l'augmentation n'est pas significative chez les adultes de la population générale D.E.S.I.R. De plus, nous disposons de données quantitatives dans cette dernière population et nous n'avons pas observé d'association des deux polymorphismes avec l'ingestion de calories ou de lipides (données non publiées, résultat non mentionné dans le papier).

Tester l'association des nouveaux SNPs associés avec l'obésité avec les comportements alimentaires est logique. D'autres équipes ont par conséquent testé la même association dans leurs cohortes. L'étude de *FTO* est bien plus complète que celle de *MC4R* mais les résultats ne sont pas encore consensuels (tableau 8).

Equipe	Population	SNP	Phénotype	Conclusion
(Wardle et al. 2009)	131 enfants de population générale GB	Rs9939609	Repas test	Augmentation de la consommation d'aliments palatables en l'absence de faim
(Wardle et al. 2008a)	3400 enfants de population générale GN	Rs9939609	Outil psychométrique du CEBQ	Diminution de la satiété
(Speakman et al. 2008)	Adultes écossais de population générale	Rs9939609	Enregistrement sur 7 jours	Augmentation de la quantité de nourriture ingérée
(Hakanen et al. 2009)	Adolescents finlandais de la STRIP Study suivi pendant 15 ans	Rs9939609	Enregistrement sur 7 jours	Absence d'association avec la quantité de nourriture ingérée
(Cecil et al. 2008)	97 enfants écossais de population générale	Rs9939609	Repas test	Augmentation de l'ingestion d'énergie sans augmenter le poids de la nourriture consommée
(Timpson et al. 2008)	8500 enfants de la cohorte ALSPAC	Rs9939609	Enregistrement sur 3 jours	Augmentation de la consommation de graisses et d'énergie totale
(Do et al. 2008)	Adultes de la Québec Family Study	Rs1781449	Questionnaire quantitatif interne	Absence d'association avec la quantité de nourriture ingérée

Tableau 8 : résultats des différentes études d'associations entre les SNPs de *FTO* et le comportement alimentaire

Les analyses de médiation réalisées par Wardle et coll. ont montré que la diminution de satiété explique partiellement l'augmentation d'adiposité associée avec l'allèle à risque dans une cohorte d'enfants (Wardle et al. 2008a). Même si son effet sur le poids est le plus fort observé à ce jour (+ 3 kg pour les homozygotes pour l'allèle à risque du rs9939609) (Frayling et al. 2007), les différences sur la prise alimentaire sont très minces et soumises aux aléas statistiques. De ce fait il est encore difficile malgré la littérature abondante de savoir si les variants à risque de *FTO* jouent sur la prise alimentaire, d'autant que cet effet peut être modulé par d'autres facteurs cérébraux et environnementaux via une modulation de son expression (Fredriksson et al. 2008). Par exemple, il a été proposé que l'effet du variant de *FTO* sur l'IMC n'est visible que chez les filles dans une population d'enfants suédois (Jacobsson et al. 2008) ; la proportion de femmes dans les différentes cohortes peut donc influencer le résultat. Mais l'explication la plus évidente réside dans le fait que les différents questionnaires utilisés ne ciblent pas exactement les mêmes phénotypes ; la diversité des résultats suggère alors un rôle de régulation très spécifique de *FTO* dans la prise alimentaire.

L'association des variants de *FTO* avec les paramètres de l'activité physique diverge également dans la littérature (Berentzen et al. 2008; Do et al. 2008; Hakanen et al. 2009; Jonsson and Franks 2009; Speakman et al. 2008; Timpson et al. 2008; Wardle et al. 2009) du fait des différents traits étudiés, de la façon dont les données sont obtenues (mesures en clinique ou questionnaires) et des populations.

A ce jour, seules deux autres équipes ont testé l'association du rs17782313 attribué à *MC4R* avec la prise alimentaire. Qi et coll. ont observé une augmentation de l'ingestion d'énergie et de graisse chez les femmes (Qi et al. 2008b). Afin de discriminer si les SNPs du locus du rs17782313 régulent plutôt *MC4R* ou *PMAIP1* (qui code Noxa, une protéine régulée par l'oncogène p53), l'association des rs12970134, rs477181 et rs502933 (en fort déséquilibre de liaison avec le rs17782313) avec la prise alimentaire et le risque de survenue du cancer colorectal a été testée dans 3800 individus écossais. Les trois SNPs ne sont associés ni avec le risque de cancer colorectal ni avec l'ingestion d'énergie quotidienne dans cette population (Tenesa et al. 2009).

ARTICLE 4

Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations.

Cauchi S, Stutzmann E, Cavalcanti-Proença C, Durand E, Pouta A, Hartikainen AL, Marre M, Vol S, Tammelin T, Laitinen J, Gonzalez-Izquierdo A, Blakemore AI, Elliott P, Meyre D, Balkau B, Järvelin MR, Froguel P.

J Mol Med. 2009 May;87(5):537-46.

Combined effects of *MC4R* and *FTO* common genetic variants on obesity in European general populations

Stéphane Cauchi · Fanny Stutzmann · Christine Cavalcanti-Proença ·
Emmanuelle Durand · Anneli Pouta · Anna-Liisa Hartikainen · Michel Marre ·
Sylviane Vol · Tuija Tammelin · Jaana Laitinen · Arturo Gonzalez-Izquierdo ·
Alexandra IF Blakemore · Paul Elliott · David Meyre · Beverley Balkau ·
Marjo-Riitta Järvelin · Philippe Froguel

Received: 9 October 2008 / Revised: 5 January 2009 / Accepted: 28 January 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Genome-wide association scans recently identified common polymorphisms, in intron 1 of *FTO* and 188 kb downstream *MC4R*, that modulate body mass index (BMI) and associate with increased risk of obesity. Although their individual contribution to obesity phenotype is modest, their combined effects and their interactions with environmental factors remained to be evaluated in large general populations from birth to adulthood. In the present study, we analyzed independent and combined effects of the *FTO* rs1421085 and *MC4R* rs17782313 risk alleles on BMI, fat mass, prevalence and incidence of obesity and subsequent type 2 diabetes (T2D) as well as their interactions with physical activity levels and gender in two European prospective population-based cohorts of

4,762 Finnish adolescents (NFBC 1986) and 3,167 French adults (D.E.S.I.R.). Compared to participants carrying neither *FTO* nor *MC4R* risk allele (20–24% of the populations), subjects with three or four risk alleles (7–10% of the populations) had a 3-fold increased susceptibility of developing obesity during childhood. In adults, their combined effects were more modest (~1.8-fold increased risk) and associated with a 1.27% increase in fat mass ($P=0.001$). Prospectively, we demonstrated that each *FTO* and *MC4R* risk allele increased obesity and T2D incidences by 24% ($P=0.02$) and 21% ($P=0.02$), respectively. However, the effect on T2D disappeared after *adjustment* for BMI. The Z-BMI and ponderal index of newborns homozygous for the rs1421085 C allele were 0.1 units ($P=0.02$) and

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00109-009-0451-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Marjo-Riitta Järvelin and Philippe Froguel equally contributed to this work.

S. Cauchi · F. Stutzmann · C. Cavalcanti-Proença · E. Durand ·
D. Meyre · P. Froguel
CNRS 8090—Institute of Biology, Pasteur Institute,
Lille, France

A. Pouta
Public Health Science and General Practice, University of Oulu,
Oulu, Finland

A. Pouta · A. Gonzalez-Izquierdo · P. Elliott · M.-R. Järvelin
Epidemiology and Public Health, Imperial College London,
London, UK

A.-L. Hartikainen
Department of Clinical Sciences/Obstetrics and Gynecology,
University of Oulu,
Oulu, Finland

M. Marre
INSERM U695,
Paris, France

M. Marre
René Diderot–Paris 7 University,
Paris, France

M. Marre
Endocrinology–Diabetology and Nutrition, Bichat Claude
Bernard Hospital,
Paris, France

S. Vol
Regional Institute for Health,
La Riche, France

0.27 g/cm³ ($P=0.005$) higher, respectively, than in those without *FTO* risk allele. The *MC4R* rs17782313 C allele was more associated with obesity and fat mass deposition in males than in females ($P=0.003$ and $P=0.03$, respectively) and low physical activity accentuated the effect of the *FTO* polymorphism on BMI increase and obesity prevalence ($P=0.008$ and $P=0.01$, respectively). In European general populations, the combined effects of common polymorphisms in *FTO* and *MC4R* are therefore additive, predictive of obesity and T2D, and may be influenced by interactions with physical activity levels and gender, respectively.

Keywords Obesity · SNP · Population genetics

Introduction

Genome-wide association (GWA) scans have identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) consistently associated with obesity predisposition and located in the *FTO* locus [1–4]. Each rs9939609A allele (chr16:52,378,028; dbSNP build 129) increased body weight by 1.2 kg in adult general populations and conferred a 31% higher risk of developing obesity [1]. Similar effect sizes were observed in children and adolescents in whom each *FTO* risk allele increased the body mass index (BMI) by 0.08–0.12 Z-score units, while the risk of being overweight and obese

increased ~1.27- and ~1.35-fold with each additional risk allele [1]. Independently, we observed that the rs1421085 SNP (chr16:52,358,455; dbSNP build 129), in strong linkage disequilibrium with the rs9939609 SNP ($r^2=0.93$; based on CEU HapMap, NCBI B36 assembly), was also a good proxy for obesity [5]. Recently, the rs17782313 C allele (chr18:56,002,077; dbSNP build 129), located 188 kb downstream of *MC4R*, was similarly associated with childhood obesity (OR=1.30 [1.20–1.41]) [4]. Each *MC4R* and *FTO* risk allele was found to be associated with higher fat mass in children (Z-score units per rs9939609A allele=0.12 [0.08–0.16]; Z-score units per rs17782313 C allele=0.10 [0.05–0.14]) [1, 4]. However, none of them were found to affect birth weight [1, 4, 6].

Recent studies reported interactions between *FTO* genetic variants and physical activity as well as interactions with gender in determining risk of obesity [7–9]. Subjects homozygous for the *FTO* risk allele were found to be two BMI units heavier if they were physically inactive whereas physically active individual homozygote for the same allele had the same BMI as the non-carriers for the *FTO* risk allele [7]. In another study, when stratified by gender, the *FTO* variant rs9939609 showed association with obesity and BMI among girls ($P=0.006$ and 0.004, respectively) but not among boys [8].

In the present study, independent and combined effects of the *FTO* rs1421085 risk alleles on BMI, prevalence and incidence of obesity and subsequent type 2 diabetes (T2D), and fat mass were assessed in two large prospective populations of Finnish adolescents (NFBC 1986; Northern Finland 1986 Birth Cohort) and French middle-aged adults (D.E.S.I.R.; “Données Épidémiologiques sur le Syndrome d’Insulino-Résistance”). Furthermore, interactions with gender and physical activity levels during adolescence and adulthood were analyzed with body measures from birth to adulthood.

Results

Characteristics of French and Finnish participants

We first analyzed genotypic distributions in the whole groups of French and Finnish subjects. Regarding the *FTO* rs1421085 SNP, no genotypic heterogeneity (chi square=1.4, $df=2$, $P=0.5$) was found between the French adults from the D.E.S.I.R. cohort (1,614 T/T, 2,303 T/C, and 809 C/C; C allele frequency=41.5%) and the Finnish children from the NFBC 1986 (1,951 T/T, 2,650 T/C, and 931 C/C; C allele frequency=40.8%). However, the *MC4R* rs17782313C allele was more prevalent (chi square=110.3, $df=2$, $P=1.1 \times 10^{-24}$) in French participants (2,525 T/T, 1,575 T/C, and 244 C/C; C allele frequency=23.7%)

T. Tammelin · J. Laitinen
Finnish Institute of Occupational Health,
Helsinki, Finland

A. IF Blakemore · P. Froguel (✉)
Genomic Medicine, Hammersmith Hospital,
Imperial College London,
Du Cane Road,
London W12 0NN, UK
e-mail: p.froguel@imperial.ac.uk

B. Balkau
INSERM U780–IFR69,
Villejuif, France

B. Balkau
University of Paris-Sud,
Paris, France

M.-R. Järvelin
Institute of Health Sciences and Biocenter Oulu,
University of Oulu,
Oulu, Finland

M.-R. Järvelin
Department of Child and Adolescent Health,
National Public Health Institute,
Helsinki, Finland

Table 1 Clinical characteristics of the studied populations

Variable	NFBC 1986			D.E.S.I.R.							
	Baseline	Time 7	Time 16	Baseline		Time 3		Time 6		Time 9	
	NG	NG	NG	NG	T2D	NG	T2D	NG	T2D	NG	T2D
<i>N</i> (total)	4,802	4,016	4,780	3,167	120	2,713	197	2,395	241	2,351	307
<i>N</i> (males/ females)	2,306/ 2,496	1,945/ 2,071	2,297/ 2,483	1,488/ 1,679	86/34	1,234/ 1,479	136/61	1,065/ 1,330	170/71	1,011/ 1,340	215/92
Age (years)	0	7	16	46.6± 9.68	55.37± 7.63	49.36± 9.71	57.0± 8.35	52.07± 9.7	59.3± 8.51	54.45± 9.66	61.64± 8.72
Z-BMI	0.02±0.98	-0.01± 0.99	0.02± 1.01	0.00±0.9	0.95± 1.01	0.01± 0.91	0.9± 1.05	0.02±0.9	1.01± 1.06	0.03± 0.91	0.91± 1.02
BMI (kg/m ²)	13.95±1.3	16.19± 2.07	21.29± 3.79	24.31± 3.53	28.98± 4.45	24.55± 3.68	29.0± 4.75	24.75± 3.65	29.58± 5.06	24.9± 3.77	29.09± 4.64
Fat mass (%)	na	na	na	na	na	na	na	27.22±8	31.61± 8.26	27.82± 8.16	31.39± 8.12

Data on age, BMI, and fat mass are presented as mean±standard deviation

N, number of individuals; *NG*, normoglycemic individuals (fasting glucose <6.1 mmol/l); *T2D*, type 2 diabetic subjects (fasting plasma glucose ≥7.0 mmol/l); *Time n*, *n* years after baseline

than in Finnish subjects (3,790 T/T, 1,620 T/C, and 178 C/C; C allele frequency=17.7%). All further analyses on BMI, obesity, and fat mass were restricted to normoglycemic individuals (fasting glucose <6.1 mmol/l) who were not on lipid- or glucose-lowering medications. Clinical characteristics of the studied populations are reported in Table 1.

MC4R and *FTO* effects on BMI

The *MC4R* and *FTO* effects on the BMI were first investigated independently of each other (Table 2). In Finnish newborns, carrying the *FTO* rs1421085 C allele was associated with a higher Z-BMI (*P*=0.02) whereas carrying the *MC4R* rs17782313 C allele had no effect (*P*=

Table 2 Effects of *FTO* and *MC4R* genetic variants on Z-score of BMI (or BMI) from birth to adulthood

Gene	Cohort	Age at examination	Genotypes			<i>P</i> value	SNP ^x gender	SNP ^x physical activity
			T/T	T/C	C/C			
<i>FTO</i> rs1421085	NFBC 1986	Birth ^a	-0.02±0.98 _(1,661)	0.03±0.98 _(2,222)	0.08±1.02 ₍₈₁₀₎	0.02	0.84	na
		7 years ^a	-0.09±0.9 _(1,399)	0.02±1.01 _(1,863)	0.06±1.08 ₍₆₉₈₎	0.0002	0.37	na
		16 years ^a	-0.07±0.94 _(1,666)	0.04±1.01 _(2,228)	0.18±1.09 ₍₈₁₆₎	2.32 × 10 ⁻⁸	0.33	0.008
	D.E.S.I.R.	Adult ^a	-0.04±0.93 _(3,516)	0.03±0.89 _(4,926)	0.11±0.9 _(1,805)	0.003	0.20	0.20
		Adult ^b	24.48±3.8 _(3,516)	24.65±3.55 _(4,926)	24.84±3.79 _(1,805)	0.006	0.30	0.09
<i>MC4R</i> rs17782313	NFBC 1986	Birth ^a	0.03±0.98 _(3,207)	-0.01±0.99 _(1,386)	0.14±1.02 ₍₁₄₇₎	0.84	0.76	na
		7 years ^a	-0.03±0.96 _(2,714)	0.03±1.03 _(1,165)	0.2±1.14 ₍₁₁₆₎	0.009	0.24	na
		16 years ^a	0±0.99 _(3,219)	0.07±1.05 _(1,393)	0.18±1.02 ₍₁₄₆₎	0.002	0.35	0.40
	D.E.S.I.R.	Adult ^a	-0.07±0.94 _(5,486)	-0.01±0.93 _(3,254)	0.12±0.89 ₍₅₀₁₎	0.04	0.10	0.20
		Adult ^b	24.29±3.77 _(5,486)	24.44±3.8 _(3,254)	24.91±3.7 ₍₅₀₁₎	0.05	0.30	0.10

Data are presented as mean Z-BMI or BMI±standard deviation (number of available observations). *P* values are from linear regression models adjusted for gender, age (or gestational age), and physical activity (only available at 16 years of age and during adulthood). In adults, mixed models were used, taking into account the four times of follow-up.

^a Z-BMI

^b BMI

^x Interaction term

0.84). The ponderal index (PI) is another way of characterizing the relationship of height to mass for an individual (see ‘Materials and methods’). The *FTO* risk allele was also associated with higher PI in Finnish newborns (T/T=27.48±2.36 g/cm³, T/C=27.66±2.3 g/cm³, C/C=27.75±2.46 g/cm³; $P=0.005$) whereas no effect was found for the *MC4R* SNP (T/T=27.63±2.35 g/cm³, T/C=27.54±2.33 g/cm³, C/C=27.81±2.54 g/cm³; $P=0.74$).

Later in life (Table 2), the *FTO* and *MC4R* risk alleles were found to have similar effects on Z-BMI (or BMI), at 7 years of age ($P=0.0002$ and $P=0.009$, respectively), at 16 years of age ($P=2.32\times 10^{-8}$ and $P=0.002$, respectively), and finally during adulthood ($P=0.006$ and $P=0.05$, respectively).

Then, we assessed the effect of carrying increasing number of *FTO* and *MC4R* risk alleles on Z-BMI (or BMI). Each allele increased Z-BMI of 0.08 [0.04–0.11] units ($P=7.6\times 10^{-6}$; Fig. 1a) at 7 years of age, of 0.11 [0.08–0.14] units ($P=2.1\times 10^{-10}$; Fig. 1b) at 16 years of age, and increased BMI of 0.92 [0.36–1.40] units ($P=1\times 10^{-3}$; Fig. 1c) during adulthood.

Low physical activity was found to accentuate the effect of the *FTO* SNP on Z-BMI in Finnish adolescents of 16 years of age ($P=0.008$; Figure S1a of the Electronic supplementary material, Table 2), whereas in the French middle-aged D.E.S.I.R. cohort, no clear interaction was detected ($P=0.09$, Table 2). However, for the *MC4R* SNP, such interaction was found neither in adolescents ($P=0.4$, Table 2) nor in adults ($P=0.1$, Table 2). For either SNP, the effects on BMI did not differ between genders (Table 2).

MC4R and *FTO* association with obesity and subsequent T2D risks

We then assessed the *FTO* and *MC4R* effects on obesity (Table 3). Finnish children and French adults were considered obese cases if their Z-BMI ≥ 1.90 (97th percentile) or if their BMI ≥ 30 kg/m² during the follow-up, respectively. They were considered controls if their Z-BMI ranged from -1.20 (10th percentile) to 1.30 (90th percentile) or if their BMI <25 kg/m² during the follow-up, respectively. None of the SNPs were associated with macrosomia prevalence at birth. However, the *FTO* and *MC4R* SNPs were associated with obesity prevalence at 7 years (OR=1.41 [1.14–1.75], $P=0.01$ and OR=1.32 [1.02–1.72], $P=0.04$, respectively) and at 16 years of age (OR=1.44 [1.19–1.75], $P=0.0002$ and OR=1.44 [1.14–1.81], $P=0.002$, respectively). In French adults, after 9 years of follow-up, the *MC4R* rs17782313 C allele was also associated with obesity (OR=1.29 [1.01–1.66], $P=0.04$) in contrast to the *FTO* rs1421085 C allele (OR=1.17 [0.95–1.44], $P=0.1$). The population risk of obesity

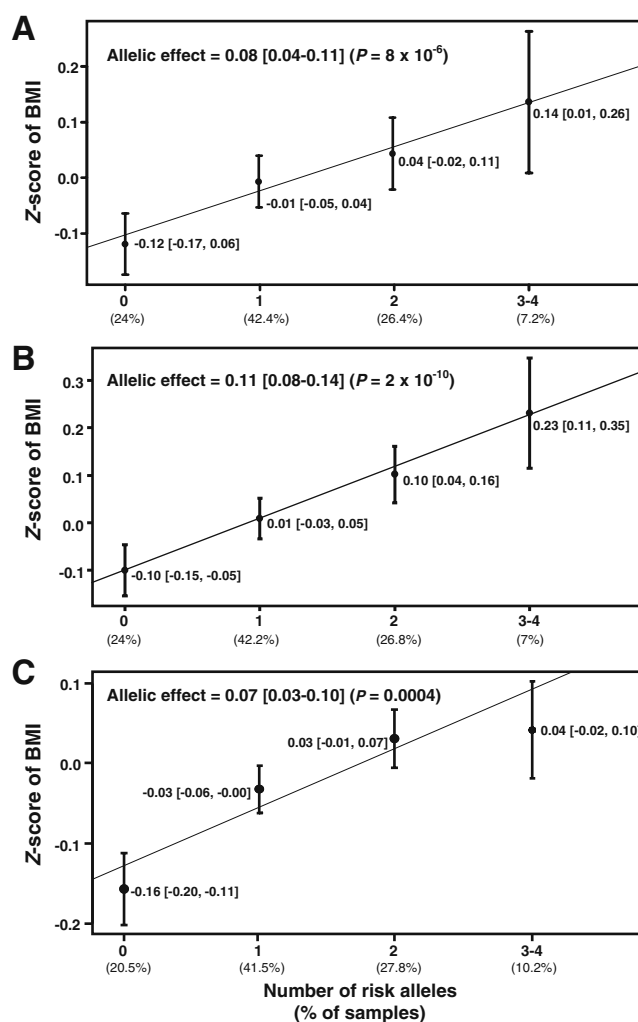


Fig. 1 Effects on Z-BMI in children (7 years of age, NFBC 1986, **a**), adolescents (16 years of age, NFBC 1986, **b**), and middle-aged adults (D.E.S.I.R., **c**) carrying increasing numbers of *FTO* and *MC4R* risk alleles

attributable to the *FTO* SNP (PAR) was estimated at 0.14 [0.05–0.23] and 0.15 [0.07–0.23] in children and adolescents, respectively. For the *MC4R* genetic variant, the PAR was estimated at 0.05 [0.00–0.11], 0.07 [0.02–0.13], and 0.06 [0.00–0.13] at 7 years, 16 years, and during adulthood, respectively.

Then, we evaluated the effect of carrying increasing number of *FTO* and *MC4R* risk alleles on the development of obesity. The risk increased by 1.36 [1.15–1.60] ($P=0.0003$; Fig. 2a) odds at 7 years of age and by 1.44 [1.24–1.67] ($P=2\times 10^{-6}$; Fig. 2b) odds at 16 years of age. The cumulative effect of *FTO* and *MC4R* risk alleles on obesity and subsequent T2D prevalence and incidence was then measured in adults. Each allele was associated with OR and hazard ratio (HR) of 1.21 [1.03–1.41] ($P=0.02$; Fig. 2c) and 1.24 [1.04–1.49] ($P=0.02$; Fig. 3a) for obesity, and of 1.19

Table 3 Association of *FTO* and *MC4R* genetic variants with obesity from birth to adulthood

Gene	Cohort	Age at examination	Controls		Cases		Allelic OR [95% CI]	P value	SNP ^x gender	SNP ^x physical activity	
			T/T	T/C	T/T	T/C					
<i>FTO</i> rs1421085	NFBC 1986	Birth	1,336 _(0.35)	1,794 _(0.48)	634 _(0.17)	72 _(0.49)	28 _(0.19)	1.12 [0.89–1.42]	0.33	0.80	na
		7 years	1,221 _(0.36)	1,574 _(0.47)	570 _(0.17)	94 _(0.54)	39 _(0.22)	1.42 [1.15–1.75]	0.001	0.56	na
		16 years	1,435 _(0.36)	1,904 _(0.47)	684 _(0.17)	115 _(0.47)	66 _(0.27)	1.42 [1.17–1.72]	0.0004	0.60	0.90
	D.E.S.I.R.	Adult	373 _(0.36)	483 _(0.47)	166 _(0.16)	107 _(0.45)	50 _(0.21)	1.17 [0.95–1.44]	0.10	0.28	0.01
		Birth	2,581 _(0.68)	1,101 _(0.29)	120 _(0.03)	41 _(0.28)	6 _(0.04)	1.02 [0.75–1.38]	0.90	0.37	na
		7 years	2,318 _(0.68)	981 _(0.29)	93 _(0.03)	60 _(0.34)	8 _(0.05)	1.32 [1.01–1.72]	0.04	0.58	na
D.E.S.I.R.	Adult	2,762 _(0.68)	1,179 _(0.29)	121 _(0.03)	92 _(0.37)	9 _(0.04)	1.43 [1.13–1.80]	0.003	0.10	0.30	
	Birth	636 _(0.61)	363 _(0.35)	48 _(0.05)	82 _(0.38)	16 _(0.08)	1.29 [1.01–1.66]	0.04	0.003	0.23	
	16 years										

Data are presented as number of individuals (proportion within case or control group). P values are from logistic regression models adjusted for age (or gestational age), gender, and physical activity (only available at 16 years of age and during adulthood)

^x Interaction term

[1.04–1.37] ($P=0.01$, Figure S2 of the Electronic supplementary material) and 1.21 [1.04–1.41] ($P=0.01$, Fig. 3b) for T2D, respectively. No effect on T2D was detected after adjustment for BMI (OR=1.13 [0.98–1.31], $P=0.1$; HR=1.12 [0.96–1.31], $P=0.1$). These data suggest that the effect of both SNPs on T2D risk is driven by their effect on BMI. However, no significant interaction between BMI and the number of risk alleles was observed ($P=0.06$).

Low physical activity was found to accentuate the effect of the *FTO* SNP on obesity in French adults ($P=0.01$; Figure S1b of the Electronic supplementary material, Table 3). In the same middle-aged population, no such interaction was found with the *MC4R* SNP ($P=0.23$,

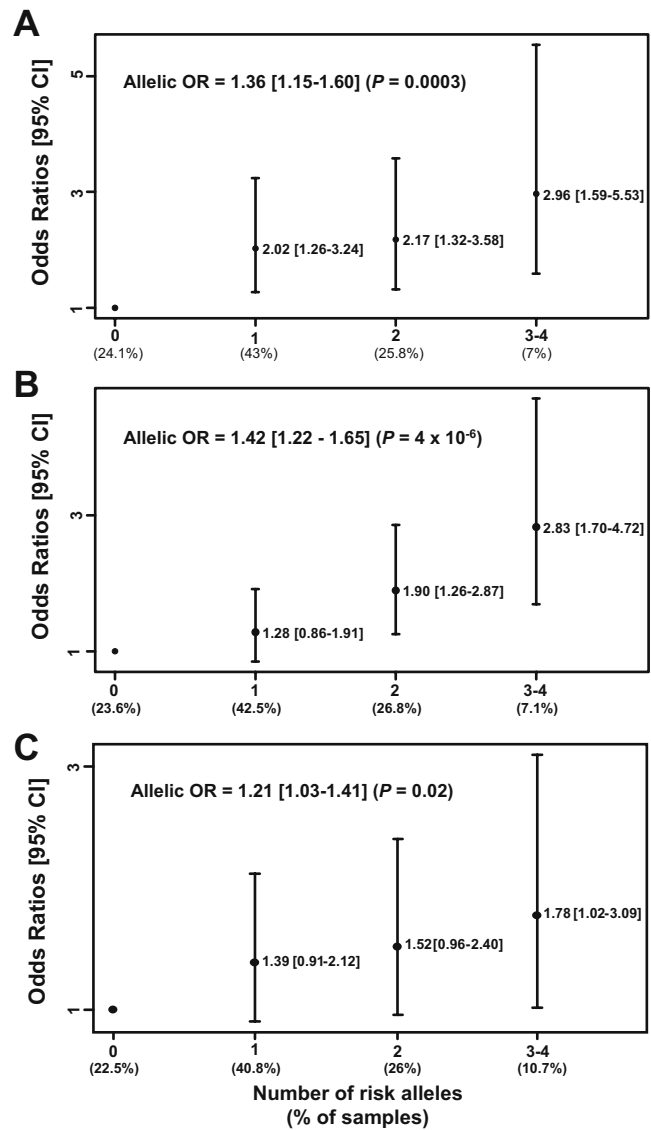


Fig. 2 Effects on obesity in children (7 years of age, NFBC 1986, a), adolescents (16 years of age, NFBC 1986, b), and middle-aged adults (D.E.S.I.R., c) carrying increasing numbers of *FTO* and *MC4R* risk alleles

Fig. 3 Incidence of obesity (a) and T2D (b) in adult participants (D.E.S.I.R.) carrying increasing number of *FTO* and *MC4R* risk alleles during the 9 years of follow-up. Proportion of incident T2D cases: circle (mean) and solid line (95% CI). Hazard ratio: diamond (mean) and dashed line (95% CI)

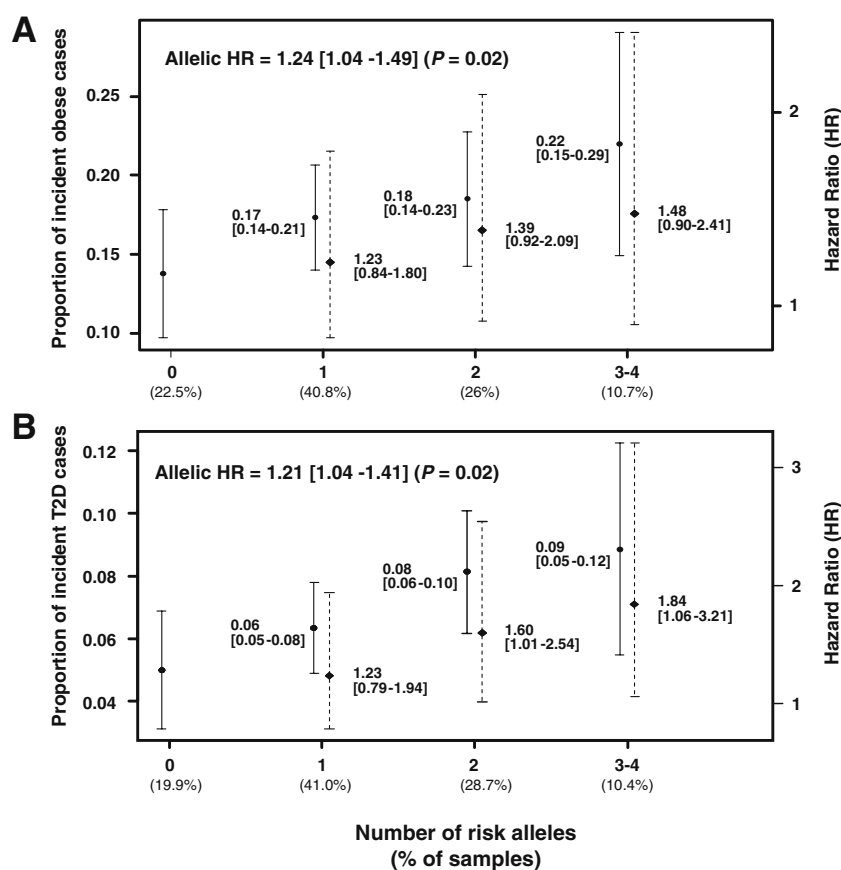


Table 3). However, the effect of this SNP on obesity was higher in men than in women during adulthood ($P=0.003$; Figure S3a of the Electronic supplementary material, Table 3). No such interaction was detected with the *FTO* SNP ($P=0.28$, Table 3).

MC4R and *FTO* effects on fat mass in French adults

Fat mass was only available in D.E.S.I.R. participants after 6 and 9 years of follow-up (Table 1 of the Electronic supplementary material). Both *FTO* and *MC4R* SNPs were associated with higher fat mass ($P=0.04$ and $P=0.03$, respectively). The combined effect of *FTO* and *MC4R* risk alleles on fat mass was then calculated in the same population of middle-aged participants. Each allele increased fat mass of 0.48 [0.19–0.76] % ($P=0.001$; Figure S4 of the Electronic supplementary material).

The effect of the *MC4R* rs17782313 C allele on fat mass was found to be accentuated in men in comparison with women ($P=0.03$; Figure S3b of the Electronic supplementary material) whereas the effect of the *FTO* rs1421085 C allele was similar in men and women ($P=0.4$). For both SNPs, no interaction with physical activity was detected ($P=0.2$ and $P=0.4$, respectively).

Discussion

Obesity is the result of complex interactions between behavioral, environmental, and genetic factors that modulate individual responses to diet and physical activity [10]. Although a large number of genetic variants and quantitative trait loci that potentially predispose to obesity-related traits have been reported, only few of these variants and loci have been convincingly confirmed [11]. This has been mainly caused by the fact that most studies were weak in terms of study design, phenotype assessment, marker coverage of genes, or had statistically underpowered sample sizes. Recently, GWA followed by large-scale replication studies have provided two major successes in the field of obesity genetics with the discovery of *FTO* and *MC4R* loci [1, 4]. Their role as genes predisposing to higher BMI, obesity [2–5, 7, 12–14], fat mass [1, 4, 7, 13, 15], and subsequently to T2D risk [1, 7, 16–20] has then been confirmed in many populations. However, because their respective influence was found to be modest, their combined effects needed to be further evaluated from birth to adulthood.

In a previous study, when comparing individuals with no risk alleles at either loci with those homozygous at both, the

point estimate of the BMI difference amounted to ~ 1.17 kg/m² in adults and to 0.56 Z-score units in children [4]. In the present study, similar additive effects were found in two large prospective cohorts of Finnish children and French adults with consequences on fat mass, obesity prevalence, and incidence. Compared to participants carrying neither *FTO* nor *MC4R* risk allele (20–24% of the populations), subjects with three or four risk alleles (7–10% of the populations) had a 3-fold increased susceptibility of developing obesity during childhood. In adults, their combined effects were modest (~ 1.8 -fold increased risk) and associated with a 1.27% increase in fat mass. Prospectively, we demonstrated that each *FTO* and *MC4R* risk allele was a predictive factor for obesity and subsequently for T2D, associated with incidences increased by 24% and 21%, respectively, during 9 years of follow-up. The association with T2D disappeared after adjustment for BMI. On the whole, both genetic variants had similar effect size estimates. However, the *FTO* rs1421085 C allele ($\sim 40\%$) was about twice as frequent as the *MC4R* rs17782313 C allele ($\sim 20\%$), with PAR evaluated at $\sim 14\%$ and $\sim 7\%$, respectively, suggesting a more modest impact of the *MC4R* SNP than the *FTO* genetic variant in European general populations.

Interestingly, both SNPs were found to have different effects on birth weight and to differentially interact with physical activity or gender. While no association was previously observed with birth weight or PI at birth [1, 6, 7], *FTO* SNPs were, however, associated with increased weight and PI at the age of 2 weeks [6]. In our study, we found that the Z-BMI and PI of newborns homozygous for the rs1421085 C allele were 0.1 units and 0.27 g/cm³ higher, respectively, than in those without *FTO* risk allele. However, we could not assess the influence of the mother's genotype since only ~ 200 DNA samples were available. Further investigations on birth weight should therefore be pursued to determine the role of *FTO*. In agreement with what was found previously [4], no association with birth parameters was detected for the *MC4R* rs17782313 C allele.

Interactions with physical activity were not detected when testing the effects of *MC4R* but were found when testing the effects of *FTO* on Z-BMI, at 16 years of age and on obesity, during adulthood. Our data confirm previous findings [7, 9] but are in contradiction with others, hypothesizing that homozygous carriers of the rs9939609A allele may not have low leisure time physical activity [21]. However, questionnaires may not adequately reflect true underlying physical activity. Further studies are therefore necessary to clearly determine how physical activity influences the effects of *FTO* SNPs.

Contrary to what was reported [8], *FTO* was not differentially associated with anthropometric parameters

between men and women. Intriguingly, however, we found that the *MC4R* rs17782313 C allele was more associated with obesity and fat mass deposition in men than in women. In *MC4R*-deficient mice, in contrast, homozygous mutant females were on average twice as heavy as their wild-type siblings, while homozygous mutant males were approximately 50% heavier than wild-type controls [22]. Similarly, the observed effect of *MC4R* monogenic mutations was about twice as strong in females than in males, with BMI differences between mutation carriers and wild-type relatives of approximately 9.5 and 4 kg/m² in middle-aged women and men, respectively [23, 24]. The appetite-suppressing effect of MC4R in response to α -MSH may therefore be regulated by sex hormones in interaction with the etiologic SNP. Interestingly, testosterone replacement to castrated rats significantly reduced *POMC* mRNA levels suggesting that male sex steroids have an inhibitory effect on the biosynthesis of POMC in the medial basal hypothalamus [25].

Therefore, to confirm our results, this interaction with gender needs to be replicated in other cohorts when assessing the effect of *MC4R* common variants on weight gain.

In European general populations, common polymorphisms in *MC4R* and *FTO* may therefore be influenced by other parameters, such as physical activity or gender, and their combined effects play an important role in fat mass deposition, obesity prevalence, and incidence. Additional GWA studies and meta-analyses of compatible datasets should identify additional obesity-susceptibility loci, but they are likely to also have modest effect sizes potentially influenced by environmental factors. From a population perspective, only the combined effect of the most potent genetic variants should be then considered.

Materials and methods

Participants of the Finnish and French prospective cohorts

Clinical characteristics of the studied populations were reported in Table 1. All of them were white Caucasians.

The Northern Finland Birth Cohort (NFBC) 1986 is a genetically homogenous cohort of Caucasian children born in the two northernmost provinces of Finland, Oulu and Lapland, with expected dates of birth between July 1, 1985 and June 30, 1986. The mothers were enrolled during routine visits to communal maternity health centers during the 25th week of gestation. Ninety nine percent of eligible women and their children were included into the cohort. Obstetrical and birth data were coded from hospital records at the time of delivery. A postal questionnaire concerning the health of their child was mailed to parents when

children were 7 years old. Ninety percent of the parents responded to the questionnaire. At the same time, information on the child's health was supplemented from hospital records. At 16 years of age, 74% of children attended a clinical examination, including blood draw. The follow-up at 7 years of age was not as complete as at 16 years of age regarding BMI and, for some individuals, gestational age was not available at birth.

The D.E.S.I.R. ("Data from an Epidemiological Study on the Insulin Resistance syndrome") cohort is a French cohort of middle-aged subjects (aged between 30 and 65 years at inclusion) who were clinically and biologically evaluated at inclusion and at 3, 6, and 9 years after the entry into the study [26]. Participants were recruited from volunteers insured by the French social security system, which offers periodic health examinations free of charge. They came from ten health examination centers in the western-central part of France. The protocol was approved by the Ethics Committee for the Protection of Subjects for Biomedical Research of Bicêtre Hospital. Among the 5,212 subjects of the D.E.S.I.R. cohort, 3,786 individuals were followed during the entire study.

All participants signed an informed consent and our protocol was approved by local ethic committees. We have shown that genetic variations may be differentially prevalent within type 2 diabetic and normoglycemic subjects if one compares obese and non-obese groups [2–6]. Furthermore, the proportion of type 2 diabetic participants is lower in non-obese individuals than in obese subjects, leading to potential bias. Finally, most diabetic participants take drugs potentially influencing BMI, obesity, and/or fat mass. For those reasons, all analyses on BMI, obesity, and fat mass were restricted to normoglycemic individuals (fasting glucose <6.1 mmol/l) who were not on lipid- or glucose-lowering medications. Subjects excluded from analysis were presented in Table 2 of the Electronic supplementary material.

Measures

Body mass index (BMI) is defined as the individual's body weight (kg) divided by the square of their height (m). The ponderal index (PI) is a way of characterizing the relationship of height to mass for an individual. It is determined by the ratio of mass (g) divided by the cube root of height (cm). This fraction is multiplied by 100. Fat mass percentage was calculated using bio-electrical impedance analysis (TBF-300P model by Tanita, Neuilly-Sur-Seine, France) on lightly dressed barefoot subjects with an empty bladder [27–29]. The *Z*-score of BMI (age and gender adjusted) was used rather than BMI in children. Children with *Z*-BMI ≥ 1.90 (97th percentile) were considered as obese cases and those with -1.20 (10th percentile) $< Z$ -BMI

< 1.30 (90th percentile) were considered as controls. Middle-aged adults from D.E.S.I.R. with $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ during the follow-up were defined as obese cases whereas those with $\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$ were defined as controls. Physical activity was assessed in both NFBC 1986 (only at 16 years of age) and D.E.S.I.R. using different questionnaires. In adults, this variable represented the number of times a participant was involved in a physical activity per week and in adolescents, this number represented categories based on hours of physical activity during the week (1 = inactive, less than 1 h a week; 2 = somewhat active, 1–3 h a week; 3 = active, four or more hours per week). Population attributable risk (PAR) was calculated using the following formula $(fR (RR-1))/(1+fR (RR-1))$, *fR* representing the frequency the risk allele and *RR* the relative risk [26]. Two classes of glycemic status were defined according to 1997 American Diabetes Association criteria: normoglycemia, fasting plasma glucose <6.1 mmol/l and type 2 diabetic (T2D), and fasting plasma glucose ≥ 7.0 mmol/l.

SNP genotyping

The rs1421085 and rs17782313 SNPs were genotyped using an allelic discrimination assay-by-design TaqMan method on ABI 7900 (Applied Biosystems). There was a 97–99% genotyping success rate. The genotyping error rate was assessed by randomly sequencing 384 participants from D.E.S.I.R. and NFBC 1986. No difference was found with the first genotyping results. The genotypic distributions of both polymorphisms were in Hardy–Weinberg equilibrium in both prospective cohorts.

Statistical analysis

The effects of *FTO* and *MC4R* SNPs on obesity and *Z*-BMI (or BMI) were first calculated separately. The quantitative effects and the odds ratios (ORs) of obesity were measured by linear regression and logistic regression models, respectively, adjusted for age (or gestational age), gender, and physical activity (only available at 16 years of age and during adulthood). We used linear mixed models to analyze repeated measures of quantitative phenotypes in D.E.S.I.R. population. Gene–Physical activity and Gene–Gender interactions (i.e., deviation from a multiplicative model) were tested by comparing a logistic regression model including only the main effects to another model including the main effects and an interaction term with a likelihood ratio test. We further explored the way a gene interacts with physical activity or with gender by drawing interaction plots. In all analyses, no interactions between the *FTO* rs1421085 and *MC4R* rs17782313 SNPs were detected. We explored the combined effect of both *FTO* and *MC4R* SNPs using linear, mixed, and logistic regression models, including a variable

for the number of risk alleles in order to quantify the risk per supplementary allele for all the variants included in the model. The ORs [95% CI] corresponding to a given number of risk alleles compared to the reference group were also calculated. Combined association of both SNPs on obesity incidence were presented using Kaplan–Meier survival curves and were analyzed using Cox proportional hazard models adjusted for gender and physical activity. The hazard ratio (HR) represents an estimate of the ratio of the hazard rate in the cases versus the control group. The hazard rate is the probability that if the event in question has not already occurred, it will occur in the next time interval, divided by the length of that interval. The time interval is made very short so that in effect the hazard rate represents an instantaneous rate. An assumption of proportional hazards regression is that the hazard ratio is constant over time. Incident obesity was defined as BMI ≥ 30 kg/m² among subjects who were not obese at baseline. Incident T2D was defined as fasting plasma glucose ≥ 7.0 mmol/l among subjects who were not T2D at baseline.

All *P* values were two sided. R statistics (version 2.6.1) software was used for general statistical analysis.

Acknowledgements This work was partly supported by the French Government “*Agence Nationale de la Recherche*”, and the charities: “*Association Française des Diabétiques*” and “*Programme national de recherche sur le diabète*”. We thank Marianne Deweider and Frederic Allegaert for the DNA bank management. We are indebted to all subjects who participated to this study. The D.E.S.I.R. study has been supported by CNAMTS, Lilly, Novartis Pharma, and Sanofi-Aventis, by INSERM (“*Réseaux en Santé Publique, Interactions entre les déterminants de la santé*”), by “*Association Diabète Risque Vasculaire*”, “*Fédération Française de Cardiologie*”, “*Fondation de France*”, ALFEDIAM, ONIVINS, Ardix Medical, Bayer Diagnostics, Becton Dickinson, Cardionics, Merck Santé, Novo Nordisk, Pierre Fabre, Roche, and Topcon. The D.E.S.I.R. Study Group: INSERM U780: B. Balkau, P. Ducimetière, E. Eschwège; INSERM U367: F. Alhenc-Gelas; CHU D'Angers: Y. Gallois, A. Girault; Bichat Hospital: F. Fumeron, M. Marre; Medical Examination Services: Alençon, Angers, Caen, Chateauroux, Cholet, Le Mans, and Tours; Research Institute for General Medicine: J. Cogneau; General practitioners of the region; Cross-Regional Institute for Health: C. Born, E. Caces, M. Cailleau, J. G. Moreau, F. Rakotozafy, J. Tichet, S. Vol. The NFBC 1986 study has been supported by the Oulu University Hospital, Finland, the Academy of Finland, and the European Commission (Framework 5 award QLG1-CT-2000-01643). We thank Professor Leena Peltonen-Palotie for her contribution in DNA extraction and distribution.

References

1. Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN et al (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316:889–894
2. Scuteri A, Sanna S, Chen WM et al (2007) Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. *PLoS Genet* 3:e115
3. Hinney A, Nguyen TT, Scherag A et al (2007) Genome wide association (GWA) study for early onset extreme obesity supports the role of fat mass and obesity associated gene (FTO) variants. *PLoS ONE* 2:e1361
4. Loos RJ, Lindgren CM, Li S et al (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 40:768–775
5. Dina C, Meyre D, Gallina S et al (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39:724–726
6. Lopez-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M et al (2008) The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 93:1501–1505
7. Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS et al (2008) Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 57:95–101
8. Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V et al (2008) Major gender difference in association of FTO gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 368:476–482
9. Rampersaud E, Mitchell BD, Pollin TI et al (2008) Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Arch Intern Med* 168:1791–1797
10. Farooqi S (2007) Insights from the genetics of severe childhood obesity. *Horm Res* 68 Suppl 5:5–7
11. Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC et al (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14:529–644
12. Price RA, Li WD, Zhao H (2008) FTO gene SNPs associated with extreme obesity in cases, controls and extremely discordant sister pairs. *BMC Med Genet* 9:4
13. Peeters A, Beckers S, Verrijken A et al (2008) Variants in the FTO gene are associated with common obesity in the Belgian population. *Mol Genet Metab* 93:481–484
14. Hunt SC, Stone S, Xin Y et al (2008) Association of the FTO gene with BMI. *Obesity (Silver Spring)* 16:902–904
15. Kring SI, Holst C, Zimmermann E et al (2008) FTO gene associated fatness in relation to body fat distribution and metabolic traits throughout a broad range of fatness. *PLoS ONE* 3:e2958
16. Freathy RM, Timpson NJ, Lawlor DA et al (2008) Common variation in the FTO gene alters diabetes-related metabolic traits to the extent expected given its effect on BMI. *Diabetes* 57:1419–1426
17. Hertel JK, Johansson S, Raeder H et al (2008) Genetic analysis of recently identified type 2 diabetes loci in 1,638 unselected patients with type 2 diabetes and 1,858 control participants from a Norwegian population-based cohort (the HUNT study). *Diabetologia* 51:971–977
18. Ng MC, Park KS, Oh B et al (2008) Implication of genetic variants near TCF7L2, SLC30A8, HHEX, CDKAL1, CDKN2A/B, IGF2BP2, and FTO in type 2 diabetes and obesity in 6,719 Asians. *Diabetes* 57:2226–2233
19. Sanghera DK, Ortega L, Han S et al (2008) Impact of nine common type 2 diabetes risk polymorphisms in Asian Indian Sikhs: PPARG2 (Pro12Ala), IGF2BP2, TCF7L2 and FTO variants confer a significant risk. *BMC Med Genet* 9:59
20. Qi L, Kraft P, Hunter DJ et al (2008) The common obesity variant near MC4R gene is associated with higher intakes of total energy and dietary fat, weight change, and diabetes risk in women. *Hum Mol Genet* 17:3502–3508
21. Berentzen T, Kring SI, Holst C et al (2008) Lack of association of fatness-related FTO gene variants with energy expenditure or physical activity. *J Clin Endocrinol Metab* 93:2904–2908
22. Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V et al (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88:131–141

23. Dempfle A, Hinney A, Heinzel-Gutenbrunner M et al (2004) Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J Med Genet* 41:795–800
24. Stutzmann F, Tan K, Vatin V et al (2008) Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes* 57:2511–2518
25. Blum M, Roberts JL, Wardlaw SL (1989) Androgen regulation of proopiomelanocortin gene expression and peptide content in the basal hypothalamus. *Endocrinology* 124:2283–2288
26. Balkau B, Eschwege E, Tichet J et al (1997) Proposed criteria for the diagnosis of diabetes: evidence from a French epidemiological study (D.E.S.I.R.). *Diabetes Metab* 23:428–434
27. Boneva-Asiova Z, Boyanov MA (2008) Body composition analysis by leg-to-leg bioelectrical impedance and dual-energy X-ray absorptiometry in non-obese and obese individuals. *Diabetes Obes Metab* 10:1012–1018
28. Hemmingsson E, Udden J, Neovius M (2009) No apparent progress in bioelectrical impedance accuracy: validation against metabolic risk and DXA. *Obesity (Silver Spring)* 17:183–187
29. Pietrobelli A, Rubiano F, St-Onge MP et al (2004) New bioimpedance analysis system: improved phenotyping with whole-body analysis. *Eur J Clin Nutr* 58:1479–1484
30. Cole P, MacMahon B (1971) Attributable risk percent in case-control studies. *Br J Prev Soc Med* 25:242–244

Interaction du variant rs17782313 de *MC4R* avec le polymorphisme de *FTO*, l'environnement et le sexe

Parallèlement à l'étude des effets du rs1421085 de *FTO* et rs17782313 de *MC4R* sur les comportements alimentaires, nous avons approfondi l'étude de l'association de ces polymorphismes avec l'IMC et l'obésité : à partir de quel âge l'effet est-il significatif ? Cet effet décroît-il avec l'âge ? Ces polymorphismes ont-ils un effet sur l'incidence de l'obésité ? De plus, ces variants étant les plus importants identifiés à ce jour, il était intéressant de tester également l'effet combiné de ces SNPs. Enfin, certaines études ont montré que des polymorphismes de *FTO* interagissent avec le sexe et l'activité physique (Andreasen et al. 2008; Jacobsson et al. 2008; Rampersaud et al. 2008). D'après Andreasen et coll., les sujets homozygotes pour l'allèle à risque du rs9939609 physiquement inactifs montrent un IMC de 1,95 kg/m² supérieur aux sujets homozygotes actifs, dont l'IMC est similaire aux sujets non porteurs du variant (Andreasen et al. 2008). Dans d'autres études, ce même polymorphisme est associé avec l'obésité et l'IMC uniquement chez les filles (Jacobsson et al. 2008; Qi et al. 2008a).

Nous avons vérifié ces hypothèses pour le rs1421085 de *FTO* et les avons testé pour le rs17782313 de *MC4R* dans deux populations générales : 4762 adolescents de la cohorte de naissance finlandaise NFBC1986 et 3167 adultes français de la cohorte D.E.S.I.R. Les données sur les enfants finlandais ont été collectées à leur naissance, à l'âge de 7 ans et à 16 ans. Leur niveau d'activité physique a été catégorisé à partir du nombre d'heures d'activité physique pratiquée par semaine à 16 ans. Chez les adultes de la population D.E.S.I.R., ce niveau représente le nombre de fois où le sujet pratiquait une activité physique par semaine, quelque soit sa durée. Cette information a été obtenue à l'inclusion. Les sujets ont été suivis pendant 9 ans, à raison d'une évaluation clinique tous les 3 ans. Ainsi, nous avons pu évaluer l'évolution de l'association des SNPs avec la corpulence et avec l'incidence d'obésité au cours de l'enfance et pendant l'âge adulte.

Effets du rs1421085 de *FTO*

L'indice pondéral est une autre méthode de calcul de la corpulence du nouveau né, il est déterminé par la masse en gramme sur le cube de la taille en centimètres. A la naissance, nous avons utilisé le z-score d'IMC et l'indice pondéral, chez les enfants le z-score d'IMC, et l'IMC chez les adultes. Ces variables sont corrélées mais la dimension de l'effet (c'est-à-dire

l'odds ratio) entre enfants et adultes n'est pas comparable. Toutefois, il s'agit de variables officielles, ce qui permet par contre de comparer la dimension de l'effet entre études similaires. Dans la cohorte NFBC1986, le rs1421085 est associé avec une augmentation du z-score de l'IMC et de l'indice pondéral à la naissance. Son effet se poursuit et s'accroît (en termes de dimension et de significativité) pendant l'enfance et l'adolescence. Dans cette même cohorte, le rs1421085 est également associé avec une augmentation de 41-44% du risque d'obésité. Chez les adultes de la cohorte D.E.S.I.R. à l'inclusion, le rs1421085 est associé avec une augmentation significative de l'IMC, de la masse grasse mais il n'est pas associé avec le risque d'obésité.

	NFBC1986			D.E.S.I.R.	
	A la naissance	A 7 ans	A 16 ans	A l'inclusion	Après 9 ans
z-score d'IMC ou IMC	+0,05 DS p=0,02	+0,07 DS p=0,0002	+0,14 DS p=2,32x10 ⁻⁸	+0,20 kg/m ² p=0,006	
Indice pondéral	+0,15g/cm ³ p=0,005				
Risque d'obésité		OR=1,41 - p=0,01 - PAR=0,14	OR=1,44 - p=2x10 ⁻⁴ PAR=0,15		p=0,1
Masse grasse					p=0,04

Tableau 9 : effets du rs1421085 de *FTO* sur les phénotypes de corpulence dans les cohortes NFBC1986 et D.E.S.I.R.

Si l'association entre les variants de *FTO* et le z-score d'IMC est unanimement répliquée dans les populations d'enfants européennes (Dina et al. 2007; Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007), l'effet très précoce des variants de *FTO* est moins clair : la plupart des études ayant testé le poids de naissance n'ont pas observé d'association significative (Andreasen et al. 2008; Frayling et al. 2007; Hakanen et al. 2009; Lopez-Bermejo et al. 2008). D'après une étude sur 234 nouveau-nés espagnols, le rs9939609 est associé avec le poids, l'indice pondéral et la masse grasse à l'âge de 2 semaines mais pas avec le poids de naissance (Lopez-Bermejo et al. 2008). Une autre étude basée sur des données longitudinales à partir de l'âge de 7 mois n'a pas observé d'association avant l'âge de 7 ans (Hakanen et al. 2009). Dans cette étude, un polymorphisme de *FTO* interagit avec l'âge pour augmenter l'IMC de ces enfants entre 7 et 15 ans, résultat retrouvé par Haworth et coll. entre 4 et 11 ans (Haworth et al. 2008a). Cette dernière observation est partiellement vérifiée dans notre population d'enfants : l'effet du SNP de *FTO* augmente à chaque âge mais nous n'avons pas testé la significativité de ce changement. Curieusement, le rs1421085 n'est

pas associé significativement avec une augmentation du risque d'obésité dans la cohorte D.E.S.I.R. Il s'agit du premier exemple d'absence d'association dans une population caucasienne, mais étant donné le nombre d'obèses dans la population D.E.S.I.R. cela peut être le seul reflet d'un manque de puissance statistique. Dans des populations non européennes, les résultats sont plus contrastés (Chang et al. 2008; Do et al. 2008; Grant et al. 2008; Li et al. 2008; Scuteri et al. 2007). L'effet du rs1421085 de *FTO* sur la masse grasse que nous avons observé chez les adultes est en accord avec l'association observée chez les enfants de la population ALSPAC à 9 ans (Frayling et al. 2007), ce qui suggère un effet continu des SNPs de *FTO* sur la masse grasse de l'enfance à l'âge adulte.

Effets du rs17782313 de MC4R

Contrairement à *FTO*, le polymorphisme de *MC4R* n'a pas d'effet à la naissance, quelque soit le critère de mesure considéré. De plus, le rs177823113 est associé avec le z-score d'IMC chez les enfants ou l'IMC chez les adultes avec une moindre significativité que *FTO* bien que l'OR soit supérieur. Ceci est le reflet de la différence de fréquence des deux polymorphismes (40,8-41,5% pour le rs1421085 et 17,7-23,7% pour le rs17782313). Cette différence se répercute surtout sur le risque attribuable dans la population (PAR) de devenir obèse : avec un odds ratio similaire à 16 ans (+44% pour les 2 SNPs), le PAR du rs1421085 est le double de celui du rs17782313 (0,15 et 0,07 respectivement). Par contre, le rs17782313 de *MC4R* est associé avec le risque d'obésité chez l'adulte (OR = 1,29) avec un risque attribuable similaire, ce qui suggère un effet constant au cours de la vie. Enfin, le rs17782313 est également associé avec une augmentation de la masse grasse chez l'adulte.

	NFBC1986			D.E.S.I.R.	
	A la naissance	A 7 ans	A 16 ans	A l'inclusion	Après 9 ans
z-score d'IMC ou IMC	p=0,84	+0,1 DS p=0,009	+0,8 DS p=0,002	+0,3 kg/m ² p=0,05	
Indice pondéral	p=0,74				
Risque d'obésité		OR=1,32 - p=0,04 PAR=0,05	OR=1,44 - p=0,002 PAR=0,07		OR=1,29 - p=0,04 PAR=0,06
Masse grasse					p=0,03

Tableau 10 : effets du rs17782313 de MC4R sur les phénotypes de corpulence dans les cohortes NFBC1986 et D.E.S.I.R.

Notre étude confirme l'association du rs17782313 avec les paramètres de corpulence chez l'enfant et chez l'adulte (Chambers et al. 2008; Loos et al. 2008). A l'image du papier initial de découverte de ce polymorphisme, nous n'avons pas observé d'association du rs17782313 avec le poids de naissance (Loos et al. 2008). Comme pour *FTO*, l'association du rs17782313 avec la masse grasse chez l'adulte dans la population D.E.S.I.R. est en accord avec les résultats sur la masse grasse des enfants de la population ALSPAC (Loos et al. 2008). Enfin, l'effet du rs17782313 sur l'IMC (ou le z-score d'IMC) diminue entre l'enfance et l'âge adulte dans notre étude tout comme dans l'étude initiale (Loos et al. 2008), une conclusion également proposée dans un contexte monogénique par Farooqi et coll. quoique nous n'ayons pas répliqué ce résultat dans notre cohorte de porteurs de mutations de *MC4R* (Farooqi et al. 2003; Stutzmann et al. 2008). L'association du rs17782313 avec l'obésité et l'IMC a été retrouvée dans trois autres grandes études génome-entier (Meyre et al. 2009; Thorleifsson et al. 2009; Willer et al. 2009) et dans des études de réplifications (Grant et al. 2009; Qi et al. 2008b). L'absence d'association du variant de *MC4R* à la naissance à la différence des variants de *FTO* suggère que ces deux gènes ne participent pas à la même voie de régulation.

Effets combinés de *MC4R* et *FTO*

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets combinés des deux polymorphismes. Chaque allèle à risque augmente significativement le z-score d'IMC à 7 et 16 ans et l'IMC chez l'adulte (tableau 11). Le risque d'obésité est également augmenté par l'accumulation d'allèles à risque à tous les âges, de même que l'incidence d'obésité au cours des 9 ans de suivi de la population D.E.S.I.R. et la masse grasse (figure 21 = *supplemental figure S4*).

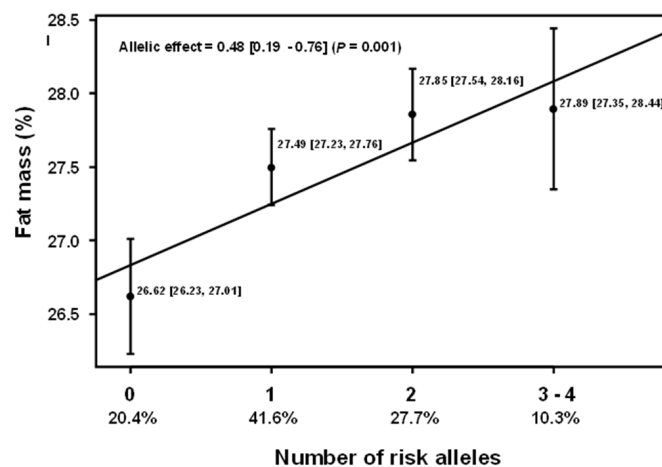


Figure 21 : effets combinés des rs1421085 et rs17782313 sur la masse grasse dans la cohorte D.E.S.I.R. au bout de 9 ans

	A 7 ans	A 16 ans	A l'inclusion : prévalence	Après 9 ans : incidence
z-score d'IMC	+0,08 DS $p=7,6 \times 10^{-6}$	+0,11 DS $p=2,1 \times 10^{-10}$	+0,92 kg/m ² $p=1,0 \times 10^{-3}$	
Risque d'obésité	OR=1,36 $p=0,0003$	OR=1,44 $p=2,0 \times 10^{-6}$	OR=1,21 $p=0,02$	HR=1,24 $p=0,02$
Masse grasse			+0,48% $p=0,001$	

Tableau 11 : effets combinés du rs17782313 de MC4R et du rs1421085 de FTO sur les phénotypes de corpulence dans les cohortes NFBC1986 et D.E.S.I.R.

De tels effets additifs ont également été rapportés par Loos et coll. : l'IMC est augmenté de 1,17 kg/m² chez les adultes et le z-score d'IMC est augmenté de 0,56 DS chez les enfants entre les individus ne portant aucun allèle à risque et les individus homozygotes pour les deux SNPs (Loos et al. 2008). Notre étude compare quant à elle les non-porteurs avec les individus porteurs de 3 ou 4 allèles à risque, ce qui peut expliquer pourquoi la dimension des effets est différente, notamment chez les enfants. L'effet des polymorphismes de *FTO* et *MC4R* s'ajoute également à celui des autres polymorphismes identifiés par la suite, comme le montre une étude « préliminaire » (c'est-à-dire parue avant l'identification de SNPs supplémentaires (Meyre et al. 2009))(Willer et al. 2009).

Interaction des SNPs avec l'activité physique

Nous avons observé une interaction entre le niveau d'activité physique et le variant rs1421085 de *FTO* sur le z-score de l'IMC : les adolescents physiquement les plus actifs (niveau 3 = 4h et plus d'activité physique hebdomadaire) sont moins sujets aux effets des variants de *FTO* (figure 22 = *supplemental figure S1*). Le rs1421085 interagit également avec l'activité physique chez l'adulte : le faible niveau d'activité physique accentue, voire provoque, les effets du SNP de *FTO* sur le risque d'obésité chez l'adulte (pour rappel, le rs1421085 n'est pas associé avec le risque d'obésité chez l'adulte dans notre étude). Ce résultat encourage les méthodes interventionnelles basées sur la pratique du sport. Aucune interaction entre l'activité physique et le rs17782313 de *MC4R* n'a été observée.

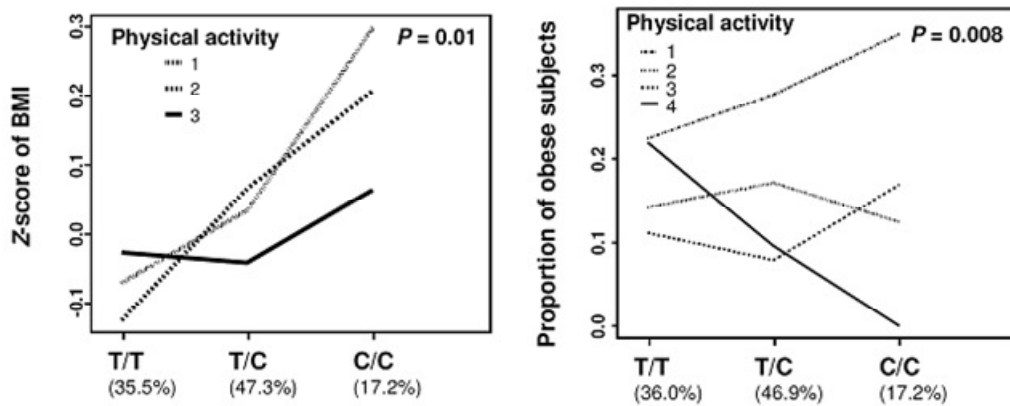


Figure 22 : interaction entre le rs1421085 et l'activité physique sur le z-score d'IMC chez les enfants finlandais (à gauche) et sur le risque d'obésité chez les adultes français (à droite)

Une étude sur des jumeaux adultes a montré qu'il est possible de « contrecarrer » les effets de la prédisposition génétique sur l'IMC et le tour de taille par l'activité physique (Mustelin et al. 2009). L'interaction observée entre le niveau d'activité physique et le rs1421085 sur l'IMC et le risque d'obésité est une parfaite illustration génétique de cette conclusion épidémiologique. La variation de *FTO* n'expliquant qu'1% de la variance génétique de l'IMC (Frayling et al. 2007), les mêmes interactions sont attendues pour d'autres polymorphismes, bien que cela ne soit apparemment pas le cas pour le rs17782313 de *MC4R*. L'interaction entre le rs1421085 et l'activité physique dépend toutefois des populations et de la façon dont l'activité physique est mesurée, toutes les études n'ont pas abouti à la même conclusion (Andreasen et al. 2008; Berentzen et al. 2008; Jonsson et al. 2009; Rampersaud et al. 2008). Aucune autre étude n'a testé l'interaction du rs17782313 avec l'activité physique. Des réplifications sont attendues avant de totalement exclure cette hypothèse.

Interaction des SNPs avec le sexe

Enfin, nous avons testé l'interaction des polymorphismes avec le sexe. Aucune interaction entre le rs1421085 et le sexe n'a été observée dans nos populations. Par contre, l'effet du rs17782313 sur le risque d'obésité et sur l'augmentation de la masse grasse est supérieur chez les hommes que chez les femmes dans la population D.E.S.I.R. (figure 23 = *supplemental figure 3*).

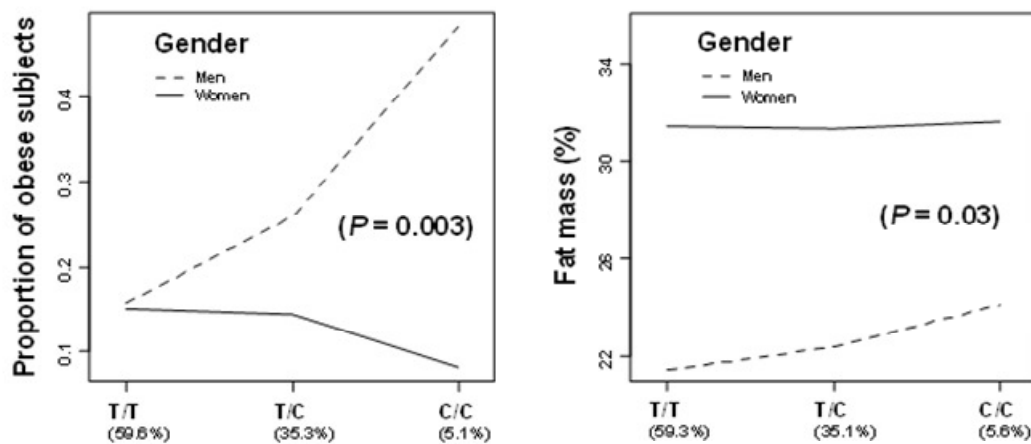


Figure 23 : interaction entre le rs17782313 et le sexe sur le risque d'obésité (à gauche) et sur la masse grasse (à droite) chez les adultes français

L'observation faite par Jacobsson et coll. suite à l'analyse stratifiée par sexe de l'association de polymorphismes de *FTO* avec l'IMC (Jacobsson et al. 2008) a été confirmée par plusieurs études (Cornes et al. 2009; Lappalainen et al. 2009; Qi et al. 2008a). Toutefois nous ne sommes pas les seuls à ne pas répliquer cette interaction (Hakanen et al. 2009). En revanche, l'interaction que nous avons observée entre le sexe et le rs17782313 est en opposition avec les conclusions de Loos et coll. à partir d'une méta-analyse sur 77000 individus (Loos et al. 2008). Bien que notre association concerne le risque d'obésité et la masse grasse tandis que l'étude princeps portait sur l'IMC, il est très probable que notre résultat soit un faux positif. Des études complémentaires permettraient d'asseoir cette conclusion. Par ailleurs, si un effet du sexe est aussi observé dans le cas d'obésité monogénique provoquée par la déficience en MC4R chez la souris (Huszar et al. 1997) et chez l'homme (Dempfle et al. 2004; Stutzmann et al. 2008), celui-ci s'applique dans le sens inverse : les femmes porteuses de mutations ont un IMC augmenté de 8,7 kg/m² par rapport aux femmes non porteuses quand l'augmentation est de 4,3 kg/m² pour les hommes.

Une étude australienne a montré par comparaison des variances au sein de paires de jumeaux monozygotes que le génotype de *FTO* n'interagit pas avec l'environnement, après stratification par sexe (Cornes et al. 2009). Pourtant de nombreuses études ont montré

l'interaction de polymorphismes de *FTO* avec l'activité physique, le sexe et l'âge (Andreasen et al. 2008; Hakanen et al. 2009; Jacobsson et al. 2008; Qi et al. 2008a; Rampersaud et al. 2008). Les effets combinés du sexe et du génotype de *FTO* semblent être d'origine hormonale ou endocrine (Cornes et al. 2009; Hubacek et al. 2009) Enfin, l'ethnie semble aussi jouer un rôle sur les effets des polymorphismes de *FTO*. Tout d'abord, les fréquences alléliques varient beaucoup entre les populations européennes et asiatiques (fréquence de l'allèle rare de rs9939609 dans HapMap : HCB 0,122 – CEU 0,450). C'est pourquoi la réplication de l'association des variants de *FTO* dans les populations non caucasiennes est très hétérogène (Chang et al. 2008; Do et al. 2008; Hennig et al. 2009; Lappalainen et al. 2009; Li et al. 2008; Ohashi et al. 2007; Wing et al. 2009). L'absence d'association entre le rs9939609 et l'IMC dans une population de Gambie peut s'expliquer par leur mode de vie : on peut considérer cette population comme physiquement très active, ce qui corrobore l'interaction génotype x activité physique (Hennig et al. 2009). Le rôle de l'ethnie sur les effets de polymorphismes de *MC4R* a également été testé (Grant et al. 2009) : des SNPs en fort déséquilibre de liaison (DL) avec le rs17782313 sont associés avec l'obésité chez les enfants américains d'origine européenne, par contre leur DL en population afro-américaine est moindre et ils ne sont pas associés avec l'obésité dans cette population (Grant et al. 2009).

Finalement, bien que *MC4R* soit un gène important dans la génétique de l'obésité, l'association du rs17782313 suscite moins d'engouement que le nouveau gène *FTO*, comme l'illustre la moindre densité de littérature en termes d'études d'association. Toutefois, nos résultats sur le SNP de *MC4R* sont en parfaite adéquation avec ceux du papier princeps, à l'exception de l'interaction avec le sexe, qui semble être un faux positif (Loos et al. 2008). Les conclusions concernant *FTO* sont moins définitives : le débat est encore ouvert quant à son effet à la naissance et son interaction avec l'activité physique et avec le sexe.

DISCUSSION GENERALE
ET PERSPECTIVES

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les rôles du récepteur 4 aux mélanocortines sont connus et variés (prise alimentaire, fonction érectile, mais également dans une moindre mesure homéostasie de l'insuline et du glucose, pression artérielle, etc...) mais la déficience en MC4R se caractérise principalement par une hyperphagie qui conduit très rapidement à l'obésité, chez l'homme comme chez la souris. En plus des 90 mutations rapportées à ce jour, deux polymorphismes codants rares sont protecteurs et des polymorphismes fréquents à proximité de *MC4R* ont été associés avec une augmentation de l'IMC et du risque d'obésité. De ce fait, un même gène peut être impliqué à la fois dans l'obésité monogénique et dans l'obésité commune, et à la protection comme au risque d'obésité.

Mes travaux ont contribué à montrer que

- (1) l'environnement est capable de moduler la pénétrance des mutations « perte de fonction » de *MC4R* ;
- (2) le variant rs17782313 situé à distance du locus *MC4R* est associé avec des troubles du comportement alimentaire ;
- (3) le gène *MC4R* possède un second polymorphisme rare dont l'allèle mineur est associé avec une diminution de 50% du risque d'obésité ;
- (4) le variant intergénique rs17782313 interagit avec le sexe pour moduler l'IMC et le risque d'obésité ;
- (5) le variant rs1421085 de *FTO* identifié par GWAS n'est pas associé de manière évidente (en tout cas moins que *MC4R*) avec les troubles du comportement alimentaire ;
- (6) l'effet du variant rs1421085 de *FTO* est modulé par le niveau d'activité physique.

A - Les mutations de MC4R illustrent l'adage que « les gènes chargent le revolver mais c'est l'environnement qui appuie sur la gâchette » (Olden and Wilson 2000).

A l'aide de 25 familles tri-générationnelles, nous avons clairement montré que la pénétrance des mutations pathogéniques de *MC4R* est phénotypiquement variable, en termes d'âge d'apparition de l'obésité et de sévérité de la maladie. Cette variabilité étant visible au sein même des familles, la sévérité relative des différentes mutations sur la signalisation de la mélanocortine ne suffit pas à expliquer ce phénomène. En 2006, au commencement de cette thèse, la notion de pénétrance incomplète n'était pas encore

acceptée dans le domaine de l'obésité monogénique. Aujourd'hui, les exemples de porteurs non obèses se sont multipliés et le caractère incomplet de la pénétrance des mutations de *MC4R* est évident, quoique ses causes soient encore mal connues. De ce fait, nous nous sommes intéressés aux explications potentielles de cette variabilité. La pénétrance augmente graduellement avec les générations, elle atteint 78% chez les enfants, alors que seuls 40% des grands-parents porteurs sont obèses.

Notre hypothèse majeure est que l'environnement joue un rôle important dans l'expressivité de la déficience en *MC4R*. En effet, cette déficience se traduit par des pulsions alimentaires. Mais dans un contexte où l'accès à la nourriture est limité, le sujet ne prend pas de poids. Ainsi, les grands-parents ayant subi des restrictions alimentaires ne sont pas devenus obèses dans l'enfance. Aujourd'hui où l'accès à la nourriture est facilité, 50% des individus minces à 20 ans ont atteint un IMC > 35 kg/m² à 45 ans, montrant l'importance de l'environnement obésogénique. On s'éloigne donc du schéma classique selon lequel « une mutation dans un gène cause la maladie ».

⇒ Malgré les nombreuses études qui ont déjà été réalisées sur les effets des mutations de *MC4R*, aucune cohorte n'a été utilisée dans un but prospectif sans intervention. Un moyen efficace de vérifier nos hypothèses sur les effets de *MC4R* chez l'adulte serait de décrire aujourd'hui ce que sont devenus les patients porteurs identifiés depuis dix ans, en termes de corpulence et de comportement alimentaire. Les enfants porteurs de mutations non obèses sont rares dans la littérature mais représentent une population particulièrement intéressante pour expliquer pourquoi et comment certains porteurs deviennent obèses précocement, tardivement ou restent minces. Le séquençage de *MC4R* dans de larges cohortes prospectives permettrait de mieux répondre aux questions de la pénétrance incomplète et de l'âge d'apparition variable de l'obésité. En effet, des cohortes telles que ALPSAC, EPIC, NFBC1986, NFBC1966 ou WGHS sont très largement phénotypées en ce qui concerne le statut socio-économique des parents, le niveau d'étude, le statut tabagique des parents et des sujets, le mode de vie, les habitudes alimentaires et sportives, etc... et des données de corpulence sont disponibles à plusieurs âges. La principale limitation à ce projet est le besoin d'une cohorte suffisamment grande, puisque la fréquence des mutations de *MC4R* en population générale est de 0,15%.

⇒ Un autre facteur environnemental intéressant est le facteur ethnique. En effet, la plupart des études concernant les mutations de *MC4R* ont été réalisées sur des

populations européennes (voir introduction figure 16) et les rares études dans des populations asiatiques ou afro-américaines rassemblaient un trop faible effectif pour fournir des résultats conclusifs. Les études de l'équipe de O'Rahilly dans une population mixte britannique/pakistanaise avec enrichissement en familles consanguines ont montré une fréquence de mutations de 5,8%, très supérieure à celle rapportée dans les autres études. Cette valeur peut être attribuée au taux de consanguinité de leur cohorte. Toutefois, il serait intéressant de comparer ce résultat avec celui d'autres populations d'Asie centrale et occidentale et de compléter l'étude avec des populations natives américaines et africaines.

⇒ De plus, il est possible que l'expressivité des mutations de *MC4R* soit également modulée par des polymorphismes associés avec l'obésité, à l'image des observations faites sur la modulation de l'effet de mutations du gène du MODY HNF1A par les polymorphismes identifiés dans les GWAS de diabète de type 2 (Lango 2009).

B - Comment évaluer les comportements alimentaires ?

Il est de plus en plus évident que l'obésité est une maladie héréditaire du comportement alimentaire. Tous les gènes intervenant dans l'obésité monogénique appartiennent à la voie de signalisation leptine-mélanocortine et les exemples d'obésités syndromiques sont des obésités hyperphagiques. Il est donc particulièrement important de savoir mesurer la prise alimentaire et évaluer les comportements alimentaires et les troubles associés. Notre étude sur l'association des rs1421085 de *FTO* et rs17782313 de *MC4R* avec les troubles du comportement alimentaire a révélé les limitations de nos questionnaires disponibles au laboratoire et les limites des questionnaires alimentaires en général.

Au laboratoire :

Dans la population D.E.S.I.R., un questionnaire de fréquence alimentaire a été complété et les équations NAQA ont été appliquées, il s'agit de la seule cohorte renseignée pour la prise alimentaire de manière quantitative parmi les populations disponibles. Dans la cohorte NFBC1986, un questionnaire de fréquence alimentaire a aussi été adressé aux adolescents à l'âge de 16 ans. Ce questionnaire est semblable à celui proposé aux enfants des cohortes ALSPAC et EPIC. L'application d'algorithmes permet d'en déduire de manière assez fine la consommation de graisses, de glucides, de protéines, de calories ou encore de cholestérol. La transformation des données de fréquence alimentation dans la cohorte finlandaise en données générales nous permettrait de bénéficier d'une cohorte de

réplication et de mieux tester les effets de variants génétiques sur les comportements alimentaires.

Parmi les populations d'obèses, les Français recrutés par la campagne multimédia ont répondu à la version longue du questionnaire de Stunkard, qui évalue les comportements alimentaires. Une étude sur la cohorte SOS a montré que ce questionnaire est adapté aux populations générales mais pas aux populations obèses pour lesquelles les auteurs recommandent la version courte du TFEQ (Karlsson et al. 2000). Malheureusement, nous n'avons pas accès aux réponses brutes de la plupart des sujets mais seulement aux scores finaux. Le questionnaire de comportement alimentaire de Spitzer appliqué aux obèses suisses est adapté à l'étude des troubles du comportement alimentaire et des préférences alimentaires (Spitzer et al. 1993). Toutefois, nous ne disposons pas de données quantitatives dans les populations obèses.

Les questionnaires en général :

Il est nécessaire de noter la multiplicité des questionnaires alimentaires utilisés. Même lorsqu'un questionnaire de fréquence identique est utilisé par plusieurs équipes, il est ensuite transformé en données générales à partir d'équations propres à chaque pays, ce qui module les valeurs quantitatives finales pour des réponses brutes identiques. Dans le cas de polymorphismes, dont l'effet est tenu par définition, cette variabilité subtile de matériel de base rend d'autant plus difficile la réplication d'un résultat. L'évaluation objective et reproductible de la prise alimentaire n'est pas encore possible avec les questionnaires actuels.

De plus, le Dr M Pigeyre du Centre Hospitalier Universitaire de Lille, avec laquelle nous collaborons, souligne que les questionnaires de fréquence alimentaire ou les reports de consommation sur une semaine sont biaisés car personne n'est capable de les remplir correctement : qui prend la peine de peser à chaque repas tous les aliments qu'il consomme, jusqu'à la pincée de sel ? Selon elle, les expériences de repas *ad libitum* sont les plus informatives : le médecin peut peser la nourriture ingérée, il connaît la composition exacte du plat qu'il propose et peut dans le même temps analyser le comportement du sujet, la vitesse d'ingestion, les préférences alimentaires.

Le Dr M Pigeyre a réalisé des repas-tests sur des individus déficitaires en MC4R de notre cohorte et des sujets appariés. La poursuite de cette collaboration est importante pour l'établissement d'une nouvelle cohorte pédiatrique avec des données de comportement

alimentaire et d'alimentation quantitative : ses patients volontaires vont être soumis à un repas *ad libitum* et se prêter à un prélèvement sanguin pour être génotypés au laboratoire, nous espérons obtenir une cohorte d'au moins deux cents sujets.

C - Evaluation critique de la technologie des GWAS

Une large part de l'héritabilité de l'obésité est due à des polymorphismes fréquents. Ces variations sont également présentes chez des sujets non obèses, voire minces, c'est pourquoi leur implication dans l'obésité repose uniquement sur les résultats d'analyses statistiques : une distribution différente des fréquences alléliques entre sujets obèses et sujets minces suffit à affirmer l'association (et potentiellement l'impact direct) d'un SNP avec une maladie commune. L'hypothèse de « variant fréquent-maladie commune » est à l'origine des analyses de gènes candidats, des analyses de liaison et des GWAS. Cette nouvelle technologie a permis l'identification de 250 locus associés avec des maladies communes en moins de deux années (Hirschhorn 2009), ce qui implique que nous traversons actuellement une période prolifique de la génétique humaine des maladies polygéniques. Cette technologie présente quelques limites et offre de multiples possibilités d'analyse.

1 - Les limites du protocole des GWAS

1-1- La puissance statistique

Les méthodes d'analyses des puces à ADN ont permis de démontrer l'association de variants fréquents à effets forts avec des maladies communes comme le diabète de type 2 ou l'obésité. Mais cette méthodologie n'est pas adaptée pour détecter les polymorphismes avec une faible contribution ou peu fréquents. A ce jour, *FTO* est le gène dont les polymorphismes présentent l'effet le plus fort ($OR=1,5$), on peut donc s'attendre à ce que les autres SNPs associés avec l'obésité aient un effet moindre, nécessitant des effectifs de plus en plus grands pour être identifiés.

Un moyen de contourner ce problème est de combiner les résultats des différentes puces publiés à ce jour. L'aspect logistique et financier de projets d'une telle ampleur nécessite la mise en place de consortiums ; c'est pourquoi les équipes travaillant sur la génétique de l'obésité se sont unies dans le consortium GIANT+ (*Genetic Investigation of Anthropometric Traits*) qui peut rassembler les données de génotypage par puce de 128000 individus et dispose de 100000 individus supplémentaires pour l'étape de phase II. Un

consortium implique également de larges plateformes de génotypage et des outils statistiques adaptés.

1-2- Le choix du meilleur proxy

Une étude réalisée dans notre laboratoire a identifié l'association du rs1421085 de *FTO* avec l'obésité (Dina et al. 2007) tandis que Frayling et coll. et Scuteri et coll. ont identifié le rs9939609 (Frayling et al. 2007; Scuteri et al. 2007). Les études qui ont suivi ont toutes concerné le rs9939609 mais nous avons utilisé le rs1432085 dans les études sur le comportement alimentaire et sur les interactions avec le sexe et l'activité physique. Cela peut-il expliquer la différence de résultats obtenus ? Non car les deux polymorphismes sont en fort déséquilibre de liaison ($r^2 > 0,95$).

Cette question soulève toutefois la nécessité d'identifier le variant causal, suite à toute étude d'association. Le séquençage du bloc de liaison permettrait de réaliser une cartographie fine de la région et de déterminer le variant le plus associé. Des études fonctionnelles seront ensuite nécessaires pour valider et expliquer l'association statistique, mais elles seront toutefois difficiles tant qu'on ne connaîtra pas plus précisément le rôle et la fonction de *FTO*. Le séquençage a été entrepris dans plusieurs équipes, dont la nôtre, il déterminera le choix du SNP pour les potentielles études d'association futures.

1-3- Le choix des populations

Les analyses génome-entier reposent sur la comparaison de fréquences alléliques entre un groupe de contrôles et un groupe de cas. Il est important de bien déterminer les critères de sélection de chacun de ces groupes afin d'éviter certains biais; dans le cas de l'obésité cela implique par exemple de ne pas comparer un cas-contrôle d'obésité « tous niveaux » et un cas-contrôle d'obésité sévère. L'association originelle de *FTO* par Frayling et coll. illustre un biais potentiel de conception : leur étude d'association avec le diabète de type 2 a identifié des polymorphismes de *FTO*, dont l'association disparaît après correction pour l'IMC (Frayling et al. 2007). En effet, les cas avaient un IMC moyen de 3 kg/m² supérieur à celui des contrôles. L'association avec l'obésité a ensuite été répliquée en phase II. Cette situation n'est pas choquante car la corpulence est un important facteur confondant dans l'étude du diabète de type 2. D'autres facteurs confondants plus subtils peuvent être à

l'origine de résultats faux-positifs ou faux-négatifs. Pour s'en affranchir au maximum, il est donc important d'utiliser des populations homogènes et bien phénotypées.

Il a longtemps été admis que les populations isolées génétiquement et géographiquement (Islandais, Finlandais, Sardaigne, juifs Ashkénazes, Amish ou Indiens Pima) permettraient de découvrir des nouveaux gènes impliqués dans les maladies communes. En effet, ces populations (i) partagent un environnement plus homogène, (ii) possèdent un nombre limité d'ancêtres fondateurs, (iii) présentent parfois une prévalence accrue de certaines maladies, (iv) disposent de données généalogiques très complètes (Korner et al. 2008). Pourtant les études d'association génome-entier sur le diabète de type 2 ont détruit ce mythe : les GWAS réalisés dans les populations de Sardaigne (Scuteri et al. 2007), islandaise (Steinthorsdottir et al. 2007) ou finlandaise (Scott et al. 2007) ont identifié les mêmes gènes que les autres études (FTO, CDKAL1).

Au contraire, ou plutôt de manière complémentaire, il est intéressant de comparer des populations avec un contexte génétique et environnemental très différent. Dans les populations européennes, africaines et asiatiques, les fréquences alléliques sont parfois très différentes, à l'image du rs9939609 de *FTO* : CEU 45%, CHB 12%, JPT 17%, YRI 52% (www.hapmap.org). Ainsi, certains allèles rares en Europe peuvent atteindre un seuil de détection dans une autre population et conduire à l'identification de nouveaux gènes associés avec l'obésité, comme c'est le cas pour *KCNQ1* dans le diabète de type 2 (Unoki et al. 2008; Yasuda et al. 2008). De plus, puisque les blocs de déséquilibre de liaison sont différents suivant les populations, des associations différentielles dans ceux-ci peuvent participer à l'identification du SNP causal.

2 - D'autres utilisations des données de GWAS

2-1- GWAS de la masse grasse

L'obésité est-elle uniquement une maladie du comportement alimentaire ? Afin de cibler plus particulièrement des polymorphismes ayant un effet sur l'adipogenèse ou la dépense énergétique, il est envisageable d'utiliser les données de GWAS d'individus phénotypés pour la composition corporelle ou encore le métabolisme de repos et d'analyser l'effet des polymorphismes sur ces traits continus. De plus, la masse grasse est un indicateur de corpulence plus précis que l'IMC car elle permet de discriminer les sportifs des obèses. La difficulté principale d'une telle étude est de disposer d'une puissance statistique suffisante :

les mesures de DEXA ou d'impédance bioélectrique ne sont pas couramment appliquées. Toutefois il existe des cohortes. Les enfants de la cohorte ALSPAC sont renseignés pour ces valeurs, qui ont été utilisées dans les études de *FTO* et de *MC4R* (Frayling et al. 2007; Loos et al. 2008), de même que les individus de la cohorte D.E.S.I.R. dont nous avons utilisé les données dans l'étude des effets combinés de *FTO* et *MC4R*, (quoiqu'elles soient peu homogènes quant à la méthode de mesure). Notre population d'obèses familiaux, utilisée dans les puces génome-entier, est également renseignée pour la composition corporelle par DEXA. Des données par impédance bioélectrique sont disponibles dans une cohorte suédoise (Malmö Diet and Cancer Cohort) (Lahmann et al. 2002) mais il convient de ne pas mélanger les différents types de mesure.

2-2- GWAS sexe-spécifiques

Le sexe a des effets mesurables sur la morphologie, les circuits neurobiologiques, la susceptibilité aux maladies auto-immunes, le diabète, l'asthme, les maladies cardiovasculaires et psychiatriques et sur des traits quantitatifs comme l'IMC, les taux de lipides et la pression sanguine (Weiss et al. 2006). Par exemple, le diabète de type 2 est plus prévalent chez les hommes et la dépression plus fréquente chez les femmes ; des interactions sexe-âge ont été observées dans l'asthme et dans le diabète de type 1. Certains traits morphologiques présentent des pics de liaison génome-entier sexe-spécifiques (Weiss et al. 2006). Ceci illustre l'importance de modéliser l'architecture sexe-spécifique dans les analyses de GWAS. En effet, les méthodes classiques en population mixte peuvent masquer l'effet de locus sexe-spécifiques.

Des exemples d'association sexe-spécifique ont déjà été rapportés dans le cas de l'obésité. C'est le cas notamment de polymorphismes de la périlipine dont l'association sexe-spécifique a été répliquée dans trois études (Qi et al. 2004a; Qi et al. 2004b; Qi et al. 2005). L'association du variant R1252W de *TBC1D1* avec l'obésité est également propre aux femmes (Meyre et al. 2008; Stone et al. 2006). De plus, les femmes ont en général une proportion de masse grasse supérieure aux hommes, une distribution de la masse grasse et un métabolisme du gras différents. L'expression des gènes des adipocytes (*UCP2*, leptine, résistine, *AGRP*) est aussi différente entre les deux sexes (Klaus and Keijer 2004). Une première explication est un effet réciproque des hormones sexuelles sur les adipocytes. En effet, la distribution du tissu adipeux est différent suivant que les femmes sont

ménopausées ou non (Ferrara et al. 2002), tandis que l'excès de poids entraîne des troubles de la fertilité (Wilborn et al. 2005). Un déterminisme génétique différent est une autre explication plausible. Il pourrait donc être intéressant d'analyser les données des puces génome-entier séparément pour les hommes et les femmes.

2-3- GWAS et CNVs

Une large part de la variabilité génétique interindividuelle du génome humain réside dans les « *copy number variations* » ou CNVs, des délétions, insertions et duplications de régions de plus de 1kb. Il est estimé que 10% du génome fait l'objet de CNVs (Redon et al. 2006). Ces variations peuvent avoir un effet à plusieurs niveaux.

⇒ Les CNVs peuvent par exemple expliquer la variabilité de pénétrance de mutations « perte de fonction ». Imaginons la famille suivante (figure 24): le père I-1 présente une duplication d'un locus renfermant le gène A et la mère I-2 possède une mutation à l'état hétérozygote, causale d'une maladie monogénique. Si leur enfant II-2 reçoit à la fois la duplication de son père et la mutation de sa mère, il est en possession de deux allèles sauvages. Dans le cas d'un allèle dominant, cette configuration permet au sujet de ne pas être malade, contrairement à sa sœur II-4 qui possède un allèle sauvage et un allèle muté (Beckmann et al. 2007).

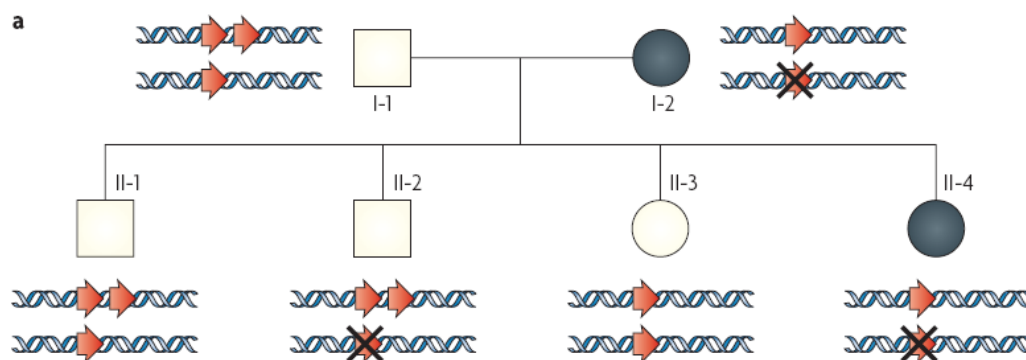


Figure 24 : illustration de l'effet d'un CNV sur la pénétrance des maladies monogéniques (d'après Beckmann et al. 2007)

A ce jour, les données sur les CNVs dans le génome sont incomplètes mais il serait intéressant de s'intéresser au locus de *MC4R* et de tester cette hypothèse pour expliquer la

variabilité de la pénétrance des mutations. Pour l'instant, les bases disponibles sur Internet n'indiquent aucun CNV fréquent à ce locus.

⇒ Mais surtout, des CNVs ont été associés avec la susceptibilité à plusieurs maladies communes, comme l'autisme, le retard mental, les maladies auto-immunes ou le VIH (Fanciulli et al. 2007; Gonzalez et al. 2005; Szatmari et al. 2007). Il a même été proposé que des CNVs puissent influencer les réponses interindividuelles aux traitements (Ouahchi et al. 2006). De ce fait, des CNVs peuvent être associés avec l'obésité ou la perte de poids. Une première étude dans une population chinoise a identifié un locus sur le chromosome 10. A partir de données de puces SNPs génome-entier, ils ont déterminé les régions dupliquées et délétées et testé l'association des réarrangements chromosomiques avec l'IMC. La perte du CNV 10q11.22 est associée avec une augmentation de 12,4% d'IMC et le gain de ce CNV avec une diminution de 5,4% de l'IMC. Cette région contient 4 gènes dont le récepteur 1 du neuropeptide Y, qui joue un rôle dans la régulation de la prise alimentaire. Bien que l'étude soit peu puissante, ce gène est un argument en faveur de la validité du résultat. Cette étude confirme surtout l'utilité de la recherche d'association de CNV avec l'obésité. De plus, l'identification d'un polymorphisme de NEGR1 associé avec l'obésité a permis de mettre en évidence deux CVN au locus de ce gène (Willer et al. 2009).

2-4- GWAS et transmission familiale

Les études de transmission familiale peuvent être utilisées pour étudier l'association d'un polymorphisme candidat avec un phénotype (comme nous l'avons fait pour mettre en évidence le rôle protecteur du variant I251L de *MC4R* et pour vérifier l'association des rs1421085 et rs17782313 avec l'IMC). Il est également possible d'envisager une recherche de nouvelles associations à l'échelle du génome à l'aide de puces génome-entier réalisées sur des familles nucléaires dont le descendant est obèse. Ce design d'étude présente plusieurs opportunités d'analyse. Tout d'abord, la vérification de la transmission des allèles peut participer aux contrôles-qualité des puces et éviter l'exclusion de certains polymorphismes rares négligés dans les GWAS précédents. De plus, les biais sont moins importants au sein des familles : pas de stratification de population, environnement partagé. L'analyse combinée de polymorphismes voisins permettrait également la définition d'haplotypes à risque, plus puissants que les polymorphismes isolés. Enfin, l'analyse séparée

de la transmission par la mère et par le père pourrait aussi mettre en évidence de nouvelles régions d'empreinte parentale.

D - Obésité monogénique : nouveaux gènes candidats

1 - Une continuité dans les différents types génétiques d'obésité

La présence au sein d'un même gène de mutations pathogéniques causales d'obésité, de variants rares protecteurs et de variants fréquents prédisposant à l'obésité montre qu'il existe un continuum entre les obésités monogénique et polygénique. Ces deux formes de la maladie reposent sur des mécanismes communs. Ce phénomène se retrouve fréquemment : Hirschhorn a recensé que 1 locus/5 associé avec les maladies communes par GWA inclut un gène muté dans la maladie monogénique correspondante (Hirschhorn 2009). Dans l'obésité aussi, il existe d'autres illustrations de cette continuité : des polymorphismes de *POMC* sont associés avec une augmentation de la masse grasse, du rapport taille/hanche ou l'obésité (Baker et al. 2005; Challis et al. 2002; Chen et al. 2005; Sutton et al. 2005). Des polymorphismes de *PCSK1* sont également associés avec l'obésité de manière hétérogène (Benzinou et al. 2008b; Renstrom et al. 2009), de même que *BDNF* plus récemment (Thorleifsson et al. 2009). De plus, il existe un continuum entre l'obésité syndromique et l'obésité commune : des polymorphismes des gènes du syndrome de Bardet-Biedl *BBS2*, *BBS4* et *BBS6* sont associés avec l'obésité dans des cohortes françaises (Benzinou et al. 2006) et des polymorphismes de *SIM1* (participant au syndrome de Prader-Willi like) ont été associés avec l'obésité chez les Indiens Pima (Traurig et al. 2009). Or il existe une relation physiologique entre les protéines BBS et POMC ou la leptine (Davenport et al. 2007; Seo et al. 2009). De même, *SIM1* est nécessaire au développement des neurones à ocytocine, dont la libération est stimulée par l' α -MSH. Les souris déficientes en *sim1* ne répondent pas à l'effet anorexigène du mélanotan II (Kublaoui et al. 2006a). De ce fait, il est possible que des gènes associés à des formes syndromiques d'obésité présentent des mutations responsables d'obésité monogénique ou des polymorphismes prédisposant à l'obésité. Inversement il n'existe pas encore d'exemple de gène identifié d'abord dans un contexte polygénique qui présente des mutations pathogéniques dans l'obésité, mais Kir6.2/SUR dans le diabète de type 2 est une illustration de cette possibilité. Les nouveaux gènes découverts par les GWAS représentent donc des gènes candidats intéressants dans l'obésité monogénique.

2 - Dans la voie de signalisation de MC4R

Une autre catégorie de gènes candidats réside dans les gènes codant les protéines intervenant dans la voie de signalisation de MC4R.

⇒ En amont de MC4R, (i) les ligands de MC4R : POMC et AGRP, (ii) les effecteurs de la leptine : STAT3 et SOCS3, (iii) les autres cibles de la leptine : MCH, NPY, ses récepteurs et CART n'ont jamais été séquencés extensivement. Une mutation dans CART a par exemple été identifiée en Italie (del Giudice et al. 2001).

⇒ Dans les voies parallèles à la voie leptine-mélanocortine, les récepteurs à la cholécystokinine (Moran et al. 1998) ou à la ghréline sont de bons gènes candidats, de même que la périlipine, le polypeptide pancréatique ou l'urocortine (Delplanque et al. 2002; Rankinen et al. 2006).

⇒ En aval de MC4R, par contre, la littérature est très maigre. Aucune étude n'a été publiée sur la recherche des cibles directes de MC4R. Ce récepteur couplé aux protéines G produit de l'AMP cyclique et active la voie des MAP kinases, qui agissent comme facteurs de transcription. Ainsi les puces à expression pourraient permettre de distinguer les gènes régulés par la stimulation α -MSH dans le modèle murin. Se pose éventuellement la question du choix de la lignée cellulaire ou de l'organe à prélever, étant donné l'expression et le rôle variables de MC4R dans différents tissus. Il a été proposé que le couple BDNF/TRKB (Bariohay et al. 2009; Nicholson et al. 2007; Xu et al. 2003) et SIM1 (Kublaoui et al. 2006b) agissent en aval de MC4R. Ces conclusions sont issues du modèle animal, elles reposent sur (i) les mesures de production de protéine en réponse aux agonistes de MC4R, (ii) la prise alimentaire d'animaux auxquels ont été administrés des agonistes/antagonistes de MC4R et/ou BDNF, (iii) la comparaison phénotypique de souris déficientes en l'un ou l'autre gène, (iv) l'effet d'un transgène *SIM1* chez des souris déficientes en *mc4r*. Ces expériences concernent l'étude d'un candidat précis et ne sont bien entendu pas réalisables à l'échelle d'un catalogue de gènes candidats. Malgré tout, un premier criblage par puce sur des biopsies d'hypothalamus (*SIM1*, BDNF), de complexe dorso-vagal (BDNF) ou de tissu adipeux brun (*UCP1*) devrait permettre d'identifier les cibles de MC4R et de nouveaux gènes candidats dans l'obésité monogénique.

E - Utilité de nos travaux

Il est toujours réconfortant pour un scientifique en recherche fondamentale de constater que les résultats de ses travaux peuvent avoir un impact clinique et agir sur la vie des malades.

1 – Intérêt prédictif

L'utilité des polymorphismes de prédisposition à l'obésité dans la prédiction d'un développement futur de la maladie n'a pas encore été évaluée. Des études de ce genre ont été réalisées dans le diabète de type 2 (Lin et al. 2009; Lyssenko et al. 2008; Sparso et al. 2009; van Hoek et al. 2008), le cancer de la prostate (Salinas et al. 2009) ou les maladies coronariennes dans un contexte d'hypercholestérolémie (van der Net et al. 2009). Le principe repose sur la variation de l'incidence de la maladie dans de grandes populations générales suivies prospectivement, en fonction de facteurs cliniques et génétiques. Plusieurs types d'analyses ont été développés, en comptabilisant le nombre d'allèles à risque ou en les pondérant en fonction de leur effet, en groupant les individus par quartiles, quintiles ou selon la médiane, mais quelle que soit la méthode, la conclusion est la même : les polymorphismes apportent très peu d'information supplémentaire par rapport aux facteurs prédictifs cliniques. Dans l'obésité pourtant, l'information génétique est d'autant plus importante qu'il existe très peu de facteurs prédictifs cliniques précoces : à part dans un contexte d'obésité familiale, il est à ce jour presque impossible de déterminer le risque d'un enfant de devenir obèse. Le caractère prédictif des polymorphismes de prédisposition, s'il est un jour mis en évidence, permettra de mettre en place des mesures préventives ciblées sur les individus à risque, qui pourraient se montrer plus efficaces que la prévention à l'échelle de la population générale.

2 – Intérêt préventif

Il n'est bien entendu pas question d'envisager une médecine personnalisée justifiée par quelques polymorphismes à l'effet faible. Nos études ont montré une forte influence de l'environnement sur l'effet des gènes sur l'IMC et l'obésité. L'effet protecteur d'un niveau d'activité physique suffisant sur l'effet prédisposant des allèles à risque de *FTO* illustre les conclusions d'une étude de jumeaux qui avait montré que l'activité physique diminue l'héritabilité générale du tour de taille et de l'IMC (Mustelin et al. 2009). Une autre étude a montré qu'il est bénéfique aux patients obèses de savoir qu'il existe une prédisposition

généétique à l'obésité, même sans diagnostic génétique personnel (Rief et al. 2007), les sujets apprécient surtout de recevoir des informations réalistes sur leur état. Ainsi, il convient de combiner ces informations pour motiver plus efficacement la population générale à pratiquer une activité physique régulière et éviter le fatalisme. Si l'effet prédictif des polymorphismes se révèle suffisant, cette démarche pourra cibler les individus à risque, qui se sentiront peut-être plus concernés, car pour l'instant les mesures préventives gouvernementales sont inefficaces.

Dans le cas de mutations responsables de formes monogéniques d'obésité, au contraire, une médecine personnalisée peut être appliquée. C'est le cas par exemple pour les patients déficients en leptine pour lesquels un traitement a été mis au point, malgré leur rareté (Farooqi et al. 2002). Les enfants porteurs de mutations de *MC4R* soumis à une approche interventionnelle stricte pendant trois semaines, six semaines (Hainerova et al. 2007), ou un an (Reinehr et al. 2009) sont capables de perdre autant de poids que les enfants sans mutation mais sont incapables de maintenir la perte de poids à l'issue de l'intervention (Reinehr et al. 2009). Ainsi, les sujets déficients en *MC4R* doivent être plus particulièrement suivis nutritionnellement, une restriction alimentaire importante doit pouvoir leur être imposée.

⇒ Afin de déterminer les méthodes préventives et curatives les mieux adaptées, il serait intéressant d'étudier les données de cohortes interventionnelles comme deCODE ou de mettre en place une telle cohorte en France, en partenariat par exemple avec l'un des nombreux établissements spécialisés dans le traitement de l'obésité. Le principe de telles cohortes est le suivant : sur une grande population prospective, plusieurs groupes sont destinés à un suivi minimum, un régime ou une incitation au sport, un traitement médicamenteux ou un placebo, etc. et les sujets à risque (dans l'hypothèse où les polymorphismes identifiés à ce jour seraient prédictifs) ou porteurs de mutations sont répartis dans chacun de ces groupes. L'évolution de leur poids est suivie pendant une durée suffisante et des corrélations sont mesurées. Dans le cas de mutations, et de *MC4R* en particulier, un tel dispositif est difficile à mettre en place, car ces mutations sont rares et nécessitent un effectif initial très important.

3 – Intérêt curatif

3-1- Approches médicamenteuses

L'injection intrapéritonéale d'un agoniste synthétique de MC4R, le melanotan II, est capable d'induire l'expression de UCP1 dans le tissu adipeux brun de jeunes rats (Glavas et al. 2007). Or la présence d'un tissu brun thermogénique exprimant une UCP1 active a été récemment mise en évidence (Cypess et al. 2009; van Marken Lichtenbelt et al. 2009; Virtanen et al. 2009). L'utilisation d'agonistes stimulant l'activité des adipocytes bruns et la dépense énergétique est donc une nouvelle voie thérapeutique, notamment pour les sujets déficients en MC4R. Chez ces patients, il est probable que les effets secondaires des agonistes de MC4R soient estompés : en effet, chez des sujets sains, l'activation de la voie mélanocortinergique atteint peut-être un plateau de saturation responsable d'effets indésirables. On peut supposer que chez des sujets déficients en MC4R, l'activation d'une voie de signalisation qui fonctionne à 50% de ses capacités peut avoir des effets bénéfiques, aussi bien sur la diminution de la prise alimentaire que sur l'augmentation de la dépense énergétique dans le tissu adipeux brun.

3-2- Approches chirurgicales

Quelques études ont testé la relation entre des variants et la perte de poids après chirurgie bariatrique (Chen et al. 2007; Luyckx et al. 1998; Peraglie 2007; Peterli et al. 2002; Poitou et al. 2005; Potoczna et al. 2004b; Sesti et al. 2005). Ces études attestent que la variation génétique peut influencer la réponse d'un individu à la chirurgie mais les résultats doivent être confirmés. Dans une étude pionnière, Potoczna et coll. ont analysé les effets de variants codants de plusieurs gènes sur la perte de poids. Ils ont montré que la variation de *MC4R* module les issues de la chirurgie bariatrique (Potoczna et al. 2004a). Malheureusement, cette équipe a regroupé indifféremment les variants protecteurs, les mutations « perte de fonction » et les mutations non synonymes sans effet fonctionnel. Nous collaborons avec cette équipe, qui dispose aujourd'hui de l'ADN et de données phénotypiques sur près de 3000 patients opérés par chirurgie bariatrique et suivis pendant six ans à raison d'une visite par an au minimum. Nous nous intéressons donc actuellement aux conséquences de la chirurgie bariatrique (perte de poids, réopérations, complications et améliorations des comorbidités) en fonction de tous les génotypes de *MC4R* connus (les

mutations « perte de fonction », les variants protecteurs V103I et I251L, et le variant de prédisposition rs17782313).

En conclusion, malgré des études nombreuses et approfondies, le fonctionnement de MC4R et l'impact de ses mutations n'est pas encore élucidé. Il représente un paradigme de l'obésité et justifie tous les efforts fournis par les nombreuses équipes de la génétique de l'obésité à identifier mutations et polymorphismes. L'impact fort de l'environnement aussi bien sur des polymorphismes que sur des mutations remet la prise alimentaire et l'activité physique au cœur des préoccupations des médecins en charge de patients obèses. D'autre part, les gènes connus à ce jour ne représentent qu'une faible part de la variabilité génétique associée à l'obésité. Les nouvelles technologies ont permis d'augmenter considérablement la connaissance de la prédisposition aux maladies communes. Les puces génome-entier n'ont pas encore été exploitées au maximum de leurs capacités mais de nouveaux supports d'analyses du génome humain tels que le séquençage des exons à l'échelle du génome se préparent déjà.

POUR FINIR ...

Les études de jumeaux, même les plus récentes, ont montré une héritabilité de l'obésité autour de 80%. En deux ans, les études d'association génome-entier ont découvert 16 nouveaux locus dont l'effet combiné explique une infime part de la variance du trait. Cela implique qu'il faudrait encore identifier plusieurs centaines de polymorphismes.

Mais ne faut-il pas revoir l'évaluation des rôles respectifs de l'environnement et du patrimoine génétique ? L'estimation de l'héritabilité de l'obésité est-elle fautive ou biaisée ? En effet, même si l'information transmise par les polymorphismes est figée, ces derniers interagissent avec un environnement mouvant et contrôlable. Même un effet aussi fort que celui des mutations perte de fonction de MC4R peut être modulé par l'environnement et notamment l'accès à la nourriture. Bien qu'il ne faille pas privilégier l'épidémiologie au détriment de la génétique, il est important de constater que l'environnement n'occupe pas encore une place assez importante dans les études génétiques. Concernant l'obésité polygénique, les études d'association s'intéressent aux interactions des polymorphismes avec certains facteurs environnementaux tels que l'activité physique. Mais ces analyses ne sont effectuées que pour des polymorphismes dont l'association a été suffisamment répliquée dans plusieurs populations. Or ces populations ne partagent pas forcément le même environnement et une interaction potentielle peut interférer avec les répliquations et être négligée. En d'autres termes, il faut commencer par connaître les facteurs confondants environnementaux avant d'étudier leur interaction avec les polymorphismes.

Les principaux facteurs de prédisposition sont notamment le contexte familial, le niveau socio-éducatif, le tabagisme, les grossesses, le stress, la prise d'anti-psychotropes, la ménopause et les perturbations hormonales, la sédentarité, le temps de sommeil quotidien, etc. Pourtant, tous les individus ne réagissent pas de la même façon dans un environnement similaire. Comme je le soulignais plus haut lorsque je proposais des GWAS sexe-spécifiques, des facteurs environnementaux peuvent masquer l'association de SNPs avec l'obésité. Il serait sans doute intéressant d'établir des cohortes de sujets sélectionnés au sein d'un environnement précis et d'effectuer des analyses cas-contrôle dans ces sous-groupes. En quoi est-ce l'avenir puisque la technologie est déjà au point ? Sans doute parce que de telles cohortes n'existent pas et que leur mise en place s'établit sur plusieurs années.

En définitive, le *take home message* de cette thèse serait effectivement l'idée que l'environnement joue un rôle important dans l'obésité, même dans un contexte monogénique. Pourra-t-on un jour précisément expliquer la pénétrance variable de mutations pathogéniques ? Est-ce que les sujets porteurs de mutations de *MC4R* non obèses sont porteurs d'une seconde mutation qui inactive une protéine orexigène ou sur-active une protéine anorexigène ? Toutes les hypothèses peuvent être testées. La connaissance de l'environnement et de ses interactions avec les gènes est la clé des prochaines découvertes en génétique humaine et surtout dans l'obésité : les nouvelles tendances pour les études d'épistasie ou de l'environnement microbien du tractus digestif sont issues de ce mode de pensée et ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de la prédisposition à l'obésité.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- (1998) Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. *Obes Res* 6 Suppl 2: 51S-209S
- (2000) Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser* 894: i-xii, 1-253
- Adams KF, Schatzkin A, Harris TB, et al. (2006) Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med* 355: 763-78
- Adams TD, Gress RE, Smith SC, et al. (2007) Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 357: 753-61
- Adan RA, Tiesjema B, Hillebrand JJ, et al. (2006) The MC4 receptor and control of appetite. *Br J Pharmacol* 149: 815-27
- Ahima RS (2006) Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5: 242S-249S
- Ahima RS, Saper CB, Flier JS, et al. (2000) Leptin regulation of neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 21: 263-307
- Albarado DC, McClaine J, Stephens JM, et al. (2004) Impaired coordination of nutrient intake and substrate oxidation in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Endocrinology* 145: 243-52
- Alharbi KK, Spanakis E, Tan K, et al. (2006) Prevalence and functionality of paucimorphic and private MC4R mutations in a large, unselected European British population, scanned by meltMADGE. *Hum Mutat*
- Alley DE, Chang VW (2007) The changing relationship of obesity and disability, 1988-2004. *Jama* 298: 2020-7
- Anderson JW, Schwartz SM, Hauptman J, et al. (2006) Low-dose orlistat effects on body weight of mildly to moderately overweight individuals: a 16 week, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Pharmacother* 40: 1717-23
- Andreasen CH, Stender-Petersen KL, Mogensen MS, et al. (2008) Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes* 57: 95-101
- Aravich PF, Sclafani A (1983) Paraventricular hypothalamic lesions and medial hypothalamic knife cuts produce similar hyperphagia syndromes. *Behav Neurosci* 97: 970-83
- Arenz S, Ruckerl R, Koletzko B, et al. (2004) Breast-feeding and childhood obesity--a systematic review. *Int J Obes Relat Metab Disord* 28: 1247-56
- Argiolas A (1999) Neuropeptides and sexual behaviour. *Neurosci Biobehav Rev* 23: 1127-42
- Baker M, Gaukrodger N, Mayosi BM, et al. (2005) Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution: a family study. *Diabetes* 54: 2492-6
- Balkau B (1996) [An epidemiologic survey from a network of French Health Examination Centres, (D.E.S.I.R.): epidemiologic data on the insulin resistance syndrome]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 44: 373-5
- Bamshad M, Song CK, Bartness TJ (1999) CNS origins of the sympathetic nervous system outflow to brown adipose tissue. *Am J Physiol* 276: R1569-78
- Bariohay B, Roux J, Tardivel C, et al. (2009) Brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase receptor type B signaling is a downstream effector of the brainstem melanocortin system in food intake control. *Endocrinology* 150: 2646-53
- Beckers S, Mertens I, Peeters A, et al. (2006) Screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Belgian morbidly obese adults and children. *Int J Obes (Lond)* 30: 221-5
- Beckmann JS, Estivill X, Antonarakis SE (2007) Copy number variants and genetic traits: closer to the resolution of phenotypic to genotypic variability. *Nat Rev Genet* 8: 639-46
- Benzinou M, Chevre JC, Ward KJ, et al. (2008a) Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Hum Mol Genet* 17: 1916-21
- Benzinou M, Creemers JW, Choquet H, et al. (2008b) Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet* 40: 943-5

Benzinou M, Walley A, Lobbens S, et al. (2006) Bardet-Biedl syndrome gene variants are associated with both childhood and adult common obesity in French Caucasians. *Diabetes* 55: 2876-82

Berentzen T, Kring SI, Holst C, et al. (2008) Lack of association of fatness-related FTO gene variants with energy expenditure or physical activity. *J Clin Endocrinol Metab*

Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, et al. (2008) Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 8: 200

Bernardis LL, Bellinger LL (1987) The dorsomedial hypothalamic nucleus revisited: 1986 update. *Brain Res* 434: 321-81

Bessesen DH (2008) Update on obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 2027-34

Biebermann H, Krude H, Elsner A, et al. (2003) Autosomal-dominant mode of inheritance of a melanocortin-4 receptor mutation in a patient with severe early-onset obesity is due to a dominant-negative effect caused by receptor dimerization. *Diabetes* 52: 2984-8

Billington CJ, Briggs JE, Grace M, et al. (1991) Effects of intracerebroventricular injection of neuropeptide Y on energy metabolism. *Am J Physiol* 260: R321-7

Blondet A, Gout J, Durand P, et al. (2005) Expression of the human melanocortin-4 receptor gene is controlled by several members of the Sp transcription factor family. *J Mol Endocrinol* 34: 317-29

Bloom SR, Kuhajda FP, Laher I, et al. (2008) The obesity epidemic: pharmacological challenges. *Mol Interv* 8: 82-98

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo J* 18: 1723-9

Bonaglia MC, Ciccone R, Gimelli G, et al. (2008) Detailed phenotype-genotype study in five patients with chromosome 6q16 deletion: narrowing the critical region for Prader-Willi-like phenotype. *Eur J Hum Genet* 16: 1443-9

Boston BA, Blaydon KM, Varnerin J, et al. (1997) Independent and additive effects of central POMC and leptin pathways on murine obesity. *Science* 278: 1641-4

Branson R, Potoczna N, Kral JG, et al. (2003) Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 348: 1096-103

Breen TL, Conwell IM, Wardlaw SL (2005) Effects of fasting, leptin, and insulin on AGRP and POMC peptide release in the hypothalamus. *Brain Res* 1032: 141-8

Bronner G, Sattler AM, Hinney A, et al. (2006) The 103I variant of the melanocortin 4 receptor is associated with low serum triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 535-8

Brownson RC, Boehmer TK, Luke DA (2005) Declining rates of physical activity in the United States: what are the contributors? *Annu Rev Public Health* 26: 421-43

Bulenger S, Marullo S, Bouvier M (2005) Emerging role of homo- and heterodimerization in G-protein-coupled receptor biosynthesis and maturation. *Trends Pharmacol Sci* 26: 131-7

Burke V, Beilin LJ, Dunbar D (2001) Family lifestyle and parental body mass index as predictors of body mass index in Australian children: a longitudinal study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 25: 147-57

Butler AA (2006) The melanocortin system and energy balance. *Peptides* 27: 281-90

Butler AA, Kesterson RA, Khong K, et al. (2000) A unique metabolic syndrome causes obesity in the melanocortin-3 receptor-deficient mouse. *Endocrinology* 141: 3518-21

Butler AA, Marks DL, Fan W, et al. (2001) Melanocortin-4 receptor is required for acute homeostatic responses to increased dietary fat. *Nat Neurosci* 4: 605-11

Buttenheim AM, Wong R, Goldman N, et al. (2009) Does social status predict adult smoking and obesity? Results from the 2000 Mexican National Health Survey. *Glob Public Health*: 1-14

Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, et al. (2009) Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet* 18: 1140-7

Cannon B, Nedergaard J (2004) Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiol Rev* 84: 277-359

- Caprio S, Daniels SR, Drewnowski A, et al. (2008) Influence of race, ethnicity, and culture on childhood obesity: implications for prevention and treatment: a consensus statement of Shaping America's Health and the Obesity Society. *Diabetes Care* 31: 2211-21
- Carnell S, Haworth CM, Plomin R, et al. (2008) Genetic influence on appetite in children. *Int J Obes (Lond)* 32: 1468-73
- Carnell S, Wardle J (2008) Appetite and adiposity in children: evidence for a behavioral susceptibility theory of obesity. *Am J Clin Nutr* 88: 22-9
- Cecil JE, Tavendale R, Watt P, et al. (2008) An obesity-associated FTO gene variant and increased energy intake in children. *N Engl J Med* 359: 2558-66
- Chadt A, Leicht K, Deshmukh A, et al. (2008) Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet* 40: 1354-9
- Chaki S, Hirota S, Funakoshi T, et al. (2003) Anxiolytic-like and antidepressant-like activities of MCL0129 (1-[(S)-2-(4-fluorophenyl)-2-(4-isopropylpiperidin-1-yl)ethyl]-4-[4-(2-methoxy-naphthalen-1-yl)butyl]piperazine), a novel and potent nonpeptide antagonist of the melanocortin-4 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 818-26
- Challis BG, Pritchard LE, Creemers JW, et al. (2002) A missense mutation disrupting a dibasic prohormone processing site in pro-opiomelanocortin (POMC) increases susceptibility to early-onset obesity through a novel molecular mechanism. *Hum Mol Genet* 11: 1997-2004
- Chambers JC, Elliott P, Zabaneh D, et al. (2008) Common genetic variation near MC4R is associated with waist circumference and insulin resistance. *Nat Genet* 40: 716-8
- Chan LF, Webb TR, Chung TT, et al. (2009) MRAP and MRAP2 are bidirectional regulators of the melanocortin receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 6146-51
- Chang YC, Liu PH, Lee WJ, et al. (2008) Common variation in the fat mass and obesity-associated (FTO) gene confers risk of obesity and modulates BMI in the Chinese population. *Diabetes* 57: 2245-52
- Chen AS, Metzger JM, Trumbauer ME, et al. (2000) Role of the melanocortin-4 receptor in metabolic rate and food intake in mice. *Transgenic Res* 9: 145-54
- Chen HH, Lee WJ, Wang W, et al. (2007) Ala55Val polymorphism on UCP2 gene predicts greater weight loss in morbidly obese patients undergoing gastric banding. *Obes Surg* 17: 926-33
- Chen Y, Snieder H, Wang X, et al. (2005) Proopiomelanocortin gene variants are associated with serum leptin and body fat in a normal female population. *Eur J Hum Genet* 13: 772-80
- Christakis NA, Fowler JH (2007) The spread of obesity in a large social network over 32 years. *N Engl J Med* 357: 370-9
- Church TS, Earnest CP, Skinner JS, et al. (2007) Effects of different doses of physical activity on cardiorespiratory fitness among sedentary, overweight or obese postmenopausal women with elevated blood pressure: a randomized controlled trial. *Jama* 297: 2081-91
- Clement K, Dubern B, Mencarelli M, et al. (2008) Unexpected endocrine features and normal pigmentation in a young adult patient carrying a novel homozygous mutation in the POMC gene. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4955-62
- Clement K, Vaisse C, Lahlou N, et al. (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392: 398-401
- Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, et al. (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *Bmj* 320: 1240-3
- Cornes BK, Lind PA, Medland SE, et al. (2009) Replication of the association of common rs9939609 variant of FTO with increased BMI in an Australian adult twin population but no evidence for gene by environment (G x E) interaction. *Int J Obes (Lond)* 33: 75-9
- Creemers JW, Lee YS, Oliver RL, et al. (2008) Mutations in the amino-terminal region of proopiomelanocortin (POMC) in patients with early-onset obesity impair POMC sorting to the regulated secretory pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 4494-9
- Cummings DE, Overduin J (2007) Gastrointestinal regulation of food intake. *J Clin Invest* 117: 13-23
- Cypess AM, Lehman S, Williams G, et al. (2009) Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med* 360: 1509-17

Daniel PB, Fernando C, Wu CS, et al. (2005) 1 kb of 5' flanking sequence from mouse MC4R gene is sufficient for tissue specific expression in a transgenic mouse. *Mol Cell Endocrinol* 239: 63-71

Daniels D, Patten CS, Roth JD, et al. (2003) Melanocortin receptor signaling through mitogen-activated protein kinase in vitro and in rat hypothalamus. *Brain Res* 986: 1-11

Dansinger ML, Gleason JA, Griffith JL, et al. (2005) Comparison of the Atkins, Ornish, Weight Watchers, and Zone diets for weight loss and heart disease risk reduction: a randomized trial. *Jama* 293: 43-53

Davenport JR, Watts AJ, Roper VC, et al. (2007) Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol* 17: 1586-94

Davis JD, Smith GP (1990) Learning to sham feed: behavioral adjustments to loss of physiological postingestional stimuli. *Am J Physiol* 259: R1228-35

de Smith AJ, Purmann C, Walters RG, et al. (2009) A Deletion of the HBII-85 Class of Small Nucleolar RNAs (snoRNAs) is Associated with Hyperphagia, Obesity and Hypogonadism. *Hum Mol Genet*

del Giudice EM, Santoro N, Cirillo G, et al. (2001) Mutational screening of the CART gene in obese children: identifying a mutation (Leu34Phe) associated with reduced resting energy expenditure and cosegregating with obesity phenotype in a large family. *Diabetes* 50: 2157-60

Delplanque J, Vasseur F, Durand E, et al. (2002) Mutation screening of the urocortin gene: identification of new single nucleotide polymorphisms and association studies with obesity in French Caucasians. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 867-9

Delrue MA, Michaud JL (2004) Fat chance: genetic syndromes with obesity. *Clin Genet* 66: 83-93

Dempfle A, Hinney A, Heinzl-Gutenbrunner M, et al. (2004) Large quantitative effect of melanocortin-4 receptor gene mutations on body mass index. *J Med Genet* 41: 795-800

Dina C, Meyre D, Gallina S, et al. (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet* 39: 724-6

Do R, Bailey SD, Desbiens K, et al. (2008) Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. *Diabetes* 57: 1147-50

Donohoue PA, Tao YX, Collins M, et al. (2003) Deletion of codons 88-92 of the melanocortin-4 receptor gene: a novel deleterious mutation in an obese female. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5841-5

Dube MG, Sahu A, Kalra PS, et al. (1992) Neuropeptide Y release is elevated from the microdissected paraventricular nucleus of food-deprived rats: an in vitro study. *Endocrinology* 131: 684-8

Dubern B, Bisbis S, Talbaoui H, et al. (2007) Homozygous null mutation of the melanocortin-4 receptor and severe early-onset obesity. *J Pediatr* 150: 613-7, 617 e1

Dubern B, Lubrano-Berthelie C, Mencarelli M, et al. (2008) Mutational analysis of the pro-opiomelanocortin gene in French obese children led to the identification of a novel deleterious heterozygous mutation located in the alpha-melanocyte stimulating hormone domain. *Pediatr Res* 63: 211-6

Durand E, Boutin P, Meyre D, et al. (2004) Polymorphisms in the amino acid transporter solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter) member 14 gene contribute to polygenic obesity in French Caucasians. *Diabetes* 53: 2483-6

Echwald SM (1999) Genetics of human obesity: lessons from mouse models and candidate genes. *J Intern Med* 245: 653-66

Edwards P, Roberts I (2009) Population adiposity and climate change. *Int J Epidemiol*

El Achhab Y, Meyre D, Bouatia-Naji N, et al. (2009) Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with type 2 diabetes and obesity in the Moroccan population. *Diabetes Metab* 35: 37-42

Ellacott KL, Cone RD (2006) The role of the central melanocortin system in the regulation of food intake and energy homeostasis: lessons from mouse models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1265-74

- Fan W, Dinulescu DM, Butler AA, et al. (2000) The central melanocortin system can directly regulate serum insulin levels. *Endocrinology* 141: 3072-9
- Fanciulli M, Nowsorthy PJ, Petretto E, et al. (2007) FCGR3B copy number variation is associated with susceptibility to systemic, but not organ-specific, autoimmunity. *Nat Genet* 39: 721-3
- Farooqi IS, Drop S, Clements A, et al. (2006) Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* 55: 2549-53
- Farooqi IS, Keogh JM, Kamath S, et al. (2001) Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature* 414: 34-5
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, et al. (2003) Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 348: 1085-95
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al. (2002) Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110: 1093-103
- Farooqi IS, Yeo GS, Keogh JM, et al. (2000) Dominant and recessive inheritance of morbid obesity associated with melanocortin 4 receptor deficiency. *J Clin Invest* 106: 271-9
- Ferrara CM, Lynch NA, Nicklas BJ, et al. (2002) Differences in adipose tissue metabolism between postmenopausal and perimenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4166-70
- Fioramonti X, Contie S, Song Z, et al. (2007) Characterization of glucosensing neuron subpopulations in the arcuate nucleus: integration in neuropeptide Y and pro-opio melanocortin networks? *Diabetes* 56: 1219-27
- Fischer J, Koch L, Emmerling C, et al. (2009) Inactivation of the Fto gene protects from obesity. *Nature* 458: 894-8
- Fisher BL, Schauer P (2002) Medical and surgical options in the treatment of severe obesity. *Am J Surg* 184: 9S-16S
- Ford ES, Mokdad AH (2008) Epidemiology of obesity in the Western Hemisphere. *J Clin Endocrinol Metab* 93: S1-8
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, et al. (2007) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 316: 889-94
- Fredriksson R, Hagglund M, Olszewski PK, et al. (2008) The obesity gene, FTO, is of ancient origin, upregulated during food deprivation and expressed in neurons of feeding-related nuclei of the brain. *Endocrinology*
- Fujioka K (2002) Management of obesity as a chronic disease: nonpharmacologic, pharmacologic, and surgical options. *Obes Res* 10 Suppl 2: 116S-123S
- Gantz I, Miwa H, Konda Y, et al. (1993) Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor. *J Biol Chem* 268: 15174-9
- Gao S, Lane MD (2003) Effect of the anorectic fatty acid synthase inhibitor C75 on neuronal activity in the hypothalamus and brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5628-33
- Gardner CD, Kiazand A, Alhassan S, et al. (2007) Comparison of the Atkins, Zone, Ornish, and LEARN diets for change in weight and related risk factors among overweight premenopausal women: the A TO Z Weight Loss Study: a randomized trial. *Jama* 297: 969-77
- Geller F, Reichwald K, Dempfle A, et al. (2004) Melanocortin-4 receptor gene variant I103 is negatively associated with obesity. *Am J Hum Genet* 74: 572-81
- Gerken T, Girard CA, Tung YC, et al. (2007) The obesity-associated FTO gene encodes a 2-oxoglutarate-dependent nucleic acid demethylase. *Science* 318: 1469-72
- Getting SJ (2006) Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. *Pharmacol Ther* 111: 1-15
- Gibbs J, Young RC, Smith GP (1973) Cholecystokinin elicits satiety in rats with open gastric fistulas. *Nature* 245: 323-5
- Giuliani D, Mioni C, Altavilla D, et al. (2006) Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. *Endocrinology* 147: 1126-35

- Glavas MM, Joachim SE, Draper SJ, et al. (2007) Melanocortinergic activation by melanotan II inhibits feeding and increases uncoupling protein 1 messenger ribonucleic acid in the developing rat. *Endocrinology* 148: 3279-87
- Gluckman PD, Hanson MA (2008) Developmental and epigenetic pathways to obesity: an evolutionary-developmental perspective. *Int J Obes (Lond)* 32 Suppl 7: S62-71
- Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. (2005) The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. *Science* 307: 1434-40
- Gotoda T, Scott J, Aitman TJ (1997) Molecular screening of the human melanocortin-4 receptor gene: identification of a missense variant showing no association with obesity, plasma glucose, or insulin. *Diabetologia* 40: 976-9
- Grant SF, Bradfield JP, Zhang H, et al. (2009) Investigation of the Locus Near MC4R With Childhood Obesity in Americans of European and African Ancestry. *Obesity (Silver Spring)*
- Grant SF, Li M, Bradfield JP, et al. (2008) Association analysis of the FTO gene with obesity in children of Caucasian and African ancestry reveals a common tagging SNP. *PLoS ONE* 3: e1746
- Gray J, Yeo GS, Cox JJ, et al. (2006) Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene. *Diabetes* 55: 3366-71
- Greenfield JR, Miller JW, Keogh JM, et al. (2009) Modulation of blood pressure by central melanocortinergic pathways. *N Engl J Med* 360: 44-52
- Grill HJ, Ginsberg AB, Seeley RJ, et al. (1998) Brainstem application of melanocortin receptor ligands produces long-lasting effects on feeding and body weight. *J Neurosci* 18: 10128-35
- Grill HJ, Kaplan JM (2002) The neuroanatomical axis for control of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 23: 2-40
- Gu W, Tu Z, Kleyn PW, et al. (1999) Identification and functional analysis of novel human melanocortin-4 receptor variants. *Diabetes* 48: 635-9
- Hahn TM, Breininger JF, Baskin DG, et al. (1998) Coexpression of Agrp and NPY in fasting-activated hypothalamic neurons. *Nat Neurosci* 1: 271-2
- Hainerova I, Larsen LH, Holst B, et al. (2007) Melanocortin 4 receptor mutations in obese Czech children: studies of prevalence, phenotype development, weight reduction response, and functional analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 3689-96
- Hakanen M, Raitakari OT, Lehtimäki T, et al. (2009) FTO genotype is associated with body mass index after the age of seven years but not with energy intake or leisure-time physical activity. *J Clin Endocrinol Metab* 94: 1281-7
- Han JC, Liu QR, Jones M, et al. (2008) Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med* 359: 918-27
- Harris KC, Kuramoto LK, Schulzer M, et al. (2009) Effect of school-based physical activity interventions on body mass index in children: a meta-analysis. *Cmaj* 180: 719-26
- Hart Sailors ML, Folsom AR, Ballantyne CM, et al. (2007) Genetic variation and decreased risk for obesity in the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Obes Metab* 9: 548-57
- Haskell-Luevano C, Monck EK (2001) Agouti-related protein functions as an inverse agonist at a constitutively active brain melanocortin-4 receptor. *Regul Pept* 99: 1-7
- Haworth CM, Carnell S, Meaburn EL, et al. (2008a) Increasing heritability of BMI and stronger associations with the FTO gene over childhood. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2663-8
- Haworth CM, Plomin R, Carnell S, et al. (2008b) Childhood obesity: genetic and environmental overlap with normal-range BMI. *Obesity (Silver Spring)* 16: 1585-90
- He W, Lam TK, Obici S, et al. (2006) Molecular disruption of hypothalamic nutrient sensing induces obesity. *Nat Neurosci* 9: 227-33
- Heid IM, Vollmert C, Hinney A, et al. (2005) Association of the 103I MC4R allele with decreased body mass in 7937 participants of two population based surveys. *J Med Genet* 42: e21
- Heid IM, Vollmert C, Kronenberg F, et al. (2008) Association of the MC4R V103I Polymorphism With the Metabolic Syndrome: The KORA Study. *Obesity (Silver Spring)* 16: 369-76

- Hennig BJ, Fulford AJ, Sirugo G, et al. (2009) FTO gene variation and measures of body mass in an African population. *BMC Med Genet* 10: 21
- Hensrud DD, Klein S (2006) Extreme obesity: a new medical crisis in the United States. *Mayo Clin Proc* 81: S5-10
- Herpertz S, Siffert W, Hebebrand J (2003) Binge eating as a phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 349: 606-9; author reply 606-9
- Hill SJ (2006) G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S27-37
- Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, et al. (2006) Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1761-9
- Hirschhorn JN (2009) Genomewide association studies--illuminating biologic pathways. *N Engl J Med* 360: 1699-701
- Ho G, MacKenzie RG (1999) Functional characterization of mutations in melanocortin-4 receptor associated with human obesity. *J Biol Chem* 274: 35816-22
- Hoggard N, Hunter L, Duncan JS, et al. (2004) Regulation of adipose tissue leptin secretion by alpha-melanocyte-stimulating hormone and agouti-related protein: further evidence of an interaction between leptin and the melanocortin signalling system. *J Mol Endocrinol* 32: 145-53
- Holder JL, Jr., Butte NF, Zinn AR (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9: 101-8
- Hruby VJ, Lu D, Sharma SD, et al. (1995) Cyclic lactam alpha-melanotropin analogues of Ac-Nle4-cyclo[Asp5, D-Phe7,Lys10] alpha-melanocyte-stimulating hormone-(4-10)-NH2 with bulky aromatic amino acids at position 7 show high antagonist potency and selectivity at specific melanocortin receptors. *J Med Chem* 38: 3454-61
- Hubacek JA, Pitha J, Adamkova V, et al. (2009) A common variant in the FTO gene is associated with body mass index in males and postmenopausal females but not in premenopausal females. Czech post-MONICA and 3PMFs studies. *Clin Chem Lab Med* 47: 387-90
- Hughes AR, Farewell K, Harris D, et al. (2007) Quality of life in a clinical sample of obese children. *Int J Obes (Lond)* 31: 39-44
- Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, et al. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 88: 131-41
- Inui A (2001) Ghrelin: an orexigenic and somatotrophic signal from the stomach. *Nat Rev Neurosci* 2: 551-60
- Irani BG, Haskell-Luevano C (2005) Feeding effects of melanocortin ligands--a historical perspective. *Peptides* 26: 1788-99
- Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, et al. (2003) Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 112: 1550-60
- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, et al. (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 16: 303-6
- Jacobson P, Ukkola O, Rankinen T, et al. (2002) Melanocortin 4 receptor sequence variations are seldom a cause of human obesity: the Swedish Obese Subjects, the HERITAGE Family Study, and a Memphis cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 4442-6
- Jacobsson JA, Danielsson P, Svensson V, et al. (2008) Major gender difference in association of FTO gene variant among severely obese children with obesity and obesity related phenotypes. *Biochem Biophys Res Commun* 368: 476-82
- James WP (2008) The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 263: 336-52
- Jansen AS, Hoffman JL, Loewy AD (1997) CNS sites involved in sympathetic and parasympathetic control of the pancreas: a viral tracing study. *Brain Res* 766: 29-38

- Jia H, Lubetkin EI (2005) The impact of obesity on health-related quality-of-life in the general adult US population. *J Public Health (Oxf)* 27: 156-64
- Johnson PR, Greenwood MR, Horwitz BA, et al. (1991) Animal models of obesity: genetic aspects. *Annu Rev Nutr* 11: 325-53
- Jonsson A, Franks PW (2009) Obesity, FTO gene variant, and energy intake in children. *N Engl J Med* 360: 1571-2; author reply 1572
- Jonsson A, Renstrom F, Lyssenko V, et al. (2009) Assessing the effect of interaction between an FTO variant (rs9939609) and physical activity on obesity in 15,925 Swedish and 2,511 Finnish adults. *Diabetologia* 52: 1334-8
- Kalra SP, Dube MG, Pu S, et al. (1999) Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. *Endocr Rev* 20: 68-100
- Karlsson J, Persson LO, Sjostrom L, et al. (2000) Psychometric properties and factor structure of the Three-Factor Eating Questionnaire (TFEQ) in obese men and women. Results from the Swedish Obese Subjects (SOS) study. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24: 1715-25
- Katsuki A, Sumida Y, Gabazza EC, et al. (2001) Plasma levels of agouti-related protein are increased in obese men. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1921-4
- Kim MS, Rossi M, Abusnana S, et al. (2000) Hypothalamic localization of the feeding effect of agouti-related peptide and alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Diabetes* 49: 177-82
- Kipping RR, Jago R, Lawlor DA (2008) Obesity in children. Part 1: Epidemiology, measurement, risk factors, and screening. *Bmj* 337: a1824
- Kishi T, Aschkenasi CJ, Lee CE, et al. (2003) Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 457: 213-35
- Klaus S, Keijer J (2004) Gene expression profiling of adipose tissue: individual, depot-dependent, and sex-dependent variabilities. *Nutrition* 20: 115-20
- Kobayashi H, Ogawa Y, Shintani M, et al. (2002) A Novel homozygous missense mutation of melanocortin-4 receptor (MC4R) in a Japanese woman with severe obesity. *Diabetes* 51: 243-6
- Konturek SJ, Pepera J, Zabielski K, et al. (2003) Brain-gut axis in pancreatic secretion and appetite control. *J Physiol Pharmacol* 54: 293-317
- Korenkov M, Sauerland S (2007) Clinical update: bariatric surgery. *Lancet* 370: 1988-90
- Korner A, Kiess W, Stumvoll M, et al. (2008) Polygenic contribution to obesity: genome-wide strategies reveal new targets. *Front Horm Res* 36: 12-36
- Krakoff J, Ma L, Kobes S, et al. (2008) Lower metabolic rate in individuals heterozygous for either a frameshift or a functional missense MC4R variant. *Diabetes* 57: 3267-72
- Krieger N (2003) Does racism harm health? Did child abuse exist before 1962? On explicit questions, critical science, and current controversies: an ecosocial perspective. *Am J Public Health* 93: 194-9
- Krude H, Biebermann H, Luck W, et al. (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 19: 155-7
- Krude H, Biebermann H, Schnabel D, et al. (2003) Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 4633-40
- Kublaoui BM, Holder JL, Jr., Gemelli T, et al. (2006a) Sim1 haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol Endocrinol*
- Kublaoui BM, Holder JL, Jr., Tolson KP, et al. (2006b) SIM1 overexpression partially rescues agouti yellow and diet-induced obesity by normalizing food intake. *Endocrinology* 147: 4542-9
- Kuo JJ, Silva AA, Hall JE (2003) Hypothalamic melanocortin receptors and chronic regulation of arterial pressure and renal function. *Hypertension* 41: 768-74
- Lahmann PH, Lissner L, Gullberg B, et al. (2002) A prospective study of adiposity and all-cause mortality: the Malmo Diet and Cancer Study. *Obes Res* 10: 361-9
- Lam TK, Gutierrez-Juarez R, Poci A, et al. (2005a) Regulation of blood glucose by hypothalamic pyruvate metabolism. *Science* 309: 943-7

- Lam TK, Schwartz GJ, Rossetti L (2005b) Hypothalamic sensing of fatty acids. *Nat Neurosci* 8: 579-84
- Lango A (2009) BSHG abstract - polymorphisms and HNF1A.
- Lappalainen TJ, Tolppanen AM, Kolehmainen M, et al. (2009) The common variant in the FTO gene did not modify the effect of lifestyle changes on body weight: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Obesity (Silver Spring)* 17: 832-6
- Larsen LH, Echwald SM, Sorensen TI, et al. (2005) Prevalence of mutations and functional analyses of melanocortin 4 receptor variants identified among 750 men with juvenile-onset obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 219-24
- Lee YS, Challis BG, Thompson DA, et al. (2006) A POMC variant implicates beta-melanocyte-stimulating hormone in the control of human energy balance. *Cell Metab* 3: 135-40
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, et al. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022-3
- Li H, Wu Y, Loos RJ, et al. (2008) Variants in the fat mass- and obesity-associated (FTO) gene are not associated with obesity in a Chinese Han population. *Diabetes* 57: 264-8
- Lin X, Song K, Lim N, et al. (2009) Risk prediction of prevalent diabetes in a Swiss population using a weighted genetic score--the CoLaus Study. *Diabetologia* 52: 600-8
- Liu H, Kishi T, Roseberry AG, et al. (2003) Transgenic mice expressing green fluorescent protein under the control of the melanocortin-4 receptor promoter. *J Neurosci* 23: 7143-54
- Liu YJ, Liu XG, Wang L, et al. (2008) Genome-wide association scans identified CTNBL1 as a novel gene for obesity. *Hum Mol Genet* 17: 1803-13
- Livingston EH (2002) Obesity and its surgical management. *Am J Surg* 184: 103-13
- Loos RJ, Lindgren CM, Li S, et al. (2008) Common variants near MC4R are associated with fat mass, weight and risk of obesity. *Nat Genet* 40: 768-75
- Loos RJ, Rankinen T, Tremblay A, et al. (2005) Melanocortin-4 receptor gene and physical activity in the Quebec Family Study. *Int J Obes (Lond)* 29: 420-8
- Lopez-Bermejo A, Petry CJ, Diaz M, et al. (2008) The association between the FTO gene and fat mass in humans develops by the postnatal age of two weeks. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 1501-5
- Lu XY, Barsh GS, Akil H, et al. (2003) Interaction between alpha-melanocyte-stimulating hormone and corticotropin-releasing hormone in the regulation of feeding and hypothalamo-pituitary-adrenal responses. *J Neurosci* 23: 7863-72
- Lubrano-Berthelier C, Cavazos M, Le Stunff C, et al. (2003a) The human MC4R promoter: characterization and role in obesity. *Diabetes* 52: 2996-3000
- Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, et al. (2006) Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1811-8
- Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, et al. (2003b) Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet* 12: 145-53
- Lubrano-Berthelier C, Le Stunff C, Bougneres P, et al. (2004) A homozygous null mutation delineates the role of the melanocortin-4 receptor in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2028-32
- Luiten PG, ter Horst GJ, Steffens AB (1987) The hypothalamus, intrinsic connections and outflow pathways to the endocrine system in relation to the control of feeding and metabolism. *Prog Neurobiol* 28: 1-54
- Luquet S (2008) [What's new in the regulation of eating?]. *Med Sci (Paris)* 24: 680-2
- Luyckx FH, Scheen AJ, Proenza AM, et al. (1998) Influence of the A-->G (-3826) uncoupling protein-1 gene (UCP1) variant on the dynamics of body weight before and after gastroplasty in morbidly obese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22: 1244-5
- Lysenko V, Jonsson A, Almgren P, et al. (2008) Clinical risk factors, DNA variants, and the development of type 2 diabetes. *N Engl J Med* 359: 2220-32
- Ma L, Tataranni PA, Bogardus C, et al. (2004) Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. *Diabetes* 53: 2696-9

- MacKenzie RG (2006) Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides* 27: 395-403
- Maddah M, Sharami SH (2009) Obesity among Iranian old adult women in urban and rural areas in Guilan. *Int J Cardiol*
- Maes HH, Neale MC, Eaves LJ (1997) Genetic and environmental factors in relative body weight and human adiposity. *Behav Genet* 27: 325-51
- Malecka-Tendera E, Mazur A (2006) Childhood obesity: a pandemic of the twenty-first century. *Int J Obes (Lond)* 30 Suppl 2: S1-3
- Marsh DJ, Hollopeter G, Huszar D, et al. (1999) Response of melanocortin-4 receptor-deficient mice to anorectic and orexigenic peptides. *Nat Genet* 21: 119-22
- Masek J, Fabry P (1959) High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia* 15: 444-5
- Mason EE, Tang S, Renquist KE, et al. (1997) A decade of change in obesity surgery. National Bariatric Surgery Registry (NBSR) Contributors. *Obes Surg* 7: 189-97
- Mergen M, Mergen H, Ozata M, et al. (2001) A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 3448
- Meyre D, Bouatia-Naji N, Tounian A, et al. (2005) Variants of ENPP1 are associated with childhood and adult obesity and increase the risk of glucose intolerance and type 2 diabetes. *Nat Genet* 37: 863-7
- Meyre D, Delplanque J, Chèvre J, et al. (2009) Genome-wide association study identifies new loci for severe polygenic obesity in European populations. *Nature Genetics*
- Meyre D, Farge M, Lecoecur C, et al. (2008) R125W coding variant in TBC1D1 confers risk for familial obesity and contributes to linkage on chromosome 4p14 in the French population. *Hum Mol Genet* 17: 1798-802
- Meyre D, Lecoecur C, Delplanque J, et al. (2004) A genome-wide scan for childhood obesity-associated traits in French families shows significant linkage on chromosome 6q22.31-q23.2. *Diabetes* 53: 803-11
- Migrenne S, Magnan C, Cruciani-Guglielmacci C (2007) Fatty acid sensing and nervous control of energy homeostasis. *Diabetes Metab* 33: 177-82
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387: 903-8
- Moran TH, Katz LF, Plata-Salman CR, et al. (1998) Disordered food intake and obesity in rats lacking cholecystokinin A receptors. *Am J Physiol* 274: R618-25
- Morandi A, Pinelli L, Petrone A, et al. (2009) The Q121 variant of ENPP1 may protect from childhood overweight/obesity in the Italian population. *Obesity (Silver Spring)* 17: 202-6
- Morgan C, Thomas RE, Cone RD (2004) Melanocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behavior in male mice. *Horm Behav* 45: 58-63
- Morley JE (1987) Neuropeptide regulation of appetite and weight. *Endocr Rev* 8: 256-87
- Mountjoy KG, Jenny Wu CS, Dumont LM, et al. (2003) Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology* 144: 5488-96
- Mountjoy KG, Mortrud MT, Low MJ, et al. (1994) Localization of the melanocortin-4 receptor (MC4-R) in neuroendocrine and autonomic control circuits in the brain. *Mol Endocrinol* 8: 1298-308
- Mountjoy KG, Wild JM (1998) Melanocortin-4 receptor mRNA expression in the developing autonomic and central nervous systems. *Brain Res Dev Brain Res* 107: 309-14
- Muceniece R, Zvejniece L, Kirjanova O, et al. (2005) Beta-MSH inhibits brain inflammation via MC(3)/(4) receptors and impaired NF-kappaB signaling. *J Neuroimmunol* 169: 13-9
- Muller-Riemenschneider F, Reinhold T, Berghofer A, et al. (2008) Health-economic burden of obesity in Europe. *Eur J Epidemiol* 23: 499-509
- Must A, Spadano J, Coakley EH, et al. (1999) The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama* 282: 1523-9

- Mustelin L, Silventoinen K, Pietilainen K, et al. (2009) Physical activity reduces the influence of genetic effects on BMI and waist circumference: a study in young adult twins. *Int J Obes (Lond)* 33: 29-36
- Mykytyn K, Sheffield VC (2004) Establishing a connection between cilia and Bardet-Biedl Syndrome. *Trends Mol Med* 10: 106-9
- Nargund RP, Strack AM, Fong TM (2006) Melanocortin-4 receptor (MC4R) agonists for the treatment of obesity. *J Med Chem* 49: 4035-43
- Navarro M, Cubero I, Chen AS, et al. (2005) Effects of melanocortin receptor activation and blockade on ethanol intake: a possible role for the melanocortin-4 receptor. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 949-57
- Neel JV (1962) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet* 14: 353-62
- Nicholson JR, Peter JC, Lecourt AC, et al. (2007) Melanocortin-4 receptor activation stimulates hypothalamic brain-derived neurotrophic factor release to regulate food intake, body temperature and cardiovascular function. *J Neuroendocrinol* 19: 974-82
- Nickolls SA, Maki RA (2006) Dimerization of the melanocortin 4 receptor: a study using bioluminescence resonance energy transfer. *Peptides* 27: 380-7
- Nieuwenhuizen AG, Rutters F (2008) The hypothalamic-pituitary-adrenal-axis in the regulation of energy balance. *Physiol Behav* 94: 169-77
- Nijenhuis WA, Garner KM, van Rozen RJ, et al. (2003) Poor cell surface expression of human melanocortin-4 receptor mutations associated with obesity. *J Biol Chem* 278: 22939-45
- Nogueiras R, Tovar S, Mitchell SE, et al. (2004) Regulation of growth hormone secretagogue receptor gene expression in the arcuate nuclei of the rat by leptin and ghrelin. *Diabetes* 53: 2552-8
- Nogueiras R, Wiedmer P, Perez-Tilve D, et al. (2007) The central melanocortin system directly controls peripheral lipid metabolism. *J Clin Invest* 117: 3475-88
- O'Brien PE, Dixon JB, Laurie C, et al. (2006) Treatment of mild to moderate obesity with laparoscopic adjustable gastric banding or an intensive medical program: a randomized trial. *Ann Intern Med* 144: 625-33
- Obici S, Feng Z, Arduini A, et al. (2003) Inhibition of hypothalamic carnitine palmitoyltransferase-1 decreases food intake and glucose production. *Nat Med* 9: 756-61
- Ohashi J, Naka I, Kimura R, et al. (2007) FTO polymorphisms in oceanic populations. *J Hum Genet* 52: 1031-5
- Ohshiro Y, Sanke T, Ueda K, et al. (1999) Molecular scanning for mutations in the melanocortin-4 receptor gene in obese/diabetic Japanese. *Ann Hum Genet* 63: 483-7
- Olden K, Wilson S (2000) Environmental health and genomics: visions and implications. *Nat Rev Genet* 1: 149-53
- Oosterom J, Garner KM, den Dekker WK, et al. (2001) Common requirements for melanocortin-4 receptor selectivity of structurally unrelated melanocortin agonist and endogenous antagonist, Agouti protein. *J Biol Chem* 276: 931-6
- Ortega-Alonso A, Sipila S, Kujala UM, et al. (2009) Genetic influences on change in BMI from middle to old age: a 29-year follow-up study of twin sisters. *Behav Genet* 39: 154-64
- Ouahchi K, Lindeman N, Lee C (2006) Copy number variants and pharmacogenomics. *Pharmacogenomics* 7: 25-9
- Ozata M, Ozdemir IC, Licinio J (1999) Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 3686-95
- Palkovits M (1999) Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. *Front Neuroendocrinol* 20: 270-95

- Patten CS, Daniels D, Suzuki A, et al. (2007) Structural and signaling requirements of the human melanocortin 4 receptor for MAP kinase activation. *Regul Pept* 142: 111-22
- Peeters A, Beckers S, Verrijken A, et al. (2009) Possible role for ENPP1 polymorphism in obesity but not for INSIG2 and PLIN variants. *Endocrine*
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, et al. (2007) Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia* 55: 1251-62
- Penicaud L, Leloup C, Fioramonti X, et al. (2006) Brain glucose sensing: a subtle mechanism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9: 458-62
- Peraglie C (2007) Mini-gastric bypass in a patient homozygous for Factor V Leiden. *Obes Surg* 17: 104-7
- Peterli R, Donadini A, Peters T, et al. (2002) Re-operations following laparoscopic adjustable gastric banding. *Obes Surg* 12: 851-6
- Pichler M, Kollerits B, Heid IM, et al. (2008) Association of the melanocortin-4 receptor V103I polymorphism with dietary intake in severely obese persons. *Am J Clin Nutr* 88: 797-800
- Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001) Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci* 2: 727-33
- Poggioli R, Vergoni AV, Bertolini A (1986) ACTH-(1-24) and alpha-MSH antagonize feeding behavior stimulated by kappa opiate agonists. *Peptides* 7: 843-8
- Poitou C, Lacorte JM, Coupaye M, et al. (2005) Relationship between single nucleotide polymorphisms in leptin, IL6 and adiponectin genes and their circulating product in morbidly obese subjects before and after gastric banding surgery. *Obes Surg* 15: 11-23
- Poskitt EM (1995) Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). European Childhood Obesity group. *Acta Paediatr* 84: 961-3
- Potoczna N, Branson R, Kral JG, et al. (2004a) Gene variants and binge eating as predictors of comorbidity and outcome of treatment in severe obesity. *J Gastrointest Surg* 8: 971-81; discussion 981-2
- Potoczna N, Wertli M, Steffen R, et al. (2004b) G protein polymorphisms do not predict weight loss and improvement of hypertension in severely obese patients. *J Gastrointest Surg* 8: 862-8; discussion 868
- Qi L, Corella D, Sorli JV, et al. (2004a) Genetic variation at the perilipin (PLIN) locus is associated with obesity-related phenotypes in White women. *Clin Genet* 66: 299-310
- Qi L, Kang K, Zhang C, et al. (2008a) Fat mass-and obesity-associated (FTO) gene variant is associated with obesity: longitudinal analyses in two cohort studies and functional test. *Diabetes* 57: 3145-51
- Qi L, Kraft P, Hunter DJ, et al. (2008b) The Common Obesity Variant near MC4R Gene Is Associated with Higher Intakes of Total Energy and Dietary Fat, Weight Change, and Diabetes Risk in Women. *Hum Mol Genet*
- Qi L, Shen H, Larson I, et al. (2004b) Gender-specific association of a perilipin gene haplotype with obesity risk in a white population. *Obes Res* 12: 1758-65
- Qi L, Tai ES, Tan CE, et al. (2005) Intragenic linkage disequilibrium structure of the human perilipin gene (PLIN) and haplotype association with increased obesity risk in a multiethnic Asian population. *J Mol Med* 83: 448-56
- Rampersaud E, Mitchell BD, Pollin TI, et al. (2008) Physical activity and the association of common FTO gene variants with body mass index and obesity. *Arch Intern Med* 168: 1791-7
- Ranadive SA, Vaisse C (2008) Lessons from extreme human obesity: monogenic disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 37: 733-51, x
- Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, et al. (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring)* 14: 529-644
- Ravussin E (2005) Physiology. A NEAT way to control weight? *Science* 307: 530-1
- Redinger RN (2008) The prevalence and etiology of nongenetic obesity and associated disorders. *South Med J* 101: 395-9

- Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444: 444-54
- Reinehr T, Hebebrand J, Friedel S, et al. (2009) Lifestyle intervention in obese children with variations in the melanocortin 4 receptor gene. *Obesity (Silver Spring)* 17: 382-9
- Renstrom F, Payne F, Nordstrom A, et al. (2009) Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet* 18: 1489-96
- Rief W, Conradt M, Dierk JM, et al. (2007) Is information on genetic determinants of obesity helpful or harmful for obese people?--A randomized clinical trial. *J Gen Intern Med* 22: 1553-9
- Ritter RC (2004) Gastrointestinal mechanisms of satiation for food. *Physiol Behav* 81: 249-73
- Romijn JA, Corssmit EP, Havekes LM, et al. (2008) Gut-brain axis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 11: 518-21
- Rong R, Tao YX, Cheung BM, et al. (2006) Identification and functional characterization of three novel human melanocortin-4 receptor gene variants in an obese Chinese population. *Clin Endocrinol (Oxf)* 65: 198-205
- Rosik CH (2005) Psychiatric symptoms among prospective bariatric surgery patients: rates of prevalence and their relation to social desirability, pursuit of surgery, and follow-up attendance. *Obes Surg* 15: 677-83
- Rosmond R, Chagnon M, Bouchard C, et al. (2001) A missense mutation in the human melanocortin-4 receptor gene in relation to abdominal obesity and salivary cortisol. *Diabetologia* 44: 1335-8
- Ross SE, Hemati N, Longo KA, et al. (2000) Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science* 289: 950-3
- Russo P, Strazzullo P, Cappuccio FP, et al. (2007) Genetic variations at the endocannabinoid type 1 receptor gene (CNR1) are associated with obesity phenotypes in men. *J Clin Endocrinol Metab* 92: 2382-6
- Rutanen J, Pihlajamaki J, Karhapaa P, et al. (2004) The Val103Ile polymorphism of melanocortin-4 receptor regulates energy expenditure and weight gain. *Obes Res* 12: 1060-6
- Sahoo T, del Gaudio D, German JR, et al. (2008) Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* 40: 719-21
- Salinas CA, Koopmeiners JS, Kwon EM, et al. (2009) Clinical utility of five genetic variants for predicting prostate cancer risk and mortality. *Prostate* 69: 363-72
- Samuel I, Mason EE, Renquist KE, et al. (2006) Bariatric surgery trends: an 18-year report from the International Bariatric Surgery Registry. *Am J Surg* 192: 657-62
- Sanchez-Pulido L, Andrade-Navarro MA (2007) The FTO (fat mass and obesity associated) gene codes for a novel member of the non-heme dioxygenase superfamily. *BMC Biochem* 8: 23
- Santini F, Maffei M, Ceccarini G, et al. (2004) Genetic screening for melanocortin-4 receptor mutations in a cohort of Italian obese patients: description and functional characterization of a novel mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 904-8
- Santos JL, Amador P, Valladares M, et al. (2008) Obesity and eating behaviour in a three-generation Chilean family with carriers of the Thr150Ile mutation in the melanocortin-4 receptor gene. *J Physiol Biochem* 64: 205-10
- Santry HP, Gillen DL, Lauderdale DS (2005) Trends in bariatric surgical procedures. *Jama* 294: 1909-17
- Sawchenko PE, Swanson LW (1983) The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218: 121-44
- Schioth HB, Mutulis F, Muceniece R, et al. (1998) Discovery of novel melanocortin4 receptor selective MSH analogues. *Br J Pharmacol* 124: 75-82
- Schioth HB, Petersson S, Muceniece R, et al. (1997) Deletions of the N-terminal regions of the human melanocortin receptors. *FEBS Lett* 410: 223-8
- Schwartz GJ, Moran TH (2002) Leptin and neuropeptide y have opposing modulatory effects on nucleus of the solitary tract neurophysiological responses to gastric loads: implications for the control of food intake. *Endocrinology* 143: 3779-84

- Schwartz MW, Seeley RJ, Woods SC, et al. (1997) Leptin increases hypothalamic pro-opiomelanocortin mRNA expression in the rostral arcuate nucleus. *Diabetes* 46: 2119-23
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., et al. (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661-71
- Scott LJ, Mohlke KL, Bonnycastle LL, et al. (2007) A genome-wide association study of type 2 diabetes in Finns detects multiple susceptibility variants. *Science* 316: 1341-5
- Scuteri A, Sanna S, Chen WM, et al. (2007) Genome-Wide Association Scan Shows Genetic Variants in the FTO Gene Are Associated with Obesity-Related Traits. *PLoS Genet* 3: e115
- Selkirk JV, Nottebaum LM, Lee J, et al. (2007) Identification of differential melanocortin 4 receptor agonist profiles at natively expressed receptors in rat cortical astrocytes and recombinantly expressed receptors in human embryonic kidney cells. *Neuropharmacology* 52: 459-66
- Seo S, Guo DF, Bugge K, et al. (2009) Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 18: 1323-31
- Sesti G, Perego L, Cardellini M, et al. (2005) Impact of common polymorphisms in candidate genes for insulin resistance and obesity on weight loss of morbidly obese subjects after laparoscopic adjustable gastric banding and hypocaloric diet. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 5064-9
- Singh AS, Mulder C, Twisk JW, et al. (2008) Tracking of childhood overweight into adulthood: a systematic review of the literature. *Obes Rev* 9: 474-88
- Sjostrom L, Narbro K, Sjostrom CD, et al. (2007) Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med* 357: 741-52
- Sloan JL, Mager S (1999) Cloning and functional expression of a human Na(+) and Cl(-)-dependent neutral and cationic amino acid transporter B(0+). *J Biol Chem* 274: 23740-5
- Smith SR, de Jonge L, Pellymounter M, et al. (2001) Peripheral administration of human corticotropin-releasing hormone: a novel method to increase energy expenditure and fat oxidation in man. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 1991-8
- Smolnik R, Molle M, Fehm HL, et al. (1999) Brain potentials and attention after acute and subchronic intranasal administration of ACTH 4-10 and desacetyl-alpha-MSH in humans. *Neuroendocrinology* 70: 63-72
- Song Z, Routh VH (2005) Differential effects of glucose and lactate on glucosensing neurons in the ventromedial hypothalamic nucleus. *Diabetes* 54: 15-22
- Sparso T, Grarup N, Andreassen C, et al. (2009) Combined analysis of 19 common validated type 2 diabetes susceptibility gene variants shows moderate discriminative value and no evidence of gene-gene interaction. *Diabetologia* 52: 1308-14
- Speakman J, Hambly C, Mitchell S, et al. (2007) Animal models of obesity. *Obes Rev* 8 Suppl 1: 55-61
- Speakman JR (2007) A nonadaptive scenario explaining the genetic predisposition to obesity: the "predation release" hypothesis. *Cell Metab* 6: 5-12
- Speakman JR, Rance KA, Johnstone AM (2008) Polymorphisms of the FTO Gene Are Associated With Variation in Energy Intake, but not Energy Expenditure. *Obesity (Silver Spring)*
- Spitzer RL, Yanovski S, Wadden T, et al. (1993) Binge eating disorder: its further validation in a multisite study. *Int J Eat Disord* 13: 137-53
- Srinivasan S, Lubrano-Berthelie C, Govaerts C, et al. (2004) Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest* 114: 1158-64
- Ste Marie L, Miura GI, Marsh DJ, et al. (2000) A metabolic defect promotes obesity in mice lacking melanocortin-4 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12339-44
- Steinthorsdottir V, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al. (2007) A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 39: 770-5
- Stone S, Abkevich V, Russell DL, et al. (2006) TBC1D1 is a candidate for a severe obesity gene and evidence for a gene/gene interaction in obesity predisposition. *Hum Mol Genet* 15: 2709-20
- Stratakis CA, Lafferty A, Taymans SE, et al. (2000) Anisomastia associated with interstitial duplication of chromosome 16, mental retardation, obesity, dysmorphic facies, and digital anomalies:

molecular mapping of a new syndrome by fluorescent in situ hybridization and microsatellites to 16q13 (D16S419-D16S503). *J Clin Endocrinol Metab* 85: 3396-401

Stunkard AJ, Messick S (1985) The three-factor eating questionnaire to measure dietary restraint, disinhibition and hunger. *J Psychosom Res* 29: 71-83

Stutzmann F, Tan K, Vatin V, et al. (2008) Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes* 57: 2511-8

Sugerman HJ (2000) The epidemic of severe obesity: the value of surgical treatment. *Mayo Clin Proc* 75: 669-72

Sutton BS, Langefeld CD, Williams AH, et al. (2005) Association of proopiomelanocortin gene polymorphisms with obesity in the IRAS family study. *Obes Res* 13: 1491-8

Suviolahti E, Oksanen LJ, Ohman M, et al. (2003) The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J Clin Invest* 112: 1762-72

Szatmari P, Paterson AD, Zwaigenbaum L, et al. (2007) Mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat Genet* 39: 319-28

Tallam LS, Stec DE, Willis MA, et al. (2005) Melanocortin-4 receptor-deficient mice are not hypertensive or salt-sensitive despite obesity, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia. *Hypertension* 46: 326-32

Tan K, Pogosheva ID, Yeo GS, et al. (2009) Functional characterization and structural modeling of obesity associated mutations in the melanocortin 4 receptor. *Endocrinology* 150: 114-25

Tanabe K, Gamo K, Aoki S, et al. (2007) Melanocortin receptor 4 is induced in nerve-injured motor and sensory neurons of mouse. *J Neurochem* 101: 1145-52

Tanyolac S, Mahley RW, Hodoglugil U, et al. (2008) Gender differences in the relationship of ENPP1/PC-1 variants to obesity in a Turkish population. *Obesity (Silver Spring)* 16: 2468-71

Tao YX (2005) Molecular mechanisms of the neural melanocortin receptor dysfunction in severe early onset obesity. *Mol Cell Endocrinol* 239: 1-14

Tao YX (2006) Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: structure-function insights and therapeutic implications. *Pharmacol Ther* 111: 949-73

Tenesa A, Campbell H, Theodoratou E, et al. (2009) Common genetic variants at the MC4R locus are associated with obesity, but not with dietary energy intake or colorectal cancer in the Scottish population. *Int J Obes (Lond)* 33: 284-8

Thorleifsson G, Walters GB, Gudbjartsson DF, et al. (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet* 41: 18-24

Timpson NJ, Emmett PM, Frayling TM, et al. (2008) The fat mass- and obesity-associated locus and dietary intake in children. *Am J Clin Nutr* 88: 971-8

Traurig M, Mack J, Hanson RL, et al. (2009) Common Variation in SIM1 is Reproducibly Associated with Body Mass Index in Pima Indians. *Diabetes*

Trevaskis JL, Butler AA (2005) Double leptin and melanocortin-4 receptor gene mutations have an additive effect on fat mass and are associated with reduced effects of leptin on weight loss and food intake. *Endocrinology* 146: 4257-65

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444: 1027-31

Unoki H, Takahashi A, Kawaguchi T, et al. (2008) SNPs in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes in East Asian and European populations. *Nat Genet* 40: 1098-102

Vaisse C, Clement K, Durand E, et al. (2000) Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 106: 253-62

Vaisse C, Clement K, Guy-Grand B, et al. (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet* 20: 113-4

Valassi E, Scacchi M, Cavagnini F (2008) Neuroendocrine control of food intake. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18: 158-68

- Valli-Jaakola K, Lipsanen-Nyman M, Oksanen L, et al. (2004) Identification and characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in morbidly obese Finnish children and adults. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 940-5
- Van Cauter E, Knutson KL (2008) Sleep and the epidemic of obesity in children and adults. *Eur J Endocrinol* 159 Suppl 1: S59-66
- Van den Pol AN, Powley T (1979) A fine-grained anatomical analysis of the role of the rat suprachiasmatic nucleus in circadian rhythms of feeding and drinking. *Brain Res* 160: 307-26
- van der Net JB, Janssens AC, Defesche JC, et al. (2009) Usefulness of genetic polymorphisms and conventional risk factors to predict coronary heart disease in patients with familial hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 103: 375-80
- Van der Ploeg LH, Martin WJ, Howard AD, et al. (2002) A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 11381-6
- van Hoek M, Dehghan A, Witteman JC, et al. (2008) Predicting type 2 diabetes based on polymorphisms from genome-wide association studies: a population-based study. *Diabetes* 57: 3122-8
- van Marken Lichtenbelt WD, Vanhommel JW, Smulders NM, et al. (2009) Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *N Engl J Med* 360: 1500-8
- VanLeeuwen D, Steffey ME, Donahue C, et al. (2003) Cell surface expression of the melanocortin-4 receptor is dependent on a C-terminal di-isoleucine sequence at codons 316/317. *J Biol Chem* 278: 15935-40
- Virtanen KA, Lidell ME, Orava J, et al. (2009) Functional brown adipose tissue in healthy adults. *N Engl J Med* 360: 1518-25
- Vongs A, Lynn NM, Rosenblum CI (2004) Activation of MAP kinase by MC4-R through PI3 kinase. *Regul Pept* 120: 113-8
- Vrinten DH, Gispen WH, Groen GJ, et al. (2000) Antagonism of the melanocortin system reduces cold and mechanical allodynia in mononeuropathic rats. *J Neurosci* 20: 8131-7
- Wahlen K, Sjolín E, Hoffstedt J (2008) The common rs9939609 gene variant of the fat mass- and obesity-associated gene FTO is related to fat cell lipolysis. *J Lipid Res* 49: 607-11
- Walley AJ, Asher JE, Froguel P (2009) The genetic contribution to non-syndromic human obesity. *Nat Rev Genet*
- Wangensteen T, Kolsgaard ML, Mattingsdal M, et al. (2009) Mutations in the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene in obese patients in Norway. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 117: 266-73
- Wardle J, Carnell S, Haworth CM, et al. (2008a) Obesity-associated genetic variation in FTO is associated with diminished satiety. *J Clin Endocrinol Metab*
- Wardle J, Carnell S, Haworth CM, et al. (2008b) Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr* 87: 398-404
- Wardle J, Llewellyn C, Sanderson S, et al. (2009) The FTO gene and measured food intake in children. *Int J Obes (Lond)* 33: 42-5
- Weide K, Christ N, Moar KM, et al. (2003) Hyperphagia, not hypometabolism, causes early onset obesity in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Physiol Genomics* 13: 47-56
- Weiss LA, Pan L, Abney M, et al. (2006) The sex-specific genetic architecture of quantitative traits in humans. *Nat Genet* 38: 218-22
- Westerterp KR, Speakman JR (2008) Physical activity energy expenditure has not declined since the 1980s and matches energy expenditures of wild mammals. *Int J Obes (Lond)* 32: 1256-63
- Wikberg JE, Mutulis F (2008) Targeting melanocortin receptors: an approach to treat weight disorders and sexual dysfunction. *Nat Rev Drug Discov* 7: 307-23
- Wilborn C, Beckham J, Campbell B, et al. (2005) Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. *J Int Soc Sports Nutr* 2: 4-31
- Willer CJ, Speliotes EK, Loos RJ, et al. (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet* 41: 25-34
- Williams DL, Cummings DE (2005) Regulation of ghrelin in physiologic and pathophysiologic states. *J Nutr* 135: 1320-5

- Williams G, Cai XJ, Elliott JC, et al. (2004) Anabolic neuropeptides. *Physiol Behav* 81: 211-22
- Williams PT, Blanche PJ, Krauss RM (2005) Behavioral versus genetic correlates of lipoproteins and adiposity in identical twins discordant for exercise. *Circulation* 112: 350-6
- Wing MR, Ziegler J, Langefeld CD, et al. (2009) Analysis of FTO gene variants with measures of obesity and glucose homeostasis in the IRAS Family Study. *Hum Genet* 125: 615-26
- Wolff GL, Roberts DW, Mountjoy KG (1999) Physiological consequences of ectopic agouti gene expression: the yellow obese mouse syndrome. *Physiol Genomics* 1: 151-63
- Xiang Z, Litherland SA, Sorensen NB, et al. (2006) Pharmacological characterization of 40 human melanocortin-4 receptor polymorphisms with the endogenous proopiomelanocortin-derived agonists and the agouti-related protein (AGRP) antagonist. *Biochemistry* 45: 7277-88
- Xu B, Goulding EH, Zang K, et al. (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6: 736-42
- Yang Y, Chen M, Lai Y, et al. (2003) Molecular determination of agouti-related protein binding to human melanocortin-4 receptor. *Mol Pharmacol* 64: 94-103
- Yang Y, Chen M, Loux TJ, et al. (2005) Molecular mechanism of the intracellular segments of the melanocortin-4 receptor for NDP-MSH signaling. *Biochemistry* 44: 6971-9
- Yang YK, Fong TM, Dickinson CJ, et al. (2000) Molecular determinants of ligand binding to the human melanocortin-4 receptor. *Biochemistry* 39: 14900-11
- Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, et al. (2008) Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet* 40: 1092-7
- Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, et al. (1999) Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 5: 1066-70
- Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, et al. (2004) A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7: 1187-9
- Yeo GS, Farooqi IS, Aminian S, et al. (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet* 20: 111-2
- Yeo GS, Lank EJ, Farooqi IS, et al. (2003) Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet* 12: 561-74
- Young EH, Wareham NJ, Farooqi S, et al. (2007) The V103I polymorphism of the MC4R gene and obesity: population based studies and meta-analysis of 29 563 individuals. *Int J Obes (Lond)*
- Zhong Q, Sridhar S, Ruan L, et al. (2005) Multiple melanocortin receptors are expressed in bone cells. *Bone* 36: 820-31

RESUME

Résumé

Les premières mutations causales d'obésité dans le gène du récepteur 4 aux mélanocortines ont été identifiées en 1998. Depuis lors, *MC4R* a suscité un intérêt constant dans l'étude de l'obésité monogénique. C'est aujourd'hui la forme la plus commune d'obésité monogénique. En 2004, un variant rare non synonyme a été associé avec une diminution du risque d'obésité.

L'étude approfondie de 25 familles tri-générationnelles porteuses de mutations pathogéniques de *MC4R* nous a permis de constater que la pénétrance des mutations est dépendante des générations (40% chez les grands-parents, 60% chez les parents et 78% chez les enfants, $p=0,032$). De plus, 50% des adultes non obèses à 20 ans sont devenus obèses de classe III ($IMC \geq 40 \text{ kg/m}^2$) à 45 ans. Les pressions de l'environnement obésogénique moderne peuvent expliquer ces deux phénomènes. En contrepartie, les mutations de *MC4R* ont le même effet quel que soit l'environnement socio-éducatif.

Au cours de ce séquençage extensif, nous avons constaté que *MC4R* possède 3 variants rares. Le génotypage de ces variants chez 16800 individus européens de 10 cohortes différentes nous a permis de montrer l'association négative d'un second variant rare de *MC4R* avec l'obésité. En effet, le variant I251L diminue le risque d'obésité dans une large étude cas-contrôle française ($OR=0,42$; $95CI \ 0,25-0,73$; $p=0,001$) et dans 3 études de cas-contrôle de réplication. Ce variant est sous-transmis aux enfants dans des familles avec obésité (23,3%, $p=0,003$). Il est associé avec une diminution de 0,76 DS du z-score d'IMC dans ces familles et de 0,35 DS dans des familles de population générale. Dans la population générale adulte, il est associé avec une diminution de 0,7 kg/m^2 . Deux méta-analyses ont confirmé l'association négative du précédent variant V103I et du nouveau variant I251L avec l'obésité.

La nouvelle technologie des puces à ADN et les études d'association génome-entier ont identifié deux locus dont les polymorphismes sont associés avec le risque d'obésité. Le premier locus est situé dans le premier intron du gène *FTO* dont la fonction et le rôle sont encore méconnus. Le second locus est situé à 188 kb en aval de la séquence codante de *MC4R*.

Nous avons testé l'effet du rs1421085 de *FTO* et du rs17782313 de *MC4R* sur les troubles du comportement alimentaire dans trois cohortes d'obèses et deux cohortes de population générale. Le rs1421085 n'est associé avec aucun trouble dans aucune cohorte. Par contre, le rs17782313 est associé avec le grignotage chez les enfants obèses français ($p=0,01$), les adultes obèses suisses ($p=0,04$) et les adolescents finlandais ($p=0,04$). Il est également associé avec une augmentation du score de faim de Stunkard chez les adultes obèses français ($p=0,02$) et avec une tendance des enfants obèses français à ingérer de grandes quantités d'aliments pendant les repas ($p=0,04$).

Dans les populations générales d'adolescents finlandais et d'adultes français, les deux polymorphismes ont un effet additif sur l'obésité, l'IMC et la masse grasse : les porteurs de 3 ou 4 allèles à risque ont une susceptibilité 3 fois supérieure à celle des individus ne portant aucun allèle à risque de devenir obèses durant l'enfance. Un faible niveau d'activité physique accentue les effets du rs1421085 ($p=0,01$) tandis que le rs17782313 montre une interaction avec le sexe : l'association est plus significative chez les hommes que chez les femmes.

En résumé, les résultats obtenus au cours des études de *MC4R* et *FTO* montrent surtout l'impact de l'environnement aussi bien sur des polymorphismes que sur des mutations « perte de fonction », ce qui place la prise alimentaire et l'activité physique au cœur des préoccupations des médecins en charge de patients obèses.

ABSTRACT

Abstract

The first mutations in the melanocortin receptor 4 leading to obesity have been identified in 1998. Afterwards, this gene has been extensively studied in the context of monogenic obesity and represents the most common monogenic form of obesity. In 2004, one rare non synonymous variant has been associated with a decrease in the obesity risk.

Through the extensive study of 25 French tri-generational pedigrees with probands carrying a pathogenic mutation in the *MC4R* gene, we showed that the penetrance of mutations in the *MC4R* gene was generation-dependant (40% in grandparents, 60% in parents and 78% in children). Moreover, 50% of the obligate adults who were not obese at 20y became morbidly obese ($BMI \geq 40 \text{ kg/m}^2$) at 45y. Pressures from the modern obesogenic environment may be part of the explanation of these two phenomena. However, the effects of the mutations in the *MC4R* gene overcame the protective influence of the educational level.

Thanks to this extensive sequencing, we identified three rare variants in the sequence of the *MC4R* gene. We genotyped these variants in 16800 subjects of European descent from 10 cohorts and demonstrated the negative association of a second rare *MC4R* variant with obesity. Indeed the I251L variant was associated with a significant decrease in obesity risk in a French case-control study (OR=0.42; 95CI 0.25-0.73; $p=0.001$) and in 3 case-control replication studies. This variant is under-transmitted to the obese children (23.3%, $p=0.003$). It was associated with a decrease of 0.76 SD in the BMI z-score in these families and of 0.35 SD in families from a population-based cohort. In a second general population, it was associated with the diminution of the BMI (-0.7 kg/m^2). Two meta-analyses confirmed the negative association of the previously identified V103I variant and the new I251L variant with obesity risk.

In the meantime, the chip technology and genome-wide association studies developed and two loci were strongly associated with obesity. The first one is located in the first intron of the *FTO* gene, whose role and function are still unknown. The second hit is located 188 kb downstream of the *MC4R* coding region.

We tested the association between the *FTO* rs1421085/*MC4R* rs17782313 and troubles in eating behaviours in three cohorts of obese subjects and two population-based cohorts. No consistent association of the *FTO* rs1421085 and eating behaviours was found in any studied population. On the contrary, the *MC4R* rs17782313 was reproducibly associated with the snacking pattern in the French obese children ($p=0.01$), the Swiss obese adults ($p=0.04$) and the Finnish teenagers ($p=0.04$). This variant was also associated with a higher Stunkard hunger score in the French obese adults ($p=0.02$) and the tendency to eat large amounts of food during meals for the French obese children ($p=0.04$).

In both general populations, the *FTO* rs1421085 and *MC4R* rs17782313 had an additive effect on BMI, obesity and fat mass: subjects carrying 3-4 risk alleles had a 3-fold higher susceptibility to become obese during childhood than individuals without any risk allele. Low levels of physical activity accentuated the effect of the *FTO* polymorphism on BMI increase and obesity prevalence whereas the *MC4R* rs17782313 interacted with the gender: the association was more significant in men than in women.

In summary, the different studies on *MC4R* and *FTO* genes highlighted the strong influence of environment on polymorphisms and mutations effects. This might lead food intake and physical activity on top of the obesity-related medical concern again.