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

Hélène CHOQUET

Contribution du gène *PCSK1* aux formes monogéniques et polygéniques d'obésité

Thèse dirigée par le Docteur David Meyre

Date de soutenance : le 8 octobre 2010

Jury :

Mme le Professeur Hélène Dollfus	**Rapporteur**
Mr le Professeur Olivier Ziegler	**Rapporteur**
Mr le Professeur Ronan Roussel	**Examinateur**
Mr le Professeur Christophe Magnan	**Examinateur**
Mr le Doyen Jean-Charles Cailliez	**Examinateur**
Mr le Docteur David Meyre	**Directeur de thèse**

Remerciements

Je remercie …

Les Professeurs **Hélène Dollfus** et **Olivier Ziegler** de m'avoir fait l'honneur de juger mes travaux de thèse. Je remercie également les Professeurs **Ronan Roussel**, **Christophe Magnan** et **Jean-Charles Cailliez** d'avoir accepté d'examiner ce travail et de faire partie du jury.

Le Professeur **Philippe Froguel** de m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire et de m'avoir apporté les moyens techniques et financiers nécessaires à la réalisation de mes travaux.

Le Professeur **John Creemers** de m'avoir encouragée à poursuivre en thèse.

Le Docteur **David Meyre**, mon directeur de thèse de m'avoir permis de réaliser ma thèse malgré mon parcours atypique et de m'avoir encadrée durant ces deux dernières années « concentrées » et de m'avoir initiée au métier de chercheur. Merci David de m'avoir transmis une partie de tes nombreuses connaissances, merci de m'avoir consacré une énorme partie de ton temps malgré tes nouvelles responsabilités. Merci pour ta disponibilité, ta patience (modèle allélique …) et tes explications. Enfin merci pour ta bonne humeur.

Stéphane Lobbens, mon 1er maître de stage, de m'avoir initiée aux techniques de génétique moléculaire et de m'avoir aidée à décrocher mon 1er job. Tu vois, un peu grâce à toi je ne travaillerai pas dans une centrale nucléaire !

Mes responsables scientifiques, les Docteurs **Karin Séron**, **Stéphane Cauchi** (à nos soirées poker !), et **Cyril Couturier** qui m'ont supervisée pendant ces années où j'étais ingénieur d'études et avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Le Docteur **Nabila Bouatia-Naji** ma voisine de bureau. Merci Nabila pour ton écoute, tes conseils avisés, j'ai beaucoup apprécié ta compagnie et nos échanges.

Audrey Leloire et **Marlène Huyvaert** pour tous les bons moments passés ensemble.

Le trio de choc **Jérôme**, **Manue** et **VV** (mister bisous) … et plus récemment **Sidonie** pour leur sympathie.

Les « banquiers » **Marianne Deweirder** et **Frédéric Allegaert**.

Marcel Marquez (le roi de la muscu) pour sa sympathie. Bonne chance pour la suite !

Toute **l'équipe bioinfo-biostatistiques**, particulièrement Sophie Gallina pour son professionnalisme et sa réactivité, Cécile Lecoeur pour sa gentillesse, David Leguicher (fini le chantage au chocolat !), Franck (mon photographe préféré), Stef Gaget pour ses solutions magiques à tous les problèmes d'excel.

Tous les **membres de l'unité**, les chargés du recrutement, les responsables de la gestion administrative.

Plus personnellement, je remercie …

JC2, merci de m'avoir transmis ta passion pour la science.

Quentin, mon cher et tendre de m'avoir supportée depuis le bac et pour sa patience lors de mes rentrées tardives.

Mes parents pour m'avoir encouragée à faire de longues études et particulièrement ma mère pour son soutien moral.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLES……6
LISTE DES FIGURES……..7
LISTE DES ABREVIATIONS……..8

INTRODUCTION……..10
I - INTRODUCTION GENERALE……11
A – Epidémiologie de l'obésité……11
1 – Définitions……11
2 – Prévalence de l'obésité dans le monde……..12
B – Complications associées……14
1 – Syndrome métabolique……..14
2 – Autres complications relatives à l'obésité……15
3 – Complications psychologiques et sociales……15
C – Traitements et prévention……16
1 – Modifications du mode de vie……16
2 – Pharmacothérapie……...16
3 – Chirurgie……17
4 – Prévention……..18
D – Etiologie de la maladie……19
1 – Facteurs environnementaux……19
2 – Facteurs épigénétiques……22
3 – Facteurs génétiques……23
Gènes associés à une obésité monogénique chez l'Humain
Gènes associés à une obésité syndromique chez l'Humain
Gènes de susceptibilité à une obésité polygénique chez l'Humain

II – PC1/3 : UNE PROTEINE ISSUE DE LA FAMILLE DES PROHORMONES CONVERTASES (PCs)……29
A – Vue d'ensemble des prohormones convertases (PCs)……29
1-Historique……...29
2-Les proprotéines convertases (PCs)……...29
3-Structure des proprotéines convertases……..30
4-Maturation des proprotéines convertases……...31
5-Maturation de la protéine PC1/3……32
6-Maturation de subtrats par les proprotéines convertases: prédiction des substrats, spécificité et redondance……...32
7-Inhibiteurs et régulateurs de PC1/3……33
8-Expression des proprotéines convertases……...34
9-Pathologies associées aux proprotéines convertases……..36
Maladies génétiques
Maladies infectieuses
Cancers
Neurodégénérescence
Dyslipidémie
10-Souris inactivées pour les proprotéines convertases……....39
B – Déficiences en *PCSK1* et phénotypes associés……....41
1-Déficiences en *PCSK1* chez la souris……..41
2-Déficiences en *PCSK1* chez l'homme……42
Buts de l'étude……..44

PRESENTATION DES TRAVAUX……..45
ARTICLE 1…….46
Contribution de variants communs codants du gène *PCSK1* dans l'obésité polygénique
ARTICLE 2…….51
Contribution de mutations rares *PCSK1* dans l'obésité monogénique

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES…….55
I – DICUSSION……...55
1-*PCSK1* et obésité polygénique……..55
Réplications
Autres rôles de PCSK1 ?
2-*PCSK1* et obésité monogénique……57
Apports de notre étude
Limitations de notre projet
3-*PCSK1* et obésité monogénique et polygénique……....58
Continuum obésité monogénique et polygénique
Associations synthétiques

II – PERSPECTIVES POUR *PCSK1*.....60
1-Variants communs de *PCSK1* et associations traits spécifiques……60
2-*PCSK1* : coségrégations et études phénotypiques……....60
3-Locus *PCSK1* et CNVs……..61
4-Contribution de *PCSK1* dans diverses ethnies……...62

III – PERSPECTIVES GENERALES……...…...63
1-Identification de nouveaux gènes causatifs de l'obésité par approche gène candidat..…63
Autres prohormones convertase
Etude de nouvelles voies moléculaires
Projet de séquençage gènes candidats
2- Identification de nouveaux gènes causatifs de l'obésité par approche génome entier….67
Projet de séquençage
« Homozygocity mapping »
Consortiums GWAS SNPs et CNVs
3-Nouveau traitement potentiel : modification de la flore bactérienne……...…..68
4-Génétique et prédiction……...……...68
Les gènes monogéniques de nouveau sur le devant de la scène
Les variants communs : encore peu prédictifs
Réponse aux traitements
Intégration de données issues de diverses sources
Pour conclure …

ANNEXES……74
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES……..83
RESUME……....103
ABSTRACT……106

LISTE DES TABLES

Table 1 : Seuils de corpulence, définis par l'OMS…….11

Table 2 : Principales techniques de chirurgie de l'obésité (d'après Fisher & Schauer 2002 et Livingston 2002)…….18

Table 3 : Nomenclature des proprotéines convertases……30

Table 4 : Localisation subcellulaire et distribution tissulaire des proprotéines convertases...35

Table 5: Phénotypes des souris déficientes en proprotéines convertases (d'après Scamuffa N, FASEB J, 2006)……40

Table 6 : Associations des variants rs6232 et rs6235 avec l'obésité dans les études cas-contrôles……48

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde (d'après l'OMS 2005)……..12

Figure 2 : Prévisions mondiales de l'obésité (d'après l'OMS 2005)……..13

Figure 3 : Priorité du gène monogénique à séquencer en fonction des phénotypes spécifiques associés (d'après Choquet et Meyre 2010)…….24

Figure 4 : Représentation schématique des proprotéines convertases……31

Figure 5 : Activation des proprotéines convertases (d'après Seidah NG and Prat A, J Mol Med, 2007)…….……32

Figure 6: La balance protéique de PCSK9 et du récepteur LDL (d'après Seidah NG and Prat A, J Mol Med, 2007)……39

Figure 7: Comparaison des courbes de croissance des souris déficientes en PC1/3 et des souris sauvages (d'après Zhu X et al., PNAS, 2002)……...41

Figure 8: Stratégie intégrative pour l'identification précoce des sujets prédisposés à l'obésité (d'après Choquet H et Meyre D., Genome Medicine, 2010) (Annexe 2)…….72

LISTE DES ABREVIATIONS

AAP	Académie américaine de pédiatrie
ACTH	hormone adrénocortocotrophique
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ADN	acide désoxyribonucléique
AGRP	Agouti-related peptide
ALMS1	Astrom syndrome 1
ASPS	alveolar soft-part sarcoma
BBS	syndrome de Bardet-Biedl
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BNP	brain natriuretic peptide
CART	cocaïne et amphétamine regulated peptide
CCK	cholécystokinine
CI	intervalle de confiance
CNR1	cannabinoid receptor 1
CNV	copy number variation
COH1	cohen syndrome 1
CPE	carboxypeptidase E
CRS	caudal regression syndrome
DESIR	Data from the Epidemiological Study on the Insulin Resistance Syndrome
DEXA	Dual energy X-ray absorptiometry = absorption bi-photonique à rayons X
DT2	diabète de type 2
ECOG	European Children Obesity Group
ENPP1	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1
FTO	fat mass and obesity associated
GHRH	growth hormone releasing hormone
GIP	glucose-dependent insulino-tropic polypeptide precursor
GLP-1	glucagon like peptide 1
RE	réticulum endoplasmique
GWAS	genome-wide association study = étude d'association génome entier
GSI	granules de sécrétion immatures
GSM	granules de sécrétion matures
HOMA-B	homeostasis model assessment beta-cell function
HOMA-S	homeostasis model assessment insulin sensitivity
IMC	indice de masse corporelle
IRM	imagerie par résonance magnétique
KO	knockout
LDL	low-density lipoprotein
LDLR	récepteur du LDL
LEP	leptine
LEPR	récepteur à la leptine
LPH	lipotropic-stimulating hormone
MAF	minor allele frequency
Mb	méga base
MEC	matrice extracellulaire
MC4R	récepteur 4 aux mélanocortines
MP	membrane plasmique
MSH	melanocyte-stimulating hormone
Nhlh2	nescient helix-loop-helix 2
OMS	organisation mondiale de la santé
OR	Odd-ratio
p	p-value
PANTHER	Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships
PAX6	paired box 6
PC	prohormone convertase

PC1/3/PCSK1	prohormone convertase 1
PolyPhen	Polymorphism Phenotyping
POMC	proopiomélanocortine
proSAAS/PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor
PMut	Prediction Mutation
PWS	syndrome de Prader-Willi
RTG	réseau trans-golgien
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SIM1	single minded homologue 1
SLC6A14	solute carrier family 6 (amino acid transporter), member 14
SNAP	screening for non-acceptable polymorphisms
SNP	single nucleotide polymorphism
STAT3	signal transducter and activator of transcription 3
TBC1D1	TBC1 domain family, member 1
TRKB/NTRK2	tyrosine kinase receptor B
VACTERL	syndrome Vertèbres Anus Cœur Trachée Reins Membres
VEGF-C	vascular endothelial growth factor C
WAGR	Wilms tumor, Aniridia, Genitourinary malformations and mental Retardation
WNT10B	wingless-type MMTV integration site family, member 10B
WT	Wild-Type
WT1	Wilms tumor 1

INTRODUCTION

I - INTRODUCTION GENERALE

A – Epidémiologie de l'obésité

1-Définitions

L'obésité est reconnue comme un problème majeur de santé publique depuis 1997 (1). La gravité de l'obésité est évaluée par l'indice de masse corporelle (IMC). Il correspond au poids divisé par le carré de la taille exprimé en kg/m². L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a défini les seuils de maigreur, normalité, surpoids et obésité selon la capacité de travail, la sensibilité aux infections et les statistiques de mortalité. Ces seuils sont présentés en **Table 1**.

IMC (kg/m²)	Statut
<18.5	maigreur
18.5-25	normalité
25-30	surpoids
30-35	Obésité modérée ou de classe I
35-40	Obésité sévère ou de classe II
≥40	Obésité morbide ou de classe III

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

Chez l'enfant, sachant que l'IMC varie selon l'âge et le sexe entre la naissance et l'âge adulte, les seuils correspondants aux percentiles sont utilisés et sont établis à partir de populations de références. Une population de référence a été établie afin de proposer une définition internationale standard du surpoids et de l'obésité infantile en se basant sur les données de six larges études de croissance (2). Aux Etats-Unis, l'obésité infantile est définie par l'IMC ≥ 95ème percentile pour un sexe et un âge donné (3). En Europe, l'ECOG (European Children Obesity Group) a défini le surpoids chez l'enfant pour des valeurs d'IMC comprises entre le 90ème et le 97ème percentile, et l'obésité pour des valeurs d'IMC ≥ 97ème percentile (4).

D'autres méthodes basées sur l'évaluation de la composition corporelle et en particulier sur l'estimation de la masse grasse sont utilisées en complément de l'IMC. La mesure du tour de taille (seuil d'obésité défini à 102 cm pour les hommes et à 88 cm pour les femmes) (1998) et l'épaisseur des plis cutanés sont des mesures directes reflétant la distribution de la graisse sous-cutanée et viscérale (5). La composition corporelle peut être mesurée par densitométrie, absorptiométrie biphotonique à rayons X (DEXA), impédance

bioélectrique et par des méthodes d'imagerie en coupe utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM) et la tomodensitométrie (6, 7). Cependant ces méthodes sont plus difficiles à mettre en place et sont plus coûteuses et le calcul de l'IMC reste la méthode la plus utilisée pour définir l'obésité.

2–Prévalence de l'obésité dans le monde

L'obésité est devenue un problème de santé à l'échelle mondiale. Ces dernières années, la prévalence de l'obésité n'a cessé d'augmenter partout dans le monde touchant à la fois les pays développés et les pays en voie de développement. Plus récemment, les études sur le surpoids et l'obésité de l'enfant ont montré que l'épidémie atteignait un plateau dans les pays les plus développés (8-10). Aux Etats-Unis, les obèses représentent 33% de la population (**Figure 1**). 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 (11).

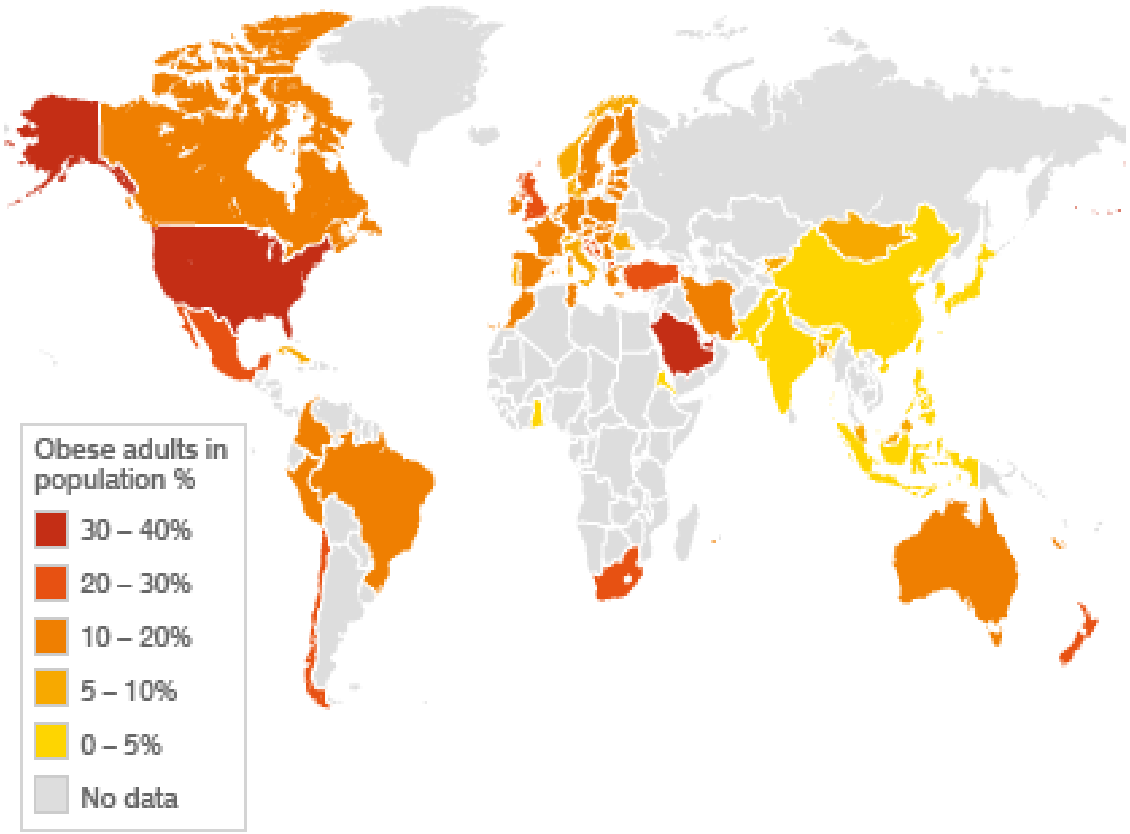


Figure 1 : Prévalence de l'obésité dans le monde (d'après l'OMS 2005)

D’après les projections de l’OMS pour 2015, environ 2.3 milliard d’adultes (âgés de 15 ans et plus) seront en surpoids, et plus de 700 millions d’adultes seront obèses (**Figure 2**).

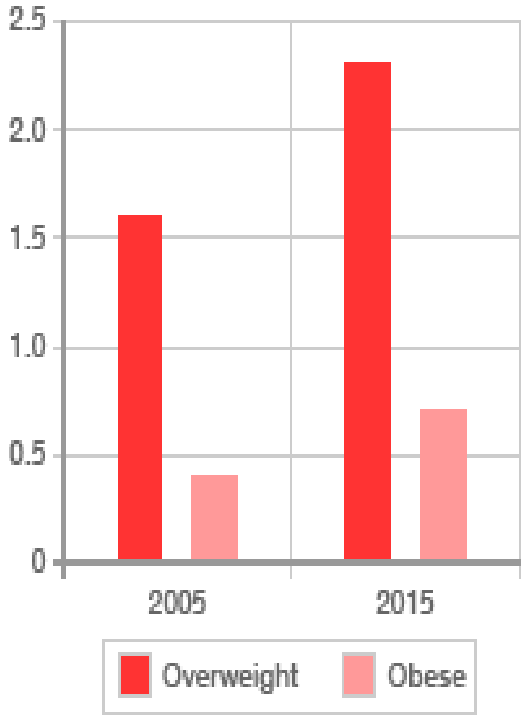


Figure 2 : Prévisions mondiales de l’obésité (d’après l’OMS 2005)

Chez l'enfant, la prévalence du surpoids et de l'obésité est en augmentation dans le monde entier, et ce à un rythme alarmant. Aujourd'hui, environ un enfant ou adolescent sur trois est en surpoids ou obèse aux Etats-Unis. Au cours des trois dernières décennies, la prévalence de l'obésité a triplé chez les enfants de 2 à 5 ans et chez les jeunes 12-19 ans, et a quadruplé pour les enfants de 6-11 ans (12). Selon l'Organisation mondiale de la santé et l'International Obesity Task Force, plus de 155 millions d'enfants et adolescents dans le monde sont en surpoids et 40 millions sont obèses.

B – Complications associées

Une apparition précoce de l'obésité est associée à un risque accru de chronicité de l'obésité à l'âge adulte (13). L'obésité favorise un grand nombre de pathologies qui lui sont souvent associées, appelées comorbidités. Ces complications apparaissent ou s'aggravent d'autant plus que l'IMC est important et leur présence influe sur le pronostic vital et contribue à la détérioration de la qualité de vie. D'après l'OMS plus d'un million de décès chaque année peuvent être attribués à des maladies liées à une surcharge pondérale en Europe. L'obésité est associée à un risque 2 à 3 fois plus élevé de mortalité toutes causes confondues (14). Les complications associées à l'obésité pourraient conduire d'après les projections à une diminution de l'espérance de vie de 2 à 5 ans pour les générations actuelles d'enfants aux États-Unis (15).

1–Syndrome métabolique

Le syndrome métabolique englobe une série de pathologies liées à un défaut métabolique global. Les maladies métaboliques associées à l'obésité sont principalement le diabète de type 2 et les hyperlipidémies. **Le diabète de type 2** est dû à une mauvaise régulation de l'utilisation des sucres par l'organisme et il favorise lui-même de nombreuses maladies, notamment cardiovasculaires, rénales et ophtalmologiques (16). **Les dyslipidémies** sont des troubles de la régulation des lipides dans le sang. L'obésité favorise la plupart des dyslipidémies (hypercholestérolémies, hypertriglycéridémies) (17). Le principal risque de ces pathologies est l'apparition de **maladies cardiovasculaires**, par la formation de plaques d'athéromes qui bouchent progressivement les artères et sont à l'origine d'une athérosclérose. Les **maladies cardiovasculaires** favorisées par l'obésité sont principalement **l'hypertension artérielle,** l'insuffisance coronaire, les accidents vasculaires cérébraux, les thromboses veineuses et les embolies pulmonaires. Il faut y ajouter l'**insuffisance cardiaque**, qui résulte de la fatigue du cœur provoquée par la surcharge pondérale et ses complications. Par rapport à un individu de poids normal, les obèses ont un risque multiplié par 7 de diabète de type 2, et par 6 d'hypertension (5, 18).

2–Autres complications relatives à l'obésité

L'obésité favorise les **complications orthopédiques** mais aussi l'**arthrose** en augmentant la contrainte mécanique supportée par les articulations, notamment au niveau des genoux et de la colonne vertébrale. L'obésité induit également l**es maladies respiratoires** telles que l'insuffisance respiratoire et le syndrome d'apnées du sommeil (19). Par rapport à un individu de poids normal, les obèses ont un risque multiplié par 4 de développer de l'arthrite et par 3 de l'asthme (5, 18).

La surcharge pondérale provoque un relâchement du groupe musculaire situé à l'entrée de l'estomac à l'origine d'un **reflux gastro-œsophagien,** en général sans danger, mais pouvant causer une inflammation des parois de l'œsophage, qui dégénère parfois en cancer (20). La surcharge pondérale augmente également la pression abdominale sur la vessie et peut engendrer l'**incontinence**, surtout chez les femmes (21). L'obésité est aussi associée à une augmentation de l'incidence de la **stéatose hépatique non alcoolique** (19).

L'obésité peut être à l'origine d'altérations homonales causant des dystrophies ovariennes et entraînant des troubles de la **fertilité** (19). Enfin, l'obésité est un facteur de risque pour de nombreux **cancers**, principalement les cancers du colon, de la prostate, de l'oesophage et du sein (22).

3–Complications psychologiques et sociales

D'une manière indirecte, l'obésité favorise la **dépression**. En effet, de nombreux facteurs tels qu'une mauvaise estime de soi, des difficultés à accomplir certaines tâches quotidiennes, et l'opinion des autres peuvent être responsables de problèmes psycho-sociaux chez les patients obèses (23). Les phénomènes de discrimination et de stigmatisation liés à l'obésité peuvent également conduire les individus obèses à l'isolement social. Un suivi de 7 ans d'adolescents et de jeunes adultes a montré que le surpoids était associé à des performances scolaires inférieures, un risque accru de pauvreté et d'isolement affectif (24).

C – Traitements et prévention

Les pathologies associées à l'obésité s'estompent avec la perte de poids améliorant ainsi le pronostic vital. Vu la difficulté qu'expérimentent les professionnels de santé dans le traitement de l'obésité, l'objectif des traitements proposés aux patients obèses n'est pas forcément de supprimer l'obésité mais de perdre du poids d'une manière stable dans la durée. Aujourd'hui, il existe trois options thérapeutiques majeures pour aider les patients à modérer leur obésité: le changement du mode de vie, la pharmacothérapie et la chirurgie bariatrique.

1–Modifications du mode de vie

Les modifications du mode de vie reposent sur les changements volontaires du comportement. Il faut associer des mesures visant l'équilibre alimentaire et l'activité physique. Le succès ne peut être acquis que si ces mesures sont réalistes, c'est-à-dire si elles peuvent être appliquées sur le long terme, en étant acceptées et bien tolérées par le patient obèse. Il est important de modifier les habitudes alimentaires sans subir de frustrations. L'analyse du comportement alimentaire permettra au patient de prendre conscience de ses erreurs, de trouver les solutions pour les corriger et de connaître les bases d'une alimentation équilibrée (25). Cependant, moins de 5% des sujets obèses qui suivent ces recommandations perdent réellement du poids et maintiennent cette perte de poids (26).

2–Pharmacothérapie

Les cibles thérapeutiques des médicaments de l'obésité peuvent avoir soit une action centrale, en diminuant la sensation de faim, ou soit périphérique, en altérant l'absorption des nutriments et/ou en augmentant la dépense énergétique (27). Il existe des médicaments (sibutramine, orlisat et rimonabant), cependant leur effet en terme de perte de poids est modeste (perte moyenne de 5 kg) et tous s'accompagnent d'effets secondaires indésirables (dépression, incontinance fécale, nausées) (communiqué de presse de l'AFSSAPS, 10 avril 2009). Le rimonabant responsable de dépression dans certains cas a été retiré de la vente en Europe en octobre 2008 et la « Food and Drug Administration » (FDA) a refusé sa mise en vente sur le marché américain en juin 2007. Une méta-analyse chez l'adulte a montré que la prise de la sibutramine durant 1 à 4 ans réduisait en moyenne le poids corporel de 4% et la prise de l'orlistat durant cette même période entraînait une perte de poids de 3% (28).

Une étude canadienne effectuée sur 17000 utilisateurs d'orlistat et 3500 utilisateurs de sibutramine a révélé que moins de 10% des patients continuaient leur traitement au bout d'un an, et moins de 2% au bout de 2 ans, par manque de résultat et/ou à cause des effets secondaires (29). Etant donné le faible effet sur la perte de poids de chaque médicament pris

séparément, les cliniciens s'orientent vers l'idée d'une prescription multitraitements qui agirait sur des mécanismes physiologiques distincts, ciblant des molécules clefs des différentes voies physiologiques de l'homéostasie énergétique, et permettrait d'aboutir à des pertes de poids importantes, en limitant les mécanismes physiologiques compensatoires (30). Les compagnies Orexigen Therapeutics Inc. et Amylin Pharmaceuticals évaluent en ce moment l'impact de traitements multiples simultanés dans des essais cliniques. Les limitations de ces approches concernent le coût prohibitif des multi-thérapies et la possibilité de développer de multiples effets secondaires.

3–Chirurgie

A ce jour, la chirurgie de l'obésité représente la solution thérapeutique la plus efficace en terme de perte de poids sur le long terme: 14 à 25% de perte de poids selon les procédures (31, 32). De plus, toute diminution de poids présente l'intérêt d'améliorer les comorbidités associées à l'obésité: 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 (33-35) conduisant ainsi à un réel bénéfice en terme d'allongement de la durée de vie. La chirurgie bariatrique permet aussi de diminuer de 60% l'incidence des cancers reliés à l'obésité (36).

La chirurgie bariatrique est soumise à des indications précises : des critères d'éligibilité ont été définis en fonction de l'âge des patients, de leur IMC et des comorbidités dont ils sont atteints: seuls les patients ayant un IMC $\geq$ 40 kg/m² ou un IMC $\geq$ 35 kg/m² et au moins une comorbidité, et pour lesquels les autres mesures de perte de poids ont échoué peuvent être opérés.

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 (37). Il est donc recommandé aux patients de se soumettre à un suivi médical régulier après l'opération.

Dans la chirurgie de l'obésité, deux approches opératoires sont utilisées. Les procédures malabsortives qui induisent une diminution de l'absorption des aliments par le tractus digestif et les techniques restrictives qui réduisent le volume de l'estomac afin de limiter les apports alimentaires ("restriction gastrique"). Les techniques mixtes telles que le bypass gastrique Roux-en-Y associent une diminution du volume de l'estomac à un court-circuit d'une partie de l'intestin (38). Les principales techniques utilisées sont présentées en **Table 2** (37-40). Le choix de la technique repose sur des critères d'ordre médicaux et chirurgicaux (sévérité de l'obésité, morphologie du patient, antécédents de chirurgie abdominale). Cependant en Europe, les anneaux gastriques sont souvent posés en première intention en raison de la simplicité du geste chirurgical et de la réversibilité de la procédure.

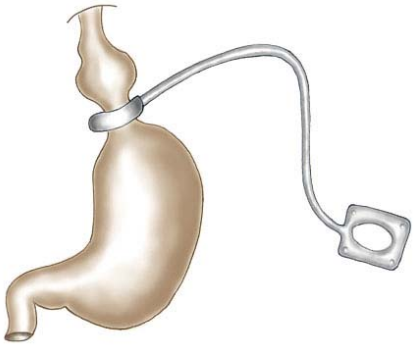
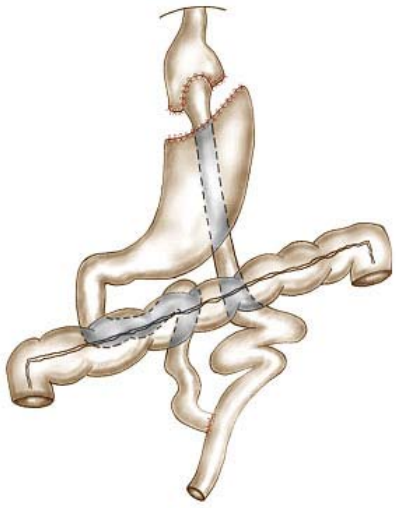
Type de chirurgie	Gastroplastie verticale calibrée	Cerclage gastrique par anneau ajustable	Bypass gastrique
Illustration			
Principe	**Restriction du volume gastrique**		**Restriction du volume gastrique et malabsorption intestinale**
Description	Une petite poche gastrique orientée verticalement avec un passage étroit est créée. Le tout est fixé par un anneau pour ralentir la vidange de l'estomac.	Un anneau en silicone est placé autour de la partie supérieure de l'estomac, formant une poche gastrique.	Une petite poche gastrique est créée par agrafage. Sur cette poche est suturée une portion de l'intestin grêle de telle sorte qu'environ 1m d'intestin soit court-circuitée et ne reçoive plus d'aliments.

Table 2 : Principales techniques de chirurgie de l'obésité (d'après Fisher & Schauer 2002 et Livingston 2002)

La chirurgie bariatrique reste un nouveau traitement pour l'obésité morbide dans une population pédiatrique, mais la pertinence d'appliquer une procédure chirurgicale invasive chez l'enfant ou l'adolescent est encore débattue (41). Une étude récente (42) a reporté le premier cas de gastrectomie laparoscopique réalisée avec succès chez un enfant de 6 ans souffrant d'obésité morbide. Les données sont insuffisantes pour permettre une évaluation précise des risques à long terme chez les jeunes patients.

Il existe aussi une chirurgie esthétique de l'obésité : la lipectomie. Cette opération consiste à enlever l'excès de tissu adipeux sous-cutané. La lipectomie permet également de faciliter l'hémodialyse chez les patients obèses atteints d'insuffisance rénale (43).

4–Prévention

En raison du manque d'efficacité des approches actuelles pour enrayer la progression de la maladie, la prévention de l'obésité chez les enfants a été proposée comme traitement de première intention en 2003 par l'Académie Américaine de Pédiatrie (AAP) (44). Dans sa déclaration de politique générale, l'AAP a promu l'allaitement, les bonnes habitudes alimentaires, l'activité physique et a encouragé la limitation du temps passé devant la

télévision. Les approches préventives chez l'enfant consistent d'une part à éduquer l'équilibre alimentaire et d'autre part à augmenter l'activité physique (45). Un programme d'éducation nutritionnelle a été mis en place dans les écoles de deux villes du Nord de la France (Fleurbaix et Laventie), le but était d'évaluer si l'intégration d'une éducation nutritionnelle dans les programmes scolaires pouvait modifier le comportement alimentaire des enfants et de leur famille. Cette intervention de prévention s'est révélée efficace. En effet, la prévalence du surpoids était plus faible chez ces enfants qui avaient été sensibilisés en comparaison avec d'autres enfants (8.8% *vs.* 17.8% respectivement) (46).

Toutefois, les programmes actuels de prévention ont une efficacité modeste en général et ne semblent pas efficaces pour inverser la hausse des taux d'obésité chez les enfants (47). Cette constatation révèle le besoin urgent de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques complexes impliqués dans l'obésité afin de proposer une meilleure prévention de la maladie et des soins.

D – Etiologie de la maladie

L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle. Cette maladie provient d'un déséquilibre chronique entre les apports et les dépenses énergétiques conduisant à une balance énergétique positive. Des facteurs environnementaux, épigénétiques et génétiques contribuent à ce déséquilibre.

1–Facteurs environnementaux

L'épidémie de l'obésité peut-être attribuée à de récents changements au sein de notre environnement. Un accès facile à une **alimentation riche en énergie**, combiné à une diminution de **l'activité physique** jouent sans aucun doute un rôle majeur dans l'augmentation de la prévalence de l'obésité mais d'autres facteurs environnementaux contribuant à l'épidémie de l'obésité ont été récemment proposés (48).

La prise de poids peut-être associée aux effets **secondaires de certains médicaments**, notamment certains psychotropes (mais aussi contraceptifs, traitements d'immunodéficience) ou l'interaction complexe médicamenteuse. Des agents pharmaceutiques comme l'olanzapine (antipsychotique utilisé pour traiter la schizophrénie et d'autres troubles psychiatriques) peuvent induire l'adipogenèse *in vitro* (49-51). Une étude a montré qu'après un an de traitement à l'olanzapine, la prise de poids moyenne était de 12 kg (52).

D’autres facteurs contribuant à l’épidémie de l’obésité pourraient être **les perturbateurs endocriniens**, appelés également modulateurs endocriniens ou molécules hormono-mimétiques. Ces molécules agissent sur l’équilibre hormonal d’espèces vivantes. Une exposition à ces molécules chimiques contribuerait à l’obésité aussi bien chez l’Homme que chez les animaux par le biais du système endocrinien (signaux d’œstrogène et d’androgène) et via la dérégulation du développement du tissu adipeux. Une étude a montré que les concentrations dans les urines de certains perturbateurs endocriniens étaient positivement et significativement corrélés à l’obésité abdominale chez les hommes américains adultes (53).

La contribution possible des **infections** dans l’étiologie de l’obésité chez l’homme est souvent ignorée alors que dix microbes ont été reportés comme étant la cause de l’obésité dans plusieurs modèles expérimentaux (54). L’obésité est associée à un état inflammatoire chez l’homme (55, 56), cependant, les relations causatives et retro-causatives entre inflammation et obésité sont encore mal connues.

La **composition de la flore intestinale**, encore appelée microbiote, peut être considérée comme un facteur environnemental qui régule le stockage des graisses (57) et pourrait expliquer une partie du risque de l'obésité. Des modifications significatives de la composition du microbiote intestinal ont été identifiées chez les souris obèses, suggérant une implication des microbes intestinaux dans l'obésité (58). Plusieurs études chez l’Homme ont montré des différences quantitatives et qualitatives en comparant les microbiotes intestinaux d’individus obèses et minces (59-61). Un catalogue répertoriant 3,3 millions de gènes microbiens de l’intestin humain, publié en Mars 2010, permettra d'évaluer avec plus de précision l'impact de la diversité du métagénome sur l'obésité chez les patients humains (62).

L’âge tardif de la maternité pourrait être un autre facteur impactant sur l’obésité de l’enfant. Une étude prospective a montré que les mères d’enfants obèses étaient plus âgées en moyenne de 3.5 ans au moment de la naissance en comparaison des mères d’enfants ayant un poids normal (63). Une autre étude a révélé que les enfants nés d’une mère âgée de plus de 30 ans avaient une composition corporelle en graisse plus élevée que les enfants nés d’une mère âgée de moins de 25 ans (64). Une explication pourrait être que le développement du tissu adipeux commence très tôt pendant le développement fœtal et que la régulation de la production du tissu adipeux est influencée considérablement par le milieu intra-utérin qui lui est en partie déterminé par l’âge maternel (65).

Un nombre important d'études durant ces 40 dernières années a montré une corrélation entre une augmentation incidente de l'obésité avec une **diminution du temps de sommeil**. Chez les rongeurs une privation de sommeil entraîne une augmentation de la prise alimentaire sans prise de poids associée (66). Un manque de sommeil conduit à des dérégulations des taux de peptides impliqués dans la régulation du métabolisme (67). Des études chez l'homme ont montré qu'une diminution du temps de sommeil induisait une diminution du taux de leptine plasmatique et une augmentation du taux de ghreline, conduisant ainsi à une prise alimentaire plus élevée et donc à une prise de poids (68, 69).

La réduction des variabilités de la température ambiante, par l'utilisation de l'air conditionné, pourrait aussi influencer la prise alimentaire et donc la prise de poids. En effet, l'environnement thermique affecte aussi bien la dépense que l'apport énergétique pour maintenir l'homéostasie, notamment l'homéothermie (70). De nombreuses études chez l'homme ont montré qu'une augmentation de la température résultait en une diminution du métabolisme, sachant que la prise alimentaire est généralement moins importante et moins riche en calories quand il fait chaud (71). L'utilisation de plus en plus fréquente de l'air conditionné pourrait ainsi atténuer l'effet d'un environnement chaud, conduisant ainsi à une balence énergétique positive par un apport énergétique croissant et une réduction des dépenses énergétiques.

Les origines évolutives de l'obésité. La théorie du gène « économe » (Thrifty Gene Hypothesis) a été exposée par Neel en 1962, proposant l'évolution de notre génome pour favoriser la collecte de nourriture et l'accumulation de graisse afin de prévenir les périodes de famines (72). A notre époque où la nourriture abonde, cette évolution serait devenue désavantageuse conduisant au développement d'une obésité par anticipation d'une famine qui ne se produit pas. La théorie de Neel ne permet cependant pas d'expliquer pourquoi, même dans des conditions « obésogéniques », une large fraction de la population reste mince. Si les allèles « gaspilleurs » avaient été contre-sélectionnés efficacement chez les êtres humains au cours de l'évolution, les populations dans leur ensemble, et non une fraction seulement, seraient touchées par l'obésité. Pour expliquer ce phénomène, Speakman a proposé que jusqu'à la maîtrise du feu et l'organisation des populations humaines en sociétés organisées, l'obésité apportait un désavantage sélectif en terme de survie face aux prédateurs, contrebalançant les avantages du stockage adipeux en périodes de famine (73).

2–Facteurs épigénétiques

Une partie non négligeable de l'obésité pourrait être expliquée par des mécanismes épigénétiques. Le terme épigénétique se réfère à des mécanismes moléculaires (tels que la méthylation de l'ADN et la modification des histones) qui affectent l'expression des gènes sans modifier la séquence d'ADN primaire. Les adaptations épigénétiques sont héréditaires et se transmettent aux générations suivantes (74).

De récentes études sur les jumeaux monozygotes ont montré qu'à la naissance, les jumeaux sont épigénétiquement identiques dans la plupart des cas, mais avec l'âge, les différences épigénétiques s'accumulent (75, 76). Le phénotype d'un individu est le résultat d'interactions complexes entre le génome, l'épigénome et l'environnement ancestral passé et actuel, conduisant à un remodelage perpétuel de l'épigénome. Ces interactions influent sur le phénotype mature et déterminent la sensibilité à des facteurs environnementaux ultérieurs, ainsi que le risque de devenir obèse.

Il existe peu d'études faisant le lien entre l'épigénétique et l'obésité chez l'homme, mais de nombreux travaux, réalisés notamment chez les modèles animaux, ont montré la contribution des mécanismes épigénétiques dans le risque d'obésité. Une étude récente chez le rat (77) a démontré qu'une suralimentation précoce pouvait affecter la régulation épigénétique du promoteur du gène proopiomélanocortine *POMC*, gène clé exprimé dans l'hypothalamus et impliqué dans une forme monogénique d'obésité à début précoce. Dans cette même étude, une relation a été trouvée entre les niveaux de méthylation du promoteur de *POMC* et certains paramètres métaboliques tels que les niveaux de glucose dans le sang (77). Une autre étude a montré qu'un régime alimentaire riche en graisses modifiait le profil de méthylation du promoteur de la leptine et les taux circulants de leptine chez le rat (78). La leptine est une hormone clé dans le contrôle du poids et la déficience congénitale en leptine induit une forme sévère d'obésité monogénique chez l'Homme. De façon intéressante, l'administration de leptine néonatale chez le rat module le statut épigénétique à l'âge adulte selon l'état nutritionnel du fœtus *in utero* (79).

La nutrition est un signal environnemental externe directement lié à l'obésité, et peut induire des altérations épigénétiques qui affectent l'expression des gènes spécifiques impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. La composition des aliments peut également influencer la méthylation de l'ADN car des molécules de petites tailles (tels que l'acide folique, vitamine B12, la méthionine et la choline) peuvent inverser l'activation ou l'inactivation épigénétique des gènes (80, 81). Les expositions périnatales spécifiques telles qu'une suralimentation maternelle, le diabète ou une sous-alimentation, prédisposent la progéniture à un risque accru d'obésité. Il a été montré que ces expositions périnatales

générent des changements épigénétiques chez les descendants conduisant à un risque accru d'obésité chez ces individus (82).

Les différences dans le profil épigénétique peuvent également prédire la réponse de perte de poids à la restriction calorique chez les patients obèses. Trente-cinq loci ont été trouvés différentiellement méthylés dans le tissu adipeux sous-cutané d'individus répondants différemment au régime avant la perte de poids (83).

3–Facteurs génétiques

Si les facteurs environnementaux et épigénétiques expliquent une partie de l'épidémie de l'obésité, les facteurs génétiques contribuent également aux variations inter-individuelles dans le risque de l'obésité. Cette proportion de la variation phénotypique dans une population, attribuable à la variation génétique entre les individus représente l'héritabilité (84). Des études récentes chez des jumeaux ont confirmé la forte influence génétique dans l'obésité de l'enfant et de l'adulte (héritabilité de 50-90%) (85, 86). Les approches génétiques peuvent par conséquent fournir un outil essentiel pour comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques complexes impliqués dans la régulation de la prise de poids (87).

Gènes associés à une obésité monogénique chez l'Humain

Une altération au sein d'un seul gène est suffisante pour entraîner des formes sévères d'obésité, on parle alors d'obésité monogénique. Jusqu'à ce jour, huit gènes d'obésité monogénique ont été identifiés : le gène de la leptine (*LEP*), le gène codant le récepteur à la leptine (*LEPR*), la proopiomélanocortine (*POMC*), la prohormone convertase 1 (*PCSK1*), le gène codant le récepteur 4 aux mélanocortines (*MC4R*), le gène brain derived neurotrophic factor (*BDNF*) et son récepteur *TRKB* codé par le gène *NTRK2* et enfin l'homologue au gène Single Minded de la drosophile (*SIM1*) (88-102). Ces gènes codent des hormones ou des neurotransmetteurs et leurs récepteurs hypothalamiques de la voie hautement conservée de la leptine-mélanocortine, qui est essentielle pour la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel (87).

Une mutation dans un de ces gènes implique une obésité mais entraîne également des pathologies spécifiques selon le gène altéré (stérilité (98) et altération de la réponse immunitaire (103, 104) pour *LEP*, troubles intestinaux et hypoglycémie pour *PCSK1* (94), retard mental pour *BDNF* (92, 105)). Ces caractéristiques cliniques associées peuvent ainsi guider le choix du gène à séquencer en priorité dans l'élucidation de la pathologie (**Figure 3**). Les formes monogéniques d'obésité sont accompagnées d'un développement normal à l'exception des déficiences en *BDNF*, *SIM1* et *NTRK2* associées à des troubles cognitifs, troubles du comportement ou syndromique caractéristiques (92, 100).

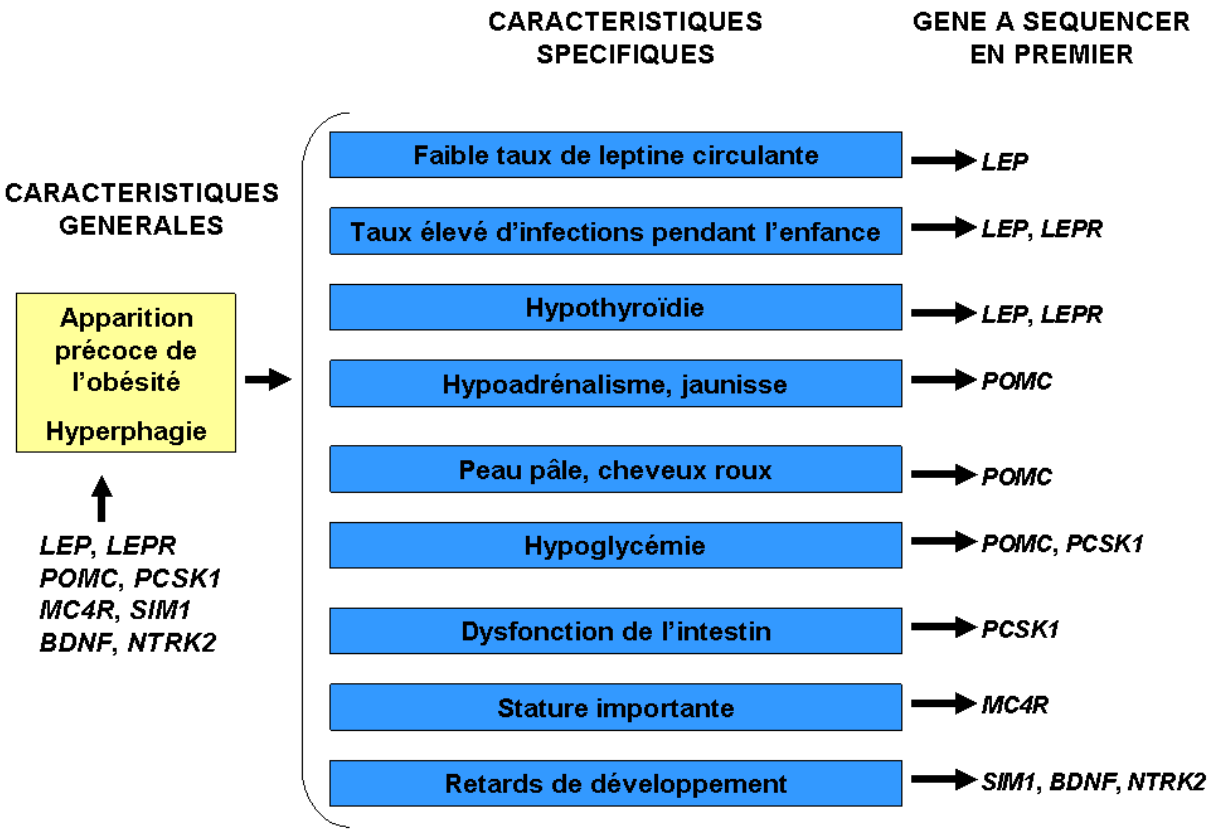


Figure 3. Priorité du gène monogénique à séquencer en fonction des phénotypes spécifiques associés (d'après Choquet et Meyre 2010) (Annexe 2).

La pertinence de la voie leptine-mélanocortine en tant que cible pour une intervention pharmacologique chez les patients présentant une obésité sévère s'est avérée efficace. La meilleure illustration est sans doute le cas d'un enfant présentant un déficit congénital en leptine qui a pu être traité par des injections sous-cutanées de la leptine humaine recombinante, conduisant à la correction de toutes les anomalies phénotypiques vu chez ce patient (106).

D'autres gènes pourraient également être impliqués dans les formes monogéniques d'obésité. Une mutation C256Y perte de fonction du gène *WNT10B*, codant pour un régulateur de la différenciation adipocytaire, a été démontré coségrègeant avec le surpoids ou l'obésité dans une famille, mais des études supplémentaires sont nécessaires pour confirmer le lien de ce gène avec les formes monogéniques de l'obésité à début précoce (107).

Gènes associés à une obésité syndromique chez l'Humain

Les syndromes complexes d'obésité sont définis comme des troubles mendéliens présentant l'obésité comme une caractéristique clinique, mais souvent associée à un retard mental, une dysmorphie ainsi que des anomalies du développement de certains organes spécifiques. Jusqu'à présent, plus de 50 syndromes incluant l'obésité ont été identifiés (108).

Les bases génétiques de certaines de ces formes syndromiques de l'obésité ont été élucidées montrant une importante hétérogénéité génétique de ces formes syndromiques. Certains de ces syndromes impliquent plusieurs gènes et d'autres syndromes ont une cause génétique unique.

Les analyses de génétique moléculaire des individus atteints du **syndrome de WAGR** (syndrome marqué par la combinaison de tumeur de Wilms, Aniridie, anomalies génito-urinaires et retard mental) ont révélé que les gènes *WT1* et *PAX6* étaient impliqués dans ce syndrome, mais récemment, des délétions au sein d'une région de 80 kb de l'exon 1 du gène *BDNF* ont été identifiées et expliqueraient le phénotype de l'obésité dans un sous-groupe de patients atteints du syndrome de WAGR (105).

D'autre part, le **syndrome de Prader-Willi (PWS)** peut avoir diverses étiologies, mais il est toujours associé à une perte d'expression des gènes transmis par le père sur la partie du chromosome 15q11-13. 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. Une microdélétion du petit ARN nucléolaire HBII-85 (snoRNAs) a causé le phénotype PWS chez un enfant (109) et récemment, une autre de novo microdélétion sur le chromosome 15q11-13 qui englobe le snoRNAs non codant a été identifié chez un patient diagnostiqué négatif pour le syndrome de Prader-Willi mais atteint d'hyperphagie, d'obésité précoce, d'hypogonadisme et de difficultés d'apprentissage modérées (110). Une microdélétion de 236 kilobases incluant le snoRNAs HBII-85 a été retrouvée chez une mère et son enfant avec un syndrome de Prader-Willi (111). Un défaut au niveau de la maturation du pré-ARNm HTR2C contribue également au PWS (112).

En ce qui concerne le syndrome de **Bardet-Biedl (BBS)**, il est caractérisé par une rétinopathie pigmentaire, une polydactylie, un hypogonadisme chez les garçons, des difficultés d'apprentissage, des anomalies rénales et par l'obésité (108). L'obésité se développe au cours des premières années de la vie et s'accompagne de résistance à l'insuline dans 45% des cas. Ce syndrome présente une hétérogénéité génétique vaste et à ce jour 14 gènes ont été associés à ce syndrome (113). La plupart des protéines BBS sont impliquées dans la fonction ciliée (114). Or la suppression de la fonction ciliée dans les neurones à POMC conduit à une obésité hyperphagique chez la souris (115) et les protéines BBS sont nécessaires à la signalisation de la leptine (116), montrant le lien entre la signalisation des protéines BBS et la voie de la leptine-mélanocortine.

D’autres formes syndromiques d’obésité comme les **syndromes d’Alström et de Cohen** n’impliquent qu’un seul gène : respectivement *ALMS1* et *COH1* (117, 118). Le syndrome d'Alström présente les caractéristiques cliniques suivantes: rétinopathie pigmentaire, surdité sensorineurale et résistance à l'insuline alors que le syndrome de Cohen est caractérisé par un retard psychomoteur, une microcéphalie, un dysmorphisme facial et une granulocytopénie.

GNAS est un locus complexe soumis à empreinte uniquement maternelle. Des mutations du gène *GNAS* conduisent à l'obésité dans le cas de l’ostéodystrophie héréditaire d’Albright (119-121).

Gènes de susceptibilité à une obésité polygénique chez l’Humain

Les formes polygéniques d’obésité résultent de l’interaction entre plusieurs gènes incluant de nombreux variants génétiques communs et l’environnement. Plusieurs approches ont permis d’identifier des formes polygéniques d’obésité : les approches génome entier ou gène candidat.

Les **études de liaison** : études de liaison génétique familiale sur l’ensemble du génome avec une couverture classique de 400 marqueurs microsatellites, suivies par des approches de clonage positionnel ou des approches de gènes positionnels candidats, ont eu un succès limité dans l’identification de gènes associés à l’obésité. Jusqu’à ce jour plus de 60 études de liaison pour les traits liés à l’obésité ont été publiées (122).

Les **études de clonage positionnel** de gènes d’obésité à partir de liaison génome entier sur les chromosomes 4p (123) et X (124) ont mis en évidence respectivement le rôle des gènes *TBC1D1* (125) et *SLC6A14* (126). L’association femme-spécifique du variant codant R125W de *TBC1D1* avec l’obésité sévère, constatée dans la population américaine (125) a été confirmée dans la population française (127). Chez la souris, l’inactivation du gène *TBC1D1* induit un phénotype de maigreur chez la souris (128). *SLC6A14* est un transporteur d’acides aminés qui régule la disponibilité en sérotonine (129). L’association de polymorphismes nucléotidiques simples (SNPs) au sein du gène *SLC6A14* avec l’obésité familiale a été répliquée et il existe une possible contribution des variants génétiques à la liaison génétique à l’obésité dans la population française (130). Chez les jeunes filles, les SNPs à risque d’obésité du gène *SLC6A14* diminuent la satiété, alors que chez les femmes adultes, ils augmentent la désinhibition alimentaire et la faim (130).

En combinant les résultats de ces études de liaison, avec les connaissances sur les modèles animaux et la physiologie humaine, des études de **gènes candidats** positionnels ont permis de montrer l'association des gènes *CNR1* et *ENPP1* avec l'obésité (131, 132). Dans le cas d'*ENPP1*, l'haplotype à risque associé au risque d'obésité et de diabète de type 2 contribuait aussi en partie à la liaison génétique au chromosome 6q pour l'obésité infantile (132). Certaines de ces associations ont été répliquées, notamment pour le gène *CNR1* et le contrôle de la prise de poids (133-136). De même l'association de *ENPP1* avec l'obésité a été répliquée chez les enfants allemands (137) ainsi que dans d'autres populations adultes (138-142).

Les approches gènes candidats ont montré l'association de 127 gènes candidats avec l'obésité dans au moins une étude (122). Cependant très peu de ces études ont été répliquées de façon convaincante dans diverses populations. On peut néanmoins citer l'exemple du gène *MC4R* et des variants codants non-synonymes V103I et I251L, qui ont été associés à une protection vis-à-vis de l'obésité dans de larges méta-analyses (143) et l'exemple de SNPs introniques dans *SIM1*, associés de façon convaincante à l'obésité dans la population indienne Pima (144).

Ces dernières années, les nouvelles technologies utilisant les puces à ADN ont révolutionné les approches génétiques facilitant la détection de nouveaux *loci* associés à l'obésité. De plus, les avancées au niveau de la carte du génome humain répertoriant tous les SNPs par le consortium international HapMap ont facilité les **études d'association génome entier** (GWAS pour Genome-wide association study). Ces trois dernières années, les études GWAS (145-149) ont permis l'identification de 22 *loci* associés avec le risque d'obésité et la variation de l'IMC à un niveau de signification stringent ($p<10^{-7}$). Leur association a été répliquée pour la plupart dans des études cas-contrôles supplémentaires. 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 (149).

Plusieurs études récentes ont montré que les **variations structurales du génome**, telles que les CNVs (pour copy number variations) incluant les délétions, les duplications, les translocations, et les inversions chromosomiques pourraient expliquer une part considérable de l'héritabilité dans les maladies complexes comme l'obésité (150). Ces variations structurales du génome peuvent être soit héritées ou causées *de novo*. Une délétion fréquente de 45 kb en amont du gène *NEGR1* taggée par le SNP rs2815752 a été identifiée associée à des variations de l'IMC chez l'adulte et chez l'enfant (149, 151). Des délétions rares sur le chromosome 16p11.2 ont également été associées à des formes hautement pénétrantes d'obésité (152, 153).

Les études d'association avec des CNVs ont permis la détection de nouvelles régions chromosomiques associées à l'obésité mais des études supplémentaires sont nécessaires pour permettre d'identifier les gènes potentiels et les voies physiologiques impliquées dans la susceptibilité de la maladie et de mieux comprendre les mécanismes conduisant à la prise de poids.

II – PC1/3 : UNE PROTEINE ISSUE DE LA FAMILLE DES PROHORMONES CONVERTASES (PCs)

A – Vue d'ensemble des prohormones convertases (PCs)

1-Historique

La recherche sur les proprotéines ayant la capacité de transformer des enzymes a commencé en 1967 par deux observations indépendantes montrant que certaines hormones peptidiques sont synthétisées sous forme de précurseurs de protéines. Steiner et ses collègues ont montré que l'insuline est composée de deux chaînes peptidiques produites par deux clivages d'un précurseur unique, la proinsuline (154). Simultanément, Chrétien et ses collègues ont apporté la preuve que l'hormone stimulant la β-mélanocyte (β-MSH) et l'hormone γ-lipotropique (γ-LPH) étaient dérivées de la β-LPH (155). Etant donné que les sites de clivages étaient composés de Lys-Lys, Lys-Arg, Arg-Arg, ces résultats ont suggéré l'existence d'enzymes clivant la partie carboxy-terminale des motifs d'acides aminés basiques.

Le premier gène de proprotéine convertase (PC) de mammifère fut cloné en 1986 et fut nommé *FUR* (Fes Upstream Region). La proprotéine correspondante prit le nom de furine. Peu de temps après, les prohormones convertases 1 et 2 (PC1/3 et PC2) ont été découvertes suivi de la prohormone convertase 4 (PC4), la proprotéine convertase subtilisine-kexine 6 (PACE4 ou PCSK6), la proprotéine convertase 5/6 (PC5/6) et la proprotéine convertase 7 (PC7) (154). Les deux dernières PCs, la subtilisine-kexine isozyme-1 (SKI-1) et la proprotéine convertase subtilisine-kexine 9 (PCSK9) ont été découvertes plus récemment (156).

2-Les proprotéines convertases (PCs)

Les proprotéines convertases (PCs) sont une famille de sérines endoprotéases (famille SB, sous-famille S8B) comprenant neuf membres (**Table 1**). Sept d'entre elles clivent la partie carboxy-terminale du site consensus (K/R)-(X)n-(K/R), où X correspond à un acide aminé et n=0,2,4 ou 6 (157) ce sont : PC1/3, PC2, furine, PC4, PC5/6, PACE4, et PC7. Leurs gènes correspondants sont notés de *PCSK1* à *PCSK7*. Les deux autres convertases: SKI-1 et PCSK9 sont des membres de la sous-famille S8A et clivent des proprotéines au niveau de motifs non basiques. SKI-1 reconnaît (R/K)-X-(L/V)-Z, où Z est un acide-aminé à l'exception de Pro, Cys, Glu et Val. PCSK9 clive uniquement au niveau carboxy-terminus de son prodomaine carboxy-terminal sur le motif LVFAQ.

Nom commun	Nomenclature proposée	Autres noms
PC1/3	PCSK1	SPC3
PC2	PCSK2	SPC
Furine	PCSK3	PACE, SPC1
PC4	PCSK4	SPC
PC5/6	PCSK5	SPC
PACE4	PCSK6	SPC
PC7	PCSK7	SPC7, PC8, LPC
SKI-1	PCSK8	SIP, MBTPS1
PCSK9	PCSK9	NARC-1, FH3

Table 3: Nomenclature des proprotéines convertases

Acronymes : PC, proprotein convertase ; PACE, paired basic amino acid converting enzyme; PCSK, proprotein convertase subtilisin/kexin type; SPC: subtilisin-like proprotein convertase ; LPC, lymphoma proprotein convertase ; SIP, site-1 protease ; MBTPS1, membrane-bound transcription factor peptidase, site 1 ; NARC, neural apoptosis regulated convertase ; FH, familial hypercholesterolemia.

3-Structure des proprotéines convertases

Les PCs ont en commun la structure protéique composée d'un pro-peptide suivi d'un domaine catalytique, un domaine P et des domaines carboxy-terminaux (**Figure 4**) (157, 158). La plus forte homologie entre les PCs se trouve au niveau du domaine catalytique. Le pro-domaine est essentiel pour la conformation, l'activation, le transport et la régulation de ces PCs. Le domaine P est indispensable pour l'activité enzymatique de ces PCs à l'exception de PCSK9 (159, 160). Les domaines carboxy-terminaux sont moins conservés entre les PCs. Les motifs de séquences répétées jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire (158). La structure de la protéine PC1/3 est donc composée d'un peptide signal, d'un pro-domaine, d'un domaine catalytique, d'un domaine P et enfin d'un domaine riche en Ser/Thr.

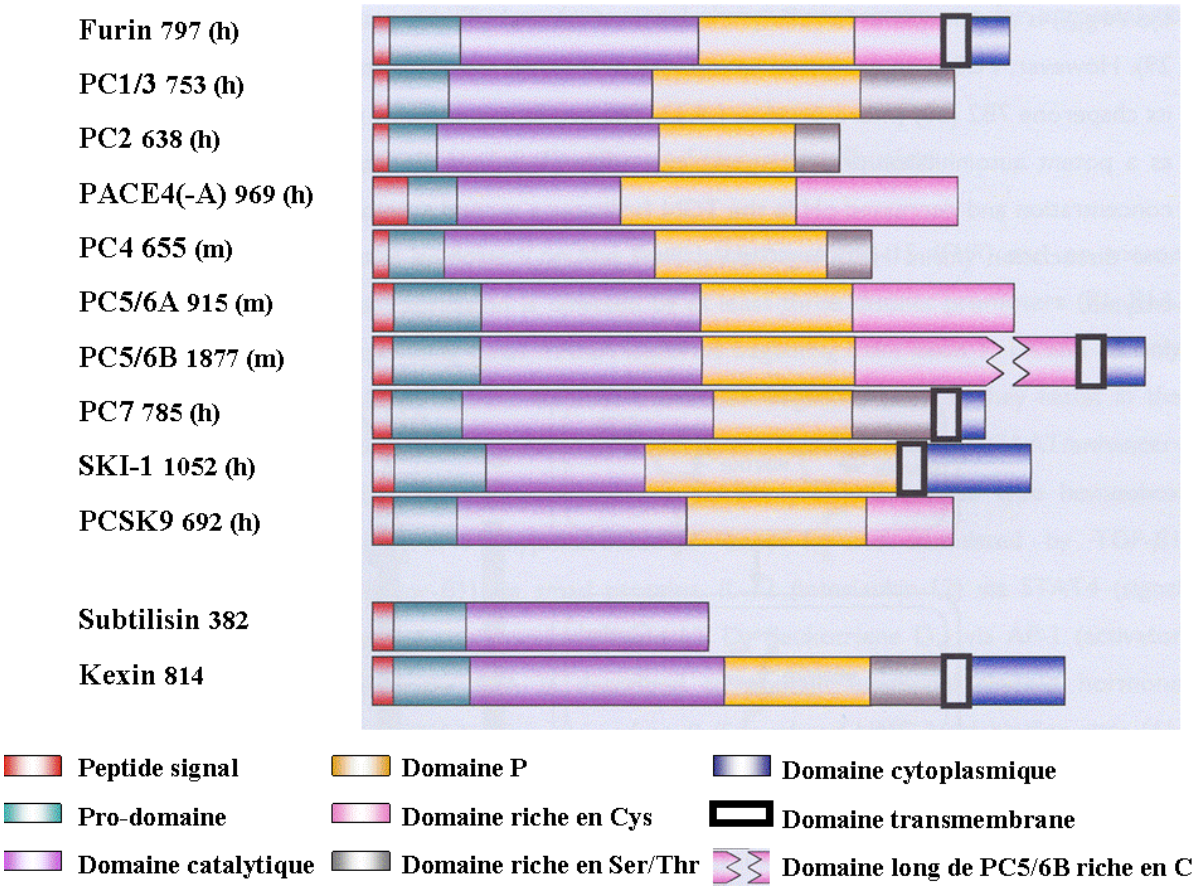


Figure 4 : Représentation schématique des proprotéines convertases.

Les domaines structuraux ont été schématisés pour PC1/3, les six PCs étroitement liées, SKI-1 et PCSK9. Les protéines Kexine et subtilisine sont illustrées pour comparaison. La taille de chaque membre est indiquée en acides aminés. h : human ; m : mouse.

4-Maturation des proprotéines convertases

A l'exception de PC2, les PCs suivent un clivage auto-catalytique de leur pro-domaine chaperon/inhibiteur dans le réticulum endoplasmique (RE). Le complexe pro-domaine/enzyme catalytique sort du RE pour atteindre les compartiments Golgi ou post-Golgi, où habituellement un second clivage du pro-domaine inhibé résulte en une activation des zymogènes. Les conditions favorisant l'activation varient d'une PC à une autre et incluent le pH, la concentration en calcium, et dans certains cas la présence d'autres partenaires (**Figure 5**).

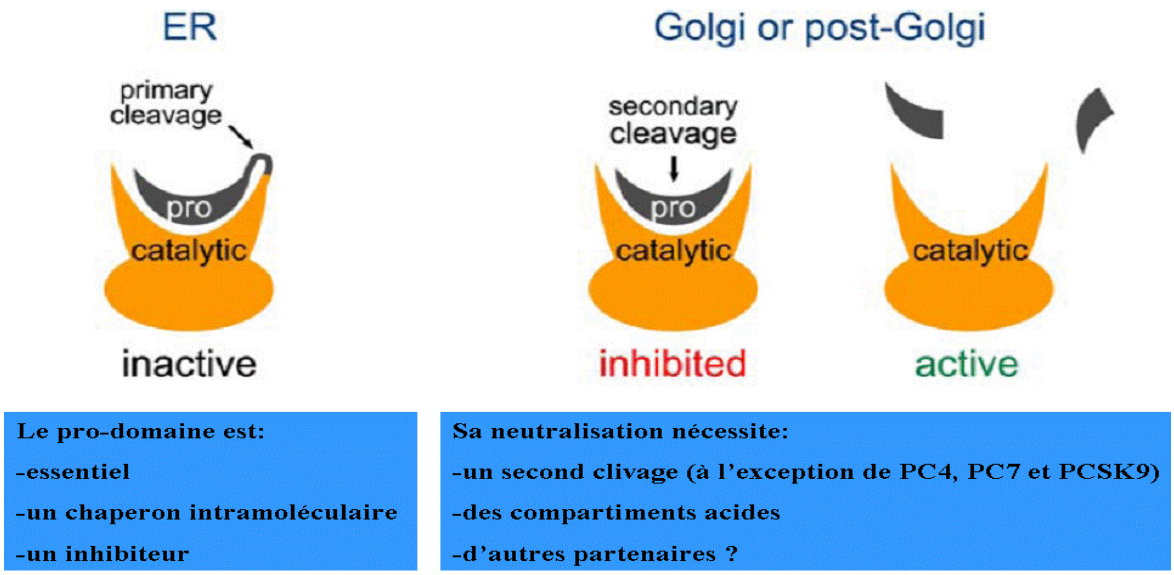


Figure 5 : Activation des proprotéines convertases (d'après Seidah NG and Prat A, J Mol Med, 2007).

5-Maturation de la protéine PC1/3

PC1/3 est elle-même synthétisée sous la forme inactive proPC1/3. Ce précurseur va subir plusieurs événements de maturation auto-catalytique: un premier clivage rapide se fait dans le RE puis un second au sein du réseau trans-Golgien et des vésicules de sécrétion de la voie de sécrétion régulée (161, 162). La protéine mature et active PC1/3 est enfin stockée au cœur d'épaisses granules de sécrétion, avec ses substrats. PC1/3 est capable de contrôler sa propre activité enzymatique dans toutes les régions de la cellule qui l'entoure. Ce mode d'autocontrôle est unique parmi tous les membres de la famille des protéases (163).

6-Maturation de subtrats par les proprotéines convertases: prédiction des substrats, spécificité et redondance.

Jusqu'à présent, de nombreuses études *in vitro* et *ex vivo* ont mis en évidence des substrats potentiels des PCs, impliqués dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Etant donné que les sept membres des PCs ont des spécificités similaires, des formes d'expression et des localisations cellulaires partiellement chevauchantes, il est parfois difficile de prédire *in vivo* les couples enzyme-substrat et/ou le niveau de redondance fourni par les autres PCs. La recherche actuelle vise à élucider les substrats spécifiques des PCs en analysant les souris inactivées pour ces gènes ou les patients humains présentant des mutations perte de fonction.

La liste de subtrats activés par les PCs n'a cessé d'augmenter ces dernières années et inclut les neuropeptides, les hormones peptidiques, les facteurs de croissance et de différenciation, les récepteurs, les enzymes, les molécules d'adhésion, les facteurs de

coagulation du sang, les protéines plasmatiques, les protéines de l'enveloppe virale, et les toxines bactériennes (164). PC1/3 mature un large éventail de substrats (165) notamment la proghreline (166), le proglucagon (167), la protéine AGRP (agouti-related protein) (168), le peptide CCK (peptide containing cholecystokinin) (169), la proinsuline (170), le polypeptide GIP (pour glucose-dependent insulino-tropic polypeptide precursor) (171) et le proglucagon intestinal en hormone incrétine GLP-1 pour glucagon like peptide 1 (167). Dans certains cas, la protéine PC1/3 agit de manière complémentaire avec d'autres PCs (notamment PC2) pour maturer les propeptides. En effet, la maturation du peptide neuroendocrinien CART (cocaine and amphetamine-regulated transcript) impliqué dans le contrôle de l'appétit, se fait par les protéines PC1/3 et PC2 (172). La progastrine est également maturée par PC1/3 et PC2 (173). Les protéines PC1/3 et PC2 ainsi que la cathepsine L transforment la proopiomelanocortine (POMC) en hormones peptidiques ACTH, alpha-MSH et beta-endorphine (174).

Une étude récente a comparé les peptides présents dans le cerveau de souris inactivées pour PC1/3, hétérozygotes ou sauvages en utilisant la peptidomique quantitative (175). Parmi les 92 peptides identifiés, environ un tiers ont diminué chez les souris « knockout » (KO), en comparaison des souris sauvages, montrant un rôle important de PC1/3 dans la production d'un large éventail de peptides (175).

7-Inhibiteurs et régulateurs de PC1/3

Des travaux sur les inhibiteurs spécifiques des PCs sont nécessaires pour des applications thérapeutiques éventuelles. Il existe des inhibiteurs et des régulateurs de PC1/3 (176). Le précurseur proSAAS est un inhibiteur potentiel de PC1/3 (177). Une étude récente chez la souris a montré que les peptides dérivés de proSAAS pourraient inhiber PC1/3 dans le cerveau embryonnaire mais dans le cerveau adulte les peptides de proSAAS auraient un rôle dans la régulation du poids corporel et agiraient comme des neuropeptides (178). La transcription de PC1/3 est contrôlée de manière coordonnée par les facteurs de transcription Nhlh2 (nescient helix-loop-helix 2) et STAT3 (signal transducter and activator of transcription 3) (179). Nhlh2 est une cible du signal de la leptine et est exprimé dans les neurones POMC au niveau du noyau arqué. Nhlh2 est nécessaire pour l'expression hypothalamique de PC1/3 sachant que les souris KO pour Nhlh2 ont une diminution des taux des ARNm PC1/3. De plus, STAT3 a la capacité de se lier au promoteur de PC1/3 pour ensuite moduler l'expression de PC1/3 via la leptine (179). Une autre protéine ayant la propriété de réguler la production de PC1/3 par le biais de la liaison au promoteur de PC1/3 est PAX6 (paired box 6). Une mutation dans le gène *PAX6* conduit à une déficience en PC1/3 chez l'homme induisant une maturation défectueuse de la proinsuline et en un métabolisme

du glucose anormal (PAX6 régule le métabolisme du glucose via la maturation de la proinsuline gérée par PC1/3) (180). De manière indirecte, certaines protéines peuvent également générer une inhibition de PC1/3. La CPE (carboxypeptidase E) est la principale enzyme responsable de l'élimination des résidus de la partie C-terminale après l'action des PCs. Une étude a montré que les souris inactivées pour le gène *CPE* présentaient des déficiences en PCs, notamment en PC1/3 et PC2 dans certaines régions du cerveau et au niveau de l'hypophyse (181).

8-Expression des proprotéines convertases

Les PCs sont principalement exprimées dans le cerveau et dans les organes périphériques, à l'exception de PC4 qui est exprimé au niveau des testicules. Elles jouent un rôle dans la production de divers neuropeptides tels que des facteurs de croissance et des récepteurs mais aussi dans la régulation de l'adhésion et la migration cellulaire, dans l'homéostasie du cholestérol et des acides gras et enfin dans la croissance et la différenciation de cellules souches (164, 182-185). Chaque PC possède une localisation subcellulaire distincte mais souvent partiellement chevauchante. Elles sont actives dans des compartiments intracellulaires variés et des voies de sécrétion (constitutives et régulées), la voie d'endocytose et à la surface cellulaire (**Table 4**). L'expression tissulaire des PCs est considérée comme ubiquitaire (furine, SKI-1, PC7), généralisée (PC5/6A, PACE4), limitée (PC1/3, PC2, PC5/6B, PCSK9) ou restreinte (PC4) (**Table 4**) (164, 182-185). A l'exception de PC1/3 et PC2, les PCs sont exprimées au niveau de l'endomètre humain (186).

PC	Compartiment cellulaire	Distribution des tissus
furine	RTG, endosomes, GSI, surface cellulaire : MP et MEC	Ubiquitaire : foie, placenta, reins, rate …
PC1/3	GSI, GSM	Limitée : neuroendocrine
PC2	GSM	Limitée : neuroendocrine
PACE4	RTG, surface cellulaire : MEC	Large: cerveau, moelle épinière, cœur, intestin …
PC4	Surface cellulaire : MP	Restreinte: cellules germinales testiculaires (interstitium ovarien, placenta)
PC5/6A	RTG, GSI, GSM, surface cellulaire : MEC	Large : glande surrénale, tissus neuronaux, ovaires, intestin
PC5/6B	RTG, endosomes, surface cellulaire : MP et MEC	Limitée : intestin, reins, glande surrénale
PC7	RTG, endosomes, surface cellulaire : MP	Ubiquitaire : colon, tissu lymphoïde, testicule
SKI-1	Cis/medial golgi, endosomes, lysosomes	Ubiquitaire : hypophyse antérieure, thyroïde, glande surrénale …
PCSK9	Surface cellulaire : espace extracellulaire	Limitée : foie, intestin …

Table 4: Localisation subcellulaire et distribution tissulaire des proprotéines convertases

Acronymes : RTG, réseau trans-Golgien ; GSI, granules de sécrétion immatures ; GSM, granules de sécrétion matures ; MP, membrane plasmique ; MEC, matrice extracellulaire. Concernant la localisation subcellulaire, les compartiments présentés sont ceux dans lequels la PC est active. Concernant la distribution tissulaire, dans le cas où les tissus sont listés suivi de « … », les tissus donnés sont ceux ayant la plus forte expression.

Il existe un seul transcrit ARNm de PC1/3. La PC1/3 est principalement exprimée dans le cerveau, les cellules enteroendocrines et le système neuroendocrine (164). Une étude récente chez la souris a montré que la PC1/3 est exprimée dans les trois régions du petit intestin : duodenum, jejunum et ileum alors que PC2 et la furine sont principalement exprimées au niveau du duodenum et du jejunum (187). Ces données suggèrent que PC1/3, PC2 et la furine pourraient jouer des rôles différents et redondants dans la maturation de prohormones dans ces régions du petit intestin.

9-Pathologies associées aux proprotéines convertases

L'identification de mutations pathogéniques dans certaines PCs et leurs substrats ainsi que l'étude des souris « Knock-Out » pour les PCs, ont permis de mettre en évidence que les PCs avaient de nombreuses fonctions et étaient impliquées dans des pathologies variées. Certaines de ces PCs maturent des protéines impliquées dans des pathologies comme des tumeurs malignes, la régénération de tissus et des infections virales. La présence de sites potentiels de clivage au sein des médiateurs de maladies ou la modification d'expression des PCs ont encouragé les chercheurs à définir le rôle des PCs dans certaines pathologies.

Maladies génétiques

Des mutations au sein des PCs ou sur les sites de clivage de leurs substrats peuvent générer de nombreuses maladies congénitales. En effet des mutations sur le site de clivage de *POMC* (substrat de PC1/3) ont été associées à un hypoadrénalisme, une obésité et une pigmentation rousse de la pilosité (96). Quatre patients sur 49 présentant des formes syndromiques de malformations congénitales tels que VACTERL (Vertèbres, Anus, Cœur, Trachée, Reins, Membres (en anglais, Limbs)) ou CRS (caudal regression syndrome) étaient porteurs de mutations au sein du gène PC5/6 (188).

Maladies infectieuses

Les PCs jouent un rôle crucial dans l'activation des toxines bactériennes (164). Une étude chez la souris a montré que des inhibiteurs de PCs pouvaient protéger les souris contre certaines toxines bactériennes (189). Afin d'acquérir l'activité de fusion pour entrer dans la cellule hôte, les proprotéines de fusion virales sont traitées par les PCs en deux sous-unités disulfure liées (164). Les inhibiteurs de PC ont été testés comme traitement alternatif du virus de l'immunodéficience humaine (190). Les PCs transforment de nombreux virus, notamment le virus de la rougeole, le virus respiratoire syncytial et le virus Ebola (191-194).

Cancers

Les PCs sont également impliquées dans de nombreux cancers (195, 196). En contrôlant le clivage de multiples protéines associées aux cancers, les PCs jouent un rôle clef à différents stades de développement des cancers. Les protéines furine, PC5 et PC7 induisent la tumorigénèse en activant VEGF-C, un facteur de sécrétion impliqué dans de nombreux processus physiologiques de l'embryogenèse et des cancers (197). Des taux d'expression élevés des protéines furine, PACE4, PC7 et PC1/3 ont été démontrés dans les lignées de cellules tumorales et dans les échantillons de tissus de tumeurs du sein et du poumon (198-200). Récemment, des expériences *in vivo* ont montré que la furine pourrait également avoir un rôle crucial dans la tumorigénèse (201). En effet, une souris déficiente en furine dans un modèle de tumeur des glandes salivaires a un retard considérable dans l'apparition de tumeurs (201). PC5/6 a un rôle protecteur dans la tumorigénèse intestinale chez la souris (202). Les taux de protéines PC1/3 et furine ont été montrés élevés dans les carcinomes pulmonaires (203, 204). PCSK1 fait partie des transcrits significativement induits dans les cellules du cancer du poumon, et pourrait être un biomarqueur candidat (205). Une étude transcriptomique au niveau du génome entier a montré une expression élevée du transcrit PCSK1 chez les patients ayant une forme rare de tumeur maligne (ASPS pour Alveolar Soft-Part Sarcoma) (206). Les PCs pourraient être d'importants facteurs étiologiques dans les néoplasies mammaires chez l'homme. Une étude récente chez la souris transgénique a montré que la production ciblée de PC1/3 augmente le développement mammaire et la tumorigenèse (207). PC1/3 est également impliquée dans certains cancers endocriniens. Comme montré précédemment dans la partie « Maturation de substrats par les PCs », PC1/3 est connue pour être impliquée dans la transformation post-traductionnelle de POMC en hormone biologiquement active ACTH. La POMC est exprimée dans les cellules corticotropes et au niveau de la partie antérieure de l'hypophyse. Un adénome corticotrope « silencieux » est causé par un néoplasme (tumeur) hypophysaire ne sécrétant pas d'ACTH. Il a été montré que l'expression de PC1/3 est faible chez les patients atteints d'un adénome corticotrope silencieux (208). De plus, une déficience d'expression pour PC1/3 pourrait conduire à la production préférentielle de formes non transformées, biologiquement inactives de l'ACTH dans l'adénome corticotrope silencieux (209). L'apparition d'auto-anticorps contre PC1/3 chez les patients atteints d'un macroadénome hypohysaire non-fonctionnant est fréquente (210).

Neurodégénérescence

Les PCs sont également impliquées dans certaines maladies neurodégénératives, vu leurs rôles dans la maturation de certains substrats tels que les neuropeptides et les peptides

amyloïgéniques. La PC furine intervient dans le processus de clivage de la protéase β-sécrétase, protéine responsable de la génération de la protéine amyloïde β qui est à l'origine la maladie d'Alzheimer (211). D'autres PCs, telles que PACE4, PC5/6 et PC7 maturent également la β-sécrétase *in vivo* (212). Une autre étude a montré que la PC7 contribuait à la maturation de la protéine précurseur β-amyloïde impliquée dans la maladie d'Alzheimer (213). L'angiopathie amyloïde de type britannique (ou démence familiale de type britannique) est une maladie autosomique dominante causée par une mutation ponctuelle au sein du codon stop du gène BRI. Le clivage protéolytique du précurseur de ce gène se fait par la PC furine. Une augmentation de la synthèse du mutant BRI par l'intermédiaire de la furine génère des formes toxiques de peptides amyloïdogéniques qui sont à l'origine de la pathogenèse de la maladie (214, 215).

Dyslipidémie

La dyslipidémie est un terme regroupant les maladies pour lesquelles l'homéostasie lipidique est perturbée. Les PCs sont impliquées dans la dyslipidémie. Il a été démontré que *PCSK9* dégrade les récepteurs du LDL (low-density lipoprotein) dans le foie et contrôle ainsi le niveau de LDL dans le plasma (216). Plusieurs études ont montré que des mutations perte ou gain de fonctions au sein du gène *PCSK9* étaient associées respectivement à une hypocholestérolémie ou à une hypercholestérolémie (diminution ou augmentation des LDL) (217-221). La relation entre PCSK9 et le récepteur du LDL (LDLR) est illustrée en **Figure 6** montrant les possibles voies menant à des taux plus élevé (en rouge) ou plus faible (en vert) de la protéine PCSK9 ou de son activité selon les mutations perte ou gain de fonction (l'effet est inversé pour les taux de la protéine LDLR, étant donné que PCSK9 améliore la dégradation du LDLR). Plus récemment, une relation directe entre des mutations du gène *PCSK9*, des taux circulants de PCSK9 et des niveaux de LDL cholestérol a été établie (222). L'hypercholestérolémie est un facteur de risque pour la mortalité par infarctus du myocarde (223) alors que l'hypocholestérolémie est associée à une diminution du risque des maladies coronariennes (224, 225). Cependant, l'effet à long terme d'un faible taux de LDL est encore mal connu. Une étude longitudinale a montré que des mutations au sein du gène *PCSK9* étaient associées à une diminution du taux de LDL et à une réduction du risque de maladies coronariennes (226). Contrairement à PCSK9 qui inactive le récepteur LDL, SKI-I /S1P active la synthèse du cholestérol et des acides gras tel que le récepteur du LDL (227). De plus, la furine, PC4, PC5 et/ou, PACE4 inactivent les lipases endothéliales et lipoprotéines (228). Ainsi les PCs sont des potentielles cibles thérapeutiques pour diminuer les taux de LDL plasmatiques et pour prévenir les maladies coronariennes.

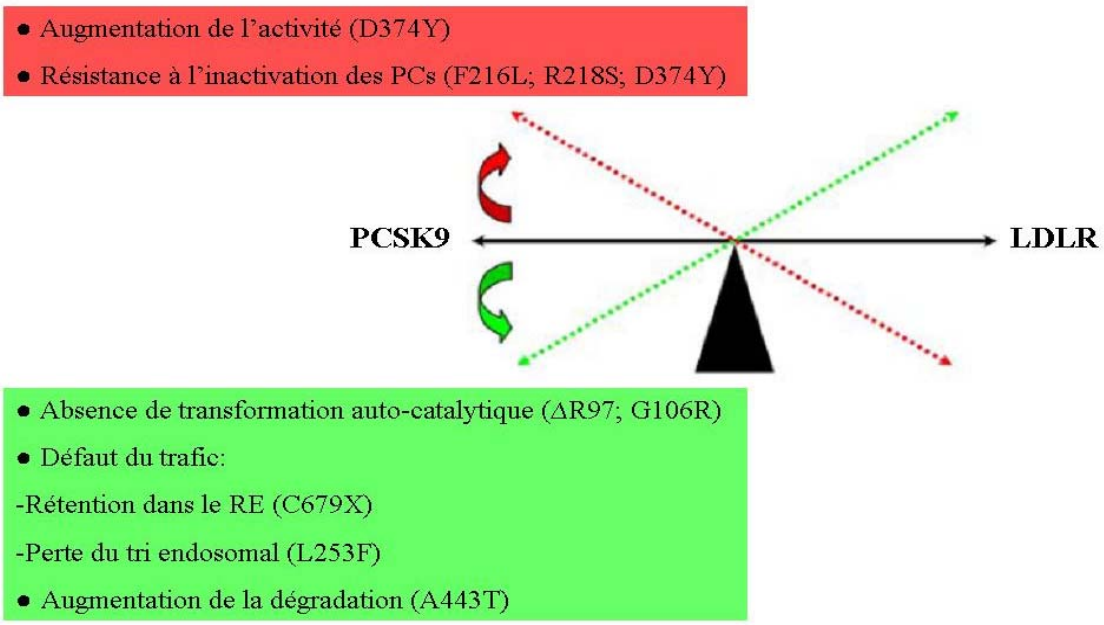


Figure 6: La balance protéique de PCSK9 et du récepteur LDL (d'après Seidah NG and Prat A, J Mol Med, 2007)

10-Souris inactivées pour les proprotéines convertases

Pour déterminer l'importance physiologique des PCs, les gènes correspondants ont été inactivés individuellement dans des modèles de souris KO. La variété des phénotypes chez les souris KO résultant de l'absence des convertases fonctionnelles souligne la complexité et le large éventail de précurseurs protéiques synthétisés par ces enzymes. Les phénotypes associés à ces souris KO montrent que certains précurseurs sont maturés par une PC spécifique et à un stade de développement embryonnaire bien précis (229). Les modèles de souris KO ont révélé que l'absence ou une dysfonction de la furine, PC5/6 et SKI-1/S1P est létale à un stade embryonnaire précoce (164, 230). Les souris inactivées pour PC1/3 et PC2 sont viables malgré des déficiences hormonales et neuroendocrines (231, 232). Les souris KO pour PC4 sont infertiles ou hypofertiles (233). Les souris déficientes en PACE4 sont viables à 75% et présentent dans certains cas des anomalies cranio-faciales (234). Les phénotypes des souris inactivées pour les PCs sont résumés en **Table 5**.

Convertases	Phenotype
Furin	Souris meurent à e10.5 dû à une insuffisance hémodynamique, défauts embryonnaires
PC1/3	Souris viables ; souris de petites tailles (60% de la taille normale) ; des défauts dans la maturation de précurseurs d'hormones ; hyperproinsulinémie.
PC2	Souris viables ; retard de croissance ; hypoglycémie ; défauts dans la maturation de peptides endocriniens.
PACE4	25% des souris meurent à e10.5 à cause de défauts du situs et/ou de malformations cranio-faciales
PC4	Souris viables ; diminution de la fertilité
PC5	Souris meurent à e4.5-7.5
PC7	Pas de phénotype anormal apparent
SKI-1	Souris meurent à e4. L'inactivation du gène empêche la formation normale de l'épiblaste et donc son implantation ; réduction de la synthèse du cholestérol et des acides gras
PCSK9	Augmentation de l'absorption du cholestérol par le foie

Table 5: Phénotypes des souris déficientes en proprotéines convertases (d'après Scamuffa N, FASEB J, 2006)
e : âge embryonnaire en jours

A – Déficiences en *PCSK1* et phénotypes associés

1-Déficiences en *PCSK1* chez la souris

Une inactivation du gène Pcsk1 chez la souris résulte en de sévères anomalies du développement. La souris inactivée pour ce gène montre un retard de croissance. Les souris KO sont de plus petites tailles et ressemblent aux souris mutées pour le récepteur de l'hormone de croissance (GHRH pour growth hormone releasing hormone) (232, 235) (Figure 7). Les taux du facteur de croissance à insuline et GHRH sont significativement réduits au niveau des taux d'ARNm des hormones de croissance de l'hypophyse, ce qui suggère que cette réduction contribue au retard de croissance observée chez ces souris. L'évaluation des précurseurs des hormones peptidiques et des subtrats connus de PC1/3 et de leurs formes actives révèle l'accumulation de formes immatures associée à de faibles taux de formes matures des peptides tels que le GHRH hypothalamique, la POMC hypophysaire, la proinsuline et le proglucagon intestinal (170). La souris déficiente en Pcsk1 mature normalement la POMC hypophysaire en ACTH et a des taux normaux de corticostérone sanguin. La souris inactivée pour ce gène développe également une hyperproinsulinémie mais sans affecter l'homéostasie du glucose (170).

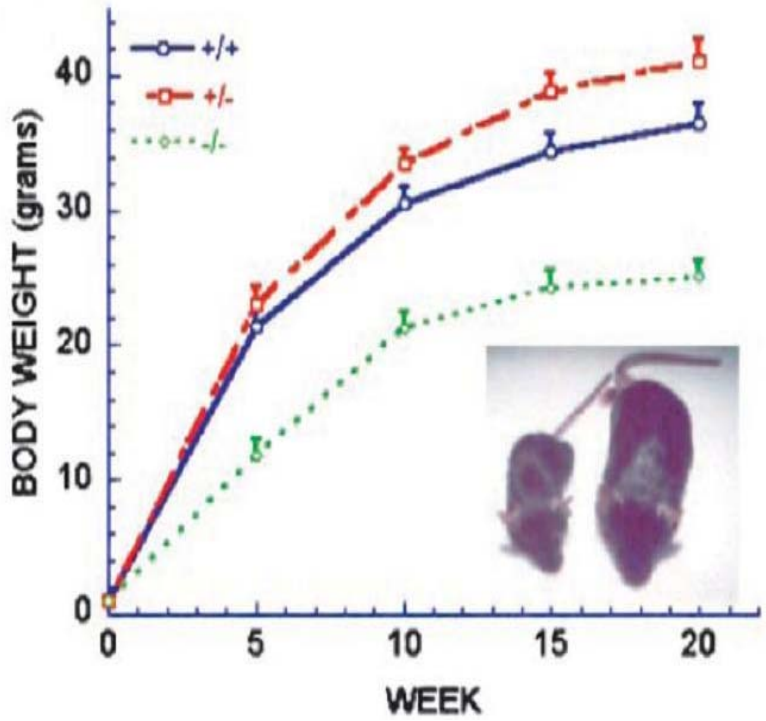


Figure 7: Comparaison des courbes de croissance des souris déficientes en PC1/3 et des souris sauvages (d'après Zhu X et al., PNAS, 2002)

Un second modèle de souris a été obtenu par mutagenèse induisant une mutation ponctuelle (N222D) au sein du domaine catalytique, rendant la protéine PC1/3 50% moins active. Ces souris mutées sont obèses, hyperphagiques et présentent une augmentation de l'efficacité du métabolisme (236). Les souris $Pc1/3^{N222D/N222D}$ sont également caractérisées par une maturation anormale de la proinsuline causant une intolérance au glucose et de nombreux problèmes endocriniens (236). Les souris $Pc1/3^{N222D/+}$ hétérozygotes présentent un phénotype intermédiaire entre les homozygotes sauvages et mutés : leur pourcentage de masse grasse augmente en comparaison des souris non mutées et elles sont hyperproinsulinémiques (236).

Récemment, un 3ème modèle de souris déficiente en Pcsk1 a été publié (237). L'approche d'inactivation du gène consiste en l'insertion d'une large délétion au locus Pcsk1 ainsi que l'insertion du gène bactérien de résistance à la néomycine. Les souris homozygotes mutées sont létales à l'état embryonnaire, ceci pourrait-être dû à la large délétion au locus Pcsk1 affectant les gènes limitrophes ou à la production d'un propeptide tronqué, pouvant inhiber les autres PCs. Chez les souris femelles $Pcsk1^{+/-}$ une prise de poids avec l'âge significativement supérieure est observée lorsque la composition en graisses du régime alimentaire est élevée (237).

2-Déficiences en *PCSK1* chez l'homme

En 1995, Steve'O Rahilly et ses collègues publient un rapport clinique décrivant une patiente de 43 ans (Sujet 1) atteinte de troubles de l'homéostasie glucidique (hypoglycémies post-prandiales) et ayant des taux anormaux de certaines prohormones telles que la proinsuline, et la POMC (238). L'histoire médicale de la patiente inclut une apparition précoce d'obésité sévère et malgré un développement normal des organes sexuels, cette patiente présente une aménorrhée. A l'époque, l'hypothèse d'une déficience en *PCSK1* est émise sachant qu'il est déjà connu que PC1/3 clive la proinsuline pour la rendre active mais l'information sur la structure génomique de *PCSK1* n'est pas disponible, et il n'est pas possible de séquencer ce gène chez cette patiente. Il faudra attendre 1997 pour réaliser ce travail et montrer que cette patiente était hétérozygote composite pour deux mutations au sein du gène *PCSK1* (95). La première mutation G593R est un changement d'acide aminé au sein de l'exon 13 qui empêche la maturation de la forme proPC1/3 et conduit à sa rétention dans le ER. La deuxième substitution au niveau de l'intron 5 ($A \rightarrow C^{+4}$) cause la suppression de l'exon 5, conduisant à la perte de 26 résidus et créant ainsi un codon stop prématuré au sein du domaine catalytique. A la suite d'un traitement aux gonadotrophines, cette patiente (Sujet 1) a réussi à procréer et a donné naissance à des quadruplets. Trois étaient hétérozygotes porteurs pour la mutation G593R et un était porteur de la mutation de l'intron 5, tous sont présentés

comme cliniquement normaux (95).

En 2003, un deuxième cas de déficience en *PCSK1* est rapporté (94). Il s'agit d'un nourrisson de 18 mois (Sujet 2) présentant des diarrhées sévères dues à une malabsorption des monosaccharides et des graisses, et une obésité extrême malgré un apport calorique inférieur à 50% de l'apport journalier recommandé. Ses taux de proinsulines étaient anormaux, suggérant une déficience en *PCSK1*. Le séquençage du gène *PCSK1* a révélé que la patiente (Sujet 2) était hétérozygote composite pour une mutation non-synonyme conduisant à un codon stop (G250stop) et une deletion produisant la perte d'une alanine (A213Δ). Ses parents hétérozygotes pour ces mutations étaient cliniquement normaux. A la suite de l'association entre les sévères perturbations gastrointestinales et les mutations *PCSK1* détectées chez le Sujet 2, les phénotypes associés à une déficience en *PCSK1* ont été réévalués chez le Sujet 1, montrant également des problèmes de la fonction d'absorption du petit intestin chez cette patiente (94).

Un dernier cas de déficience en *PCSK1* a été observé en 2007 (89). Il s'agit d'un garçon de 6 ans issu d'une union consanguine (Sujet 3). Cet enfant est obèse sévère et hyperphagique, il a des diarrhées persistentes, par contre il ne présente pas d'hypoglycemie réactive. Ce sujet est homozygote pour une nouvelle mutation non-synonyme (S307L) affectant l'activité catalytique de la protéine PC1/3 (89). Ses parents hétérozygotes pour cette mutation ne sont pas obèses.

Buts de l'étude

En 2007, le contexte de la génétique de l'obésité était le suivant : 8 gènes impliqués dans la voie leptine / mélanocortine (*MC4R*, *LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *SIM1*, *BDNF*, *NTRK2*) avaient été décrits dans des formes monogéniques d'obésité (239). Les variants introniques du gène *FTO* (240, 241) et deux polymorphismes rares du gène MC4R (V103I et I251L) (143) avaient été associés de façon concluante avec l'obésité dans de larges méta-analyses. L'implication du gène *PCSK1* dans l'obésité monogénique est connue depuis 1997, cependant au commencement de ma thèse seul trois cas de déficiences complètes en *PCSK1* avaient été rapportés. Mon objectif principal de thèse a été d'estimer la contribution du gène *PCSK1* aux formes monogéniques et polygéniques d'obésité dans la population européenne.

A l'aide d'une approche gène candidat positionnel, nous avons d'abord cherché à évaluer la contribution du gène *PCSK1* dans l'obésité polygénique. Nous nous sommes demandés si des variants codants étaient associés à l'obésité polygénique chez les adultes et les enfants d'origine européenne et s'ils avaient un effet sur l'activité de la protéine PC1/3. Nous nous sommes également demandés si les polymorphismes communs associés à l'obésité étaient associés à d'autres endophénotypes liés à l'homéostasie énergétique et au comportement alimentaire.

Nous avons voulu savoir quelle était la part de l'obésité monogénique expliquée par des déficiences partielles en *PCSK1* chez des sujets européens non-consanguins et quel était le mode de transmission des mutations *PCSK1*. Pour répondre à ces questions nous avons séquencé les parties codantes du gène *PCSK1* dans un large effectif de sujets obèses afin d'identifier de nouvelles mutations rares (MAF<1%) à effet sévère dans l'obésité. Nous avons ensuite testé si ces variants codants rares avaient un effet délétère sur la protéine PC1/3. Puis nous avons estimé la prévalence de l'obésité pour ces mutations pathogènes en génotypant un large effectif d'individus obèses et de sujets minces.

PRESENTATION DES TRAVAUX

ARTICLE 1

Common nonsynonymous variants in *PCSK1* confer risk of obesity

Benzinou M, Creemers JWM, **Choquet H**, Lobbens S, Dina C, Durand E, Guerardel A, Boutin P, Jouret B, Heude B, Balkau B, Tichet J, Marre M, Potoczna N, Horber F, Le Stunff C, Czernichow S, Sandbaek A, Lauritzen T, Borch-Johnsen K, Kiess W, Körner A, Kovacs P, Jacobson P, Carlsson LMS, Walley AJ, Hansen T, Pedersen O, Meyre D and Froguel P.

Nature Genetics. 2008 Aug;40(8):943-5.

Contribution de variants communs codants du gène *PCSK1* dans l'obésité polygénique

Quatre études de liaison génome entier ont délimité un intervalle de 5.6 Mb sur le chromosome 5q lié à des traits relatifs à l'obésité tels que l'IMC, et la masse grasse (242-245). Le gène *PCSK1* est situé dans cette large région de liaison génétique et représente le meilleur gène candidat du locus du fait de son implication dans les formes monogéniques d'obésité humaine (89, 94, 95). De plus, une étude chez la souris a montré qu'une déficience en *PCSK1* entraînait une obésité, de l'hyperphagie et une augmentation de l'efficacité du métabolisme (236).

Criblage initial du gène PCSK1

Nous nous sommes donc intéressés à l'implication de ce gène dans l'obésité polygénique. Pour cela nous avons séquencé dans un premier temps les régions codantes, 5' et 3' du gène *PCSK1* chez 48 adultes obèses qui contribuaient au pic de liaison du chromosome 5q avec l'obésité. Nous avons identifié des variants fréquents et après étude du déséquilibre de liaison, nous avons sélectionné neuf SNPs. Ces SNPs marqueurs capturaient 92% de la variabilité commune du gène *PCSK1*.

Etude cas-contrôle initiale

Les neuf SNPs ont d'abord été génotypés chez 1045 adultes obèses et 1265 sujets minces français d'origine européenne. Six variants étaient significativement associés avec l'obésité (*P*-values comprises entre 0.045 et 4.0×10^{-5}).

Etudes cas-contrôle de réplication

Les associations les plus significatives étaient pour les variants rs6232, rs6234 et rs6235. Le variant rs6234 codant le changement d'acide aminé Q665E et le variant rs6235 codant la substitution S690T étant en fort déséquilibre de liaison ($r^2>0.96$), nous avons décidé de poursuivre l'étude en génotypant uniquement le rs6235.

Nous avons confirmé ces associations avec une augmentation du risque de l'obésité dans une 1ère étude cas-contrôle d'adultes danois (OR=1.17 ; 95CI 1.01-1.36 ; p=0.019 et OR=1.12 ; 95CI 1.03-1.21 ; p=0.005 respectivement pour le variant rs6232 et rs6235). Nous avons également confirmé ces associations à l'aide d'une 2ème étude cas-témoin d'adultes suisses (OR=1.38 ; 95CI 0.95-2.01 ; p=0.045 et OR=1.38 ; 95CI 1.15-1.67 ; $p=3.5 \times 10^{-4}$ respectivement pour le variant rs6232 et rs6235).

Nous avons ensuite évalué la contribution des variants rs6232 et rs6235 au risque de l'obésité chez l'enfant. Pour cela, nous avons génotypé ces deux variants dans trois études cas-contrôles (deux d'enfants français et une d'enfants allemands) et nous avons trouvé une association du risque de l'obésité chez l'enfant pour ces deux variants. Les résultats sont présentés en **Table 6**.

Variant	Population	Etude cas-contrôle	N	OR	[95%I.C.]	p-value
rs6232	**Etude danoise**	Adultes contrôles	2,790	_	_	_
		Adultes obèses	3,074	1.17	1.01-1.36	**0.019**
	Etude suisse	Adultes contrôles	542	_	_	_
		Adultes obèses	551	1.38	0.95-2.01	**0.045**
rs6235	**Etude danoise**	Adultes contrôles	2,790	_	_	_
		Adultes obèses	3,074	1.12	1.03-1.21	**0.005**
	Etude suisse	Adultes contrôles	542	_	_	_
		Adultes obèses	551	1.38	1.15-1.67	**3.5×10^{-4}**
rs6232	**Etude française I**	Enfants minces	1,010	_	_	_
		Enfants obèses	580	1.67	1.21-2.32	**9.0×10^{-4}**
	Etude française II	Enfants minces	532	_	_	_
		Enfants obèses	505	1.57	1.07-2.31	**0.009**
	Etude allemande	Enfants minces	715	_	_	_
		Enfants obèses ou en surpoids	283	1.56	1.05-2.32	**0.013**
rs6235	**Etude française I**	Enfants minces	1,010	_	_	_
		Enfants obèses	580	1.23	1.05-1.45	**0.005**
	Etude française II	Enfants minces	532	_	_	_
		Enfants obèses	505	1.50	1.23-1.83	**3.0×10^{-5}**
	Etude allemande	Enfants minces	715	_	_	_
		Enfants obèses ou en surpoids	283	1.12	0.92-1.43	0.12

Table 6. Associations des variants rs6232 et rs6235 avec l'obésité dans les études cas-contrôles.

Transmission des variants

Les deux variants ont ensuite été génotypés dans 154 familles suédoises avec obésité. Nous avons analysé le déséquilibre de transmission des variants avec l'obésité (Transmission Disequilibrium Test). Les variants rs6232 et rs6235 étaient sur-transmis aux sujets obèses (60.6%, p=0.037 et 59%, p=0.027 respectivement).

Effets des variants en population générale

Afin de valider l'effet à risque des variants rs6232 et rs6235 dans un contexte plus large que des populations obèses, nous avons génotypé les deux variants dans la population générale D.E.S.I.R. Au vu du nombre limité des sujets obèses porteurs de l'allèle à risque pour le variant rs6232 dans cette cohorte, seule l'étude de l'effet prédictif sur l'obésité du variant le plus fréquent (rs6235) a pu être menée. Des analyses de type courbe de survie ont mis en évidence une augmentation de l'incidence de l'obésité associée avec l'allèle à risque du variant rs6235 pendant neuf ans de suivi (p=0.009).

Méta-analyse

Dans l'objectif de fournir une estimation globale des associations des variants rs6232 et rs6235 avec l'obésité, nous avons combiné les sept études décrites précédemment (cas-contrôle et familiale), totalisant 13659 individus d'origine européenne. Nous avons ainsi observé une augmentation du risque de l'obésité pour les variants rs6232 et rs6235 (OR=1.34 ; 95CI 1.20-1.49 ; $p=7.28x10^{-8}$ et OR=1.22 ; 95CI 1.15-1.29 ; $p=2.31x10^{-12}$).

Caractérisation fonctionnelle des variants de PCSK1

Ma contribution dans cette étude fut les analyses fonctionnelles des polymorphismes associés avec l'obésité en collaboration avec le Pr John Creemers de l'Université Catholique de Louvain (Belgique). Nous avons mené les études *in vitro* afin de tester l'effet des changements d'acides aminés N221D (correspondant au variant rs6232) et du cluster Q665E-S690T (correspondant aux variants rs6234-rs6235 en fort déséquilibre de liaison, d'où étudiés simultanément) sur l'activité de la protéine PC1/3 et sur son fonctionnement (clivage, maturation, sécrétion) en se basant sur les propriétés de la protéine PC1/3, sachant que :

1) La protéine PC1/3 sauvage se synthétise elle-même et s'auto-active. Des analyses Western Blots sur le milieu et le lysat cellulaire permettent donc d'identifier les différentes formes de la protéine après les clivages auto-catalytiques.

2) La protéine PC1/3 mature de nombreux substrats en clivant au niveau d'un site spécifique. L'utilisation d'un substrat fluorogénique de synthèse contenant la séquence consensus spécifique du clivage PC1/3 permet de visualiser l'activité enzymatique de la protéine PC1/3.

Ces mêmes études avaient été réalisées pour les mutations identifées dans les cas rapportés de déficience en *PCSK1* chez l'Homme et la souris (89, 94, 95, 236). Nous avons donc utilisé comme contrôles internes pour nos analyses *in vitro* les protéines PC1/3 recombinantes G593R et N222D qui avaient été démontrées délétères.

Dans un 1er temps nous avons testé si ces substitutions d'acides aminés affectaient la maturation et la sécrétion de la protéine à l'aide d'analyses par western blots sur différents types cellulaires n'exprimant pas *PCSK1* endogène. Nous n'avons pas observé de différences pour les mutations N221D et Q665E-S690T en comparaison avec la protéine PC1/3 sauvage « Wild-Type » (WT).

Nous avons ensuite testé si ces mutations affectaient l'activité enzymatique de la protéine PC1/3 en utilisant un substrat fluorogénique de synthèse possédant un site de clivage reconnu par PC1/3. Nous avons mis en évidence une diminution significative de 10.4 % de l'activité pour le recombinant N221D en comparaison avec la protéine WT PC1/3 ($p=0.03$). Une diminution non-significative de 6.1% de l'activité a été observée pour le cluster Q665E-S690T.

Conclusion

En résumé, nous avons montré que des polymorphismes communs du gène *PCSK1* étaient associés à une modulation de l'IMC et à une augmentation du risque de l'obésité chez des adultes et des enfants d'origine européenne. De plus, les analyses fonctionnelles ont démontré une altération au niveau de l'activité catalytique de la protéine PC1/3 causée par la mutation N221D.

ARTICLE 2

Partial Prohormone Convertase 1 deficiency confers increased risk of obesity in humans

Choquet H, Creemers JWM, Pigeyre M, Vatin V, Beckers S, Meulemans S, Tauber M, Balkau B, Elliot P, Jarvelin MR, Van Hul W, Van Gaal L, Horber F, Pattou F, Froguel P, Meyre D

Soumis, Diabetes. 2010

Contribution de mutations rares *PCSK1* dans l'obésité monogénique

A la suite de l'étude sur la contribution du gène *PCSK1* dans l'obésité polygénique (article 1 ; (246)), nous avons décidé de fournir une évaluation exhaustive de l'implication de *PCSK1* dans l'obésité monogénique.

Jusqu'à présent, seuls trois cas de déficience complète en *PCSK1* ont été décrits (89, 94, 95, 238). Les porteurs sont soit hétérozygotes composites ou homozygotes pour des mutations *PCSK1* et présentent des caractéristiques cliniques incluant une apparition précoce d'obésité, une hyperphagie, une hypoglycémie réactive et des troubles intestinaux. Les membres des familles porteurs hétérozygotes pour ces mutations sont décrits comme cliniquement sains.

Dans cette étude, nous avons voulu d'une part évaluer la prévalence des mutations rares codantes du gène *PCSK1* et leur effet sur l'obésité humaine dans une population non enrichie en patients consanguins, et d'autre part examiner le mode de transmission de l'obésité dans un contexte de déficience en *PCSK1*.

Criblage initial du gène PCSK1

Pour répondre à ces questions, nous avons séquencé les 14 exons du gène *PCSK1* chez 845 patients présentant une obésité extrême : 422 adultes français (IMC ≥ 40 kg/m²), 124 enfants français (zscore IMC > 99ème percentile) et 299 adultes d'origine belge ou suisse (IMC ≥ 50 kg/m²). Parmi ces 845 sujets obèses, nous avons identifié huit mutations non-synonymes chez huit porteurs (K26E, M125I, T175M, N180S, Y181H, G226R, S325N et T558A). Tous les porteurs étaient hétérozygotes pour ces mutations. Sept mutations sont localisées dans la région catalytique et la mutation T175M est localisée sur un des sites potentiels de N-glycosylation de la protéine. Une des huit mutations est localisée dans le domaine P comme la mutation G593R détectée pour le 1er cas de déficience totale en *PCSK1* (95). Nous avons utilisé cette protéine recombinante G593R comme contrôle négatif pour les analyses *in silico* et *in vitro*.

Prédictions in silico des mutations PCSK1

Afin de prédire le possible effet d'un changement d'acide aminé sur la structure et la fonction de PC1/3, nous avons utilisé et comparé 5 programmes bioinformatiques : PolyPhen, Panther, SIFT, SNAP, PMUT. Trois changements d'acide aminé étaient prédits neutres : K26E, M125I et T558A (37.5 %) et cinq avaient probablement un effet délétère : T175M, N180S, Y181H, G226R et S325N (62.3 %).

Caractérisation fonctionnelle des variants de PCSK1

En collaboration avec le Pr John Creemers (Université Catholique de Louvain, Belgique), nous avons évalué les conséquences fonctionnelles de ces mutations sur l'activité de PC1/3 et de son fonctionnement (clivage, maturation, sécrétion) comme décrit dans l'article 1 (246). Les analyses *in vitro*, ont montré que 87.5% de ces mutations avaient un effet sur la fonction de la protéine PC1/3 (la mutation K26E étant la seule à ne pas induire d'effet délétère sur l'activité de la protéine).

Etude cas-contrôle

Les sept mutations identifiées après criblage montrant un effet fonctionnel sur la protéine ont été génotypées chez 6,104 sujets obèses et 6,274 sujets non obèses d'origine européenne. Nous avons détecté des porteurs additionnels, tous hétérozygotes. La mutation Y181H a été retrouvée chez deux sujets contrôles et neuf obèses. Deux sujets obèses étaient porteurs de la mutation N180S. La mutation M125I a été identifiée chez un individu obèse. Les mutations T175M, K26E, S325N, G226R et T558A n'ont pas été retrouvées. En combinant toutes les mutations, ces données mettent en évidence un enrichissement par six de ces mutations *PCSK1* chez les sujets obèses européens (0.20 *vs.* 0.03%, Fisher test, p=0.007). En analyse indépendante, seule la mutation Y181H montre une association significative avec le risque d'obésité (p=0.002). La pénétrance de l'obésité a été estimée à 54.5% pour les porteurs hétérozygotes de mutations délétères *PCSK1*.

Conclusion

En plus des formes syndromiques très rares d'obésité dues à une déficience complète en *PCSK1*, et des variants codants fréquents non-synonymes qui augmentent modestement le risque d'obésité, nos résultats montrent qu'une déficience partielle en *PCSK1* est associée avec un risque accru d'obésité. Une déficience partielle en *PCSK1* pourrait expliquer environ 0.83% des formes extrêmes d'obésité.

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DICUSSION ET PERSPECTIVES

I-Discussion

Les rôles de PCSK1 sont connus et variés : PCSK1 mature un large éventail de substrats incluant la proinsuline, le proglucagon et les peptides dérivés de la proopiomélanocortine (POMC). Il est ainsi impliqué dans la voie très conservée de la leptine-mélanocortine qui est essentielle pour la régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids. La déficience complète en *PCSK1* chez l'humain a été associée un à syndrome multihormonal caractérisé par une hyperphagie qui conduit à une apparition précoce d'obésité sévère, une homéostasie glucidique anormale, des troubles de la fonction intestinale, et une hypoadrénalisme. L'hyperphagie résulte probablement d'une réduction du signal mélanocortine dû à une altération de la maturation de la POMC.

Mes travaux ont contribué à montrer que :

1) des variants communs codants au sein du gène *PCSK1* augmentent le risque d'obésité chez des adultes et enfants d'origine européenne;
2) le variant fréquent N221D (rs6232) affecte modestement l'activité enzymatique de la protéine PC1/3;
3) une déficience partielle en *PCSK1*, causée par des mutations rares codantes perte de fonction sous formes hétérozygotes, contribue à favoriser le risque d'obésité chez l'homme;
4) la plupart des mutations non-synonymes *PCSK1* identifiées chez des patients obèses sont délétères;
5) une déficience partielle en *PCSK1* cause une forme d'obésité avec pénétrance incomplète;
6) une déficience partielle en *PCSK1* expliquerait environ 1% des obésités sévères.

1-*PCSK1* et obésité polygénique

Réplications

Nous avons montré que des variants communs de *PCSK1* étaient associés à un risque accru d'obésité chez les adultes et enfants européens (246), plaçant *PCSK1* sur la liste principale des gènes associés à cette maladie commune. Aucune étude de réplication n'a été en mesure d'investiguer l'association originale de Benzinou et al. avec les formes sévères

d'obésité car de larges cohortes de ce type sont très rares. Les réplications ont donc été réalisées dans des cohortes avec des phénotypes différents à savoir des obésités modérées, du surpoids ou la variation de l'IMC en population générale.

Killpeläinen et ses collègues ont étudié les variants rs6232 et rs6235 de *PCSK1* chez 20249 individus européens et ont montré que le rs6232 était associé à une augmentation de l'IMC et à l'obésité seulement chez les sujets jeunes, suggérant que l'effet de ce variant était dépendant de l'âge (247). L'association avec l'obésité et l'IMC a été répliquée chez 14186 européens pour le cluster rs6234/rs6235 ($p=6,7 \times 10^{-3}$ et $p=8,7 \times 10^{-4}$ dans les modèles additifs et récessifs) et une tendance d'association a été observée pour le rs6232 (p=0.08 dans le modèle additif) (146). Récemment, une étude conduite dans une large cohorte de 6510 sujets a identifié des associations des variants de *PCSK1* avec le surpoids (rs6232) et l'obésité (rs6235) (248). Une autre étude menée sur les variants rs6234 et rs6235 de *PCSK1* dans une large cohorte de sujets chinois (3210 individus) a montré que l'allèle à risque du rs6234 était associé au risque combiné de surpoids et d'obésité (249). De plus, l'allèle à risque du rs6234 était également associé à une augmentation de l'IMC, du tour de taille et du pourcentage de masse grasse mais uniquement chez les hommes (249). En plus d'un effet âge dépendant, les variants de *PCSK1* pourraient par conséquent interagir avec le sexe. Il faut cependant noter que Qi et al n'ont pas vérifié si l'interaction entre sexe et génotype suggérée par des analyses de sous-groupes était significative. Afin de combiner les résultats des différentes analyses GWAS publiées à ce jour, des consortiums internationaux se sont mis en place diminuant ainsi l'aspect logistique et financier de projets d'une telle ampleur. Par exemple, les équipes travaillant sur la génétique de le l'indice de masse corporelle se sont unies dans le consortium GIANT (Genetic Investigation of ANthropometric Traits) ce qui a permis de rassembler les données de génotypage par puce de 32387 individus. Cette étude a détecté une association du rs6232 avec l'IMC (p=0,03), les variants rs6234/rs6235 n'ayant malheureusement pas été génotypés (149). Ces résultats sont encourageants mais d'autres études indépendantes suivies par de larges méta-analyses sont encore nécessaires pour préciser l'association des variants rs6232 et rs6234/rs6235 avec 1) le risque d'obésité sévère 2) le risque d'obésité commune ou de surpoids 3) la modulation de l'indice de masse corporelle.

Autres rôles de PCSK1 ?

Une étude chez 4923 suédois a montré que le variant rs6235 à risque d'obésité était associé à une protection pour le **diabète de type 2** après ajustement par l'âge, le sexe et l'IMC (OR=0,87 [0,77-0,99]; p=0,04) (250). Ceci est en accord avec certains cas de déficiences complètes en *PCSK1* chez l'Homme présentant des troubles de la glycémie (hypoglycémies

postprandiales) (94, 238) et les observations des défauts de la glycémie chez la souris mutée Pcsk1 (236). De manière intéressante, l'allèle à risque d'obésité du variant rs6234 est associé à une augmentation de l'HOMAB et à une diminution de l'HOMAS dans la population chinoise (249). Une autre étude chez 1498 sujets allemands a montré que les variants à risque d'obésité rs6232 et rs6235 déterminaient la conversion de la proinsuline par stimulation au glucose et que l'allèle à risque d'obésité du rs6232 augmentait la **sensitivité à l'insuline** (251). Ces données sont concordantes avec les observations chez l'Homme et la souris où une augmentation de la proinsuline a été montrée due à l'altération de la maturation de l'hormone induite par les mutations *PCSK1* délétères. L'ensemble de ces données suggèrent donc un rôle de *PCSK1* dans l'**homéostasie glucidique**.

Goossens et ses collègues se sont demandés si les variants des gènes d'obésité étaient également associés à la dépense énergétique (252). Ils ont montré que des variants de *PCSK1* étaient associés à une dépense énergétique post-absorption au repos (252). De plus, le variant rs6235 de *PCSK1* a été montré associé à une diminution de l'oxydation des graisses (253). *PCSK1* pourrait ainsi être impliqué dans **la thermogenèse**. Cette hypothèse est en adéquation avec les observations faites chez les souris mutées *Pcsk1* qui ont un métabolisme plus efficace et une meilleure capacité à stocker l'énergie en graisse (236).

En résumé, les associations observées pour les variants rs6232 et rs6234/rs6235 avec des traits reliés au métabolisme sont en accord avec les observations faites sur les patients monogéniques humains et chez les modèles animaux, et arguent pour un rôle de ces variants dans l'homéostasie énergétique.

2-*PCSK1* et obésité monogénique

Apports de notre étude

Dans notre étude, nous avons montré qu'une déficience partielle en *PCSK1* était associée à un risque accru d'obésité chez des individus non consanguins d'origine européenne et expliquait une fraction non négligeable de l'obésité sévère (environ 1%). Nous avons également montré que l'environnement et le reste du génome jouait un rôle important dans l'expressivité de la déficience partielle en *PCSK1*, sachant que les hétérozygotes ne sont pas systématiquement obèses. En effet, les membres des familles porteurs hétérozygotes de mutations *PCSK1* avaient été décrits comme cliniquement sains et non obèses (89, 94, 95) et nous avons observé que certains porteurs de la mutation délétère Y181H étaient minces (Choquet H, Diabetes, 2010). Ainsi, nous proposons un nouveau mode de transmission de l'obésité pour ces mutations *PCSK1* : un modèle co-dominant avec une pénétrance

incomplète. Ce modèle se retrouve pour d'autres formes monogéniques d'obésité (*MC4R*, *POMC*, *LEP*, *LEPR*) où les porteurs hétérozygotes de mutations montrent un phénotype intermédiaire d'obésité en comparaison des porteurs homozygotes ou hétérozygotes composites (88, 90, 254, 255).

Limitations de notre projet

Afin de démontrer de façon exhaustive le mode de transmission d'une déficience partielle en *PCSK1* dans l'obésité chez l'Homme, il aurait été nécessaire d'examiner **les coségrégations** des mutations identifiées avec l'obésité au sein des familles. Malheureusement, ce travail n'a pas pu être réalisé, par manque de disponibilité de la part de nos collaborateurs belges et suisses ou par manque de données exploitables au sein des différentes familles, certains sujets ne voulant plus participer à l'étude, ou étant perdus de vue ou décédés.

Une autre limitation de notre étude sur la contribution d'une déficience partielle en *PCSK1* à l'obésité monogénique est **le manque de données cliniques** concernant les phénotypes associés à l'obésité chez les patients mutés. Etant donné que les cas rapportés de déficience totale en *PCSK1* présentaient en plus de l'obésité, une hyperphagie, des troubles de l'homéostasie glucidique et de la fonction intestinale, nous avons établi en collaboration avec le Dr M Pigeyre du Centre Hospitalier Universitaire de Lille, un protocole clinique pour explorer de manière exhaustive les caractéristiques cliniques telles que l'hyperphagie, les taux de certaines prohormones (proinsuline, proglucagon et POMC) et les troubles intestinaux (**Annexe 3**). Dans le cadre de notre étude, le protocole n'a pas pu être appliqué vu la difficulté de sa mise en place chez nos collaborateurs étrangers (belges et suisses) par manque de disponibilité.

3-*PCSK1* et obésité monogénique et polygénique

Continuum obésité monogénique et polygénique

Nous avons vu que *PCSK1* était associé à des formes polygéniques, monogéniques graves mais très rares et des formes oligogéniques d'obésité dues à une déficience partielle en *PCSK1* mais cette fois beaucoup plus répandue (environ 1% des obèses). De ce fait, *PCSK1* est impliqué à la fois dans l'obésité monogénique et polygénique. La présence au sein d'un même gène de mutations pathogéniques causales d'obésité et de variants fréquents prédisposant à l'obésité montre qu'il existe un **continuum entre les obésités monogénique et polygénique**. Ces deux formes de maladie reposent donc sur des mécanismes au moins en

partie communs. Ce phénomène se retrouve fréquemment: Joel Hirschhorn a recensé que 1 locus sur cinq associé à des maladies communes par GWA inclut un gène muté dans la maladie monogénique correspondante (256). Dans l'obésité aussi il existe d'autres illustrations de cette continuité: des polymorphismes de *POMC* sont associés à une augmentation de la masse grasse, du rapport taille/hanche ou de l'obésité (244, 254, 257, 258). Des polymorphismes de *BDNF* et de *MC4R* sont également associés à l'obésité (143, 148, 149). Un SNP au locus *SH2B1* a récemment été associé à la variation de l'IMC par une approche GWAS (149). De façon intéressante, ce gène fait partie des 30 gènes inclus dans la délétion du chromosome 16p associée à des formes hautement pénétrantes d'obésité (153). Etant donné que les modèles de souris inactivés pour *SH2B1* développent une obésité et des caractéristiques communes aux patients porteurs de la délétion 16p (résistance à l'insuline, hyperphagie), la délétion de ce gène pourrait expliquer le phénotype monogénique d'obésité observé chez les porteurs de la délétion 16p. Si cette hypothèse se vérifie, *SH2B1* pourrait représenter un nouveau gène associé aux formes polygéniques et monogéniques d'obésité.

Associations synthétiques

Jusqu'à ce jour, cinq mutations délétères pour *PCSK1* avaient été rapportées, aucune mutation gain de fonction pour le gène *PCSK1* n'a été identifiée et trois polymorphismes codants fréquents (rs6232 et rs6234-rs6235) ont été associés à une augmentation de l'IMC et du risque d'obésité. Etant donné que des variants communs et des mutations rares fonctionnelles au sein de *PCSK1* sont associés à l'obésité, le gène *PCSK1* pourrait être un exemple d'association synthétique. En effet, des variants génétiques rares peuvent facilement créer des associations synthétiques créditées par des variants communs (259, 260). Cependant, dans notre étude (Choquet H, Diabetes, 2010), parmi les huit porteurs de mutations *PCSK1*, deux sujets étaient aussi hétérozygotes pour des polymorphismes fréquents (rs6234-rs6235) (246) et aucun sujet n'était porteur du rs6232 affectant l'activité catalytique de PC1/3. Dans notre étude, il n'y a donc pas d'évidence pour supporter une association synthétique entre des mutations rares et des variants communs de *PCSK1*.

II-Perspectives pour PCSK1

1-Variants communs de *PCSK1* et associations traits spécifiques

Nous avons vu que *PCSK1* semblait être impliqué dans l'homéostasie glucidique et la thermogenèse. Pour confirmer ces rôles de *PCSK1*, il serait intéressant de tester ces associations dans de larges cohortes indépendantes et de comprendre par quels mécanismes *PCSK1* est lié à la thermogenèse et à l'oxydation des lipides.

Actuellement, nous étudions si les polymorphismes rs6232 et rs6234 de *PCSK1*, démontrés associés à l'obésité (246), sont également associés à d'autres phénotypes relatifs au métabolisme énergétique et au comportement alimentaire. Pour cela, nous avons génotypé ces deux variants dans cinq larges cohortes de sujets européens : une cohorte française de population générale composée de 1336 sujets, une cohorte de 4809 adolescents finlandais, une cohorte de 1736 patients obèses suisses ayant subis une chirurgie bariatrique, une population française cas/contrôle relative au petit poids de naissance composée de 1402 individus et enfin 1319 enfants et 2489 adultes français recrutés sur le critère de l'obésité. Nous nous intéressons aux associations des variants rs6232 et rs6234 de *PCSK1* avec les traits de glycémie et insulinémie à jeun et après un test de tolérance au glucose. Nous testons également si ces variants influencent le comportement alimentaire de l'enfant et de l'adulte, comme réalisé précédemment pour des SNPs des gènes *MC4R* et *FTO* (261). Pour la cohorte de sujets obèses suisses, nous avons des données sur la dépense énergétique au repos, cela nous permettra de conforter l'hypothèse de l'implication des variants de *PCSK1* dans la thermogenèse. Ce travail est en cours.

Au vu des phénotypes spécifiques observés dans les cas de déficiences en *PCSK1* (altération de la maturation de certaines prohormones et malabsorptions des sucres au niveau de l'intestin), il serait intéressant d'évaluer dans de larges cohortes l'association des variants rs6232 et rs6234 de *PCSK1* avec les traits phénotypiques tels que les taux de proglucagon, POMC, proinsuline et les taux de xylosémie et xylosurie.

2-*PCSK1* : coségrégations et études phénotypiques

Dans le cadre d'une nouvelle étude sur *PCSK1*, il serait intéressant de séquencer des parties codantes du gène chez des patients obèses en prenant soin de sélectionner les patients selon différents critères : nous aurions accès au minimum à cinq membres de la famille, les sujets seraient bien renseignés dans les bases de données phénotypiques, et idéalement consentants pour participer à l'étude clinique. Ainsi, nous pourrions amplement étudier les coségrégations des mutations détectées avec l'obésité. De plus, nous pourrions évaluer les

effets générationnels et estimer la pénétrance de l'obésité pour le gène *PCSK1*, comme réalisé pour le projet *MC4R* (262). En effet, 10 ans après la découverte du gène *MC4R* comme cause monogénique d'obésité, notre équipe a démontré une interaction genotype x environnement sur la pénétrance de l'obésité (40% chez les grands parents porteurs de mutations pathogéniques vs 80% chez les petits-enfants) (262).

Un autre point important de l'étude serait l'exploration des phénotypes relatifs à l'obésité tels que l'hyperphagie mais aussi les phénotypes spécifiques associés à une déficience en *PCSK1* tels que les troubles intestinaux. Nous avons vu que le Dr M Pigeyre a déjà établi ce protocole d'étude des patients mutés *PCSK1* (**Annexe 3**). Pour mesurer l'hyperphagie, l'expérience des repas tests *ad libitum* est certainement la meilleure façon de procéder: le médecin pèse la nourriture ingérée, il connait la composition exacte du plat qu'il propose et peut dans le même temps analyser le comportement du sujet, la vitesse d'ingestion et les préférences alimentaires. Ce protocole permettant d'évaluer l'hyperphagie a été réalisé avec succès par le Dr M Pigeyre dans le cadre de l'étude *MC4R*, sur des individus déficients en *MC4R* (Pigeyre M, submitted, 2010). Ce protocole clinique permettrait également d'estimer les taux de certaines prohormones (proinsuline, proglucagon et POMC) et de diagnostiquer les malabsorptions intestinales. Le Dr M Pigeyre a prévu d'appliquer ce protocole d'évaluation des patients mutés *PCSK1* dans un centre de recherche où les patients sont plus accessibles géographiquement (lieu de résidence à proximité du centre de recherche clinique où les tests seront réalisés).

3-Locus *PCSK1* et CNVs

Nous avons vu qu'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 1 kb. Il est estimé que 10% du génome fait l'objet de CNVs (263). Il serait donc intéressant d'évaluer les CNVs au locus *PCSK1* et de tester cette hypothèse pour expliquer la variabilité de la pénétrance des mutations. Pour cela, nous pourrions utiliser l'algorithme cnvHap (264) qui permet de ré-analyser les données de GWAS pour les associations CNVs. Ainsi, nous pourrions détecter des CNVs rares dans la région de *PCSK1* ou d'autres gènes monogéniques à partir des données de puces ADN de 685 enfants obeses, 695 adultes obèses, 685 enfants minces et 731 adultes minces (146), et étudier la coségrégation de ces CNVs avec l'obésité par génotypage des familles correspondantes.

4-Contribution de *PCSK1* dans diverses ethnies

L'exploration de la contribution de la variation au locus *PCSK1* sur le risque d'obésité dans diverses ethnies permettrait de savoir si *PCSK1* a un rôle causatif dans l'obésité sévère dans d'autres ethnies. Pour cela, il faudrait séquencer les régions codantes du gène dans de larges cohortes de sujets obèses et minces de différents fonds ethniques. Cette approche a été réalisée pour le gène *MC4R* chez les Indiens Pimas et il a été montré que les variations de *MC4R* expliquaient une faible part de l'obésité pour cette ethnie (265). De manière plus générale, il serait intéressant d'estimer la contribution des autres gènes connus d'obésité monogénique (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *MC4R*, *BDNF*, *NTRK2*, *SIM1*) et d'évaluer le risque d'obésité selon les ethnies.

Une approche complémentaire serait de caractériser la variation commune au locus *PCSK1* dans chaque ethnie puis de génotyper les variants communs de *PCSK1* dans différentes ethnies afin d'estimer la contribution du gène à la susceptibilité de l'obésité et d'évaluer si les mêmes variants sont associés à la maladie. Une étude sur le gène *PCSK9* a montré des différences de prévalence des mutations de ce gène selon l'ethnie (2.6% chez les sujets noirs américains en comparaison à 3.2% chez les sujets blancs), de plus ces mutations étaient associées à une réduction du cholestérol LDL (28% chez les sujets noirs américains en comparaison à 15% chez les sujets blancs) et à une diminution du risque de développer une maladie coronarienne différente en fonction de l'ethnie (88% chez les sujets noirs américains en comparaison à 47% chez les sujets blancs) (226). Une autre étude sur 1,094 chinois a montré que des variants communs de *PCSK1* autres que ceux identifiés dans l'étude de Benzinou et al. étaient associés à l'obésité dans la population chinoise (266).

Ces résultats montrent ainsi la forte influence de l'ethnie dans l'expression de certains variants génétiques pouvant causer l'obésité. Au-delà de l'ethnie, l'environnement de vie est un facteur environnemental intéressant sachant que les modes de vie (pratiques culinaires et activité physique) sont très contrastés d'une ethnie à une autre. A titre d'exemple, les variants du gène *FTO* sont associés à des variations d'IMC et à l'obésité de manière reproductible dans les populations blanches d'origine européenne, cependant une étude menée sur une population africaine a montré que ces variants n'influençaient pas les mesures d'IMC chez les Gambiens ayant un mode de vie traditionnel et plutôt rural (267). L'estimation des effets des polymorphismes de *PCSK1* sur l'obésité au sein des mêmes ethnies, en milieu rural, en milieu urbain dans le pays d'origine, puis en milieu urbain après émigration dans un pays occidentalisé permettrait d'estimer l'impact de l'environnement sur le risque d'obésité induit par *PCSK1*.

III-Perspectives Générales

1-Identification de nouveaux gènes causatifs de l'obésité par approche gène candidat

Autres prohormones convertases

Nous savons que l'obésité monogénique peut résulter d'anomalies dans les gènes codant pour des hormones ou des neuropeptides, dont la plupart sont d'abord synthétisés sous forme de précurseurs ou de prohormones. Ces propeptides sont maturés par des protéases dont les prohormones convertases PC1/3 et PC2. Nous avons vu que PC1/3 avaient des rôles chevauchant avec PC2, notamment au niveau du clivage de certains substrats impliqués dans le contrôle de la prise alimentaire tels que la proinsuline, la progastrine et POMC. De plus, les souris déficientes en PC2 ont des caractéristiques assez proches des souris déficientes en PC1/3 (retard de croissance, hypoglycémies et des défauts de maturation de peptides endocriniens impliqués dans l'homéostasie énergétique). *PCSK2* a été identifié comme gène candidat pour la variation de la prise de poids et de l'adiposité après clonage positionnel chez la souris (268). Récemment, une déficience en PC2 chez la souris a été associée à une diminution de la masse grasse et à une protection vis-à-vis de la prise de poids sous régime riche en graisses (269). De plus, les souris obèses ont des taux d'ARNm de PC2 dans le cerveau et l'estomac significativement plus élevés que chez les souris minces (269). L'ensemble de ces données montre le rôle de PC2 dans la prise de poids et semble indiquer que *PCSK2* pourrait être un gène candidat d'obésité monogénique chez l'homme et qu'il serait intéressant de séquencer ce gène chez des patients présentant une obésité extrême et certains défauts hormonaux.

Etude de nouvelles voies moléculaires

Jusqu'à ce jour la plupart des gènes connus d'obésité monogénique se trouvent dans la voie moléculaire « leptine-mélanocortine » jouant un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire et de la prise de poids. Mais d'autres voies moléculaires doivent être étudiées afin de découvrir de nouveaux gènes associés à l'obésité. Dans le cadre du consortium SENSOFAT au sein duquel nous collaborons avec le Pr Philippe Besnard, spécialiste de la physiologie de la nutrition et des récepteurs linguaux (Université de Bourgogne, Dijon), nous nous sommes intéressés à l'implication des gènes de détection des lipides tels que *CD36* et *GPR120* dans l'obésité chez l'homme.

La protéine **CD36** (thrombospondin receptor ou fatty acid transporter) est un transporteur lipidique mais aussi un lipido-récepteur gustatif chez la souris. Une déficience en

CD36 peut engendrer des troubles du métabolisme des acides gras, occurrence élevée d'hypertension artérielle, de maladies cardio-vasculaires et de diabète de type 2, plus d'autres phénotypes moins attendus comme un risque accru de maladie d'Alzheimer ou une résistance vis-à-vis de la malaria (270). Notre laboratoire a précédemment décrit une mutation fonctionnelle (p.L360X) dans le gène *CD36* présente sous forme hétérozygote chez 9 individus d'une famille française et associée avec un risque élevé de diabète de type 2, d'hypertension et de maladies cardio-vasculaires (271). *CD36* est impliqué dans la perception des acides gras à longue chaîne au niveau lingual et dans la préférence pour le gras chez le rongeur. En particulier, les souris inactivées pour le gène *CD36* perdent complètement leur préférence pour des aliments riches en acides gras à longue chaîne (272). Une hypothèse à tester est que des mutations du gène *CD36* pourraient moduler la préférence pour les aliments gras et le risque d'obésité chez l'humain. Nous nous sommes donc interrogés sur le rôle de *CD36* dans l'obésité chez l'homme. Dans un 1er temps, suite à une étude montrant l'association de quatre polymorphismes de *CD36* avec un risque accru d'obésité ou une augmentation de l'IMC chez des adolescents européens (273), nous avons tenté de répliquer ces associations à l'aide d'études cas/contrôles et population générale mais sans succès, excluant une contribution majeure de *CD36* dans l'obésité polygénique (274) (**Annexe 4**). Dans un 2ème temps, nous avons voulu savoir si le gène *CD36* était impliqué dans l'obésité monogénique. Pour ce faire, nous avons sélectionné un échantillon de 312 sujets présentant une obésité sévère. Le séquençage des parties codantes du gène *CD36* chez ces patients a été réalisé et de nouvelles mutations ont été identifiées. Pour caractériser les conséquences des mutations (perte ou gain de fonction) sur la fonction de CD36, nous avons collaboré avec le Pr Kenneth Linton (Imperial College, Londres). Trois mutations délétères ont été identifiées. Les études de coségrégations des mutations fonctionnelles *CD36* avec l'obésité étant peu conclusives, nous évaluons actuellement la prévalence des mutations fonctionnelles dans une large étude cas/contrôles. Par la suite, en collaboration avec l'équipe du Pr Philippe Besnard (Université de Bourgogne, Dijon), il est prévu de tester l'effet de ces mutations délétères *CD36* sur la perception des acides gras à longues chaînes en explorant la préférence alimentaire au gras chez les porteurs de mutations *CD36* et les membres de leurs familles.

GPR120 (G protein-coupled receptor 120) est un membre de la famille des rhodopsines, également impliqué dans la voie des lipides. Le ligand endogène de GPR120 est un acide gras libre à moyenne ou longue chaîne qui semble avoir un rôle physiologique important dans l'homéostasie énergétique. *GPR120* est exprimé dans les papilles gustatives et les poumons mais il est également fortement exprimé dans les intestins et pourrait jouer un rôle dans la sécrétion d'insuline par l'intermédiaire des acides gras libres (275, 276). De plus,

GPR120 s'exprime de façon très forte dans les adipocytes et semble être un facteur clef dans l'adipogenèse en intervenant dans la maturation des adipocytes (277). Cependant, le mécanisme précis par lequel GPR120 agit dans les adipocytes n'est pas encore clairement défini et d'autres études faisant le lien entre l'obésité et *GPR120* paraissent nécessaires. Pour mieux comprendre le rôle de *GPR120* dans l'obésité, nous avons séquencé les exons du gène chez 312 sujets obèses sévères et de nouvelles mutations ont été identifiées (R270H et R67C). Après la caractérisation fonctionnelle des mutations en collaboration avec le Pr Gozoh Tsujimoto (Kyoto, Japon), nous avons étudié l'expression de *GPR120* dans les tissus adipeux et hépatique et nous avons également évalué la corrélation entre l'expression de ce gène et le statut de l'obésité. Nous nous sommes également intéressés aux coségrégations de la mutation fonctionnelle R270H avec l'obésité, ainsi qu'aux phénotypes associés à l'obésité selon les porteurs ou non de la mutation R270H. Enfin, des études cas-contrôles entre le variant R270H et le risque d'obésité ont été réalisées. L'ensemble de nos résultats est très conclusif et montre pour la 1ère fois l'implication du gène *GPR120* dans l'obésité. Ce travail vient d'être soumis à Nature.

Ces études sur *CD36* et *GPR120* nous montrent qu'à l'heure actuelle il est possible de trouver des nouveaux gènes d'obésité et de découvrir des voies moléculaires encore inexplorées par des approches gènes candidats classiques. Au-delà de la voie « leptine/mélanocortine », nos résultats montrent un rôle essentiel de la voie des lipides dans le contrôle de la balance énergétique. Ceci ouvre les nombreuses portes sur la recherche du développement des drogues dans le traitement de l'obésité, étant donné que les récepteurs des acides gras représentent des cibles thérapeutiques intéressantes.

Projet de séquençage gènes candidats

Grâce aux dernières avancées technologiques de séquençage à haut débit et de la réduction des coûts du séquençage, notre laboratoire a initié un projet de séquençage de l'exome sur des patients obèses en collaboration avec le centre national de séquençage Genoscope à Evry où le travail de séquençage sera réalisé. Au cours de ma thèse, j'ai participé aux étapes préliminaires de ce projet en sélectionnant les gènes candidats d'obésité selon une stratégie bien précise.

En se basant sur les données de la littérature, nous avons sélectionné dans un premier temps, les gènes trouvés en lien avec une **forme monogénique d'obésité** (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *MC4R*, *BDNF* et *NtrkB*) faisant partie de la voie moléculaire « leptine-mélanocortine » et jouant un rôle crucial dans la régulation de la prise alimentaire et du poids. Une des approches du projet est de rechercher de nouvelles mutations rares (MAF<5%) à

effet sévère dans l'obésité pour ces gènes déjà connus associés à une obésité monogénique. Ceci permettra d'une part d'établir une meilleure estimation de la prévalence de ces mutations au sein des populations européennes et d'autre part de confirmer les phénotypes associés à ces altérations et éventuellement définir de nouveaux symptômes associés à ces mutations. Ces recherches permettront également de mieux comprendre comment ces mutations affectent la physiologie humaine en étudiant la fonctionnalité des mutations non-synonymes à l'échelle cellulaire et moléculaire.

Dans un 2ème temps, nous avons sélectionné les **gènes de susceptibilité à une obésité polygénique** chez l'humain issus des approches gènes candidats et de clonage positionnel ou récemment identifiés grâce aux approches d'association pangénomiques. Certains gènes pouvant contribuer à la fois à une forme monogénique mais aussi polygénique d'obésité, il nous semblait intéressant d'étudier les gènes de susceptibilité à l'obésité polygénique déjà connus dans une approche monogénique.

Nous avons ensuite sélectionné les gènes associés à une **obésité marquée dans les modèles animaux**. Les études sur les modèles animaux ont bien souvent mis en évidence des gènes candidats pour l'obésité. Des mutations dans les gènes *LEP*, *LEPR*, *MC4R*, *BDNF*, *TrkB* and *POMC* aboutissent à une obésité chez les mammifères. L'homme et la souris semblent réagir de façon similaire aux mutations de ces gènes. Il est donc intéressant d'étudier chez l'humain des gènes associés à une obésité marquée dans les modèles animaux.

Au final, et au vu de la limite de 1.2Mb imposée par le Genoscope, nous avons sélectionné 230 gènes candidats. Treize familles obèses ont été sélectionnées selon différents critères: individus bien renseignés dans les bases de données phénotypiques et accès à un minimum de cinq membres obèses et cinq membres non obèses dans la famille afin d'étudier les coségrégations des mutations détectées avec l'obésité et le profil mendélien de transmission de l'obésité dans la famille. Les résultats de ce projet permettront d'identifier de nouvelles mutations, d'évaluer leurs prévalences dans l'obésité extrême, d'établir et ou de confirmer les spécificités phénotypiques des porteurs de mutations de gènes et de découvrir de nouveaux gènes causatifs de l'obésité chez l'homme.

2-Identification de nouveaux gènes causatifs de l'obésité par approche génome entier

Projet de séquençage

Au-delà du séquençage des parties codantes de gènes candidats, le **séquençage « full exome » du génome entier** dans les familles apporterait encore plus d'informations mais les coûts restent encore élevés à l'heure actuelle pour que ces approches soient appliquées à un grand nombre de patients. Le séquençage génome entier combiné aux études d'associations génome entier utilisant les nouvelles générations de puces (2.5 millions polymorphismes) dans de larges cohortes cas-contrôles ou familiales rendrait possible la découverte de nouveaux variants associés à l'obésité, peu fréquents et à effets intermédiaires jusqu'à ce jour difficilement détectables.

« Homozygosity mapping »

Une autre stratégie pour identifier de nouvelles mutations causatives de l'obésité serait d'utiliser la cartographie d'homozygotie (Homozygosity mapping) dans les familles consanguines avec obésité. Par cette approche, une étude a identifié de nouvelles mutations des gènes BBS dans des familles consanguines présentant le syndrome de Bardet-Biedl (278). La cartographie d'homozygotie semble être la technologie la mieux adaptée pour détecter les mutations causatives dans les petites familles consanguines avec des maladies complexes comme l'obésité.

Consortiums GWAS SNPs et CNVs

Nous savons que certains variants nécessitent de larges effectifs et une puissance statistique suffisante pour montrer un effet et une association à l'obésité. En combinant les résultats des différentes études GWAS publiées à ce jour sur l'obésité et la variation de l'IMC, les consortiums vont pouvoir établir de nouvelles listes de variants communs causatifs de l'obésité. De plus, à partir des données GWAS les consortiums pourront également identifier les associations CNVs au niveau du génome entier étant donné qu'il existe des méthodes permettant de ré-analyser les données de GWAS pour détecter les CNVs (264).

3-Nouveau traitement potentiel : modification de la flore bactérienne

Dans ce manuscrit, nous avons vu que les bactéries intestinales avaient un rôle important sur la régulation de la prise de poids. Une étude chez la souris a montré que la transplantation de la flore intestinale de souris obèses vers des souris minces générait une prise de poids (58). Chez l'Homme, la flore intestinale des sujets obèses qui avaient perdu du poids, commençait à avoir la même composition que celle des sujets minces, soulevant des questions quant à savoir si ces changements étaient relatifs aux modifications de l'alimentation ou au bilan énergétique (61). Une étude récente a comparé les bactéries fécales d'enfants européens à celles d'enfants africains ayant un mode de vie rural où le régime alimentaire était riche en fibres (279). Il en résulte que les flores intestinales étaient différentes qualitativement et quantitativement. Ces données ont permis de formuler l'hypothèse que la flore intestinale en combinaison avec un régime riche en polysaccharide permettait aux enfants africains de maximiser la prise énergétique des fibres les protégeant ainsi des inflammations et des maladies non-infectieuses du colon (279). L'apport de certains aliments ou le changement de régime alimentaire pourraient ainsi modifier la composition du microbiome intestinal. Ces résultats permettent d'envisager de nouvelles approches thérapeutiques pour réverser l'obésité.

4-Génétique et prédiction

Les gènes monogéniques de nouveau sur le devant de la scène

Actuellement, nous avons vu qu'il existait un traitement personnalisé issu d'un diagnostic génétique uniquement pour une forme monogénique d'obésité : les patients déficients en leptine (103). De plus dans le cadre des formes monogéniques, généralement une seule mutation du gène entraîne une obésité sévère. A l'heure actuelle, il paraît donc plus aisé de traiter les formes monogéniques d'obésité sachant qu'elles sont souvent accompagnées de caractéristiques cliniques spécifiques de la déficience, pouvant ainsi guider le choix du gène à séquencer en priorité dans l'élucidation de la pathologie (280). De plus, les formes monogéniques d'obésité pourraient expliquer de 5 à 10% des formes sévères d'obésité. Des études sur les gènes monogéniques comme cibles thérapeutiques restent donc primordiales dans un objectif d'appliquer une médecine personnalisée.

Les variants communs : encore peu prédictifs

L'utilité des polymorphismes de prédisposition à l'obésité dans la prédiction d'un développement futur de la maladie commence à être évaluée. Une étude a testé l'effet de 25 variants communs issus des GWAS obésité chez 6078 enfants sur la détermination de l'IMC (151). Pour les 15 variants montrés associés à une variation de l'IMC dans cette cohorte, les allèles à risque ont été cumulés montrant ainsi que le score du génotype expliquait 1.12% de la variation totale du z-score IMC ($p=2.53x10^{-16}$) (151). A ce jour, les polymorphismes apportent très peu d'information supplémentaire par rapport aux facteurs prédictifs cliniques. Cependant quelques limitations méthodologiques existent encore pour le moment (281). Une étude sur les SNPs issus de GWAS de diabète de type 1 suggère que l'amélioration de l'évaluation des risques des maladies peut être obtenue en utilisant des algorithmes qui prennent en compte les interactions entre un grand ensemble de marqueurs (281). Le caractère prédictif des polymorphismes de prédisposition, s'il est un jour mis en évidence, permettra la mise en place de mesures préventives ciblées sur les individus à risque et des traitements personnalisés.

Réponse aux traitements

Il est important de savoir pour le médecin, quel type de traitement est le mieux adapté pour le patient ? Quel est le pourcentage de réussite du traitement ? Quelle est la perte de poids espérée ? Cette perte de poids sera-t-elle possible sur le long terme ? Y aura-t-il des effets secondaires liés au traitement ? Peut-on espérer une atténuation des comorbidités ? Au vu d'un suivi personnalisé, la connaissance du profil génétique du patient pourrait apporter quelques éléments de réponses. Une leçon importante de la dissection génétique de l'obésité est qu'il s'agit globalement d'un désordre héréditaire du contrôle de la prise alimentaire (149, 282). Ceci permet de mieux comprendre l'important taux d'échec des traitements basés sur les modifications du comportement et sur l'éducation diététique. Une connaissance des bonnes pratiques alimentaires n'arme pas mieux le patient pour résister à la sensation de faim accrue qui caractérise les obésités génétiques.

Dans ce manuscrit, nous avons vu que les facteurs environnementaux tels que **l'alimentation et l'activité physique** pouvaient moduler le risque d'obésité (48). De nombreuses équipes ont cherché s'il existait des interactions entre des variants génétiques prédisposant à l'obésité et des situations environnementales spécifiques. Une étude a montré qu'un régime riche en graisse pouvait modifier l'association entre des variants de *FTO* et l'obésité (283). Une interaction entre un régime riche en graisse et le génotype sur la variation de l'IMC a également été mise en évidence pour le polymorphisme -265T>C du gène *APOA2*

dans trois études indépendantes (284). Enfin, plusieurs études ont démontré qu'il existait une interaction entre l'activité physique et le génotype de *FTO* sur la variation de l'IMC et l'obésité (285-292). Ces résultats suggèrent qu'une augmentation du risque de l'obésité due à certains variants génétiques peut être atténuée par la modification du mode de vie. D'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre la génétique polygénique de l'obésité. Nous pourrions étudier les interactions gène x environnement pour les variants issus des GWAS obésité.

De la même façon des études ont montré que des **médicaments** étaient plus efficaces en termes de perte de poids selon les variants génétiques. Une étude menée sur 111 patients obèses traités à la sibutramine a montré que le polymorphisme C825T du gène *GNB3* était associé à une réduction plus importante de la perte de poids (293). Ces résultats ont été répliqués dans une étude de 131 patients obèses taïwanais (294). Récemment, une étude sur des patients obèses taïwanais traités à la sibutramine a montré un effet du polymorphisme -866G/A du gène *UCP2* sur la perte de poids et la composition corporelle (295). Cependant ces résultats sont à prendre avec précaution car ces études avaient de faibles effectifs de patients. D'autres études sont donc nécessaires dans de larges cohortes et pour des variants conclusivement associés à l'obésité. Des études GWAS de la réponse aux médicaments seraient utiles. Il est en effet possible que des gènes différents modulent l'IMC et le risque d'obésité d'une part, et la réponse aux médicaments en terme de perte de poids.

Si la **chirurgie de l'obésité** est envisagée, les données génétiques pourraient guider le chirurgien dans la décision selon le pronostic de réussite de l'opération et dans le choix du type d'opération au vu du profil génétique du patient obèse. Des études ont mis en évidence un lien entre certains variants génétiques et la perte de poids après chirurgie bariatrique (296-301). Récemment notre laboratoire s'est intéressé à la réponse à la chirurgie bariatrique selon les types de mutations *MC4R* connus (mutations « perte de fonction », variants protecteurs et variant de prédisposition) chez 1301 patients obèses sévères ayant subi une chirurgie bariatrique en Suisse par le Pr Fritz Horber (302). Il a été montré que les patients porteurs de mutations perte de fonction pour *MC4R* étaient opérés plus jeunes et avaient un IMC avant l'opération en moyenne plus élevé. Pour les patients mutés *MC4R* opérés une 1ère fois avec un anneau gastrique, il était plus souvent nécessaire de procéder à une conversion en opération de diversion et les patients porteurs de variants gain de fonction *MC4R* étaient plus souvent réopérés (58% en comparaison à 32% chez les non porteurs de mutations *MC4R*). De plus, après six ans de suivi, seul 17% des patients porteurs de mutations perte de fonction atteignaient un IMC < 30 kg/m² en comparaison à 42% chez les contrôles (302). Il serait

intéressant de faire ce genre d'approche pour les 8 gènes déjà connus responsables de formes monogéniques d'obésité, en séquençant de larges cohortes de patients obèses opérés. Au sein de notre laboratoire, nous étudions actuellement la réponse à la chirurgie pour les 32 variants communs de gènes validés d'obésité chez les mêmes patients suisses que pour l'étude *MC4R* et réponse à la chirurgie. L'objectif étant d'estimer dans un 1er temps l'effet de chacun des variants indépendamment puis dans un 2ème temps d'évaluer l'effet cumulé des 32 allèles à risque sur la réponse à la chirurgie.

A ce jour, il est encore trop tôt pour envisager un diagnostic génétique systématique. Des études de type « evidenced-based medicine » sont nécessaires pour évaluer l'intérêt du dépistage génétique dans différents contextes (prévention, traitement) en terme de bénéfice pour le patient, mais aussi en terme économique et de faisabilité à l'échelle nationale ou internationale. Nous pouvons cependant penser dans quelques années le profil génétique pourra aider le médecin à mieux soigner son patient et à mieux prévenir le développement de l'obésité chez des individus à haut risque.

Intégration de données issues de diverses sources

A l'heure actuelle, nous avons vu que la génétique seule est insuffisante dans le processus de prédiction en pathologie humaine. L'intégration de différentes sources de données telles que les données du génome, de l'épigénome, du transcriptome, du microbiome et des expositions spécifiques environnementales pourraient aider à identifier les jeunes patients à risque pour l'obésité afin d'appliquer une prévention ciblée et un traitement personnalisé (**Figure 8**).

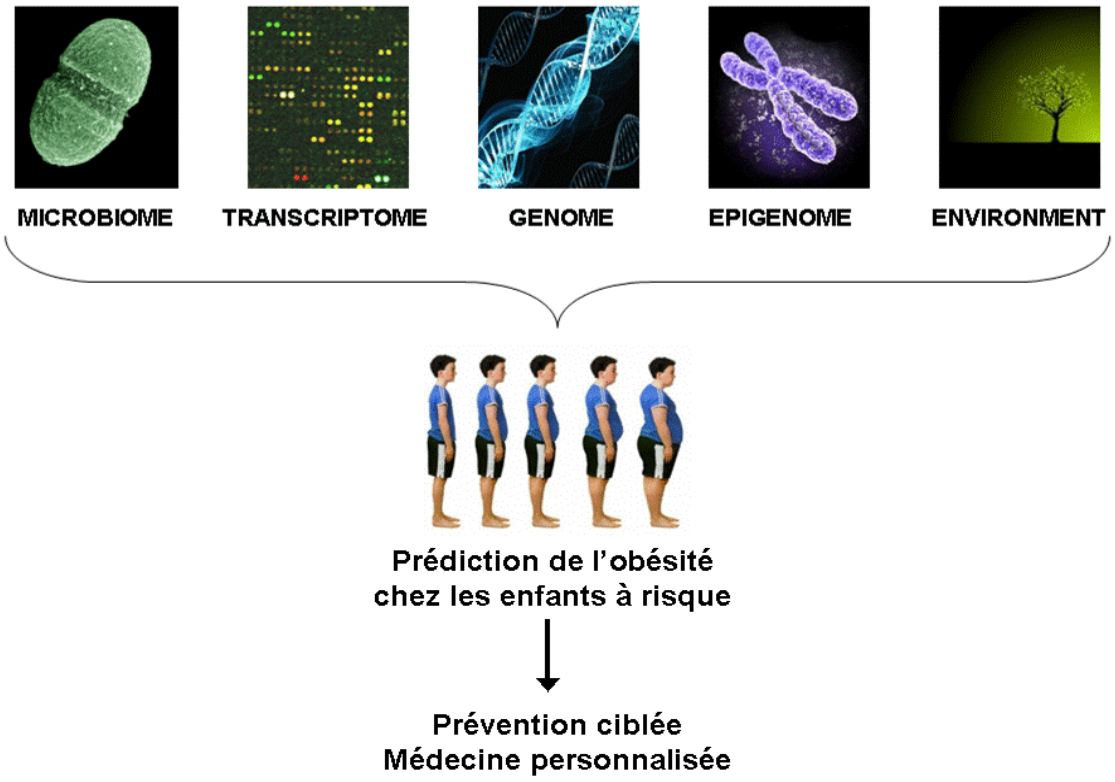


Figure 8: Stratégie intégrative pour l'identification précoce des sujets prédisposés à l'obésité (d'après Choquet H et Meyre D., Genome Medicine, 2010) (Annexe 2)

Pour conclure …

Maintenant que de nombreux variants associés à l'obésité ont été découverts, notamment récemment par les GWAS, tout reste à faire ! Les études à différentes échelles du vivant (de la cellule aux modèles animaux) combinées à d'autres disciplines (modélisation moléculaire) permettront de mieux comprendre les voies physiologiques impliquées et les fonctions des gènes.

Néanmoins, l'ensemble de ces variants n'expliquent qu'une faible part de la variance de l'obésité alors que les études sur les jumeaux estiment une héritabilité du trait jusqu'à 80%. L'obésité reste donc une maladie complexe où l'environnement reste un acteur essentiel. Il faut donc continuer à évaluer l'interaction de ces gènes avec l'environnement. Nous avons vu dans notre étude sur *PCSK1* que même un individu porteur d'une mutation délétère pour un gène monogénique d'obésité n'était pas forcément obèse, appuyant l'hypothèse que l'environnement est un facteur clef. Il faut donc disséquer l'environnement pour connaître les facteurs spatio-temporels qui le composent et qui pourraient moduler l'association de variants avec l'obésité.

Pour cela les études dans différentes ethnies permettront d'apporter des éléments de réponse sachant que les populations ne partagent pas forcément le même environnement. De plus, nous avons vu que les principaux facteurs de prédisposition sont le contexte familial, le tabagisme, les grossesses, le stress, la prise d'anti-psychotropes, les perturbations hormonales, la sédentarité, le temps de sommeil quotidien. Pourtant, nous ne sommes pas tous égaux face à un environnement similaire. Il serait donc intéressant de tester l'association des variants associés à l'obésité en réponse à un changement environnemental brutal tel que l'arrêt de la cigarette, la grossesse, la prise d'un traitement anti-psychotropes. Des approches génome entier permettront de vérifier si les changements de corpulence observés dans ces conditions particulières ne sont pas influencés par des gènes différents que ceux intervenant dans le phénotype constitutif.

En résumé, une part importante de l'obésité repose sur l'environnement. La connaissance de l'environnement et de ses interactions avec les gènes est la clef des prochaines découvertes pour les maladies complexes telles que l'obésité. La poursuite des recherches dans le domaine de l'obésité devrait amener dans les prochaines années à de nouvelles perspectives dans la compréhension de la prédisposition à l'obésité.

ANNEXES

ANNEXE 1

The T-381C SNP in BNP gene may be modestly associated with type 2 diabetes: an updated meta-analysis in 49 279 subjects.

Choquet H, Cavalcanti-Proença C, Lecoeur C, Dina C, Cauchi S, Vaxillaire M, Hadjadj S, Horber F, Potoczna N, Charpentier G, Ruiz J, Hercberg S, Maimaitiming S, Roussel R, Boenhnke M, Jackson AU, Patsch W, Krempler F, Voight BF, Altshuler D, Groop L, Thorleifsson G, Steinthorsdottir V, Stefansson K, Balkau B, Froguel P, Meyre D.

Hum Mol Genet. 2009 Jul 1;18(13):2495-501.

Etude de l'implication du gène *BNP* dans le diabète de type 2

En parallèle de mon projet principal de thèse sur le gène *PCSK1*, j'ai eu l'occasion de travailler sur d'autres projets. Je me suis notamment intéressée à la contribution du variant T-381C (rs198389) du gène *BNP* au diabète de type 2 (DT2).

Le brain natriuretic peptide (BNP ou NPPB) appartient à la famille des peptides natriurétiques. Chez l'homme, le BNP est majoritairement synthétisé par le cardiomyocyte, le BNP circulant étant essentiellement d'origine ventriculaire. La concentration plasmatique de ce peptide augmente physiologiquement avec l'âge, l'IMC et pour une même tranche d'âge, est plus élevée chez la femme. Le dosage de ce peptide est une aide au diagnostic de l'insuffisance cardiaque. Ce peptide est également un marqueur pronostique dans les syndromes coronariens aigus et les problèmes rénaux (303).

Partant de l'hypothèse que *BNP* pouvait être impliqué dans les maladies métaboliques, une première étude (304) étudiant l'implication du polymorphisme rs198389 du gène *BNP* avec le risque de DT2 a été réalisée. Cette étude a mis en évidence une association du variant rs198389 du gène *BNP* avec le DT2. Cela nous a amené à répliquer ces résultats dans un large panel de sujets, tous européens d'origine. Nous avons réalisé une méta-analyse sur 49279 sujets, montrant ainsi une modeste association du variant rs198389 avec le DT2 (305).

ANNEXE 2

Genomic insights into early-onset obesity.

Choquet H and Meyre D

Genome Med. 2010 Jun 23;2(6):36.

ANNEXE 3

Protocole clinique d'évaluation des déficients *PCSK1*

Dr M Pigeyre

Objectif principal : exploration phénotypique des individus mutés *PCSK1* et des membres de leur famille.

Critères d'inclusion

• Poids stable depuis 3 mois (variation de poids inférieure à 5% sur 3 mois)

• Sujets porteurs de mutations *PCSK1*

• Membres de la famille (porteurs ou non de mutations *PCSK1*)

Critères de non inclusion

• Variation de poids supérieur à 5 % dans les 3 mois précédents

• Prise de toxiques

• Grossesse

• Prise de traitement psychotrope, de corticoïdes ou de médicaments visant à aider au traitement de l'obésité dans les 3 mois précédents

• Diabète de type 2 traité par hypoglycémiants oraux ou par insuline ou par analogues du GLP-1

• Habitudes alimentaires particulières (végétarien ou régime très spécifique)

• Sujets ayant une anomalie clinique ou biologique significative qui au jugement de l'investigateur peut interférer avec l'évaluation en cours

Caractérisation clinique :

• Evolution de l'IMC ;

• Etude du comportement alimentaire/hyperphagie :

Les patients reçoivent 2 repas-tests isoénergétiques, l'un protido-lipidique, et l'autre protido-glucidique (40% des besoins énergétiques théoriques).

L'effet satiétant du repas est étudié de deux façons :

- Toutes les heures, pendant 10 heures les sensations de faim et de satiété sont évaluées par des échelles analogiques visuelles.
- Dix heures après le repas test, la prise alimentaire spontanée des sujets est mesurée lors de la présentation d'un plat unique *ad libitum.* Ceci permet de quantifier l'effet satiétant du repas en kJ.

• Evaluation de l'absorption intestinale

Caractéristiques métaboliques et endocriniens :

• Etude des cinétiques : glycémie, insuline, proinsuline

• Etude des cinétiques : POMC, précurseurs corticotropiques, proglucagon

Déroulement du protocole

Visite de pré-inclusion

La visite de pré-inclusion consiste en

-un examen clinique (tension artérielle, FC, poids, taille, tour de taille, tour de hanche)

-un examen biologique (numération formule sanguine, glycémie, bilan rénal, hépatique et lipidique, C Reactive Protein, vitesse de sédimentation).

-recherche d'histoires de diarrhées chroniques et exploration de la malabsorption intestinale par un test D-xylose.

-une étude de la composition corporelle par impédancemétrie ou DEXA (meilleur mais selon possibilité).

-une recherche de toxique obligatoire (amphétamines, opiacés, cannabis et cocaïne) est réalisée dans les urines.

-un auto-questionnaire alimentaire validé (TEFQ-18 items). Comme la réponse à l'effet satiétant d'un repas est modifiée chez les sujets en restriction cognitive nous avons pris en compte ce facteur en évaluant le degré de restriction de tous les sujets.

Protocole expérimental

Phase 1

J1 : Le sujet est à domicile et doit consommer sur la journée un apport énergétique standardisé égal à 1,5 BMR (métabolisme de base) réparti en 50 % de glucides, 35 % de lipides et 15 % de protéines. Le BMR est calculé pour chaque sujet selon la formule de Shofield.

J2 : Le sujet est au Centre d'Investigation Clinique de 7 h 45 à 19 h.

A 7 h 45, le sujet arrive au centre à jeun, il est pesé et mesuré. L'infirmière réalise un prélèvement sanguin pour le dosage plasmatique à jeun (glycémie, taux d'insuline, proinsuline, cortisol, ACTH, POMC, proglucagon, GLP-1) et lui présente les échelles analogiques visuelles de faim et satiété.

A 8 h, le sujet reçoit un repas-test glucidique ou lipidique distribué dans un ordre aléatoire, représentant un apport énergétique de 40 % des besoins énergétiques théoriques (soit 1,50 BMR). Le repas glucidique est composé de 80 % des calories sous forme de glucides, 20 % de protéines ; il est préparé à partir de fromage blanc à 0 %, de sucre et est aromatisé à l'aide d'édulcorants et de café décaféiné ou de vanille suivant le goût du sujet. Le repas lipidique est composé de 80 % des calories sous forme de lipides, 20 % de protéines, apportés sous forme de crème fraîche et de protéines de lait ; il est aromatisé à l'aide d'édulcorants et de café décaféiné ou de vanille.

De 8 h à 18 h, le sujet reste au centre, chaque heure pendant les 4 premières heures puis toutes les 2 heures : les échelles analogiques visuelles de faim et de satiété sont présentées au sujet de façon horaire. De plus, des prélèvements sanguins sont réalisés pour le dosage plasmatique de la glycémie, insulinémie, proinsulinémie, POMC, proglucagon, GLP-1 sauf pour le cortisol et l'ACTH où les prélèvements sont effectués à 8h, 12h et 16h. Les analyses hormonales sont réalisées à l'aide des méthodes de radio-immunologie.

A 18 h, un repas composé d'un plat unique de consommation courante (hachis parmentier ou brandade de morue et pain- densité énergétique équivalente) est proposé au sujet avec pour consigne d'en manger jusqu'à satiété et la quantité ingérée est pesée (évaluation en kJ et calcul de la ration en kJ/kg de masse maigre).

A 19 h, le sujet est autorisé à quitter le centre.

Arrêt d'au moins 24h entre les 2 phases

Phase 2

J3 : Le sujet est à domicile et reçoit un apport alimentaire identique à J1.

J4 : Le sujet est au Centre d'Investigation Clinique de 7 h 45 à 19 h.

Le déroulement est identique à celui de J2, mais le sujet reçoit l'autre repas-test.

ANNEXE 4

Lack of association of *CD36* SNPs with early-onset obesity: a meta-analysis in 9,973 European subjects.

Choquet H, Labrune Y, De Graeve F, Hinney A, Hebebrand J, Scherag A, Lecoeur C, Tauber M, Balkau B, Elliot P, Jarvelin MR, Walley AJ, Besnard P, Froguel P and Meyre D

Obesity. 2010 July. Accepted

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. James, W.P. (2008) The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med,* **263,** 336-52.
2. Cole, T.J., Bellizzi, M.C., Flegal, K.M. and Dietz, W.H. (2000) Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *Bmj,* **320,** 1240-3.
3. Chinn, S. (2006) Definitions of childhood obesity: current practice. *Eur J Clin Nutr,* **60,** 1189-94.
4. Poskitt, E.M. (1995) Defining childhood obesity: the relative body mass index (BMI). European Childhood Obesity group. *Acta Paediatr,* **84,** 961-3.
5. Hensrud, D.D. and Klein, S. (2006) Extreme obesity: a new medical crisis in the United States. *Mayo Clin Proc,* **81,** S5-10.
6. Kipping, R.R., Jago, R. and Lawlor, D.A. (2008) Obesity in children. Part 1: Epidemiology, measurement, risk factors, and screening. *Bmj,* **337,** a1824.
7. Seidell, J.C., Bakker, C.J. and van der Kooy, K. (1990) Imaging techniques for measuring adipose-tissue distribution--a comparison between computed tomography and 1.5-T magnetic resonance. *Am J Clin Nutr,* **51,** 953-7.
8. Bessesen, D.H. (2008) Update on obesity. *J Clin Endocrinol Metab,* **93,** 2027-34.
9. Lissner, L., Sohlstrom, A., Sundblom, E. and Sjoberg, A. (2010) Trends in overweight and obesity in Swedish schoolchildren 1999-2005: has the epidemic reached a plateau? *Obes Rev,* **11,** 553-9.
10. Olds, T.S., Tomkinson, G.R., Ferrar, K.E. and Maher, C.A. (2010) Trends in the prevalence of childhood overweight and obesity in Australia between 1985 and 2008. *Int J Obes (Lond),* **34,** 57-66.
11. Berghofer, A., Pischon, T., Reinhold, T., Apovian, C.M., Sharma, A.M. and Willich, S.N. (2008) Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health,* **8,** 200.
12. Daniels, S.R., Jacobson, M.S., McCrindle, B.W., Eckel, R.H. and Sanner, B.M. (2009) American Heart Association Childhood Obesity Research Summit: executive summary. *Circulation,* **119,** 2114-23.
13. Whitaker, R.C., Wright, J.A., Pepe, M.S., Seidel, K.D. and Dietz, W.H. (1997) Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med,* **337,** 869-73.
14. Adams, K.F., Schatzkin, A., Harris, T.B., Kipnis, V., Mouw, T., Ballard-Barbash, R., Hollenbeck, A. and Leitzmann, M.F. (2006) Overweight, obesity, and mortality in a large prospective cohort of persons 50 to 71 years old. *N Engl J Med,* **355,** 763-78.
15. Olshansky, S.J., Passaro, D.J., Hershow, R.C., Layden, J., Carnes, B.A., Brody, J., Hayflick, L., Butler, R.N., Allison, D.B. and Ludwig, D.S. (2005) A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med,* **352,** 1138-45.
16. Bailes, B.K. (2002) Diabetes mellitus and its chronic complications. *Aorn J,* **76,** 266-76, 278-82; quiz 283-6.
17. Franssen, R., Monajemi, H., Stroes, E.S. and Kastelein, J.J. (2008) Obesity and dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am,* **37,** 623-33, viii.
18. Must, A., Spadano, J., Coakley, E.H., Field, A.E., Colditz, G. and Dietz, W.H. (1999) The disease burden associated with overweight and obesity. *Jama,* **282,** 1523-9.
19. Wilborn, C., Beckham, J., Campbell, B., Harvey, T., Galbreath, M., La Bounty, P., Nassar, E., Wismann, J. and Kreider, R. (2005) Obesity: prevalence, theories, medical consequences, management, and research directions. *J Int Soc Sports Nutr,* **2,** 4-31.
20. Koebnick, C., Getahun, D., Smith, N., Porter, A.H., Der-Sarkissian, J.K. and Jacobsen, S.J. (2010) Extreme childhood obesity is associated with increased risk for gastroesophageal reflux disease in a large population-based study. *Int J Pediatr Obes*.

21. Subak, L.L., Richter, H.E. and Hunskaar, S. (2009) Obesity and urinary incontinence: epidemiology and clinical research update. *J Urol,* **182,** S2-7.
22. Redinger, R.N. (2008) The prevalence and etiology of nongenetic obesity and associated disorders. *South Med J,* **101,** 395-9.
23. Rosik, C.H. (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.
24. Gortmaker, S.L., Must, A., Perrin, J.M., Sobol, A.M. and Dietz, W.H. (1993) Social and economic consequences of overweight in adolescence and young adulthood. *N Engl J Med,* **329,** 1008-12.
25. Cummings, S., Parham, E.S. and Strain, G.W. (2002) Position of the American Dietetic Association: weight management. *J Am Diet Assoc,* **102,** 1145-55.
26. Miller, W.C. (1999) How effective are traditional dietary and exercise interventions for weight loss? *Med Sci Sports Exerc,* **31,** 1129-34.
27. Fujioka, K. (2002) Management of obesity as a chronic disease: nonpharmacologic, pharmacologic, and surgical options. *Obes Res,* **10 Suppl 2,** 116S-123S.
28. Rucker, D., Padwal, R., Li, S.K., Curioni, C. and Lau, D.C. (2007) Long term pharmacotherapy for obesity and overweight: updated meta-analysis. *Bmj,* **335,** 1194-9.
29. Padwal, R., Kezouh, A., Levine, M. and Etminan, M. (2007) Long-term persistence with orlistat and sibutramine in a population-based cohort. *Int J Obes (Lond),* **31,** 1567-70.
30. Bloom, S.R., Kuhajda, F.P., Laher, I., Pi-Sunyer, X., Ronnett, G.V., Tan, T.M. and Weigle, D.S. (2008) The obesity epidemic: pharmacological challenges. *Mol Interv,* **8,** 82-98.
31. Sjostrom, L., Lindroos, A.K., Peltonen, M., Torgerson, J., Bouchard, C., Carlsson, B., Dahlgren, S., Larsson, B., Narbro, K., Sjostrom, C.D. *et al.* (2004) Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med,* **351,** 2683-93.
32. Sjostrom, L., Narbro, K., Sjostrom, C.D., Karason, K., Larsson, B., Wedel, H., Lystig, T., Sullivan, M., Bouchard, C., Carlsson, B. *et al.* (2007) Effects of bariatric surgery on mortality in Swedish obese subjects. *N Engl J Med,* **357,** 741-52.
33. Mason, E.E., Tang, S., Renquist, K.E., Barnes, D.T., Cullen, J.J., Doherty, C. and Maher, J.W. (1997) A decade of change in obesity surgery. National Bariatric Surgery Registry (NBSR) Contributors. *Obes Surg,* **7,** 189-97.
34. Samuel, I., Mason, E.E., Renquist, K.E., Huang, Y.H., Zimmerman, M.B. and Jamal, M. (2006) Bariatric surgery trends: an 18-year report from the International Bariatric Surgery Registry. *Am J Surg,* **192,** 657-62.
35. Santry, H.P., Gillen, D.L. and Lauderdale, D.S. (2005) Trends in bariatric surgical procedures. *Jama,* **294,** 1909-17.
36. Adams, T.D., Gress, R.E., Smith, S.C., Halverson, R.C., Simper, S.C., Rosamond, W.D., Lamonte, M.J., Stroup, A.M. and Hunt, S.C. (2007) Long-term mortality after gastric bypass surgery. *N Engl J Med,* **357,** 753-61.
37. Livingston, E.H. (2002) Obesity and its surgical management. *Am J Surg,* **184,** 103-13.
38. Fisher, B.L. and Schauer, P. (2002) Medical and surgical options in the treatment of severe obesity. *Am J Surg,* **184,** 9S-16S.
39. Korenkov, M. and Sauerland, S. (2007) Clinical update: bariatric surgery. *Lancet,* **370,** 1988-90.
40. O'Brien, P.E., Dixon, J.B., Laurie, C., Skinner, S., Proietto, J., McNeil, J., Strauss, B., Marks, S., Schachter, L., Chapman, L. *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.
41. Inge, T.H., Xanthakos, S.A. and Zeller, M.H. (2007) Bariatric surgery for pediatric extreme obesity: now or later? *Int J Obes (Lond),* **31,** 1-14.

42. Dan, D., Harnanan, D., Seetahal, S., Naraynsingh, V. and Teelucksingh, S. (2010) Bariatric surgery in the management of childhood obesity: should there be an age limit? *Obes Surg,* **20,** 114-7.
43. Bourquelot, P., Tawakol, J.B., Gaudric, J., Natario, A., Franco, G., Turmel-Rodrigues, L., Van Laere, O. and Raynaud, A. (2009) Lipectomy as a new approach to secondary procedure superficialization of direct autogenous forearm radial-cephalic arteriovenous accesses for hemodialysis. *J Vasc Surg,* **50,** 369-74, 374 e1.
44. Krebs, N.F. and Jacobson, M.S. (2003) Prevention of pediatric overweight and obesity. *Pediatrics,* **112,** 424-30.
45. Moya, M. (2008) An update in prevention and treatment of pediatric obesity. *World J Pediatr,* **4,** 173-85.
46. Romon, M., Lommez, A., Tafflet, M., Basdevant, A., Oppert, J.M., Bresson, J.L., Ducimetiere, P., Charles, M.A. and Borys, J.M. (2009) Downward trends in the prevalence of childhood overweight in the setting of 12-year school- and community-based programmes. *Public Health Nutr,* **12,** 1735-42.
47. Birch, L.L. and Ventura, A.K. (2009) Preventing childhood obesity: what works? *Int J Obes (Lond),* **33 Suppl 1,** S74-81.
48. McAllister, E.J., Dhurandhar, N.V., Keith, S.W., Aronne, L.J., Barger, J., Baskin, M., Benca, R.M., Biggio, J., Boggiano, M.M., Eisenmann, J.C. *et al.* (2009) Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit Rev Food Sci Nutr,* **49,** 868-913.
49. Minet-Ringuet, J., Even, P.C., Valet, P., Carpene, C., Visentin, V., Prevot, D., Daviaud, D., Quignard-Boulange, A., Tome, D. and de Beaurepaire, R. (2007) Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol Psychiatry,* **12,** 562-71.
50. Vestri, H.S., Maianu, L., Moellering, D.R. and Garvey, W.T. (2007) Atypical antipsychotic drugs directly impair insulin action in adipocytes: effects on glucose transport, lipogenesis, and antilipolysis. *Neuropsychopharmacology,* **32,** 765-72.
51. Yang, L.H., Chen, T.M., Yu, S.T. and Chen, Y.H. (2007) Olanzapine induces SREBP-1-related adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Pharmacol Res,* **56,** 202-8.
52. Allison, D.B., Mentore, J.L., Heo, M., Chandler, L.P., Cappelleri, J.C., Infante, M.C. and Weiden, P.J. (1999) Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am J Psychiatry,* **156,** 1686-96.
53. Stahlhut, R.W., van Wijngaarden, E., Dye, T.D., Cook, S. and Swan, S.H. (2007) Concentrations of urinary phthalate metabolites are associated with increased waist circumference and insulin resistance in adult U.S. males. *Environ Health Perspect,* **115,** 876-82.
54. Pasarica, M. and Dhurandhar, N.V. (2007) Infectobesity: obesity of infectious origin. *Adv Food Nutr Res,* **52,** 61-102.
55. Bistrian, B.R. and Khaodhiar, L. (2000) Chronic systemic inflammation in overweight and obese adults. *Jama,* **283,** 2235; author reply 2236.
56. Pickup, J.C., Mattock, M.B., Chusney, G.D. and Burt, D. (1997) NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia,* **40,** 1286-92.
57. Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L.V., Koh, G.Y., Nagy, A., Semenkovich, C.F. and Gordon, J.I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **101,** 15718-23.
58. Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. and Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature,* **444,** 1027-31.
59. Balamurugan, R., George, G., Kabeerdoss, J., Hepsiba, J., Chandragunasekaran, A.M. and Ramakrishna, B.S. (2010) Quantitative differences in intestinal Faecalibacterium prausnitzii in obese Indian children. *Br J Nutr,* **103,** 335-8.

60. Kalliomaki, M., Collado, M.C., Salminen, S. and Isolauri, E. (2008) Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight. *Am J Clin Nutr,* **87,** 534-8.
61. Ley, R.E., Turnbaugh, P.J., Klein, S. and Gordon, J.I. (2006) Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature,* **444,** 1022-3.
62. Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature,* **464,** 59-65.
63. Wilkinson, P.W., Parkin, J.M., Pearlson, J., Philips, P.R. and Sykes, P. (1977) Obesity in childhood: A community study in Newcastle upon Tyne. *Lancet,* **1,** 350-2.
64. Blair, N.J., Thompson, J.M., Black, P.N., Becroft, D.M., Clark, P.M., Han, D.Y., Robinson, E., Waldie, K.E., Wild, C.J. and Mitchell, E.A. (2007) Risk factors for obesity in 7-year-old European children: the Auckland Birthweight Collaborative Study. *Arch Dis Child,* **92,** 866-71.
65. Symonds, M.E., Pearce, S., Bispham, J., Gardner, D.S. and Stephenson, T. (2004) Timing of nutrient restriction and programming of fetal adipose tissue development. *Proc Nutr Soc,* **63,** 397-403.
66. Rechtschaffen, A., Bergmann, B.M., Everson, C.A., Kushida, C.A. and Gilliland, M.A. (2002) Sleep deprivation in the rat: X. Integration and discussion of the findings. 1989. *Sleep,* **25,** 68-87.
67. van der Lely, A.J., Tschop, M., Heiman, M.L. and Ghigo, E. (2004) Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin. *Endocr Rev,* **25,** 426-57.
68. Spiegel, K., Leproult, R., L'Hermite-Baleriaux, M., Copinschi, G., Penev, P.D. and Van Cauter, E. (2004) Leptin levels are dependent on sleep duration: relationships with sympathovagal balance, carbohydrate regulation, cortisol, and thyrotropin. *J Clin Endocrinol Metab,* **89,** 5762-71.
69. Taheri, S., Lin, L., Austin, D., Young, T. and Mignot, E. (2004) Short sleep duration is associated with reduced leptin, elevated ghrelin, and increased body mass index. *PLoS Med,* **1,** e62.
70. Garrow, J. (1978) Energy Balance and Obesity in Man. *Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.*
71. Stroebele, N. and De Castro, J.M. (2004) Effect of ambience on food intake and food choice. *Nutrition,* **20,** 821-38.
72. Neel, J.V. (1962) Diabetes mellitus: a "thrifty" genotype rendered detrimental by "progress"? *Am J Hum Genet,* **14,** 353-62.
73. Speakman, J.R. (2007) A nonadaptive scenario explaining the genetic predisposition to obesity: the "predation release" hypothesis. *Cell Metab,* **6,** 5-12.
74. Jimenez-Chillaron, J.C., Isganaitis, E., Charalambous, M., Gesta, S., Pentinat-Pelegrin, T., Faucette, R.R., Otis, J.P., Chow, A., Diaz, R., Ferguson-Smith, A. *et al.* (2009) Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes,* **58,** 460-8.
75. Fraga, M.F., Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suner, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J. *et al.* (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **102,** 10604-9.
76. Poulsen, P., Esteller, M., Vaag, A. and Fraga, M.F. (2007) The epigenetic basis of twin discordance in age-related diseases. *Pediatr Res,* **61,** 38R-42R.
77. Plagemann, A., Harder, T., Brunn, M., Harder, A., Roepke, K., Wittrock-Staar, M., Ziska, T., Schellong, K., Rodekamp, E., Melchior, K. *et al.* (2009) Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol,* **587,** 4963-76.

78. Milagro, F.I., Campion, J., Garcia-Diaz, D.F., Goyenechea, E., Paternain, L. and Martinez, J.A. (2009) High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem,* **65,** 1-9.
79. Gluckman, P.D., Lillycrop, K.A., Vickers, M.H., Pleasants, A.B., Phillips, E.S., Beedle, A.S., Burdge, G.C. and Hanson, M.A. (2007) Metabolic plasticity during mammalian development is directionally dependent on early nutritional status. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **104,** 12796-800.
80. Friso, S. and Choi, S.W. (2002) Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr,* **132,** 2382S-2387S.
81. Friso, S. and Choi, S.W. (2005) Gene-nutrient interactions in one-carbon metabolism. *Curr Drug Metab,* **6,** 37-46.
82. Sullivan, E.L. and Grove, K.L. (2010) Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr,* **63,** 186-94.
83. Bouchard, L., Rabasa-Lhoret, R., Faraj, M., Lavoie, M.E., Mill, J., Perusse, L. and Vohl, M.C. (2010) Differential epigenomic and transcriptomic responses in subcutaneous adipose tissue between low and high responders to caloric restriction. *Am J Clin Nutr,* **91,** 309-20.
84. Visscher, P.M., Hill, W.G. and Wray, N.R. (2008) Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet,* **9,** 255-66.
85. Barsh, G.S., Farooqi, I.S. and O'Rahilly, S. (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature,* **404,** 644-51.
86. Wardle, J., Carnell, S., Haworth, C.M. and Plomin, R. (2008) Evidence for a strong genetic influence on childhood adiposity despite the force of the obesogenic environment. *Am J Clin Nutr,* **87,** 398-404.
87. Farooqi, I.S. and O'Rahilly, S. (2008) Mutations in ligands and receptors of the leptin-melanocortin pathway that lead to obesity. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab,* **4,** 569-77.
88. 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,** 1085-95.
89. Farooqi, I.S., Volders, K., Stanhope, R., Heuschkel, R., White, A., Lank, E., Keogh, J., O'Rahilly, S. and Creemers, J.W. (2007) Hyperphagia and early-onset obesity due to a novel homozygous missense mutation in prohormone convertase 1/3. *J Clin Endocrinol Metab,* **92,** 3369-73.
90. Farooqi, I.S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J.M., Lank, E., Bottomley, B., Lopez-Fernandez, J., Ferraz-Amaro, I. *et al.* (2007) Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med,* **356,** 237-47.
91. Gray, J., Yeo, G., Hung, C., Keogh, J., Clayton, P., Banerjee, K., McAulay, A., O'Rahilly, S. and Farooqi, I.S. (2007) Functional characterization of human NTRK2 mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *Int J Obes (Lond),* **31,** 359-64.
92. Gray, J., Yeo, G.S., Cox, J.J., Morton, J., Adlam, A.L., Keogh, J.M., Yanovski, J.A., El Gharbawy, A., Han, J.C., Tung, Y.C. *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.
93. Holder, J.L., Jr., Butte, N.F. and Zinn, A.R. (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet,* **9,** 101-8.
94. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Farooqi, I.S., Raffin-Sanson, M.L., Varro, A., Dockray, G.J., Holst, J.J., Brubaker, P.L., Corvol, P., Polonsky, K.S. *et al.* (2003) Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest,* **112,** 1550-60.
95. Jackson, R.S., Creemers, J.W., Ohagi, S., Raffin-Sanson, M.L., Sanders, L., Montague, C.T., Hutton, J.C. and O'Rahilly, S. (1997) Obesity and impaired prohormone

processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet,* **16,** 303-6.
96. Krude, H., Biebermann, H., Luck, W., Horn, R., Brabant, G. and Gruters, A. (1998) Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet,* **19,** 155-7.
97. Montague, C.T., Farooqi, I.S., Whitehead, J.P., Soos, M.A., Rau, H., Wareham, N.J., Sewter, C.P., Digby, J.E., Mohammed, S.N., Hurst, J.A. *et al.* (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature,* **387,** 903-8.
98. Strobel, A., Issad, T., Camoin, L., Ozata, M. and Strosberg, A.D. (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet,* **18,** 213-5.
99. Vaisse, C., Clement, K., Guy-Grand, B. and Froguel, P. (1998) A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. *Nat Genet,* **20,** 113-4.
100. Yeo, G.S., Connie Hung, C.C., Rochford, J., Keogh, J., Gray, J., Sivaramakrishnan, S., O'Rahilly, S. and Farooqi, I.S. (2004) A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci,* **7,** 1187-9.
101. Yeo, G.S., Farooqi, I.S., Aminian, S., Halsall, D.J., Stanhope, R.G. and O'Rahilly, S. (1998) A frameshift mutation in MC4R associated with dominantly inherited human obesity. *Nat Genet,* **20,** 111-2.
102. Yeo, G.S., Lank, E.J., Farooqi, I.S., Keogh, J., Challis, B.G. and O'Rahilly, S. (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.
103. Farooqi, I.S., Matarese, G., Lord, G.M., Keogh, J.M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S.A., Perna, F., Fontana, S. *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.
104. Ozata, M., Uckaya, G., Beyhan, Z. and Ozdemir, I.C. (1999) Plasma leptin levels in male patients with idiopathic central diabetes insipidus. *J Endocrinol Invest,* **22,** 451-4.
105. Han, J.C., Liu, Q.R., Jones, M., Levinn, R.L., Menzie, C.M., Jefferson-George, K.S., Adler-Wailes, D.C., Sanford, E.L., Lacbawan, F.L., Uhl, G.R. *et al.* (2008) Brain-derived neurotrophic factor and obesity in the WAGR syndrome. *N Engl J Med,* **359,** 918-27.
106. Farooqi, I.S., Jebb, S.A., Langmack, G., Lawrence, E., Cheetham, C.H., Prentice, A.M., Hughes, I.A., McCamish, M.A. and O'Rahilly, S. (1999) Effects of recombinant leptin therapy in a child with congenital leptin deficiency. *N Engl J Med,* **341,** 879-84.
107. Christodoulides, C., Scarda, A., Granzotto, M., Milan, G., Dalla Nora, E., Keogh, J., De Pergola, G., Stirling, H., Pannacciulli, N., Sethi, J.K. *et al.* (2006) WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia,* **49,** 678-84.
108. Delrue, M.A. and Michaud, J.L. (2004) Fat chance: genetic syndromes with obesity. *Clin Genet,* **66,** 83-93.
109. Sahoo, T., del Gaudio, D., German, J.R., Shinawi, M., Peters, S.U., Person, R.E., Garnica, A., Cheung, S.W. and Beaudet, A.L. (2008) Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet,* **40,** 719-21.
110. de Smith, A.J., Purmann, C., Walters, R.G., Ellis, R.J., Holder, S.E., Van Haelst, M.M., Brady, A.F., Fairbrother, U.L., Dattani, M., Keogh, J.M. *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,* **18,** 3257-65.
111. Duker, A.L., Ballif, B.C., Bawle, E.V., Person, R.E., Mahadevan, S., Alliman, S., Thompson, R., Traylor, R., Bejjani, B.A., Shaffer, L.G. *et al.* (2010) Paternally inherited microdeletion at 15q11.2 confirms a significant role for the SNORD116 C/D box snoRNA cluster in Prader-Willi syndrome. *Eur J Hum Genet*.

112. Kishore, S. and Stamm, S. (2006) The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C. *Science,* **311,** 230-2.
113. Muller, J., Stoetzel, C., Vincent, M.C., Leitch, C.C., Laurier, V., Danse, J.M., Helle, S., Marion, V., Bennouna-Greene, V., Vicaire, S. *et al.* (2010) Identification of 28 novel mutations in the Bardet-Biedl syndrome genes: the burden of private mutations in an extensively heterogeneous disease. *Hum Genet,* **127,** 583-93.
114. Mykytyn, K. and Sheffield, V.C. (2004) Establishing a connection between cilia and Bardet-Biedl Syndrome. *Trends Mol Med,* **10,** 106-9.
115. Davenport, J.R., Watts, A.J., Roper, V.C., Croyle, M.J., van Groen, T., Wyss, J.M., Nagy, T.R., Kesterson, R.A. and Yoder, B.K. (2007) Disruption of intraflagellar transport in adult mice leads to obesity and slow-onset cystic kidney disease. *Curr Biol,* **17,** 1586-94.
116. Seo, S., Guo, D.F., Bugge, K., Morgan, D.A., Rahmouni, K. and Sheffield, V.C. (2009) Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet,* **18,** 1323-31.
117. Marshall, J.D., Bronson, R.T., Collin, G.B., Nordstrom, A.D., Maffei, P., Paisey, R.B., Carey, C., Macdermott, S., Russell-Eggitt, I., Shea, S.E. *et al.* (2005) New Alstrom syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases. *Arch Intern Med,* **165,** 675-83.
118. Seifert, W., Holder-Espinasse, M., Spranger, S., Hoeltzenbein, M., Rossier, E., Dollfus, H., Lacombe, D., Verloes, A., Chrzanowska, K.H., Maegawa, G.H. *et al.* (2006) Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet,* **43,** e22.
119. Spiegel, A.M. (1990) Albright's hereditary osteodystrophy and defective G proteins. *N Engl J Med,* **322,** 1461-2.
120. Weinstein, L.S., Gejman, P.V., Friedman, E., Kadowaki, T., Collins, R.M., Gershon, E.S. and Spiegel, A.M. (1990) Mutations of the Gs alpha-subunit gene in Albright hereditary osteodystrophy detected by denaturing gradient gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **87,** 8287-90.
121. Weinstein, L.S., Xie, T., Qasem, A., Wang, J. and Chen, M. (2010) The role of GNAS and other imprinted genes in the development of obesity. *Int J Obes (Lond),* **34,** 6-17.
122. Rankinen, T., Zuberi, A., Chagnon, Y.C., Weisnagel, S.J., Argyropoulos, G., Walts, B., Perusse, L. and Bouchard, C. (2006) The human obesity gene map: the 2005 update. *Obesity (Silver Spring),* **14,** 529-644.
123. Stone, S., Abkevich, V., Hunt, S.C., Gutin, A., Russell, D.L., Neff, C.D., Riley, R., Frech, G.C., Hensel, C.H., Jammulapati, S. *et al.* (2002) A major predisposition locus for severe obesity, at 4p15-p14. *Am J Hum Genet,* **70,** 1459-68.
124. Ohman, M., Oksanen, L., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Mustajoki, P., Rissanen, A., Salmi, J., Kontula, K. and Peltonen, L. (2000) Genome-wide scan of obesity in Finnish sibpairs reveals linkage to chromosome Xq24. *J Clin Endocrinol Metab,* **85,** 3183-90.
125. Stone, S., Abkevich, V., Russell, D.L., Riley, R., Timms, K., Tran, T., Trem, D., Frank, D., Jammulapati, S., Neff, C.D. *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.
126. Suviolahti, E., Oksanen, L.J., Ohman, M., Cantor, R.M., Ridderstrale, M., Tuomi, T., Kaprio, J., Rissanen, A., Mustajoki, P., Jousilahti, P. *et al.* (2003) The SLC6A14 gene shows evidence of association with obesity. *J Clin Invest,* **112,** 1762-72.
127. Meyre, D., Farge, M., Lecoeur, C., Proenca, C., Durand, E., Allegaert, F., Tichet, J., Marre, M., Balkau, B., Weill, J. *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.
128. Chadt, A., Leicht, K., Deshmukh, A., Jiang, L.Q., Scherneck, S., Bernhardt, U., Dreja, T., Vogel, H., Schmolz, K., Kluge, R. *et al.* (2008) Tbc1d1 mutation in lean mouse strain confers leanness and protects from diet-induced obesity. *Nat Genet,* **40,** 1354-9.

129. Sloan, J.L. and 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.
130. Durand, E., Boutin, P., Meyre, D., Charles, M.A., Clement, K., Dina, C. and Froguel, P. (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.
131. Benzinou, M., Chevre, J.C., Ward, K.J., Lecoeur, C., Dina, C., Lobbens, S., Durand, E., Delplanque, J., Horber, F.F., Heude, B. *et al.* (2008) Endocannabinoid receptor 1 gene variations increase risk for obesity and modulate body mass index in European populations. *Hum Mol Genet,* **17,** 1916-21.
132. Meyre, D., Bouatia-Naji, N., Tounian, A., Samson, C., Lecoeur, C., Vatin, V., Ghoussaini, 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,** 863-7.
133. Gazzerro, P., Caruso, M.G., Notarnicola, M., Misciagna, G., Guerra, V., Laezza, C. and Bifulco, M. (2007) Association between cannabinoid type-1 receptor polymorphism and body mass index in a southern Italian population. *Int J Obes (Lond),* **31,** 908-12.
134. Jaeger, J.P., Mattevi, V.S., Callegari-Jacques, S.M. and Hutz, M.H. (2008) Cannabinoid type-1 receptor gene polymorphisms are associated with central obesity in a Southern Brazilian population. *Dis Markers,* **25,** 67-74.
135. Peeters, A., Beckers, S., Mertens, I., Van Hul, W. and Van Gaal, L. (2007) The G1422A variant of the cannabinoid receptor gene (CNR1) is associated with abdominal adiposity in obese men. *Endocrine,* **31,** 138-41.
136. Russo, P., Strazzullo, P., Cappuccio, F.P., Tregouet, D.A., Lauria, F., Loguercio, M., Barba, G., Versiero, M. and Siani, A. (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.
137. Bottcher, 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,** 4948-52.
138. El Achhab, Y., Meyre, D., Bouatia-Naji, N., Berraho, M., Deweirder, M., Vatin, V., Delplanque, J., Serhier, Z., Lyoussi, B., Nejjari, C. *et al.* (2009) Association of the ENPP1 K121Q polymorphism with type 2 diabetes and obesity in the Moroccan population. *Diabetes Metab,* **35,** 37-42.
139. Grarup, N., Urhammer, S.A., Ek, J., Albrechtsen, A., Glumer, C., Borch-Johnsen, K., Jorgensen, T., Hansen, T. and Pedersen, O. (2006) Studies of the relationship between the ENPP1 K121Q polymorphism and type 2 diabetes, insulin resistance and obesity in 7,333 Danish white subjects. *Diabetologia,* **49,** 2097-104.
140. Jenkinson, C.P., Coletta, D.K., Flechtner-Mors, M., Hu, S.L., Fourcaudot, M.J., Rodriguez, L.M., Schneider, J., Arya, R., Stern, M.P., Blangero, J. *et al.* (2008) Association of genetic variation in ENPP1 with obesity-related phenotypes. *Obesity (Silver Spring),* **16,** 1708-13.
141. Peeters, A., Beckers, S., Verrijken, A., Mertens, I., Van Gaal, L. and Van Hul, W. (2009) Possible role for ENPP1 polymorphism in obesity but not for INSIG2 and PLIN variants. *Endocrine,* **36,** 103-9.
142. Valli-Jaakola, K., Suviolahti, E., Schalin-Jantti, C., Ripatti, S., Silander, K., Oksanen, L., Salomaa, V., Peltonen, L. and Kontula, K. (2008) Further evidence for the role of ENPP1 in obesity: association with morbid obesity in Finns. *Obesity (Silver Spring),* **16,** 2113-9.
143. Stutzmann, F., Vatin, V., Cauchi, S., Morandi, A., Jouret, B., Landt, O., Tounian, P., Levy-Marchal, C., Buzzetti, R., Pinelli, L. *et al.* (2007) Non-synonymous polymorphisms in

melanocortin-4 receptor protect against obesity: the two facets of a Janus obesity gene. *Hum Mol Genet,* **16,** 1837-44.
144. Traurig, M., Mack, J., Hanson, R.L., Ghoussaini, M., Meyre, D., Knowler, W.C., Kobes, S., Froguel, P., Bogardus, C. and Baier, L.J. (2009) Common variation in SIM1 is reproducibly associated with BMI in Pima Indians. *Diabetes,* **58,** 1682-9.
145. Hinney, A., Nguyen, T.T., Scherag, A., Friedel, S., Bronner, G., Muller, T.D., Grallert, H., Illig, T., Wichmann, H.E., Rief, W. *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.
146. Meyre, D., Delplanque, J., Chevre, J.C., Lecoeur, C., Lobbens, S., Gallina, S., Durand, E., Vatin, V., Degraeve, F., Proenca, C. *et al.* (2009) Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. *Nat Genet,* **41,** 157-9.
147. Scherag, A., Dina, C., Hinney, A., Vatin, V., Scherag, S., Vogel, C.I., Muller, T.D., Grallert, H., Wichmann, H.E., Balkau, B. *et al.* (2010) Two new Loci for body-weight regulation identified in a joint analysis of genome-wide association studies for early-onset extreme obesity in French and german study groups. *PLoS Genet,* **6,** e1000916.
148. Thorleifsson, G., Walters, G.B., Gudbjartsson, D.F., Steinthorsdottir, V., Sulem, P., Helgadottir, A., Styrkarsdottir, U., Gretarsdottir, S., Thorlacius, S., Jonsdottir, I. *et al.* (2009) Genome-wide association yields new sequence variants at seven loci that associate with measures of obesity. *Nat Genet,* **41,** 18-24.
149. Willer, C.J. and Speliotes, E.K. and Loos, R.J. and Li, S. and Lindgren, C.M. and Heid, I.M. and Berndt, S.I. and Elliott, A.L. and Jackson, A.U. and Lamina, C. *et al.* (2009) Six new loci associated with body mass index highlight a neuronal influence on body weight regulation. *Nat Genet,* **41,** 25-34.
150. Conrad, D.F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., Aerts, J., Andrews, T.D., Barnes, C., Campbell, P. *et al.* (2010) Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature,* **464,** 704-12.
151. Zhao, J., Bradfield, J.P., Li, M., Wang, K., Zhang, H., Kim, C.E., Annaiah, K., Glessner, J.T., Thomas, K., Garris, M. *et al.* (2009) The role of obesity-associated loci identified in genome-wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity (Silver Spring),* **17,** 2254-7.
152. Bochukova, E.G., Huang, N., Keogh, J., Henning, E., Purmann, C., Blaszczyk, K., Saeed, S., Hamilton-Shield, J., Clayton-Smith, J., O'Rahilly, S. *et al.* (2010) Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature,* **463,** 666-70.
153. Walters, R.G., Jacquemont, S., Valsesia, A., de Smith, A.J., Martinet, D., Andersson, J., Falchi, M., Chen, F., Andrieux, J., Lobbens, S. *et al.* (2010) A new highly penetrant form of obesity due to deletions on chromosome 16p11.2. *Nature,* **463,** 671-5.
154. Steiner, D.F., Cunningham, D., Spigelman, L. and Aten, B. (1967) Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science,* **157,** 697-700.
155. Chretien, M. and Li, C.H. (1967) Isolation, purification, and characterization of gamma-lipotropic hormone from sheep pituitary glands. *Can J Biochem,* **45,** 1163-74.
156. Seidah, N.G. and Prat, A. (2002) Precursor convertases in the secretory pathway, cytosol and extracellular milieu. *Essays Biochem,* **38,** 79-94.
157. Creemers, J.W. and Khatib, A.M. (2008) Knock-out mouse models of proprotein convertases: unique functions or redundancy? *Front Biosci,* **13,** 4960-71.
158. Thomas, G. (2002) Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol,* **3,** 753-66.
159. Benjannet, S., Rhainds, D., Essalmani, R., Mayne, J., Wickham, L., Jin, W., Asselin, M.C., Hamelin, J., Varret, M., Allard, D. *et al.* (2004) NARC-1/PCSK9 and its natural mutants: zymogen cleavage and effects on the low density lipoprotein (LDL) receptor and LDL cholesterol. *J Biol Chem,* **279,** 48865-75.

160. Zhou, A., Martin, S., Lipkind, G., LaMendola, J. and Steiner, D.F. (1998) Regulatory roles of the P domain of the subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem,* **273,** 11107-14.
161. Creemers, J.W., Vey, M., Schafer, W., Ayoubi, T.A., Roebroek, A.J., Klenk, H.D., Garten, W. and Van de Ven, W.J. (1995) Endoproteolytic cleavage of its propeptide is a prerequisite for efficient transport of furin out of the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem,* **270,** 2695-702.
162. Zhou, A., Paquet, L. and Mains, R.E. (1995) Structural elements that direct specific processing of different mammalian subtilisin-like prohormone convertases. *J Biol Chem,* **270,** 21509-16.
163. Rabah, N., Gauthier, D., Dikeakos, J.D., Reudelhuber, T.L. and Lazure, C. (2007) The C-terminal region of the proprotein convertase 1/3 (PC1/3) exerts a bimodal regulation of the enzyme activity in vitro. *Febs J,* **274,** 3482-91.
164. Taylor, N.A., Van De Ven, W.J. and Creemers, J.W. (2003) Curbing activation: proprotein convertases in homeostasis and pathology. *Faseb J,* **17,** 1215-27.
165. Bergeron, F., Leduc, R. and Day, R. (2000) Subtilase-like pro-protein convertases: from molecular specificity to therapeutic applications. *J Mol Endocrinol,* **24,** 1-22.
166. Zhu, X., Cao, Y., Voogd, K. and Steiner, D.F. (2006) On the processing of proghrelin to ghrelin. *J Biol Chem,* **281,** 38867-70.
167. Ugleholdt, R., Zhu, X., Deacon, C.F., Orskov, C., Steiner, D.F. and Holst, J.J. (2004) Impaired intestinal proglucagon processing in mice lacking prohormone convertase 1. *Endocrinology,* **145,** 1349-55.
168. Creemers, J.W., Pritchard, L.E., Gyte, A., Le Rouzic, P., Meulemans, S., Wardlaw, S.L., Zhu, X., Steiner, D.F., Davies, N., Armstrong, D. *et al.* (2006) Agouti-related protein is posttranslationally cleaved by proprotein convertase 1 to generate agouti-related protein (AGRP)83-132: interaction between AGRP83-132 and melanocortin receptors cannot be influenced by syndecan-3. *Endocrinology,* **147,** 1621-31.
169. Yoon, J. and Beinfeld, M.C. (1997) Prohormone convertase 1 is necessary for the formation of cholecystokinin 8 in Rin5F and STC-1 cells. *J Biol Chem,* **272,** 9450-6.
170. Zhu, X., Orci, L., Carroll, R., Norrbom, C., Ravazzola, M. and Steiner, D.F. (2002) Severe block in processing of proinsulin to insulin accompanied by elevation of des-64,65 proinsulin intermediates in islets of mice lacking prohormone convertase 1/3. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **99,** 10299-304.
171. Ugleholdt, R., Poulsen, M.L., Holst, P.J., Irminger, J.C., Orskov, C., Pedersen, J., Rosenkilde, M.M., Zhu, X., Steiner, D.F. and Holst, J.J. (2006) Prohormone convertase 1/3 is essential for processing of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide precursor. *J Biol Chem,* **281,** 11050-7.
172. Dey, A., Xhu, X., Carroll, R., Turck, C.W., Stein, J. and Steiner, D.F. (2003) Biological processing of the cocaine and amphetamine-regulated transcript precursors by prohormone convertases, PC2 and PC1/3. *J Biol Chem,* **278,** 15007-14.
173. Rehfeld, J.F., Zhu, X., Norrbom, C., Bundgaard, J.R., Johnsen, A.H., Nielsen, J.E., Vikesaa, J., Stein, J., Dey, A., Steiner, D.F. *et al.* (2008) Prohormone convertases 1/3 and 2 together orchestrate the site-specific cleavages of progastrin to release gastrin-34 and gastrin-17. *Biochem J,* **415,** 35-43.
174. Hook, V., Funkelstein, L., Toneff, T., Mosier, C. and Hwang, S.R. (2009) Human pituitary contains dual cathepsin L and prohormone convertase processing pathway components involved in converting POMC into the peptide hormones ACTH, alpha-MSH, and beta-endorphin. *Endocrine,* **35,** 429-37.
175. Wardman, J.H., Zhang, X., Gagnon, S., Castro, L.M., Zhu, X., Steiner, D.F., Day, R. and Fricker, L.D. (2010) Analysis of peptides in prohormone convertase 1/3 null mouse brain using quantitative peptidomics. *J Neurochem,* **114,** 215-25.

176. Apletalina, E., Appel, J., Lamango, N.S., Houghten, R.A. and Lindberg, I. (1998) Identification of inhibitors of prohormone convertases 1 and 2 using a peptide combinatorial library. *J Biol Chem,* **273,** 26589-95.
177. Fricker, L.D., McKinzie, A.A., Sun, J., Curran, E., Qian, Y., Yan, L., Patterson, S.D., Courchesne, P.L., Richards, B., Levin, N. *et al.* (2000) Identification and characterization of proSAAS, a granin-like neuroendocrine peptide precursor that inhibits prohormone processing. *J Neurosci,* **20,** 639-48.
178. Morgan, D.J., Wei, S., Gomes, I., Czyzyk, T., Mzhavia, N., Pan, H., Devi, L.A., Fricker, L.D. and Pintar, J.E. (2010) The propeptide precursor proSAAS is involved in fetal neuropeptide processing and body weight regulation. *J Neurochem,* **113,** 1275-84.
179. Fox, D.L. and Good, D.J. (2008) Nescient helix-loop-helix 2 interacts with signal transducer and activator of transcription 3 to regulate transcription of prohormone convertase 1/3. *Mol Endocrinol,* **22,** 1438-48.
180. Wen, J.H., Chen, Y.Y., Song, S.J., Ding, J., Gao, Y., Hu, Q.K., Feng, R.P., Liu, Y.Z., Ren, G.C., Zhang, C.Y. *et al.* (2009) Paired box 6 (PAX6) regulates glucose metabolism via proinsulin processing mediated by prohormone convertase 1/3 (PC1/3). *Diabetologia,* **52,** 504-13.
181. Berman, Y., Mzhavia, N., Polonskaia, A. and Devi, L.A. (2001) Impaired prohormone convertases in Cpe(fat)/Cpe(fat) mice. *J Biol Chem,* **276,** 1466-73.
182. Chretien, M., Seidah, N.G., Basak, A. and Mbikay, M. (2008) Proprotein convertases as therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets,* **12,** 1289-300.
183. Essalmani, R., Hamelin, J., Marcinkiewicz, J., Chamberland, A., Mbikay, M., Chretien, M., Seidah, N.G. and Prat, A. (2006) Deletion of the gene encoding proprotein convertase 5/6 causes early embryonic lethality in the mouse. *Mol Cell Biol,* **26,** 354-61.
184. Seidah, N.G., Chretien, M. and Day, R. (1994) The family of subtilisin/kexin like pro-protein and pro-hormone convertases: divergent or shared functions. *Biochimie,* **76,** 197-209.
185. Seidah, N.G., Mowla, S.J., Hamelin, J., Mamarbachi, A.M., Benjannet, S., Toure, B.B., Basak, A., Munzer, J.S., Marcinkiewicz, J., Zhong, M. *et al.* (1999) Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **96,** 1321-6.
186. Freyer, C., Kilpatrick, L.M., Salamonsen, L.A. and Nie, G. (2007) Pro-protein convertases (PCs) other than PC6 are not tightly regulated for implantation in the human endometrium. *Reproduction,* **133,** 1189-97.
187. Gagnon, J., Mayne, J., Mbikay, M., Woulfe, J. and Chretien, M. (2009) Expression of PCSK1 (PC1/3), PCSK2 (PC2) and PCSK3 (furin) in mouse small intestine. *Regul Pept,* **152,** 54-60.
188. Szumska, D., Pieles, G., Essalmani, R., Bilski, M., Mesnard, D., Kaur, K., Franklyn, A., El Omari, K., Jefferis, J., Bentham, J. *et al.* (2008) VACTERL/caudal regression/Currarino syndrome-like malformations in mice with mutation in the proprotein convertase Pcsk5. *Genes Dev,* **22,** 1465-77.
189. Sarac, M.S., Cameron, A. and Lindberg, I. (2002) The furin inhibitor hexa-D-arginine blocks the activation of Pseudomonas aeruginosa exotoxin A in vivo. *Infect Immun,* **70,** 7136-9.
190. Kibler, K.V., Miyazato, A., Yedavalli, V.S., Dayton, A.I., Jacobs, B.L., Dapolito, G., Kim, S.J. and Jeang, K.T. (2004) Polyarginine inhibits gp160 processing by furin and suppresses productive human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Biol Chem,* **279,** 49055-63.
191. Bolt, G. and Pedersen, I.R. (1998) The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology,* **252,** 387-98.
192. Konig, P., Giesow, K., Schuldt, K., Buchholz, U.J. and Keil, G.M. (2004) A novel protein expression strategy using recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV):

modifications of the peptide sequence between the two furin cleavage sites of the BRSV fusion protein yield secreted proteins, but affect processing and function of the BRSV fusion protein. *J Gen Virol,* **85,** 1815-24.
193. Neumann, G., Feldmann, H., Watanabe, S., Lukashevich, I. and Kawaoka, Y. (2002) Reverse genetics demonstrates that proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not essential for replication in cell culture. *J Virol,* **76,** 406-10.
194. Volchkov, V.E., Feldmann, H., Volchkova, V.A. and Klenk, H.D. (1998) Processing of the Ebola virus glycoprotein by the proprotein convertase furin. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **95,** 5762-7.
195. Bassi, D.E., Lopez De Cicco, R., Cenna, J., Litwin, S., Cukierman, E. and Klein-Szanto, A.J. (2005) PACE4 expression in mouse basal keratinocytes results in basement membrane disruption and acceleration of tumor progression. *Cancer Res,* **65,** 7310-9.
196. Khatib, A.M., Siegfried, G., Chretien, M., Metrakos, P. and Seidah, N.G. (2002) Proprotein convertases in tumor progression and malignancy: novel targets in cancer therapy. *Am J Pathol,* **160,** 1921-35.
197. Siegfried, G., Basak, A., Cromlish, J.A., Benjannet, S., Marcinkiewicz, J., Chretien, M., Seidah, N.G. and Khatib, A.M. (2003) The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest,* **111,** 1723-32.
198. Bassi, D.E., Mahloogi, H. and Klein-Szanto, A.J. (2000) The proprotein convertases furin and PACE4 play a significant role in tumor progression. *Mol Carcinog,* **28,** 63-9.
199. Cheng, M., Watson, P.H., Paterson, J.A., Seidah, N., Chretien, M. and Shiu, R.P. (1997) Pro-protein convertase gene expression in human breast cancer. *Int J Cancer,* **71,** 966-71.
200. Hubbard, F.C., Goodrow, T.L., Liu, S.C., Brilliant, M.H., Basset, P., Mains, R.E. and Klein-Szanto, A.J. (1997) Expression of PACE4 in chemically induced carcinomas is associated with spindle cell tumor conversion and increased invasive ability. *Cancer Res,* **57,** 5226-31.
201. De Vos, L., Declercq, J., Rosas, G.G., Van Damme, B., Roebroek, A., Vermorken, F., Ceuppens, J., van de Ven, W. and Creemers, J. (2008) MMTV-cre-mediated fur inactivation concomitant with PLAG1 proto-oncogene activation delays salivary gland tumorigenesis in mice. *Int J Oncol,* **32,** 1073-83.
202. Sun, X., Essalmani, R., Seidah, N.G. and Prat, A. (2009) The proprotein convertase PC5/6 is protective against intestinal tumorigenesis: in vivo mouse model. *Mol Cancer,* **8,** 73.
203. Creemers, J.W., Roebroek, A.J. and Van de Ven, W.J. (1992) Expression in human lung tumor cells of the proprotein processing enzyme PC1/PC3. Cloning and primary sequence of a 5 kb cDNA. *FEBS Lett,* **300,** 82-8.
204. Schalken, J.A., Roebroek, A.J., Oomen, P.P., Wagenaar, S.S., Debruyne, F.M., Bloemers, H.P. and Van de Ven, W.J. (1987) fur gene expression as a discriminating marker for small cell and nonsmall cell lung carcinomas. *J Clin Invest,* **80,** 1545-9.
205. Moss, A.C., Jacobson, G.M., Walker, L.E., Blake, N.W., Marshall, E. and Coulson, J.M. (2009) SCG3 transcript in peripheral blood is a prognostic biomarker for REST-deficient small cell lung cancer. *Clin Cancer Res,* **15,** 274-83.
206. Stockwin, L.H., Vistica, D.T., Kenney, S., Schrump, D.S., Butcher, D.O., Raffeld, M. and Shoemaker, R.H. (2009) Gene expression profiling of alveolar soft-part sarcoma (ASPS). *BMC Cancer,* **9,** 22.
207. Blanchard, A., Iwasiow, B., Yarmill, A., Fresnosa, A., Silha, J., Myal, Y., Murphy, L.C., Chretien, M., Seidah, N. and Shiu, R.P. (2009) Targeted production of proprotein convertase PC1 enhances mammary development and tumorigenesis in transgenic mice. *Can J Physiol Pharmacol,* **87,** 831-8.
208. Ohta, S., Nishizawa, S., Oki, Y., Yokoyama, T. and Namba, H. (2002) Significance of absent prohormone convertase 1/3 in inducing clinically silent corticotroph pituitary adenoma of subtype I--immunohistochemical study. *Pituitary,* **5,** 221-3.

209. Tateno, T., Izumiyama, H., Doi, M., Akashi, T., Ohno, K. and Hirata, Y. (2007) Defective expression of prohormone convertase 1/3 in silent corticotroph adenoma. *Endocr J,* **54,** 777-82.
210. Tatsumi, K.I., Tanaka, S., Takano, T., Tahara, S., Murakami, Y., Takao, T., Hashimoto, K., Kato, Y., Teramoto, A. and Amino, N. (2003) Frequent appearance of autoantibodies against prohormone convertase 1/3 and neuroendocrine protein 7B2 in patients with nonfunctioning pituitary macroadenoma. *Endocrine,* **22,** 335-40.
211. Bennett, B.D., Denis, P., Haniu, M., Teplow, D.B., Kahn, S., Louis, J.C., Citron, M. and Vassar, R. (2000) A furin-like convertase mediates propeptide cleavage of BACE, the Alzheimer's beta -secretase. *J Biol Chem,* **275,** 37712-7.
212. Pinnix, I., Council, J.E., Roseberry, B., Onstead, L., Mallender, W., Sucic, J. and Sambamurti, K. (2001) Convertases other than furin cleave beta-secretase to its mature form. *Faseb J,* **15,** 1810-2.
213. Lopez-Perez, E., Seidah, N.G. and Checler, F. (1999) Proprotein convertase activity contributes to the processing of the Alzheimer's beta-amyloid precursor protein in human cells: evidence for a role of the prohormone convertase PC7 in the constitutive alpha-secretase pathway. *J Neurochem,* **73,** 2056-62.
214. Kim, S.H., Creemers, J.W., Chu, S., Thinakaran, G. and Sisodia, S.S. (2002) Proteolytic processing of familial British dementia-associated BRI variants: evidence for enhanced intracellular accumulation of amyloidogenic peptides. *J Biol Chem,* **277,** 1872-7.
215. Kim, S.H., Wang, R., Gordon, D.J., Bass, J., Steiner, D.F., Lynn, D.G., Thinakaran, G., Meredith, S.C. and Sisodia, S.S. (1999) Furin mediates enhanced production of fibrillogenic ABri peptides in familial British dementia. *Nat Neurosci,* **2,** 984-8.
216. Maxwell, K.N., Fisher, E.A. and Breslow, J.L. (2005) Overexpression of PCSK9 accelerates the degradation of the LDLR in a post-endoplasmic reticulum compartment. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **102,** 2069-74.
217. Abifadel, M., Varret, M., Rabes, J.P., Allard, D., Ouguerram, K., Devillers, M., Cruaud, C., Benjannet, S., Wickham, L., Erlich, D. *et al.* (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet,* **34,** 154-6.
218. Cohen, J., Pertsemlidis, A., Kotowski, I.K., Graham, R., Garcia, C.K. and Hobbs, H.H. (2005) Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet,* **37,** 161-5.
219. Kotowski, I.K., Pertsemlidis, A., Luke, A., Cooper, R.S., Vega, G.L., Cohen, J.C. and Hobbs, H.H. (2006) A spectrum of PCSK9 alleles contributes to plasma levels of low-density lipoprotein cholesterol. *Am J Hum Genet,* **78,** 410-22.
220. Leren, T.P. (2004) Mutations in the PCSK9 gene in Norwegian subjects with autosomal dominant hypercholesterolemia. *Clin Genet,* **65,** 419-22.
221. Timms, K.M., Wagner, S., Samuels, M.E., Forbey, K., Goldfine, H., Jammulapati, S., Skolnick, M.H., Hopkins, P.N., Hunt, S.C. and Shattuck, D.M. (2004) A mutation in PCSK9 causing autosomal-dominant hypercholesterolemia in a Utah pedigree. *Hum Genet,* **114,** 349-53.
222. Lakoski, S.G., Lagace, T.A., Cohen, J.C., Horton, J.D. and Hobbs, H.H. (2009) Genetic and metabolic determinants of plasma PCSK9 levels. *J Clin Endocrinol Metab,* **94,** 2537-43.
223. (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation,* **106,** 3143-421.
224. Law, M.R., Wald, N.J. and Rudnicka, A.R. (2003) Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *Bmj,* **326,** 1423.
225. Stamler, J., Daviglus, M.L., Garside, D.B., Dyer, A.R., Greenland, P. and Neaton, J.D. (2000) Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to

long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. *Jama,* **284,** 311-8.
226. Cohen, J.C., Boerwinkle, E., Mosley, T.H., Jr. and Hobbs, H.H. (2006) Sequence variations in PCSK9, low LDL, and protection against coronary heart disease. *N Engl J Med,* **354,** 1264-72.
227. Sakai, J., Rawson, R.B., Espenshade, P.J., Cheng, D., Seegmiller, A.C., Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell,* **2,** 505-14.
228. Jin, W., Fuki, I.V., Seidah, N.G., Benjannet, S., Glick, J.M. and Rader, D.J. (2005) Proprotein convertases [corrected] are responsible for proteolysis and inactivation of endothelial lipase. *J Biol Chem,* **280,** 36551-9.
229. Scamuffa, N., Calvo, F., Chretien, M., Seidah, N.G. and Khatib, A.M. (2006) Proprotein convertases: lessons from knockouts. *Faseb J,* **20,** 1954-63.
230. Roebroek, A.J., Umans, L., Pauli, I.G., Robertson, E.J., van Leuven, F., Van de Ven, W.J. and Constam, D.B. (1998) Failure of ventral closure and axial rotation in embryos lacking the proprotein convertase Furin. *Development,* **125,** 4863-76.
231. Furuta, M., Yano, H., Zhou, A., Rouille, Y., Holst, J.J., Carroll, R., Ravazzola, M., Orci, L., Furuta, H. and Steiner, D.F. (1997) Defective prohormone processing and altered pancreatic islet morphology in mice lacking active SPC2. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94,** 6646-51.
232. Zhu, X., Zhou, A., Dey, A., Norrbom, C., Carroll, R., Zhang, C., Laurent, V., Lindberg, I., Ugleholdt, R., Holst, J.J. *et al.* (2002) Disruption of PC1/3 expression in mice causes dwarfism and multiple neuroendocrine peptide processing defects. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **99,** 10293-8.
233. Mbikay, M., Tadros, H., Ishida, N., Lerner, C.P., De Lamirande, E., Chen, A., El-Alfy, M., Clermont, Y., Seidah, N.G., Chretien, M. *et al.* (1997) Impaired fertility in mice deficient for the testicular germ-cell protease PC4. *Proc Natl Acad Sci U S A,* **94,** 6842-6.
234. Constam, D.B. and Robertson, E.J. (2000) SPC4/PACE4 regulates a TGFbeta signaling network during axis formation. *Genes Dev,* **14,** 1146-55.
235. Gaylinn, B.D., Dealmeida, V.I., Lyons, C.E., Jr., Wu, K.C., Mayo, K.E. and Thorner, M.O. (1999) The mutant growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor of the little mouse does not bind GHRH. *Endocrinology,* **140,** 5066-74.
236. Lloyd, D.J., Bohan, S. and Gekakis, N. (2006) Obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency in Pc1 mutant mice. *Hum Mol Genet,* **15,** 1884-93.
237. Mbikay, M., Croissandeau, G., Sirois, F., Anini, Y., Mayne, J., Seidah, N.G. and Chretien, M. (2007) A targeted deletion/insertion in the mouse Pcsk1 locus is associated with homozygous embryo preimplantation lethality, mutant allele preferential transmission and heterozygous female susceptibility to dietary fat. *Dev Biol,* **306,** 584-98.
238. O'Rahilly, S., Gray, H., Humphreys, P.J., Krook, A., Polonsky, K.S., White, A., Gibson, S., Taylor, K. and Carr, C. (1995) Brief report: impaired processing of prohormones associated with abnormalities of glucose homeostasis and adrenal function. *N Engl J Med,* **333,** 1386-90.
239. O'Rahilly, S. and Farooqi, I.S. (2006) Genetics of obesity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* **361,** 1095-105.
240. Dina, C., Meyre, D., Gallina, S., Durand, E., Korner, A., Jacobson, P., Carlsson, L.M., Kiess, W., Vatin, V., Lecoeur, C. *et al.* (2007) Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat Genet,* **39,** 724-6.
241. 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,** 889-94.

242. Bell, C.G., Benzinou, M., Siddiq, A., Lecoeur, C., Dina, C., Lemainque, A., Clement, K., Basdevant, A., Guy-Grand, B., Mein, C.A. *et al.* (2004) Genome-wide linkage analysis for severe obesity in french caucasians finds significant susceptibility locus on chromosome 19q. *Diabetes,* **53,** 1857-65.
243. Chagnon, Y.C., Rice, T., Perusse, L., Borecki, I.B., Ho-Kim, M.A., Lacaille, M., Pare, C., Bouchard, L., Gagnon, J., Leon, A.S. *et al.* (2001) Genomic scan for genes affecting body composition before and after training in Caucasians from HERITAGE. *J Appl Physiol,* **90,** 1777-87.
244. Chen, G., Adeyemo, A.A., Johnson, T., Zhou, J., Amoah, A., Owusu, S., Acheampong, J., Agyenim-Boateng, K., Eghan, B.A., Oli, J. *et al.* (2005) A genome-wide scan for quantitative trait loci linked to obesity phenotypes among West Africans. *Int J Obes (Lond),* **29,** 255-9.
245. Hager, J., Dina, C., Francke, S., Dubois, S., Houari, M., Vatin, V., Vaillant, E., Lorentz, N., Basdevant, A., Clement, K. *et al.* (1998) A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet,* **20,** 304-8.
246. Benzinou, M., Creemers, J.W., Choquet, H., Lobbens, S., Dina, C., Durand, E., Guerardel, A., Boutin, P., Jouret, B., Heude, B. *et al.* (2008) Common nonsynonymous variants in PCSK1 confer risk of obesity. *Nat Genet,* **40,** 943-5.
247. Kilpelainen, T.O., Bingham, S.A., Khaw, K.T., Wareham, N.J. and Loos, R.J. (2009) Association of variants in the PCSK1 gene with obesity in the EPIC-Norfolk study. *Hum Mol Genet,* **18,** 3496-501.
248. Sandholt, C.H., Sparso, T., Grarup, N., Albrechtsen, A., Almind, K., Hansen, L., Toft, U., Jorgensen, T., Hansen, T. and Pedersen, O. (2010) Combined analyses of 20 common obesity susceptibility variants. *Diabetes,* **59,** 1667-73.
249. Qi, Q., Li, H., Loos, R.J., Liu, C., Hu, F.B., Wu, H., Yu, Z. and Lin, X. (2010) Association of PCSK1 rs6234 with obesity and related traits in a Chinese Han population. *PLoS One,* **5,** e10590.
250. Renstrom, F., Payne, F., Nordstrom, A., Brito, E.C., Rolandsson, O., Hallmans, G., Barroso, I., Nordstrom, P. and Franks, P.W. (2009) Replication and extension of genome-wide association study results for obesity in 4923 adults from northern Sweden. *Hum Mol Genet,* **18,** 1489-96.
251. Heni, M., Haupt, A., Schafer, S.A., Ketterer, C., Thamer, C., Machicao, F., Stefan, N., Staiger, H., Haring, H.U. and Fritsche, A. (2010) Association of obesity risk SNPs in PCSK1 with insulin sensitivity and proinsulin conversion. *BMC Med Genet,* **11,** 86.
252. Goossens, G.H., Petersen, L., Blaak, E.E., Hul, G., Arner, P., Astrup, A., Froguel, P., Patel, K., Pedersen, O., Polak, J. *et al.* (2009) Several obesity- and nutrient-related gene polymorphisms but not FTO and UCP variants modulate postabsorptive resting energy expenditure and fat-induced thermogenesis in obese individuals: the NUGENOB study. *Int J Obes (Lond),* **33,** 669-79.
253. Corpeleijn, E., Petersen, L., Holst, C., Saris, W.H., Astrup, A., Langin, D., MacDonald, I., Martinez, J.A., Oppert, J.M., Polak, J. *et al.* (2010) Obesity-related polymorphisms and their associations with the ability to regulate fat oxidation in obese Europeans: the NUGENOB study. *Obesity (Silver Spring),* **18,** 1369-77.
254. 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.
255. Farooqi, I.S., Keogh, J.M., Kamath, S., Jones, S., Gibson, W.T., Trussell, R., Jebb, S.A., Lip, G.Y. and O'Rahilly, S. (2001) Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature,* **414,** 34-5.

256. Hirschhorn, J.N. (2009) Genomewide association studies--illuminating biologic pathways. *N Engl J Med,* **360,** 1699-701.
257. Baker, M., Gaukrodger, N., Mayosi, B.M., Imrie, H., Farrall, M., Watkins, H., Connell, J.M., Avery, P.J. and Keavney, B. (2005) Association between common polymorphisms of the proopiomelanocortin gene and body fat distribution: a family study. *Diabetes,* **54,** 2492-6.
258. Sutton, B.S., Langefeld, C.D., Williams, A.H., Norris, J.M., Saad, M.F., Haffner, S.M. and Bowden, D.W. (2005) Association of proopiomelanocortin gene polymorphisms with obesity in the IRAS family study. *Obes Res,* **13,** 1491-8.
259. Cirulli, E.T. and Goldstein, D.B. (2010) Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet,* **11,** 415-25.
260. Dickson, S.P., Wang, K., Krantz, I., Hakonarson, H. and Goldstein, D.B. (2010) Rare variants create synthetic genome-wide associations. *PLoS Biol,* **8,** e1000294.
261. Stutzmann, F., Cauchi, S., Durand, E., Calvacanti-Proenca, C., Pigeyre, M., Hartikainen, A.L., Sovio, U., Tichet, J., Marre, M., Weill, J. *et al.* (2009) Common genetic variation near MC4R is associated with eating behaviour patterns in European populations. *Int J Obes (Lond),* **33,** 373-8.
262. Stutzmann, F., Tan, K., Vatin, V., Dina, C., Jouret, B., Tichet, J., Balkau, B., Potoczna, N., Horber, F., O'Rahilly, S. *et al.* (2008) Prevalence of melanocortin-4 receptor deficiency in Europeans and their age-dependent penetrance in multigenerational pedigrees. *Diabetes,* **57,** 2511-8.
263. Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W. *et al.* (2006) Global variation in copy number in the human genome. *Nature,* **444,** 444-54.
264. Coin, L.J., Asher, J.E., Walters, R.G., Moustafa, J.S., de Smith, A.J., Sladek, R., Balding, D.J., Froguel, P. and Blakemore, A.I. (2010) cnvHap: an integrative population and haplotype-based multiplatform model of SNPs and CNVs. *Nat Methods,* **7,** 541-6.
265. Ma, L., Tataranni, P.A., Bogardus, C. and Baier, L.J. (2004) Melanocortin 4 receptor gene variation is associated with severe obesity in Pima Indians. *Diabetes,* **53,** 2696-9.
266. Chang, Y.C., Chiu, Y.F., Shih, K.C., Lin, M.W., Sheu, W.H., Donlon, T., Curb, J.D., Jou, Y.S., Chang, T.J., Li, H.Y. *et al.* (2010) Common PCSK1 haplotypes are associated with obesity in the Chinese population. *Obesity (Silver Spring),* **18,** 1404-9.
267. Hennig, B.J., Fulford, A.J., Sirugo, G., Rayco-Solon, P., Hattersley, A.T., Frayling, T.M. and Prentice, A.M. (2009) FTO gene variation and measures of body mass in an African population. *BMC Med Genet,* **10,** 21.
268. Chiu, S., Kim, K., Haus, K.A., Espinal, G.M., Millon, L.V. and Warden, C.H. (2007) Identification of positional candidate genes for body weight and adiposity in subcongenic mice. *Physiol Genomics,* **31,** 75-85.
269. Anini, Y., Mayne, J., Gagnon, J., Sherbafi, J., Chen, A., Kaefer, N., Chretien, M. and Mbikay, M. (2010) Genetic deficiency for proprotein convertase subtilisin/kexin type 2 in mice is associated with decreased adiposity and protection from dietary fat-induced body weight gain. *Int J Obes (Lond).*
270. Rac, M.E., Safranow, K. and Poncyljusz, W. (2007) Molecular basis of human CD36 gene mutations. *Mol Med,* **13,** 288-96.
271. Lepretre, F., Vasseur, F., Vaxillaire, M., Scherer, P.E., Ali, S., Linton, K., Aitman, T. and Froguel, P. (2004) A CD36 nonsense mutation associated with insulin resistance and familial type 2 diabetes. *Hum Mutat,* **24,** 104.
272. Laugerette, F., Passilly-Degrace, P., Patris, B., Niot, I., Febbraio, M., Montmayeur, J.P. and Besnard, P. (2005) CD36 involvement in orosensory detection of dietary lipids, spontaneous fat preference, and digestive secretions. *J Clin Invest,* **115,** 3177-84.

273. Bokor, S., Legry, V., Meirhaeghe, A., Ruiz, J.R., Mauro, B., Widhalm, K., Manios, Y., Amouyel, P., Moreno, L.A., Molnar, D. *et al.* (2010) Single-nucleotide polymorphism of CD36 locus and obesity in European adolescents. *Obesity (Silver Spring),* **18,** 1398-403.
274. Choquet, H., Labrune, Y., De Graeve, F., Hinney, A., Hebebrand, J., Scherag, A., Lecoeur, C., Tauber, M., Balkau, B., Elliott, P. *et al.* (2010) Lack of association of CD36 SNPs with early-onset obesity: a meta-analysis in 9,973 European subjects. *Obesity (Silver Spring).*
275. Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S. and Tsujimoto, G. (2005) Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med,* **11,** 90-4.
276. Parker, H.E., Habib, A.M., Rogers, G.J., Gribble, F.M. and Reimann, F. (2009) Nutrient-dependent secretion of glucose-dependent insulinotropic polypeptide from primary murine K cells. *Diabetologia,* **52,** 289-98.
277. Gotoh, C., Hong, Y.H., Iga, T., Hishikawa, D., Suzuki, Y., Song, S.H., Choi, K.C., Adachi, T., Hirasawa, A., Tsujimoto, G. *et al.* (2007) The regulation of adipogenesis through GPR120. *Biochem Biophys Res Commun,* **354,** 591-7.
278. Pereiro, I., Valverde, D., Pineiro-Gallego, T., Baiget, M., Borrego, S., Ayuso, C., Searby, C. and Nishimura, D. (2010) New mutations in BBS genes in small consanguineous families with Bardet-Biedl syndrome: detection of candidate regions by homozygosity mapping. *Mol Vis,* **16,** 137-43.
279. De Filippo, C., Pini-Prato, A., Mattioli, G., Avanzini, S., Rapuzzi, G., Cavalieri, D., Di Paola, M., Stefanini, I., Ceccherini, I., Mavilio, D. *et al.* (2010) Genomics approach to the analysis of bacterial communities dynamics in Hirschsprung's disease-associated enterocolitis: a pilot study. *Pediatr Surg Int,* **26,** 465-71.
280. Choquet, H. and Meyre, D. (2010) Genomic insights into early-onset obesity. *Genome Med,* **2,** 36.
281. Wei, Z., Wang, K., Qu, H.Q., Zhang, H., Bradfield, J., Kim, C., Frackleton, E., Hou, C., Glessner, J.T., Chiavacci, R. *et al.* (2009) From disease association to risk assessment: an optimistic view from genome-wide association studies on type 1 diabetes. *PLoS Genet,* **5,** e1000678.
282. O'Rahilly, S. and Farooqi, I.S. (2008) Human obesity as a heritable disorder of the central control of energy balance. *Int J Obes (Lond),* **32 Suppl 7,** S55-61.
283. Sonestedt, E., Roos, C., Gullberg, B., Ericson, U., Wirfalt, E. and Orho-Melander, M. (2009) Fat and carbohydrate intake modify the association between genetic variation in the FTO genotype and obesity. *Am J Clin Nutr,* **90,** 1418-25.
284. Corella, D., Peloso, G., Arnett, D.K., Demissie, S., Cupples, L.A., Tucker, K., Lai, C.Q., Parnell, L.D., Coltell, O., Lee, Y.C. *et al.* (2009) APOA2, dietary fat, and body mass index: replication of a gene-diet interaction in 3 independent populations. *Arch Intern Med,* **169,** 1897-906.
285. Andreasen, C.H., Stender-Petersen, K.L., Mogensen, M.S., Torekov, S.S., Wegner, L., Andersen, G., Nielsen, A.L., Albrechtsen, A., Borch-Johnsen, K., Rasmussen, S.S. *et al.* (2008) Low physical activity accentuates the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on body fat accumulation. *Diabetes,* **57,** 95-101.
286. Cauchi, S., Stutzmann, F., Cavalcanti-Proenca, C., Durand, E., Pouta, A., Hartikainen, A.L., Marre, M., Vol, S., Tammelin, T., Laitinen, J. *et al.* (2009) Combined effects of MC4R and FTO common genetic variants on obesity in European general populations. *J Mol Med,* **87,** 537-46.
287. Jacobsson, J.A., Riserus, U., Axelsson, T., Lannfelt, L., Schioth, H.B. and Fredriksson, R. (2009) The common FTO variant rs9939609 is not associated with BMI in a longitudinal study on a cohort of Swedish men born 1920-1924. *BMC Med Genet,* **10,** 131.
288. Karasawa, S., Daimon, M., Sasaki, S., Toriyama, S., Oizumi, T., Susa, S., Kameda, W., Wada, K., Muramatsu, M., Fukao, A. *et al.* (2010) Association of the common fat mass

and obesity associated (FTO) gene polymorphism with obesity in a Japanese population. *Endocr J,* **57,** 293-301.
289. Mitchell, J.A., Church, T.S., Rankinen, T., Earnest, C.P., Sui, X. and Blair, S.N. (2010) FTO genotype and the weight loss benefits of moderate intensity exercise. *Obesity (Silver Spring),* **18,** 641-3.
290. Rampersaud, E., Mitchell, B.D., Pollin, T.I., Fu, M., Shen, H., O'Connell, J.R., Ducharme, J.L., Hines, S., Sack, P., Naglieri, R. *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.
291. Ruiz, J.R., Labayen, I., Ortega, F.B., Legry, V., Moreno, L.A., Dallongeville, J., Martinez-Gomez, D., Bokor, S., Manios, Y., Ciarapica, D. *et al.* (2010) Attenuation of the effect of the FTO rs9939609 polymorphism on total and central body fat by physical activity in adolescents: the HELENA study. *Arch Pediatr Adolesc Med,* **164,** 328-33.
292. Vimaleswaran, K.S., Li, S., Zhao, J.H., Luan, J., Bingham, S.A., Khaw, K.T., Ekelund, U., Wareham, N.J. and Loos, R.J. (2009) Physical activity attenuates the body mass index-increasing influence of genetic variation in the FTO gene. *Am J Clin Nutr,* **90,** 425-8.
293. Hauner, H., Meier, M., Jockel, K.H., Frey, U.H. and Siffert, W. (2003) Prediction of successful weight reduction under sibutramine therapy through genotyping of the G-protein beta3 subunit gene (GNB3) C825T polymorphism. *Pharmacogenetics,* **13,** 453-9.
294. Hsiao, D.J., Wu, L.S., Huang, S.Y. and Lin, E. (2009) Weight loss and body fat reduction under sibutramine therapy in obesity with the C825T polymorphism in the GNB3 gene. *Pharmacogenet Genomics,* **19,** 730-3.
295. Hsiao, T.J., Wu, L.S., Hwang, Y., Huang, S.Y. and Lin, E. (2010) Effect of the common -866G/A polymorphism of the uncoupling protein 2 gene on weight loss and body composition under sibutramine therapy in an obese Taiwanese population. *Mol Diagn Ther,* **14,** 101-6.
296. Chen, H.H., Lee, W.J., Wang, W., Huang, M.T., Lee, Y.C. and Pan, W.H. (2007) Ala55Val polymorphism on UCP2 gene predicts greater weight loss in morbidly obese patients undergoing gastric banding. *Obes Surg,* **17,** 926-33.
297. Luyckx, F.H., Scheen, A.J., Proenza, A.M., Strosberg, A.D., Lefebvre, P.J. and Gielen, J.E. (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.
298. Peraglie, C. (2007) Mini-gastric bypass in a patient homozygous for Factor V Leiden. *Obes Surg,* **17,** 104-7.
299. Peterli, R., Donadini, A., Peters, T., Ackermann, C. and Tondelli, P. (2002) Re-operations following laparoscopic adjustable gastric banding. *Obes Surg,* **12,** 851-6.
300. Poitou, C., Lacorte, J.M., Coupaye, M., Bertrais, S., Bedel, J.F., Lafon, N., Bouillot, J.L., Galan, P., Borson-Chazot, F., Basdevant, A. *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.
301. Sesti, G., Perego, L., Cardellini, M., Andreozzi, F., Ricasoli, C., Vedani, P., Guzzi, V., Marchi, M., Paganelli, M., Ferla, G. *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.
302. Stutzmann, F., Meyre, D., Schoilewa, I., Labrune, Y., Steffen, R., Dam, L., Kral, J.G., Blakemore, A.I., Horber, F. and Froguel, P. (2010) MC4R gene variations modulate outcomes of bariatric surgery.
303. Daniels, L.B. and Maisel, A.S. (2007) Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol,* **50,** 2357-68.

304. Meirhaeghe, A., Sandhu, M.S., McCarthy, M.I., de Groote, P., Cottel, D., Arveiler, D., Ferrieres, J., Groves, C.J., Hattersley, A.T., Hitman, G.A. *et al.* (2007) Association between the T-381C polymorphism of the brain natriuretic peptide gene and risk of type 2 diabetes in human populations. *Hum Mol Genet,* **16,** 1343-50.
305. Choquet, H., Cavalcanti-Proenca, C., Lecoeur, C., Dina, C., Cauchi, S., Vaxillaire, M., Hadjadj, S., Horber, F., Potoczna, N., Charpentier, G. *et al.* (2009) The T-381C SNP in BNP gene may be modestly associated with type 2 diabetes: an updated meta-analysis in 49 279 subjects. *Hum Mol Genet,* **18,** 2495-501.

RESUME

Résumé

Quatre études de liaison génome entier ont mis en évidence une région commune de 5,6 Mb dans la région du chromosome 5q15 liée à des traits associés à l'obésité, cette région incluant le gène de la prohormone convertase 1 (*PCSK1*). Une mutation Pc1 chez la souris a été associée à l'obésité, l'hyperphagie et à une augmentation de l'efficacité du métabolisme. La déficience complète en *PCSK1* a été associée à une forme récessive rare d'obésité chez l'homme, et depuis 1997 seuls trois patients présentant cette déficience ont été décrits dans la littérature. Les porteurs de mutations délétères *PCSK1* présentent des phénotypes sévères, incluant l'obésité, des hypoglycémies post-prandiales et des problèmes intestinaux et hormonaux. Contrairement aux observations faites chez la souris, les membres des familles porteurs hétérozygotes ont été considérés comme cliniquement sains. Toutes ces études ont désigné *PCSK1* comme un gène candidat important pour l'obésité.

Dans un premier temps, la contribution du gène *PCSK1* au risque d'obésité polygénique a été évaluée chez 13,659 individus d'origine européenne issus de huit cohortes cas contrôles ou familiales indépendantes. Neuf variants fréquents couvrant 92% de la variabilité génétique du locus ont été génotypés. Les méta-analyses des huit études pour le variant commun rs6232 et pour le cluster rs6234-rs6235 ont montré une association reproductible avec l'obésité chez l'adulte et chez l'enfant ($P=7.27x10^{-8}$ et $P=2.31x10^{-12}$ respectivement). Le rs6232 était associé à une augmentation du risque d'obésité de 34%, alors que le cluster rs6234-rs6235 augmentait le risque d'obésité de 22%. Les analyses fonctionnelles ont montré une diminution significative de 10,4% de l'activité catalytique de la protéine PC1/3 pour le N221D, et une diminution non significative de l'activité catalytique de la protéine PC1/3 pour le cluster Q665E/S690T.

L'implication du gène *PCSK1* dans l'obésité monogénique a ensuite été entreprise par le séquençage des exons de *PCSK1* chez 845 sujets obèses non-consanguins d'origine européenne,. Huit nouvelles mutations non-synonymes ont été identifiées. L'étude des conséquences fonctionnelles des mutations détectées sur la protéine PC1/3 a montré que 62.5% de ces mutations détectées étaient prédites délétères par les analyses *in silico* et 87.5% de ces mutations avaient un effet sur l'auto-activation ou sur l'activité enzymatique de PC1/3 *in vitro*. Dans le but d'estimer le degré de pénétrance pour ces sept mutations pathogéniques, 6,060 obèses et 6,274 sujets minces ont été génotypés, démontrant un enrichissement par six de ces mutations *PCSK1* chez les sujets obèses ($P=0.007$). Cette étude a mis en évidence pour la première fois une augmentation du risque d'obésité chez les porteurs hétérozygotes de mutations perte de fonction du gène *PCSK1*, confirmant un mode de transmission co-dominant de l'obésité avec une pénétrance incomplète. La pénétrance de l'obésité a été

estimée à 54.5% pour les porteurs hétérozygotes de mutations délétères *PCSK1*. Une déficience partielle en *PCSK1* pourrait expliquer environ 0.83% des formes extrêmes d'obésité et représenter la seconde forme la plus fréquente d'obésité monogénique après la dficience en *MC4R*.

Pour conclure, en plus des formes syndromiques très rares d'obésité dues à une déficience complète en *PCSK1*, ce travail a permis de démontrer le rôle des variants codants fréquents non-synonymes dans le risque d'obésité, ainsi que l'importance longtemps insoupçonné d'une déficience partielle en *PCSK1* dans les formes monogéniques d'obésité.

ABSTRACT

Abstract

Four whole genome studies basing on positional cloning approach revealed a region of chromosome 5q linked to traits related to obesity, this region contained the gene coding for the prohormone convertase 1 named *PCSK1*. Pc1 mutation in mice has been associated with obesity, hyperphagia and increased metabolic efficiency. In human, *PCSK1* deficiency is a monogenic form of obesity. The first case of complete *PCSK1* deficiency has been identified in 1997 and since two other cases were discovered. Deleterious *PCSK1* mutations carriers were either homozygous or compound heterozygous and presented severe phenotypes, such as obesity, intestinal troubles and endocrine disorders. Surprisingly, the family members who were heterozygous for these mutations appeared clinically unaffected. Overall of these studies highlighted *PCSK1* as a candidate gene for obesity.

We have therefore decided to assess the contribution of *PCSK1* gene to polygenic obesity risk. To assess the contribution of *PCSK1* to polygenic obesity risk, we genotyped tag single nucleotide polymorphisms in a total of 13,659 European individuals from eight independent case-control or family-based cohorts. The non-synonymous variants rs6232, encoding N221D, and cluster rs6234-rs6235, encoding the Q665E-S690T pair, were consistently associated with obesity in adults and children ($P=7.27 \times 10^{-8}$ and $P=2.31 \times 10^{-12}$, respectively). Functional analysis revealed a significant impairment of the N221D mutant on PC1/3 protein catalytic activity.

In continuity of this study we decided to assess the involvement of *PCSK1* gene in monogenic obesity, knowing that only three cases of complete *PCSK1* deficiency have been reported up to now. The objectives of this study were to evaluate the prevalence of rare *PCSK1* mutations contributing to human obesity and to investigate the mode of inheritance of obesity in the context of *PCSK1* deficiency. We sequenced exons of the *PCSK1* gene in 845 non-consanguineous extremely obese subjects of European origin and we identified eight novel *PCSK1* non-synonymous mutations in eight carriers, all heterozygous. We characterized the functional consequences of the detected mutations on PC1/3 protein and we found that 62.5% of mutations detected were predicted to be deleterious *in silico* and we revealed that 87.5% of mutations had an effect on the autoactivation or on the enzymatic activity of PC1/3 *in vitro*. In order to estimate the degree of penetrance for the seven pathogenic mutations, we genotyped 6,060 obese and 6,274 lean subjects. We assessed a 6-fold enrichment of these *PCSK1* mutations in obese subjects ($P = 0.007$). We provided the first evidence of an increased obesity risk in heterozygous carriers of loss of function mutations in *PCSK1* gene, confirming a co-dominant mode of transmission of obesity with incomplete penetrance for this gene. The penetrance of obesity was estimated to 54.5% for

heterozygous carriers of deleterious *PCSK1* mutations. Partial *PCSK1* deficiency might explain ~ 0.83% of extreme obesity.

To conclude, in addition of the syndromic forms of obesity due to a complete *PCSK1* deficiency, we provided the strong evidence of the contribution of common non-synonymous variants in obesity risk and we highlighted that a partial *PCSK1* deficiency is associated with an increased risk of obesity.