



Approches gène candidat et par séquençage d'exome dans les obésités syndromiques précoces

Helène Huvenne

► To cite this version:

Helène Huvenne. Approches gène candidat et par séquençage d'exome dans les obésités syndromiques précoces. Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066458 . tel-01290384

HAL Id: tel-01290384

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01290384>

Submitted on 18 Mar 2016

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

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

UNIVERSITE PARIS 6 – PIERRE ET MARIE CURIE

PÔLE VIE ET SANTÉ

Ecole doctorale de physiologie, physiopathologie et thérapeutique

HUVENNE Hélène

THESE

**Approches gène candidat et par séquençage d'exome dans
les obésités syndromiques précoces.**

Directrice de thèse: Dr POITOU-BERNERT Christine

Co-encadrant principal: Dr DUBERN Béatrice

Soutenue publiquement le 15 décembre 2015

Devant le jury composé de:

Mme le Professeur Irène NETCHINE, Président

Mme le Professeur Blandine GATTA-CHERIFI, Rapporteur

Mme le Docteur Aline MEIRHAEGHE, Rapporteur

Mr le Professeur Olivier ZIEGLER, Examineur

Mme le Docteur Christine POITOU-BERNERT, Directrice de thèse

Mme le Docteur Béatrice DUBERN, Co-encadrant principal

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements

à Irène Netchine, PU-PH à l'hôpital Armand-Trousseau (Paris) et à l'Université Paris VI (UPMC)-INSERM, UMR_S 938, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse.

à Blandine Gatta-Cherifi, PU-PH à l'hôpital Haut-Lévêque (Bordeaux) et à l'Université de Bordeaux-INSERM, U862, et Aline Meirhaeghe, PhD à l'Université de Lille I-INSERM, U1167, pour les conseils précieux qu'elles m'ont apportés pour l'aboutissement de ce travail.

à Olivier Ziegler, PU-PH au CHU de Nancy et à l'Université Henri Poincaré (Nancy) - Laboratoire de Nutrition et de Maladies Métaboliques, qui m'a fait l'honneur d'accepter d'être examinateur.

à Christine Poitou-Bernert, MCU-PH à l'hôpital La Pitié-Salpêtrière (Paris) et à l'Université Paris VI (UPMC)-INSERM Nutriomique, UMR_S ICAN U1166, et à Béatrice Dubern, PH à l'hôpital Armand-Trousseau (Paris) et à l'Université Paris VI (UPMC)-INSERM Nutriomique, UMR_S ICAN U1166, qui m'ont fait l'honneur de me confier ce travail de thèse et d'en accepter la direction. Qu'elles soient ici assurées de ma profonde reconnaissance et de ma sincère gratitude pour le rôle essentiel qu'elles ont toutes les deux joué dans la direction de mon travail de thèse et pour m'avoir toujours soutenue au cours de ce projet de recherche.

à Karine Clément, PU-PH à l'hôpital La Pitié-Salpêtrière (Paris) et à l'Université Paris VI (UPMC)-INSERM Nutriomique, UMR_S ICAN U1166, qui m'a accueillie dans son laboratoire. Qu'elle soit assurée de ma reconnaissance pour son enseignement et son soutien au cours de ce travail de thèse et pour le rôle qu'elle a joué dans le développement de ma culture scientifique.

à David-Alexandre Trégouët, PhD à l'Université Paris VI (UPMC)-INSERM, UMR_S ICAN U1166, Génomique et Physiopathologie des maladies cardio-vasculaires, et à l'ensemble de

l'équipe de Bioinformatique/Biostatistiques de la plateforme génomique de la Pitié-Salpêtrière P3S, pour le séquençage d'exome et l'analyse des données.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe INSERM Nutriomique, UMR_S ICAN U1166, pour son professionnalisme. En particulier, je remercie Véronique Pelloux-Gervais qui m'a beaucoup aidée et encadrée pour la réalisation des études de génotypage.

Je remercie Nicolas Kalach, chef du service de Pédiatrie de l'hôpital Saint-Vincent-de-Paul (Lille), qui m'a accordé sa confiance depuis 2007 et qui m'a soutenue au cours de ce projet de recherche. Et également un grand merci à l'ensemble de l'équipe, médicale et paramédicale, du service de Pédiatrie de l'hôpital Saint-Vincent-de-Paul (Lille), qui m'a soutenue tout au long de ces années de travail de thèse.

Je tiens à remercier le Groupe Francophone d'Hépatologie, Gastro-entérologie et Nutrition Pédiatrique, le laboratoire Lactalis Nutrition Santé et le Groupe Pasteur Mutualité, pour leur soutien financier de mon travail de thèse.

Enfin, un grand merci à ma famille pour leur soutien permanent.

TABLE DES MATIÈRES

I. PRÉSENTATION DU TRAVAIL	19
I.1. Quelle est l'implication des mutations du gène <i>LEPR</i> dans l'obésité sévère ?	19
I.2. Peut-on identifier de nouveaux gènes impliqués dans les obésités syndromiques précoces avec anomalies du développement ?	20
II. INTRODUCTION	23
II.1. Obésité infantile: généralités	23
II.1.1. Définition.....	23
II.1.2. Prévalence	26
II.1.3. Complications à moyen et long terme	27
II.2. Contrôle de la balance énergétique	28
II.2.1. Les signaux d'adiposité	30
a. La leptine	30
b. L'insuline	33
II.2.2. Les autres signaux périphériques	33
a. La ghréline	33
b. Autres signaux périphériques	34
II.2.3. Le système mélanocortine	36
II.2.4. Les autres voies hypothalamiques impliquées	42
a. Les monoamines	42
b. Le système endocannabinoïde	43
II.3. Obésité: physiopathologie et déterminants génétiques	43
II.3.1. Déterminants génétiques dans l'obésité	45
<i>Revue 1: Obésités génétiques rares: Diagnostics clinique et biologique en 2015</i>	<i>48</i>

II.3.2. Les obésités monogéniques	49
a. Les obésités monogéniques par mutation des gènes de la voie leptine-mélanocortines	49
b. Les autres obésités monogéniques	53
<i>Revue 2: Monogenic forms of obesity</i>	57
II.3.3 Les obésités syndromiques	58
<i>Article 1: Metabolic and adipose tissue signatures in adults with Prader-Willi syndrome: a model of extreme adiposity</i>	59
<i>Revue 3: Obésités rares d'origine génétique</i>	74
<i>Revue 4: Obesity</i>	76
III. RÉSULTATS. APPROCHE GÈNE CANDIDAT: ÉTUDE DE L'IMPLICATION DU GÈNE <i>LEPR</i> DANS UNE POPULATION D'OBÉSITÉ EXTRÊME	78
III.1. Etat actuel des connaissances	78
III.2. Matériel et Méthodes	78
III.3. Résultats	79
III.3.1. Identification de 7 nouvelles mutations du gène <i>LEPR</i>	79
III.3.2. Identification d'une même mutation chez des patients originaires de l'île de La Réunion	79
III.3.3. Phénotypes cliniques et biologiques des sujets porteurs de mutations homozygotes de <i>LEPR</i>	82
III.3.4. Phénotypes cliniques et biologiques des sujets hétérozygotes pour la mutation de <i>LEPR</i> et originaires de l'île de La Réunion	84
III.4. Conclusion	86
<i>Article 2: Seven novel deleterious LEPR mutations found in early-onset obesity: a Δexon6-8 shared by subjects from Reunion Island, France suggests a founder effect</i>	87
IV. RÉSULTATS. APPROCHE PAR SÉQUENÇAGE D'EXOME DANS L'OBÉSITÉ SYNDROMIQUE	98

IV.1. Etat actuel des connaissances	98
IV.2. Matériel et Méthodes	99
IV.2.1. Populations étudiées	99
a. Cohorte des sujets présentant une obésité syndromique	100
b. Cohorte des sujets ayant une obésité commune non syndromique	102
c. Cohorte des sujets de corpulence normale sans déficience intellectuelle	102
d. Caractérisation phénotypique	102
IV.2.2. Séquençage d'exome	106
IV.2.3. Génotypage	111
IV.2.4. Méthodologie statistique	113
IV.3. Résultats	114
IV.3.1. Modèle <i>de novo</i>	114
a. Gènes de la voie de la neurogénèse	117
b. Gènes de la voie de l'excitabilité neuronale et de la neurotransmission ,	119
c. Gènes de la voie du remodelage de la chromatine	120
d. Gènes de la voie de signalisation NOTCH	123
e. Gènes de la voie des enzymes lysosomales	123
f. Gènes de fonction inconnue	123
IV.3.2. Modèle récessif et hétérozygote composite	124
IV.3.3. Validation des gènes identifiés dans le modèle <i>de novo</i>	124
a. Gène <i>MYT1L</i>	125
b. Perspectives	128
IV.4. Conclusion	128
V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	130
BIBLIOGRAPHIE	140
ANNEXES	159

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Courbe de corpulence chez les garçons de 0 à 18 ans établie à partir de la définition internationale de l'International Obesity Task Force (IOTF)	25
Figure 2: Contrôle de la balance énergétique	30
Figure 3: Voie de signalisation leptine-mélanocortines	32
Figure 4: Intégration des signaux périphériques au niveau du système nerveux central	37
Figure 5: Sites d'action des principaux peptides issus du clivage de la proopiomélanocortine (POMC)	38
Figure 6: Rôle du système mélanocortine dans le contrôle de la balance énergétique	40
Figure 7: Evolution des différentes stratégies d'approche moléculaire utilisées dans l'obésité et principales anomalies génétiques mises en évidence	48
Figure 8: Evolution de l'IMC (indice de masse corporelle) chez trois sujets ayant une mutation du gène du récepteur de la leptine (LepR 1, LepR 2 et LepR 3)	50
Figure 9: Position des mutations identifiées dans la protéine LEPR	81
Figure 10: Produit de l'amplification PCR (polymerase chain reaction) des exons 5, 6, 7 et 8 du gène <i>LEPR</i> d'un sujet porteur homozygote de la mutation Δ exon6-8 (6-III.9) et d'un sujet témoin (control)	82
Figure 11: Courbes d'IMC des patients porteurs de mutations de <i>LEPR</i> de la naissance à l'âge adulte	83
Figure 12: Arbre généalogique d'une famille Réunionnaise porteuse de la mutation Δ exon6-8 du gène <i>LEPR</i>	85
Figure 13: Z-score d'IMC moyen des sujets homozygotes, hétérozygotes et non mutés pour les mutations du gène <i>LEPR</i> dans les familles étudiées	86
Figure 14: Photographies des profils de migration de l'ADN des 8 trios sur gel d'agarose par électrophorèse	106

Figure 15: Procédure de capture des exons sur le SureSelect Targeted Enrichment Workflow (Agilent Technologies, California, USA)	108
Figure 16: Etapes d'analyse des séquences générées par le séquençage d'exome	110
Figure 17: Présentation des résultats d'un génotypage TaqMan® Mutation Detection Assays	113
Figure 18: Rôle du complexe BAF dans le remodelage de la chromatine	122
Figure 19: Photographie du proband porteur du variant du gène <i>MYT1L</i> (myelin transcription factor 1-like)	126
Figure 20: Relation complexe entre la génétique, l'épigénétique et l'environnement pour la susceptibilité à l'obésité	139

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: Peptides issus du tube digestif jouant un rôle dans le contrôle à court terme de la prise alimentaire	35
Tableau 2: Formes rares d'obésité monogénique	56
Tableau 3: Signes cliniques et anomalies génétiques des principaux syndromes génétiques rares avec obésité	72
Tableau 4: Description clinique des 8 sujets sélectionnés pour le séquençage d'exome	101
Tableau 5: Description des trois cohortes étudiées	105
Tableau 6: Gènes et type de variants mis en évidence lors du séquençage d'exome des 8 trios dans le cadre des obésités syndromiques	115
Tableau 7: Voies physiopathologiques et gènes identifiés lors du séquençage d'exome des 8 trios dans le cadre des obésités syndromiques	117
Tableau 8: Distribution du génotype <i>MYT1L</i> dans les 3 cohortes	127

LISTE DES ANNEXES

Revue 1: Obésités génétiques rares: Diagnostics clinique et biologique en 2015	159
Revue 2: Monogenic forms of obesity	167
Revue 3: Obésités rares d'origine génétique	181
Revue 4: Obesity	191

ABREVIATIONS

Ac	Groupement acétyle
ACP1	Acid phosphatase 1, soluble
ACTH	Adrénocorticotrophine
ADRA2B	Adrenoreceptor alpha 2B
AGRP	Agouti-related protein
ALDH7A1	Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1
ALMS1	Alström syndrome 1
AMPK	5' adenosine monophosphate-activated protein kinase
APO-AIV	Apolipoprotéine A IV
ARID1A	AT rich interactive domain-containing protein 1A
ARID1B	AT rich interactive domain-containing protein 1B
ARL6	ADP-ribosylation factor-like 6
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASCL1	Achaete-scute complex, drosophila, homolog 1
BAF	BRG1-associated factor
BBIP1	BBS protein complex-interacting protein 1
BBS	Bardet-Biedl syndrome
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
β-Endo	β-endorphines
BMI	Body mass index
BWA	Burrows-Wheeler aligner

C12orf58	Chromosome 12 open reading frame 58
CADD	Combined annotation dependent depletion
CART	Cocain- and amphetamine-related transcript
CCK	Cholécystokinine
CEP290	Centrosomal protein, 290-kd
CGH	Comparative genomic hybridization
CNV	Copy number variant
COH1	Cohen syndrome 1
CPE	Carboxypeptidase E
CRH	Corticotrophin releasing hormone
CRMV	Centre de référence Maladies rares
CRNH	Centre de recherche en nutrition humaine
db	Diabetes
DER	Dépense énergétique de repos
DER HB	Dépense énergétique de repos estimée par l'équation de Harris et Benedict
DEXA	Dual-energy x-ray absorptiometry
DOCK5	Dedicator of cytokinesis 5
DS	Déviation-standard
ESPGHAN	European society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition
EVS	Exome variant server
F	Féminin
FAM189A1	Family with sequence similarity 189, member A1

FMR1	Fragile X mental retardation 1
FRMD4A	FERM domain containing 4A
FSH	Follicle-stimulating hormone
FT4	Free tetraiodothyronine
FTO	Fat mass and obesity
FXS	Fragile X syndrome
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GATK	Genome analysis toolkit
GH	Growth hormone
GH-R	Growth hormone receptor
GHS-R	Growth hormone secretagogue receptor
GLB1	Galactosidase beta-1
GLP-1	Glucagon-like peptide-1
GM1	Ganglioside M1
GNAS1	Guanine nucleotide-binding protein, alpha stimulating activity polypeptide 1
GPRIN2	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2
GRP	Gastrin releasing peptide
GWAS	Genome wide scan association study
HDM	Hypothalamus dorsomédian
HL	Hypothalamus latéral
HOMA-IR	Homeostasis model assessment of insulin resistance
5-HT _{1B}	5-hydroxytryptamine receptor 1B

HVM	Hypothalamus ventromédian
ICAN	Institut de cardiométabolisme et nutrition
ICAPS	Intervention auprès des collégiens centrée sur l'activité physique et la sédentarité
ICV	Intracérébroventriculaire
IFT27	Intraflagellar transport 27, chlamydomonas, homolog of
IGF1	Insulin-like growth factor-1
IHU	Institut hospitalo-universitaire
IMC	Indice de masse corporelle
IOTF	International Obesity Task Force
IPW	Imprinted in Prader-Willi syndrome
IRMA	Immunoradiometric assay
IRX3	Iroquois homeobox 3
IS-R	Insulin receptor
JP	Joint peptide
JRK	Jerky, mouse, homolog of
kb	Kilobase
KCNN3	Potassium channel, calcium-activated, intermediate/small conductance, subfamily N, member 3
KO	Knock-out
KSR2	Kinase supressor of Ras 2
LEP	Leptine
LEPR	Leptin receptor
LH	Luteinizing hormone

LMNA	Lamine A/C
γ LPH	γ -lipoprotein hormone
LZTFL1	Leucine zipper transcription factor-like 1
M	Masculin
MAGEL2	Mage-like 2
Mb	Mégabase
MC1R à MC5R	Melanocortin receptor type 1 à 5
MCH	Melanin concentrating hormone
MKKS	McKusick-Kaufman syndrome
MKS1	Meckel syndrome, type 1
MODY	Maturity onset diabetes of the young
MRKN3	Makorin 3
γ -, α -, β -MSH	γ -, α -, β - melanocyte stimulating hormone
MYT1L	Myelin transcription factor 1-like
NAPE	N-acylphosphatidyléthanolamine
ND	Non déterminé
NDN	Necdine
NHL	Noyau hypothalamique latéral
NOTCH2	NOTCH, drosophila, homolog of, 2
NPAP1	Nuclear pore associated protein 1
NPV	Noyau paraventriculaire
NPY	Neuropeptide Y
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2

ob	Obese, mouse, homolog of
OMS	Organisation mondiale de la santé
Ox	Orexine
OXM	Oxyntomoduline
PA	Prise alimentaire
PAR1	Prader-Willi/Angelman region RNA 1
PAR5	Prader-Willi/Angelman region RNA 5
Pb	Paire de bases
PC1 et 2	Proconvertase de type 1 et 2
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	PCR quantitative
PCSK1	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1
PHF6	PHD finger protein 6
PHF21A	PHD finger protein 21A
PHRCI	Programme hospitalier de recherche clinique interrégional
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
POMC	Proopiomélanocortine
PP	Polypeptide pancréatique
PTHB1	Parathyroid hormone-responsive B1 gene
PYY(3-36)	Peptide tyrosine-tyrosine(3-36)
QTL	Quantitative trait loci
RAI1	Retinoic acid-induced 1
SDCCAG8	Serologically defined colon cancer antigen 8

SIM-1	Single-minded homolog 1
SK3	Small conductance potassium channel 3
SMARCA2	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 2
SMARCA4	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4
SMARCB1	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1
SMARCE1	SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily E, member 1
SNC	Système nerveux central
SNP	Single nucleotide polymorphism
SNURF-SNRPN	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N upstream reading frame - small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
SPW	Syndrome de Prader-Willi
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SU.VI.MAX	Supplémentation en vitamines et minéraux anti-oxydants
SWI/SNF	Switch mutants/sucrose non-fermenting
TMEM18	Transmembrane protein 18
TRIM32	Tripartite motif-containing protein 32
TRKB	Tyrosine kinase receptor B
TRH	Thyrotropin releasing hormone
TSH	Thyroid stimulating hormone
TTC8	Tetratricopeptide repeat domain-containing protein 8

TUB	Tubby-like protein
UTR	Untranslated region
VNTR	Variable number of tandem repeat
WDPCP	WD repeat-containing planar cell polarity effector
ZNF127AS	Zinc finger protein 127, antisense

I. PRÉSENTATION DU TRAVAIL

L'obésité, définie par un excès de masse grasse, est une maladie complexe, multifactorielle résultant de l'interaction de nombreux facteurs génétiques et non génétiques environnementaux, en particulier comportementaux (apports énergétiques et activités physiques). L'expression phénotypique des facteurs génétiques impliqués dans l'obésité permet de distinguer différentes situations cliniques (obésités monogéniques ou syndromes génétiques rares, obésités oligogéniques et polygéniques). Dans le cas des obésités monogéniques et syndromiques, la précocité et la sévérité de ces obésités sont en faveur d'une origine génétique très peu dépendante de l'environnement. Or, même si les progrès des études moléculaires ont permis d'identifier quelques gènes impliqués dans ces obésités extrêmes, à ce jour, la plupart d'entre elles ne sont pas élucidées.

L'objectif principal de mon travail était de mieux comprendre les facteurs génétiques impliqués dans l'obésité sévère à début précoce. Pour cela, j'ai réalisé 2 études complémentaires afin d'appréhender cet objectif et de répondre aux questions suivantes:

- Quelle est l'implication des mutations du gène *LEPR* dans l'obésité sévère, en France ? (approche gène candidat)
- Peut-on identifier de nouveaux gènes impliqués dans les obésités syndromiques précoces avec anomalies du développement ? (approche sans a priori)

I.1. Quelle est l'implication des mutations du gène *LEPR* dans l'obésité sévère ?

Le récepteur de la leptine (*LEPR*) joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire, au sein de la voie leptine-mélanocortines. Quelques mutations du gène *LEPR* ont été décrites chez des sujets ayant une obésité massive associée à des anomalies endocriniennes. La prévalence de ces mutations est peu connue et n'a actuellement été estimée que dans 2 populations très spécifiques marquées par un taux élevé de consanguinité. Même si les mutations du gène *LEPR* semblent jouer un rôle important dans la survenue des obésités extrêmes, leur fréquence n'est pas connue dans la population obèse française. De plus, la prise en charge des sujets porteurs de mutations de *LEPR* reste difficile, sans thérapeutique actuellement disponible chez l'homme et avec une perte de poids variable après chirurgie bariatrique chez les quelques premiers patients décrits.

Afin de déterminer l'implication des mutations du gène *LEPR* dans l'obésité sévère en France, nous avons réalisé une approche 'gène candidat' dans une population de 535 sujets Français, enfants et adultes, présentant une obésité sévère par séquençage direct de *LEPR*. En cas de mutation du gène *LEPR* mise en évidence, j'ai réalisé une caractérisation phénotypique détaillée des sujets porteurs de mutations à l'état homozygote et des sujets hétérozygotes apparentés. Enfin, pour évaluer les effets de la chirurgie bariatrique, j'ai étudié l'évolution pondérale post-chirurgicale des 3 patients porteurs d'une mutation homozygote de *LEPR*.

Cette étude a permis de montrer que les mutations de *LEPR* à l'état homozygote ne sont pas rares en France (2,24% dans la population française étudiée) et qu'elles sont caractérisées par un phénotype spécifique associant une obésité extrême à début très précoce, des troubles du comportement alimentaire (hyperphagie, impulsivité alimentaire) et des anomalies endocriniennes (hypogonadisme hypogonadotrope, déficit en hormone de croissance). En particulier, nous avons identifié une nouvelle mutation du gène *LEPR*, Δ exon6-8, partagée par 6 sujets non apparentés tous originaires de l'île de La Réunion, suggérant un effet isolat de cette mutation. La perte de poids après chirurgie bariatrique chez les patients homozygotes était très variable. Enfin, les sujets hétérozygotes ne présentaient pas de phénotype intermédiaire, avec une obésité inconstante (80% des sujets), de sévérité variable et sans anomalies endocriniennes ni impulsivité alimentaire associées.

Ce travail a fait l'objet d'un article publié dans 'Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism' en mai 2015.

ARTICLE: Seven novel deleterious *LEPR* mutations found in early-onset obesity: a Δ exon6-8 shared by subjects from Reunion Island, France suggests a founder effect.

Huvenne H, Le Beyec J, Pépin D, Alili R, Pigeon Kherchiche P, Jeannic E, Frelut ML, Lacorte JM, Nicolino M, Viard A, Laville M, Ledoux S, Tounian P, Poitou C, Dubern B Clément K. J Clin Endocrinol Metab 2015; 100: 757-66.

I.2. Peut-on identifier de nouveaux gènes impliqués dans les obésités syndromiques précoces avec anomalies du développement ?

Les obésités syndromiques sont des formes particulières d'obésité associant une obésité sévère à début précoce à des anomalies du développement (retard mental, dysmorphie, malformations d'organe, atteintes neurosensorielles et/ou endocriniennes). Même si les

progrès des études moléculaires ont permis d'identifier quelques gènes impliqués dans ces obésités, à ce jour, la plupart de ces obésités ne sont pas élucidées. Or, la précocité et la sévérité des obésités syndromiques sont en faveur d'une origine génétique très peu dépendante de l'environnement. D'autres anomalies génétiques sont donc probablement en cause dans ces formes extrêmes d'obésité. L'identification de nouveaux gènes pourrait ainsi permettre de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et les mécanismes de régulation du poids et d'améliorer la prise en charge des sujets atteints d'obésité.

Afin de rechercher de nouveaux gènes impliqués dans les obésités syndromiques avec anomalies du développement, nous avons choisi une 'approche sans a priori' avec analyse par séquençage d'exome dans une population d'adultes et d'enfants présentant une obésité syndromique. Dans un premier temps, nous avons constitué une large cohorte de 41 enfants et de 74 adultes ayant une obésité syndromique. Une caractérisation phénotypique complète et un prélèvement sanguin à visée génétique ont été effectués. Nous avons ensuite analysé l'ensemble des données phénotypiques de cette cohorte dans le but de sélectionner des patients obèses ayant un phénotype clinique et biologique le plus similaire possible. Huit patients (3 enfants et 5 adultes) présentant une obésité à début précoce (avant l'âge de 6 ans) et sévère (Z-score de l'IMC (indice de masse corporelle) $> +3$ DS (déviations-standard)), associée à un retard mental et une impulsivité alimentaire et sans autre anomalie génétique préalablement identifiée ont été sélectionnés. Afin d'augmenter la capacité discriminative de détection des anomalies moléculaires, des trios composés du patient atteint d'obésité syndromique et de ses 2 parents sains ont été recrutés. Enfin, une technique de séquençage d'exome à haut débit a été réalisée chez ces 8 trios. Les données générées ont été analysées selon 3 modèles génétiques: les modèles récessif, *de novo* et hétérozygote composite.

Cette étude a permis de mettre en évidence, dans le modèle *de novo*, des variants localisés dans des gènes impliqués dans 4 voies physiopathologiques principales: 1) la voie de la neurogénèse avec des gènes intervenant dans la transformation des fibroblastes en neurones fonctionnels, la croissance neuronale, la polarité cellulaire des neurones ou la différenciation des neurones ; 2) la voie physiopathologique de l'excitabilité neuronale et de la neurotransmission qui semble jouer un rôle dans la plasticité synaptique et dans les fonctions cognitives supérieures, telles que la capacité à discriminer, à sélectionner et à exécuter ; 3) la voie du remodelage de la chromatine qui en cas d'altération peut provoquer des dysfonctionnements au niveau cérébral et neurologique ; et enfin 4) la voie de signalisation NOTCH qui intervient entre autres dans la morphogénèse du corps ciliaire.

En particulier, un variant du gène *MYT1L* (myelin transcription factor 1-like) a été mis en évidence chez un proband. Ce gène code pour un facteur de transcription neuronal intervenant dans la transformation des fibroblastes en neurones fonctionnels. L'expression de *MYT1L* est très importante dans le cerveau en développement mais aussi dans le cerveau adulte. Chez l'homme, des délétions de ce gène ont été mises en évidence chez des patients présentant une obésité centrale associée à une déficience intellectuelle [1-4]. Le gène *MYT1L* nous paraissait donc être un bon candidat dans l'obésité syndromique.

Afin de confirmer l'implication de *MYT1L*, nous avons réalisé un génotypage par la méthode TaqMan® Mutation Detection Assays (Applied Biosystems) pour la mutation identifiée dans plusieurs groupes de sujets (sujets ayant une obésité syndromique ; enfants ayant une obésité commune sans déficience intellectuelle ; enfants de corpulence normale et sans déficience intellectuelle). Ce génotypage a montré que le variant de *MYT1L* était un polymorphisme puisqu'il était identifié à l'état hétérozygote chez 11,8% des 43 sujets ayant une obésité syndromique, 19,7% des 178 enfants et adolescents ayant une obésité commune sans déficience intellectuelle et 6,7% des 195 enfants et adolescents de corpulence normale. Les études statistiques n'ont mis en évidence aucune association significative entre le génotype de *MYT1L* et le phénotype, clinique et paraclinique, des sujets des trois cohortes étudiées. Toutefois, la probabilité d'avoir un IMC normal, pour l'âge et le sexe, était plus élevée chez les sujets ne présentant pas le variant de *MYT1L*, en comparaison aux sujets hétérozygotes ($p=0,0003$), suggérant le rôle potentiel de *MYT1L* dans le développement de l'obésité.

Afin d'explorer la pertinence des autres variants mis en évidence par le séquençage d'exome, nous avons comme perspective de réaliser un séquençage des autres gènes, dans une cohorte de sujets présentant une obésité syndromique et dans une population de sujets témoins non obèses, dans le but d'essayer de confirmer leur implication dans ce type d'obésité.

II. INTRODUCTION

II.1. Obésité infantile: généralités

II.1.1. Définition

L'obésité est définie par un excès de masse grasse et résulte d'un déséquilibre prolongé de la balance énergétique. Elle est devenue un problème de santé publique en raison de l'augmentation de sa prévalence depuis les années 60 et de ses complications à court et moyen termes. L'obésité est une maladie complexe et multifactorielle, résultant de l'interaction de nombreux facteurs génétiques et non génétiques environnementaux, en particulier comportementaux (apports énergétiques et activités physiques) [5].

L'obésité est appréciée par le calcul de l'indice de masse corporelle (IMC ; en anglais body mass index ou BMI) ou indice de Quételet selon la formule suivante: poids (en kilogrammes) divisé par la taille au carré (en mètre carré). Pendant longtemps, chez l'enfant, l'obésité a été définie par un IMC supérieur au 97^e percentile pour l'âge et le sexe selon des courbes établies à partir d'un échantillon représentatif d'enfants français [6]. Cette définition était peu satisfaisante car elle était fondée sur la distribution de l'IMC dans une population pédiatrique et ne tenait pas compte du risque de surmorbidity et de surmortalité lié à l'obésité, comme c'est le cas chez l'adulte. En effet, chez l'adulte, la surcharge pondérale et l'obésité sont définies par des IMC supérieurs à, respectivement, 25 et 30 kg/m² car ces valeurs correspondent à un risque relatif de mortalité devenant significativement supérieur à 1 et rapidement croissant. Secondairement, en 2000, des courbes d'IMC basées sur le risque d'aboutir aux valeurs de 25 et de 30 kg/m² à l'âge de 18 ans (appelées respectivement courbes IOTF 25 et IOTF 30) ont été établies par l'International Obesity Task Force (IOTF) à partir de données recueillies dans plusieurs pays [7]. La courbe du 97^e percentile initialement utilisée en France est pratiquement superposable à la courbe IOTF 25. Deux degrés d'obésité ont pu être définis en fonction de la courbe IOTF 30. On parle de surpoids (degré 1) pour un IMC supérieur au 97^e percentile et inférieur à la courbe IOTF 30 ; et d'obésité (degré 2) pour un IMC supérieur à la courbe IOTF 30 (Figure 1, page 25). Ces courbes sont maintenant présentes dans tous les carnets de santé.

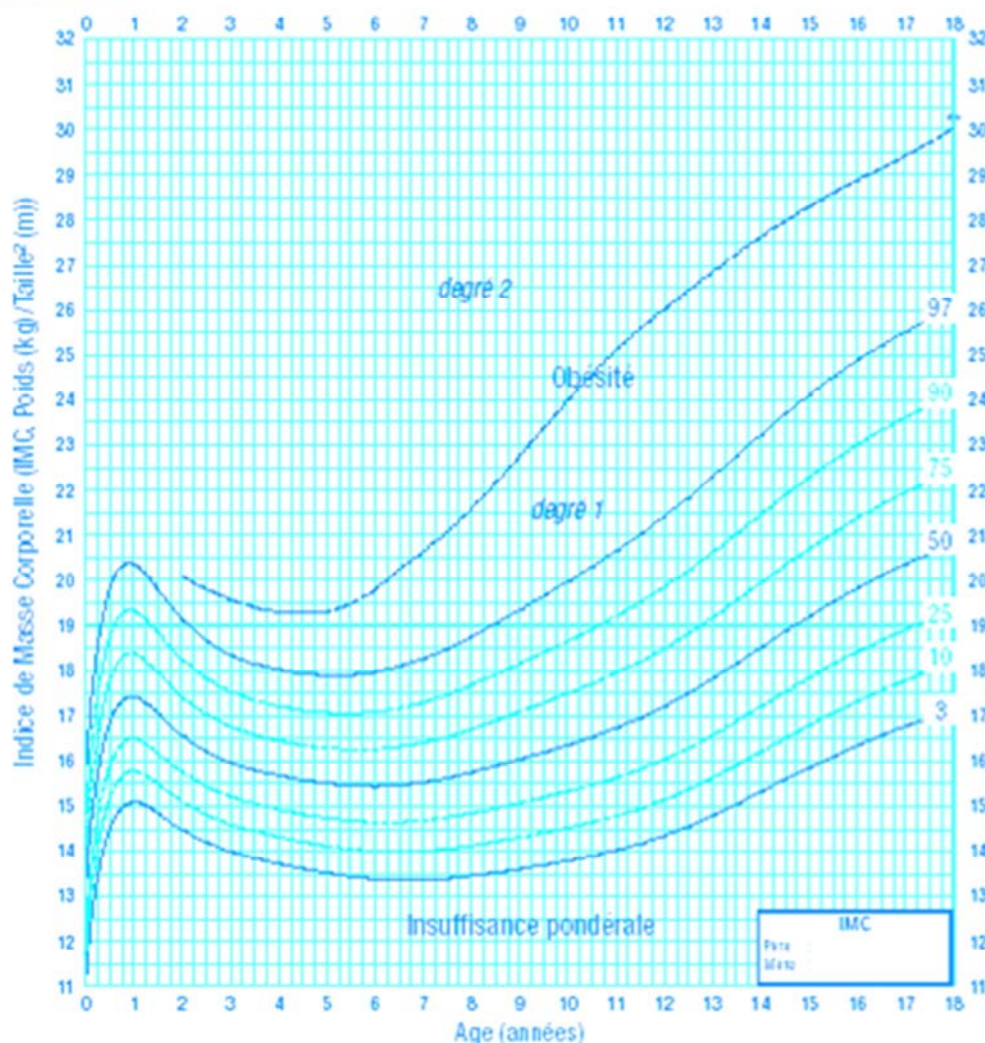
Les courbes d'IMC permettent aussi de déterminer l'âge du rebond d'adiposité. En effet, il existe une augmentation physiologique de la masse grasse, et donc de l'IMC, dans la première année de vie suivie d'une diminution jusqu'à l'âge de six ans puis enfin d'une nouvelle augmentation progressive jusqu'à la fin de la croissance [6]. Cette ré-ascension de la courbe

vers l'âge de six ans définit l'âge de rebond d'adiposité, qui est très souvent plus précoce chez les enfants obèses (vers 2-3 ans). Le rebond prématuré de l'IMC marque le véritable début de l'obésité, c'est-à-dire l'expression phénotypique initiale de sa prédisposition constitutionnelle. Cependant, dans certaines obésités sévères, le rebond de l'IMC peut être absent, l'IMC s'accroissant sans discontinuer depuis la naissance.



Courbe de Corpulence chez les garçons de 0 à 18 ans*

Nom : _____ Prénom : _____ Date de naissance : _____



Pour chaque enfant, le poids et la taille doivent être mesurés régulièrement.

• L'Indice de Masse Corporelle (IMC) est alors calculé et reporté sur la courbe de corpulence disponible sur votre santité. Il se calcule soit avec un disque de calcul soit avec une calculatrice, en divisant le poids (en kg) par la taille au carré (en mètre) soit :

$$\frac{\text{poids (kg)}}{\text{taille (m)}^2} = \text{IMC}$$

• L'IMC est un bon reflet de l'adiposité. Il varie en fonction de l'âge. L'IMC augmente au cours de la première année de vie, diminue jusqu'à 6 ans puis augmente à nouveau. La remontée de la courbe, appelée rebond d'adiposité, a lieu en moyenne à 6 ans.

• Tenir la courbe de corpulence pour chaque enfant permet d'identifier précocement les enfants obèses ou à risque de le devenir.

- lorsque l'IMC est supérieur au 97^{ème} percentile, l'enfant est obèse.

- plus le rebond d'adiposité est précoce plus le risque d'obésité est important.

- un changement de "couleur" vers le haut est un signe d'alerte.

* Cette courbe est présentée, adaptée en collaboration avec l'AFN (Association Française Nutritionnelle) et l'AN (Agence Nationale pour la Prévention et la prise en charge de l'Obésité et l'Obésité infantile).

** Données du Réseau de Surveillance Nationale de la Santé (RSN) de la Direction Générale de l'Évaluation et de la Prévention (DGEPS).

*** Les données sont présentées dans l'Annuaire de la Santé (ARS) - Collection de l'INSEE (2010) et de l'INSEE (2010).



Figure 1: Courbe de corpulence chez les garçons de 0 à 18 ans établie à partir de la définition internationale de l'International Obesity Task Force (IOTF).

Le surpoids (degré 1) est défini par un indice de masse corporelle (IMC) supérieur au 97^{ème} percentile et inférieur à la courbe IOTF 30 ; l'obésité (degré 2) est définie par un IMC supérieur à la courbe IOTF 30 [7].

II.1.2. Prévalence

L'obésité infantile constitue l'un des plus grands défis pour la santé publique au XXI^{ème} siècle. A l'échelle mondiale, le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. Auparavant, le surpoids et l'obésité étaient considérés comme des problèmes spécifiques des pays industrialisés, mais ils augmentent actuellement spectaculairement dans les pays émergents à faible ou moyen revenu, essentiellement en milieu urbain. D'après l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), en 2014, dans le monde, le surpoids concernait 1,9 milliards de personnes de 18 ans et plus, parmi lesquelles plus de 600 millions étaient obèses. Ainsi, 35% des adultes dans le monde sont atteints d'obésité ou de surpoids. Les complications associées, en particulier le diabète et les maladies cardiovasculaires, entraînent le décès d'au moins 2,8 millions de personnes chaque année. En 2013, le surpoids concernait près de 43 millions d'enfants de moins de 5 ans, près de 35 millions vivant dans des pays en développement et 8 millions dans des pays développés, avec des prévalences quasiment similaires chez les filles et les garçons [8].

En France, une augmentation franche de la prévalence de l'excès de poids a été notée depuis les années soixante. Ainsi, chez l'adulte, la prévalence de l'obésité était de 8,5% en 1997, 10,1% en 2000 puis 14,5% en 2009 pour atteindre 16% en 2013. Chez l'enfant, même s'il n'existe pas d'estimations nationales antérieures aux années 90, un certain nombre de données régionales sont disponibles et ont montré que la prévalence de l'excès de poids a été multipliée par 5 à 6 depuis les années 60. Ainsi, elle était de 3%, par définition chez les enfants de 5-12 ans en 1965 au moment de l'établissement des courbes d'IMC, puis est passée à 5,1% en 1980 pour atteindre 10-12% en 1996 puis 16% en 2000 et actuellement 18 % dans cette tranche d'âge (16% des garçons et 19% des filles). Aux États-Unis, elle est estimée à 20-25% en fonction des états. Toutefois, il est important de noter que, depuis 2003 aux États-Unis et depuis 2008 en France, la progression de l'obésité tend à se stabiliser.

En revanche, dans les pays émergents ou en voie de développement, on dénombre 115 millions d'obèses et la prévalence de l'obésité ne cesse d'augmenter. Le taux d'augmentation du surpoids et de l'obésité chez les enfants d'âge préscolaire était supérieur de plus de 30% à celui des pays développés. En Chine, la prévalence de l'obésité a augmenté de plus de 28 fois entre 1985 et 2000. La Chine est en 2013 le deuxième pays du monde touché par l'obésité [8].

II.1.3. Complications à moyen et long terme

Contrairement à l'adulte, les complications somatiques chez l'enfant obèse sont rares et ont pour la plupart peu de conséquences immédiates. Certaines d'entre elles nécessitent cependant d'être dépistées et prises en charge le plus précocement possible (complications respiratoires telles que syndrome d'apnées du sommeil, asthme ; complications orthopédiques comme l'épiphyse de la tête fémorale notamment) [9, 10].

Les anomalies métaboliques sont aussi décrites [11, 12]. Quelque soit la définition utilisée pour l'insulinorésistance, elle atteint environ la moitié des enfants et adolescents obèses. L'importance de la masse grasse abdominale, associée à l'inflammation de bas grade, augmente le risque de survenue de l'insulinorésistance, en particulier en cas de susceptibilité génétique, familiale ou ethnique [13, 14]. La fréquence des troubles glucidiques reste faible chez l'enfant et l'adolescent obèses (3,6% d'intolérance au glucose et 0,5-1% d'hyperglycémie à jeun) [13, 14]. Selon les définitions choisies et les populations étudiées, la prévalence totale du syndrome métabolique est très variable, allant de 3,6 à 34,5% des enfants et adolescents obèses [12, 14, 15].

La majorité des enfants et adolescents obèses deviennent des adultes obèses. En effet, plus de la moitié des enfants obèses de 6 ans et 70 à 80 % des enfants de plus de 10 ans restent obèses à l'âge adulte, alors que seuls 10 % des enfants du même âge et de poids normal le deviennent [16]. L'obésité a d'ailleurs d'autant plus de risque de persister à l'âge adulte qu'elle se prolonge durant l'enfance et/ou qu'il existe une obésité parentale [16, 17]. Or, l'existence de l'obésité à l'âge adulte augmente le risque de complications ou de comorbidités (syndrome métabolique, maladies cardiovasculaires, diabète de type 2 et ses complications associées rénales et rétinienues, apnées du sommeil,...) [18, 19]. La perte de poids pourrait protéger contre l'apparition de ces complications et réduire la mortalité. Cependant, la prise en charge par des programmes de régimes restrictifs et contrôlés associés à de l'activité physique n'a pas montré d'effets bénéfiques à long terme, chez l'adulte, en cas d'obésité sévère. La chirurgie bariatrique (bypass gastrique, anneau gastrique ou gastroplastie verticale) est par contre associée à une réduction à long terme de la mortalité globale et réduit l'incidence du diabète, des maladies cardiovasculaires et du cancer [20].

Il semble donc indispensable de mettre en évidence les mécanismes physiopathologiques intervenant dans l'obésité, en particulier les facteurs précoces, afin de mettre en place des mesures thérapeutiques, mais aussi préventives, les mieux adaptées, le plus précocement possible.

II.2. Contrôle de la balance énergétique

L'obésité résulte d'un déséquilibre prolongé de la balance énergétique. L'excès d'énergie en cas de balance énergétique positive est alors stocké dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides. L'adéquation exacte entre la dépense énergétique totale et un apport énergétique approprié repose sur un système intégratif complexe dans lequel interviennent des signaux multiples et des interactions à médiations nerveuses, humorales et hormonales entre le système nerveux central (SNC), en particulier l'hypothalamus, et les tissus périphériques (en particulier, les tissus adipeux, musculaire et hépatique). La prise alimentaire peut donc être considérée comme une réponse intégrée complexe. L'instant où nous mangeons est généralement déterminé par des habitudes, commodités ou opportunités et les repas sont précédés par la sécrétion de nombreuses hormones (ghréline, cholécystokinine (CCK),...) qui préparent le tube digestif à un apport calorique. La quantité que nous mangeons, quant à elle, est déterminée par des hormones sécrétées en réponse aux nutriments ingérés (insuline, GLP-1 (glucagon-like peptide-1),...) et par la leptine, hormone d'adiposité corrélée à la masse grasse, indicateur de la réserve énergétique permettant la régulation du poids corporel à long terme. De plus, tous ces signaux qui contrôlent la prise alimentaire interagissent avec de nombreux facteurs non homéostatiques, tels que la palatabilité, le stress, le contexte psychologique et les influences sociales [21].

De nombreuses molécules de type « signal » renseignent le cerveau sur l'état des stocks énergétiques. Ces principaux signaux peuvent être classés en deux catégories: 1/ ceux qui jouent un rôle à court terme, principalement le glucose et les hormones gastro-intestinales (CCK, ghréline,...), qui sont surtout impliqués dans le déclenchement ou l'arrêt du repas ; 2/ ceux qui agissent à plus long terme comme l'insuline et la leptine qui vont moduler les réponses induites par les précédents. L'intégration de ces signaux aboutit à la production de réponses physiologiques spécifiques et coordonnées ayant pour but de réguler la balance énergétique grâce à la modulation de l'appétit et de la dépense énergétique [22].

Les cellules endocrines gastro-intestinales sécrètent des hormones de satiété en réponse à la consommation d'aliments et à la digestion. Ces hormones suppriment la sensation de faim à l'aide principalement de circuits du cerveau postérieur qui gouvernent le comportement alimentaire, repas par repas. Par contraste, l'hypothalamus intègre des signaux d'adiposité qui régulent la balance énergétique à long terme et le poids corporel [23]. Tout déséquilibre de cette balance va entraîner la mise en jeu de systèmes, anaboliques ou cataboliques, de

régulation de la prise alimentaire et de la dépense énergétique par l'intermédiaire de circuits neuronaux hypothalamiques variés ayant pour objectif le rééquilibrage de la balance énergétique [24, 25] (Figure 2, page 30). Dans l'hypothalamus médiobasal, élément fondamental de contrôle de la balance énergétique, et plus précisément dans le noyau arqué, il existe au moins 2 populations majeures de neurones qui régulent l'appétit et la dépense énergétique: les neurones POMC/CART (proopiomélanocortine/cocain- and amphetamine-related transcript) et les neurones NPY/AGRP (neuropeptide Y/agouti-related protein). Ces deux populations neuronales sont d'importants intégrateurs des signaux hormonaux et neuronaux métaboliquement significatifs et agissent de façon antagoniste pour influencer la balance énergétique. Les neurones NPY/AGRP sont de puissants stimulateurs de la prise alimentaire, tandis que les neurones POMC/CART sont des agents anorexigènes [26]. Ces 2 populations neuronales constituent le **système mélanocortine**, en association avec leurs neurones cibles situés en aval et exprimant les récepteurs aux mélanocortines de type 4 et 3, MC4R et MC3R (melanocortin receptor type 4 et 3).

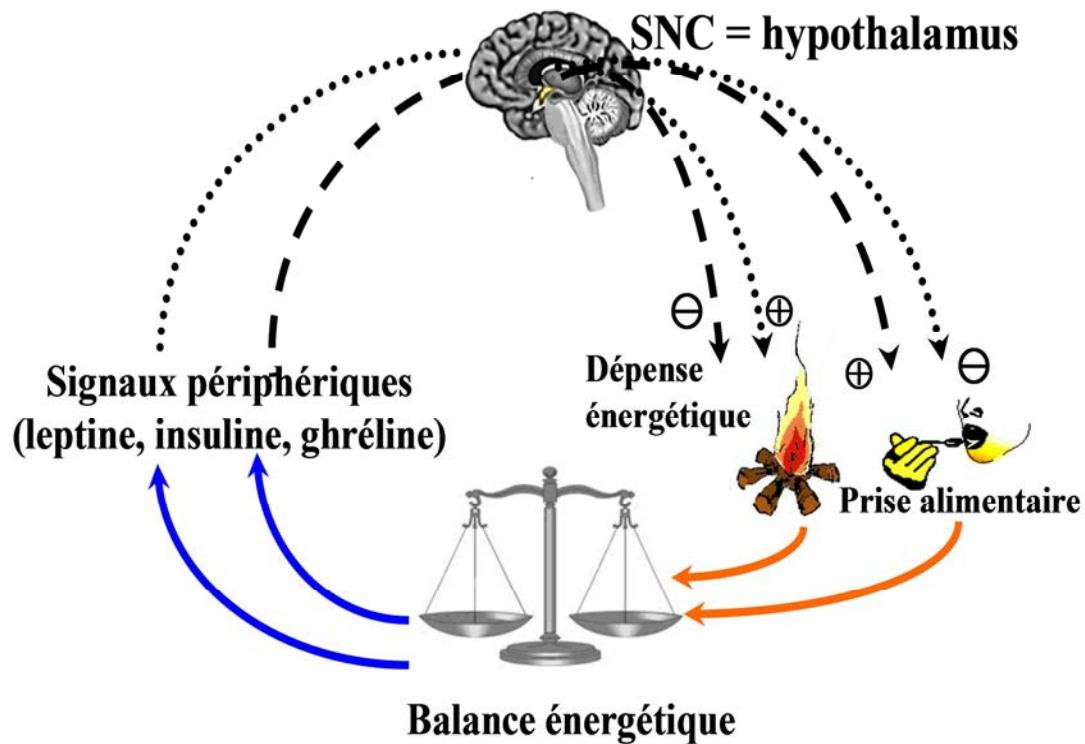


Figure 2: Contrôle de la balance énergétique (d'après [24]).

Les signaux d'adiposité (leptine, insuline) et la ghréline informent l'hypothalamus sur l'état des stocks énergétiques. Ce dernier intègre ces informations et module la prise alimentaire et la dépense énergétique par l'intermédiaire de systèmes effecteurs. Les signaux d'adiposité ont un effet anorexigène. La ghréline a l'effet inverse.

II.2.1. Les signaux d'adiposité

Les signaux d'adiposité sont des hormones dont la sécrétion est proportionnelle au niveau de graisse corporelle. Ils ont pour but de renseigner l'hypothalamus sur l'état des stocks énergétiques. Il s'agit principalement de la leptine et de l'insuline. Ces 2 hormones agissent sur des récepteurs spécifiques au niveau des neurones hypothalamiques et engendrent une nette action catabolique [21].

a. La leptine

La découverte de la leptine, produit du gène *ob* (obese, mouse, homolog of), en 1994, a ouvert une nouvelle dimension dans la compréhension de la régulation centrale de la balance

énergétique [27]. La leptine est une adipokine, hormone sécrétée par l'adipocyte du tissu adipeux blanc, qui circule dans le sang et agit au niveau du système nerveux central. Elle est la principale hormone impliquée dans le contrôle à long terme de la prise alimentaire et de la dépense énergétique et a une action anorexigène. Sa production et sa concentration plasmatique sont corrélées à la quantité corporelle de masse grasse et à la taille cellulaire adipocytaire et reflètent donc l'état des réserves énergétiques [28, 29]. Quand la masse grasse diminue, les concentrations plasmatiques de leptine diminuent, ce qui stimule l'appétit et réduit la dépense énergétique jusqu'à ce que la masse grasse soit restaurée. En cas d'augmentation des réserves énergétiques, et donc de la masse grasse, les concentrations de leptine augmentent, ce qui inhibe l'appétit jusqu'à ce que l'excès de poids soit reperdu. Ce système entretient le contrôle homéostatique de la masse du tissu adipeux.

La leptine véhicule des informations sur le statut énergétique de l'organisme, atteint le SNC et agit au niveau de l'hypothalamus, en particulier du noyau arqué, par l'intermédiaire de son récepteur spécifique, LEPR (leptin receptor), appartenant à la classe I de la famille des récepteurs aux cytokines. La fixation de la leptine à son récepteur induit une inhibition de l'appétit (Figure 3, page 32). Une des voies principales de signalisation de la leptine est la phosphorylation activatrice du facteur de transcription STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), ce qui stimule l'expression du gène *POMC* et inhibe l'expression du gène *AGRP* [29, 30]. De plus, la leptine, tout comme l'insuline, active la PI3K (phosphatidylinositol-3-kinase) au niveau des neurones POMC du noyau arqué responsables d'une diminution de la prise alimentaire [26, 31].

L'invalidation du gène de la leptine (*LEP*) ou de son récepteur (*LEPR*), respectivement chez les souris *ob/ob* et *db/db*, est responsable d'un tableau d'obésité sévère avec hyperphagie, réduction de la dépense énergétique et anomalies endocriniennes (hypogonadisme) [27, 32]. Le traitement par leptine chez les souris *ob/ob* corrige le phénotype d'obésité, en diminuant la prise alimentaire et en augmentant la dépense énergétique, et l'infertilité [33]. Or, la plupart des patients obèses (obésité commune) ont une résistance à la leptine, qui est caractérisée par l'incapacité de concentrations circulantes élevées de leptine à exercer leurs actions centrales anorexigènes, ce qui empêche l'utilisation de la leptine comme approche thérapeutique dans l'obésité commune [22].

En plus du tissu adipeux, la leptine est également produite par le placenta, les ovaires, le muscle squelettique, l'estomac, les cellules épithéliales mammaires, la moelle osseuse, l'hypophyse et le foie. Ses concentrations sériques présentent des modifications significatives

en fonction du stade de développement pubertaire [34]. La leptine possède d'autres effets biologiques périphériques puisqu'elle intervient dans la régulation du métabolisme osseux, de la croissance staturale, du système immunitaire, de l'angiogénèse et de la fonction gonadotrope, mais aussi probablement dans la cognition et la mémoire [35, 36]. Elle joue également un rôle dans la croissance des axones du noyau arqué, dans la synaptogénèse et la neurogénèse et dans la modulation des entrées excitatrices et inhibitrices du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus (NPV) [37].

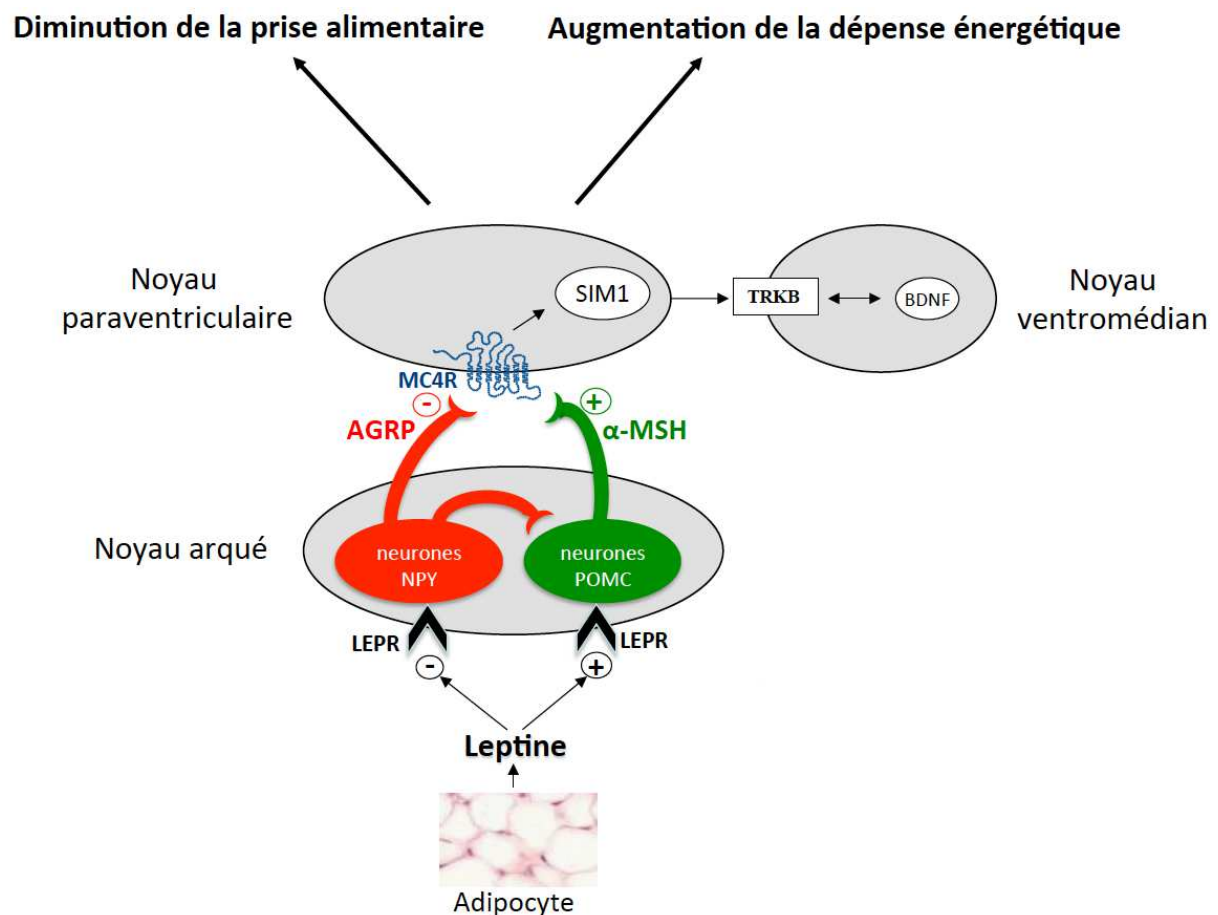


Figure 3: Voie de signalisation leptine-mélanocortines.

La leptine active les neurones POMC (proopiomélanocortine) dans le noyau arqué de l'hypothalamus qui produisent alors l' α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone). L' α -MSH active le récepteur MC4R (récepteur de type 4 aux mélanocortines) dans le noyau paraventriculaire aboutissant à un signal de satiété. Un autre groupe de neurones exprimant NPY et AGRP produisent des molécules agissant comme de puissants inhibiteurs du signal MC4R.

AGRP: agouti-related protein ; BDNF: brain-derived neurotropic factor ; LEPR: leptin receptor ; α -MSH: α -melanocyte stimulating hormone ; NPY: neuropeptide Y ; POMC: proopiomélanocortine ; SIM1: single-minded homolog 1 ; TRKB: tyrosine kinase receptor B

b. L'insuline

L'insuline est traditionnellement associée au métabolisme glucidique mais elle agit également comme un signal anorexigène dans le SNC. La sécrétion d'insuline par les cellules β pancréatiques est dépendante de la glycémie à court terme et du degré d'adiposité à long terme [38]. Comme la leptine, mais avec un effet moindre, l'absence d'insuline est associée à une hyperphagie. Par contre, l'administration chronique intracérébroventriculaire (ICV) d'insuline chez l'animal induit une baisse significative de la prise alimentaire, aboutissant à une perte de poids [39].

L'insuline agit par liaison à son récepteur spécifique (IS-R, insulin receptor), qui est exprimé dans l'hypothalamus et présente une localisation commune avec les neurones POMC et AGRP. Cette liaison entraîne l'activation de voies effectrices en aval, telles que la PI3K comme la leptine, responsable d'une réduction de l'expression du neuropeptide NPY et une augmentation de l'expression de POMC dans le noyau arqué ce qui engendre une diminution de la prise alimentaire [40].

La leptine et l'insuline régulent également l'activité de l'AMPK (5' adenosine monophosphate-activated protein kinase) qui joue un rôle central dans la régulation hypothalamique de l'homéostasie énergétique [41]. Ces 2 hormones inhibent l'AMPK et ses cibles en aval dans l'hypothalamus, ce qui est nécessaire pour leur action sur la prise alimentaire [42].

II.2.2. Les autres signaux périphériques

Parallèlement à l'insuline et à la leptine, le système nerveux central reçoit d'autres signaux périphériques provenant du tube digestif et du tissu adipeux lui permettant une adaptation de la prise alimentaire à court terme (rythme et fréquence des repas).

a. La ghréline

La ghréline est sécrétée principalement par la paroi gastrique et est la seule hormone orexigène circulante. Sa sécrétion augmente en période de jeûne, avec un pic environ 30 minutes avant le repas, puis est interrompue après le repas [43]. Chez l'animal, son administration centrale et périphérique entraîne une augmentation dose-dépendante de la prise alimentaire et par conséquent de l'adiposité et du poids corporel [44]. De même, la ghréline stimule l'appétit chez l'homme [45].

La ghréline exerce ses actions biologiques sur la balance énergétique par l'intermédiaire de son récepteur GHS-R (growth hormone secretagogue receptor) qui est exprimé dans les neurones AGRP du noyau arqué de l'hypothalamus. Elle stimule la transcription de NPY et AGRP, augmente le nombre de synapses stimulatrices des neurones AGRP et à l'inverse augmente le nombre de synapses inhibitrices des neurones POMC [44, 46]. Elle engendre donc une augmentation de l'expression du neuropeptide NPY et un blocage de l'effet anorexigène de la leptine [44, 47].

b. Autres signaux périphériques

D'autres signaux, sécrétés en particulier par les cellules du tube digestif, communiquent des informations sur le statut de la balance énergétique au SNC, principalement à l'hypothalamus. Ils sont impliqués dans le contrôle à court terme de la prise alimentaire, surtout en diminuant le signal hypothalamique orexigène et en augmentant le signal anorexigène mais aussi en agissant sur la vidange gastrique, la sécrétion gastrique acide ou la motilité intestinale. Ils ne jouent qu'un rôle mineur dans le contrôle à long terme de la balance énergétique.

Il s'agit, entre autres, de la cholécystokinine, des peptides PP (polypeptide pancréatique) et PYY(3-36) (peptide tyrosine-tyrosine(3-36)), de l'oxyntomoduline (OXM) ou du GLP-1 [48-50] (Tableau 1, page 35).

L'adiponectine est, quant à elle, une adipokine produite par les adipocytes du tissu adipeux. Elle est sécrétée en proportion inverse à la graisse corporelle. Sa sécrétion est stimulée par l'insuline. Son action au niveau du SNC a pour but d'augmenter la dépense énergétique [21].

Tableau 1: Peptides issus du tube digestif jouant un rôle dans le contrôle à court terme de la prise alimentaire (d'après [49, 50]).

Peptide	Type cellulaire	Effet sur la prise alimentaire
Amyline	Cellules β pancréatiques	↓
APO-AIV	Entérocytes	↓
Bombésine/GRP	Estomac	↓
CCK	Cellules I (duodénum, jéjunum)	↓
Entérostatine	Pancréas exocrine	↓
Ghréline	Estomac (fundus)	↑
GLP-1	Cellules L (iléon, colon)	↓
Glucagon	Cellules α pancréatiques	↓
Insuline	Cellules β pancréatiques	↓
Leptine gastrique	Estomac (fundus)	↓
NAPE	Intestin grêle	↓
Oxyntomoduline	Cellules L (iléon, colon)	↓
PP	Ilôts pancréatiques	↓
PYY(3-36)	Cellules L (iléon, colon)	↓

APO-AIV: apolipoprotéine A IV ; CCK: cholécystokinine ; GLP-1: glucagon-like peptide-1 ; GRP: gastrin releasing peptide ; NAPE: N-acylphosphatidyléthanolamine ; PP: polypeptide pancréatique ; PYY(3-36): peptide tyrosine-tyrosine(3-36)

II.2.3. Le système mélanocortine

Les différents signaux périphériques (leptine, insuline, ghréline,...) agissent au niveau du système nerveux central, en particulier au niveau de l'hypothalamus et de son noyau arqué qui joue un rôle clé dans l'intégration de ces signaux dans le but de réguler l'homéostasie énergétique [38]. Le noyau arqué est situé sous le plancher du 3^{ème} ventricule et sa partie inférieure est en dehors de la barrière hémato-méningée, cette localisation privilégiée lui permettant d'être le premier 'senseur' des signaux périphériques. Il contient en particulier deux types de neurones qui jouent un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire et de l'homéostasie énergétique: 1/ les neurones orexigènes NPY/AGRP qui, lorsqu'ils sont activés, conduisent à augmenter la prise alimentaire et à diminuer la dépense énergétique ; et 2/ les neurones anorexigènes POMC/CART qui au contraire conduisent à diminuer la prise alimentaire et à augmenter la dépense énergétique [28]. La leptine et l'insuline, mais aussi la ghréline, agissent au niveau de ces deux populations neuronales qui expriment leurs récepteurs spécifiques (LEPR, IS-R et GHS-R respectivement). La leptine et l'insuline stimulent les neurones anorexigènes et inhibent les neurones orexigènes aboutissant à une diminution de la prise alimentaire, tandis que la ghréline a l'effet inverse. Les neurones POMC et AGRP sont donc tous les 2 capables de réagir aux nombreux signaux d'origine périphérique (leptine, insuline, ghréline) mais aussi centrale (NPY, GABA (acide γ -aminobutyrique), sérotonine et mélanocortine) en modulant leur activité électrique ce qui influencera la libération de neuropeptides et de neurotransmetteurs qui au final réguleront la prise alimentaire et la dépense énergétique [22] (Figure 4, page 37). Ces circuits neuronaux hypothalamiques, associés aux neurones cibles en aval exprimant les récepteurs aux mélanocortines MC3R et MC4R, constituent le **système mélanocortine** et jouent un rôle clé dans le contrôle de la balance énergétique [51, 52].

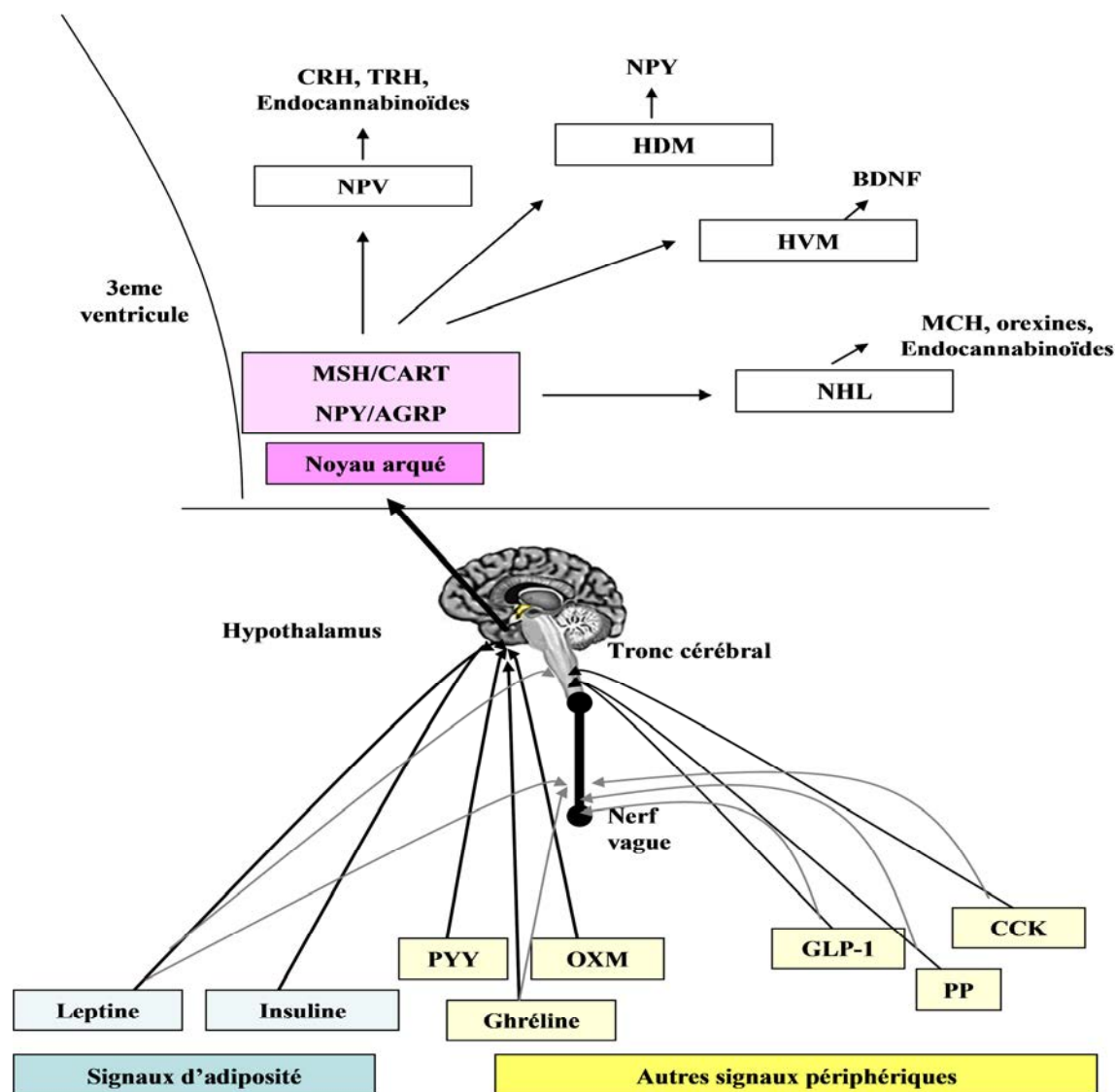


Figure 4: Intégration des signaux périphériques au niveau du système nerveux central.

Les signaux périphériques informent le système nerveux central, et en particulier le noyau arqué hypothalamique, de l'état des stocks énergétiques. Ces informations sont intégrées puis entraînent une modulation de l'activité de plusieurs populations neuronales impliquées dans le contrôle de la balance énergétique.

AGRP: agouti-related protein ; BDNF: brain-derived neurotrophic factor ; CART: cocain- and amphetamine-related transcript ; CCK: cholécystokinine ; CRH: corticotrophin releasing hormone ; GLP-1: glucagon-like peptide-1 ; HDM: hypothalamus dorsomédian ; HVM: hypothalamus ventromédian ; MCH: melanin concentrating hormone ; MSH: melanocyte stimulating hormone ; NHL: noyau hypothalamique latéral ; NPV: noyau paraventriculaire ; NPY: neuropeptide Y ; OXM: oxyntomoduline ; PP: polypeptide pancréatique ; PYY: peptide tyrosine-tyrosine ; TRH: thyrotropin releasing hormone

Le chef de file du système mélanocortine est POMC. La proopiomélanocortine est une prohormone qui est clivée, par des proconvertases (PC1 et 2), en différents peptides biologiquement actifs dans l'hypothalamus: les mélanocortines (α -, β -, γ -MSH (melanocyte stimulating hormone) et ACTH (adrénocorticotrophine)) et les β -endorphines [53]. Les peptides issus du clivage de POMC agissent ensuite sur les récepteurs aux mélanocortines dont il existe cinq types: MC1R à MC5R. Au niveau de la peau, les mélanocortines jouent un rôle clé dans la pigmentation via MC1R. L'ACTH agit par l'intermédiaire de MC2R au niveau de l'hypophyse antérieure et est un facteur-clé de l'axe corticotrope. Au niveau de l'hypothalamus, l' α -MSH influence l'appétit et le comportement alimentaire via son action sur les récepteurs MC3R et surtout MC4R. Enfin, MC5R, d'expression plus ubiquitaire, joue un rôle dans la sécrétion des glandes exocrines [51, 53] (Figure 5, page 38).

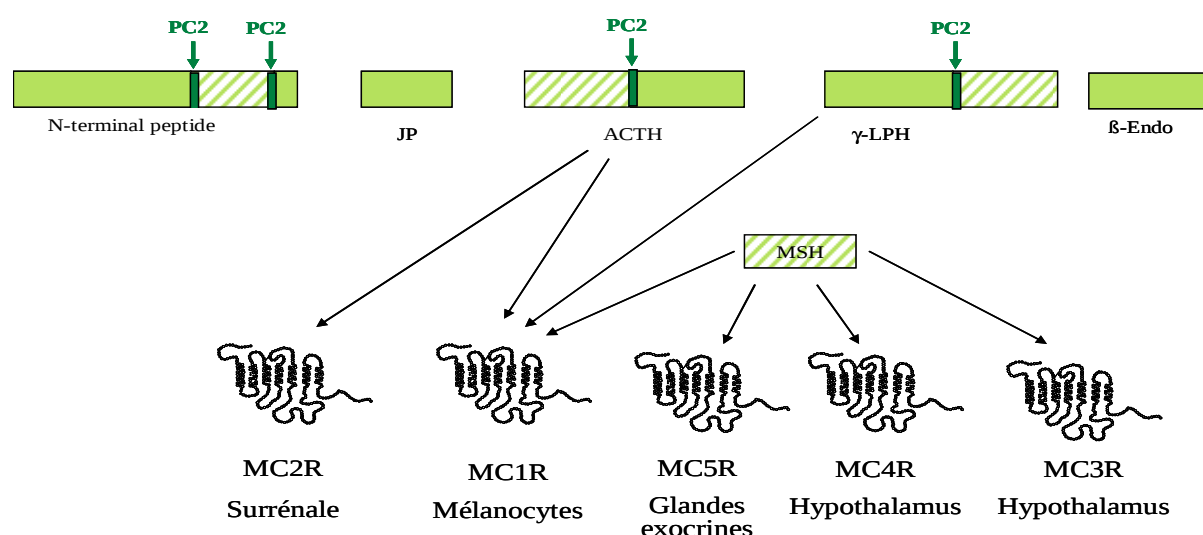


Figure 5: Sites d'action des principaux peptides issus du clivage de la proopiomélanocortine (POMC).

L'ACTH (adrénocorticotrophine) agit au niveau de MC2R et joue un rôle-clé dans l'axe corticotrope. L'ACTH, la γ -LPH (γ -lipoprotein hormone) et l' α -MSH (α -melanocyte stimulating hormone) ont un rôle dans la pigmentation via MC1R. L' α -MSH agit au niveau de l'hypothalamus via MC4R et MC3R.

β -Endo: β -endorphines ; JP: joint peptide ; MC1-5R: récepteurs aux mélanocortines de type 1 à 5 ; MSH: melanocyte stimulating hormone ; PC2: proconvertase 2

MC4R possède un rôle central dans le système mélanocortine et par conséquent dans l'homéostasie énergétique [54]. C'est un récepteur couplé à la protéine G, composé de 7 domaines transmembranaires. L'activation de MC4R par l' α -MSH induit une baisse de l'appétit et de la prise alimentaire alors que l'AGRP est un agoniste inverse de MC4R entraînant un effet orexigène [55, 56]. La variation du rapport α -MSH/AGRP au niveau hypothalamique est donc responsable de la modulation de la prise alimentaire médiée par MC4R [24]. Le rôle de MC3R dans le contrôle de la prise alimentaire est à ce jour moins bien établi que celui de MC4R [51, 57].

Au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus, les signaux d'adiposité (leptine, insuline) se fixent sur leurs récepteurs spécifiques exprimés par les neurones POMC/CART, stimulent la synthèse de POMC et parallèlement inhibent la synthèse de NPY et d'AGRP [22, 51] (Figure 6, page 40). L' α -MSH et l'AGRP, tous deux produits dans le noyau arqué, exercent leurs actions antagonistes au niveau des neurones du noyau paraventriculaire en modulant l'activité du récepteur MC4R. De plus, au sein du noyau arqué, les neurones NPY/AGRP se projettent sur les neurones POMC/CART et modulent leur activité par l'intermédiaire du neurotransmetteur GABA [58, 59]. Ainsi, la leptine a deux actions au niveau du noyau arqué: 1/ stimulation des neurones POMC et inhibition des neurones NPY/AGRP par l'intermédiaire de sa fixation sur LEPR ; mais aussi 2/ inhibition de la libération de GABA par les neurones NPY se projetant sur les neurones POMC avec ainsi stimulation de ces derniers [60, 61]. L'action de la ghréline, quant à elle, sur la prise alimentaire et la balance énergétique est médiée par les neurones AGRP. La ghréline dépolarise les neurones AGRP et augmente le nombre de synapses inhibitrices GABAergiques sur les neurones POMC [62, 63].

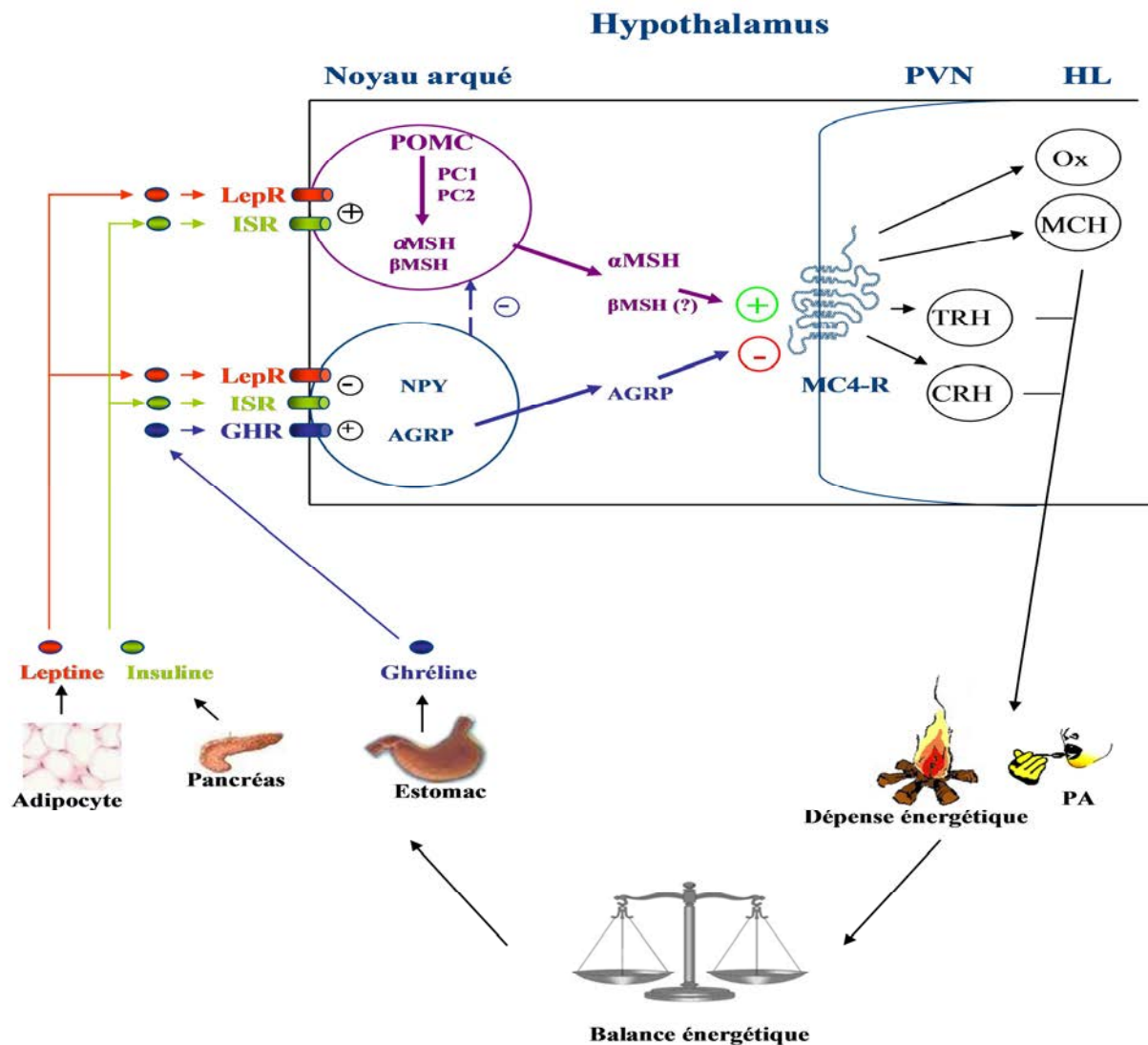


Figure 6: Rôle du système mélanocortine dans le contrôle de la balance énergétique.

Les signaux d'adiposité (leptine et insuline) et la ghréline se lient sur leurs récepteurs spécifiques au niveau des neurones POMC/CART et des neurones NPY/AGRP du noyau arqué. La variation du rapport α MSH/AGRP au niveau de l'hypothalamus module l'activité de MC4R. Ce dernier régule l'activité de plusieurs populations neuronales en aval qui agissent sur les systèmes effecteurs modulant la balance énergétique.

AGRP: agouti related protein ; CRH: corticotrophin releasing hormone ; GH-R: récepteur de la ghréline ; HL: hypothalamus latéral ; IS-R: récepteur de l'insuline ; LepR: récepteur de la leptine ; MCH: melanin concentrating hormone ; MC4R: récepteur de type 4 aux mélanocortines ; α -, β -MSH: α -, β -melanocyte stimulating hormone ; NPV: noyau paraventriculaire ; NPY: neuropeptide Y ; Ox: orexines ; PA: prise alimentaire ; PC: proconvertase ; POMC: proopiomélanocortine ; TRH: thyrotropin releasing hormone

Le rôle central du système mélanocortine dans l'homéostasie énergétique et pondérale a d'abord été prouvé chez l'animal. L'inactivation de POMC chez la souris induit une obésité sévère associée à des troubles de la pigmentation par déficit en α -MSH et à une insuffisance corticotrope par déficit en ACTH [64]. De même, la surexpression d'AGRP entraîne un tableau d'obésité [65], tandis que la destruction spécifique des neurones exprimant l'AGRP est responsable d'une baisse de la prise alimentaire et d'une perte de poids avec réduction de la masse grasse corporelle totale [66]. Les souris présentant une inactivation homozygote du gène *MC4R* (*MC4R*^{-/-}) développent une obésité morbide apparaissant à l'âge mature, associée à une hyperphagie, une hyperinsulinémie et une hyperglycémie. Les souris hétérozygotes *MC4R*^{+/-} ont, quant à elle, une obésité intermédiaire entre celle des souris non mutées et celle des souris homozygotes [67]. Enfin, le rôle spécifique du noyau paraventriculaire dans la régulation de la prise alimentaire via MC4R a aussi été démontré. En effet, l'inhibition spécifique des neurones exprimant MC4R a montré que seuls les neurones du NPV étaient impliqués dans la régulation de la prise alimentaire chez l'animal, alors que la régulation de la dépense énergétique passait par d'autres populations neuronales [68].

Plusieurs populations neuronales ont des connexions avec les neurones du système mélanocortine (Figure 6, page 40). C'est le cas des neurones à MCH (melanin concentrating hormone) ou des neurones à orexines. Les neurones à MCH sont situés dans l'hypothalamus latéral et ont de nombreuses connexions avec les neurones NPY/AGRP et POMC/CART. Ils sont considérés comme un des effecteurs majeurs des signaux provenant du noyau arqué en réponse aux modifications des signaux d'adiposité [24, 69]. L'injection ICV répétée de MCH a une action orexigène tandis que l'utilisation d'antagonistes du récepteur de MCH a une action anorexigène. Les orexines, produites dans l'hypothalamus latéral, ont elles aussi une action orexigène. Enfin, le CRH (corticotrophin releasing hormone) ou le TRH (thyrotropin releasing hormone) sont quant à eux synthétisés au niveau du NPV et ont entre autre des actions anorexigènes. Parallèlement à son action en réponse au stress, le CRH a un rôle anorexigène et catabolique. En effet, l'injection ICV de CRH diminue la prise alimentaire et la prise de poids, induit une activité locomotrice et stimule la thermogénèse du tissu adipeux brun et la lipolyse médiée par le système sympathique [37]. De plus, la leptine augmente l'expression du gène *CRH* dans le noyau paraventriculaire et le CRH inhibe directement les neurones NPY/AGRP et l'expression du gène *NPY* [70]. De même, NPY réduit l'expression du gène *TRH* tandis que la leptine, l' α -MSH et le CART en augmentent directement l'expression [37].

II.2.4. Les autres voies hypothalamiques impliquées

En plus du système mélanocortine, il existe d'autres systèmes qui ont également un rôle important dans le contrôle de la balance énergétique, tels que les monoamines et les endocannabinoïdes.

a. Les monoamines

Les neurotransmetteurs monoaminergiques (dopamine, noradrénaline, sérotonine) exercent un effet sur l'appétit et sont des cibles thérapeutiques dans l'obésité. Cependant, leurs rôles respectifs dans le contrôle de la prise alimentaire sont complexes et leurs interactions avec les voies de régulation précédemment décrites restent peu claires. Le système sérotonine a un effet anorexigène en partie par stimulation des neurones POMC. Les neurotransmetteurs monoaminergiques interagissent avec les neuropeptides NPY et α -MSH dans l'hypothalamus et avec les hormones périphériques afin de contrôler les états physiologiques de faim et de satiété [71].

La sérotonine diminue la prise alimentaire et la prise de poids, en agissant principalement sur son récepteur 5-HT_{1B} (5-hydroxytryptamine receptor 1B). La dopamine régule la faim et la satiété en agissant sur des aires hypothalamiques spécifiques par l'intermédiaire de ses récepteurs D1 et D2. L'activation par la noradrénaline des récepteurs adrénergiques α 1 et β 2 diminue la prise alimentaire tandis que celle du récepteur α 2 augmente la prise alimentaire [72]. Ainsi, des inhibiteurs du captage de la noradrénaline, comme la phentermine, ont été utilisés dans le traitement de l'obésité, ainsi que des médicaments à effet combiné sérotoninergique et noradrénergique, comme la sibutramine. Mais leurs effets secondaires marqués, notamment cardiovasculaires, ont entraîné leur retrait du marché [71]. A ce jour, de nouvelles molécules sont en cours de développement, telles que la tésofensine, qui est un inhibiteur triple du recaptage de la noradrénaline, de la sérotonine et de la dopamine. Ce traitement, chez le rat obèse, provoque une réponse prononcée anorexigène avec perte de poids [73]. De même, la lorcasérine, agoniste du récepteur 2C de la sérotonine, réduirait significativement le poids et la masse grasse et améliorerait les paramètres cardiovasculaires et métaboliques, tels que la pression artérielle, la dyslipidémie et l'hémoglobine glyquée chez le rat obèse [74, 75].

b. Le système endocannabinoïde

Le système endocannabinoïde joue aussi un rôle important dans le contrôle de la prise alimentaire. Les endocannabinoïdes, synthétisés à partir de l'acide arachidonique, agissent sur des récepteurs spécifiques, CB1 et CB2, couplés à la protéine G et ont une action orexigène [76]. Cette action serait liée en partie à l'inhibition des neurones à CRH et à la stimulation des neurones à orexines [77]. La leptine diminue les concentrations d'endocannabinoïdes alors que la ghréline et les glucocorticoïdes les augmentent [76].

Un antagoniste spécifique du récepteur CB1, le rimonabant, a été développé dans le traitement de l'obésité en raison de son action anorexigène. Mais les effets secondaires psychiatriques sévères (dépression, idées suicidaires,...) ont ensuite entraîné son retrait du marché [77]. Néanmoins, un grand intérêt persiste pour la compréhension du rôle du système endocannabinoïde dans la régulation énergétique.

II.3. Obésité: physiopathologie et déterminants génétiques

L'obésité est secondaire à un bilan énergétique positif prolongé, l'énergie excédentaire étant mise en réserve dans le tissu adipeux. Les déterminants à l'origine du déséquilibre de la balance énergétique sont nombreux et les facteurs génétiques y jouent un rôle non négligeable, en interaction avec les facteurs environnementaux. L'influence des facteurs génétiques dans la capacité d'un individu à prendre du poids en réponse aux changements environnementaux a été principalement analysée par les études d'épidémiologie génétique (expériences de suralimentation de jumeaux monozygotes, par exemple) [78-80]. Il est maintenant bien accepté que le développement de l'obésité résulte d'une interaction entre des facteurs génétiques et de multiples facteurs non génétiques environnementaux. Quarante à 70% de la variation de l'IMC seraient expliqués par les facteurs génétiques [81]. L'obésité est donc caractérisée par une large hétérogénéité phénotypique et il existe des différences individuelles dans la progression pondérale et le risque de survenue de comorbidités [82].

L'expression phénotypique des facteurs génétiques impliqués dans l'obésité permet de distinguer différentes situations cliniques:

a) l'obésité monogénique définie par une obésité rare, sévère, à début précoce associée à des anomalies endocriniennes. L'impact de la génétique y est majeur et très peu dépendant des facteurs environnementaux. Elle est le plus souvent causée par des mutations des gènes de la voie leptine-mélanocortines impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (gènes de la

leptine (*LEP*) et de son récepteur (*LEPR*), de la proopiomélanocortine (*POMC*), de la proconvertase 1 (*PC1*)...) (Figure 6, page 40).

b) l'obésité syndromique qui associe une obésité sévère à début précoce à des atteintes développementales (retard mental, dysmorphie, malformations d'organe, atteintes neurosensorielles et/ou endocriniennes).

c) l'obésité oligogénique, comme celle due aux mutations du gène *MC4R*, caractérisée par une obésité de sévérité variable, dépendante en partie des facteurs de l'environnement (IMC variable allant de 18-25 kg/m² à > 40 kg/m²), et l'absence de phénotype spécifique associé. Elle est responsable de 2-3% des obésités de l'enfant et de l'adulte, la majorité de ces mutations étant hétérozygotes [54].

d) l'obésité polygénique (obésité commune), la situation clinique la plus fréquente. Il existe un effet cumulatif de facteurs de prédisposition génétique et de facteurs environnementaux. Ainsi, dans ce cas, chaque gène de susceptibilité, pris individuellement, n'a que de faibles effets sur le poids, et la contribution cumulative de ces gènes ne devient significative qu'en interaction avec des facteurs environnementaux prédisposant à leur expression phénotypique (suralimentation, sédentarité, stress) [83, 84].

En plus des facteurs génétiques, les facteurs environnementaux et les aspects comportementaux (apports énergétiques et activité physique) jouent en complément un rôle essentiel. Ils comprennent:

1/ des **déterminants précoces** au cours desquels des phénomènes épigénétiques jouent probablement un rôle clé ;

2/ des **déterminants sociétaux**: l'industrialisation, l'urbanisation, les progrès technologiques et le développement des moyens de communication des dernières décennies ont de toute évidence procuré des conditions idéales pour permettre le développement de l'obésité. Le mode d'alimentation (densité calorique des repas et des portions, diversité et disponibilité de la nourriture, abondance et promotion des aliments riches en graisses et en sucres, déstructuration des rythmes alimentaires,...) et le niveau d'activité physique (motorisation, sédentarisation, nombre d'heures passées devant la télévision ou l'ordinateur,...) ont en effet été tous deux bouleversés ces dernières décennies ;

3/ des **déterminants psychologiques**: le divorce des parents, un décès dans la famille, un changement de mode de vie, des soucis à l'école,..., peuvent être des facteurs déclenchants qui révèlent ou aggravent une prédisposition à l'obésité. Des difficultés précoces dans l'attachement maternel et d'éventuels traumatismes peuvent être en cause dans le

développement de troubles du comportement alimentaire qui favorisent la constitution et/ou le maintien d'une obésité.

L'identification de nouveaux déterminants génétiques intervenant dans l'obésité est de grande importance afin de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de l'obésité et de la biologie de la balance énergétique. Les obésités génétiques rares, très peu dépendantes de l'environnement, sont donc importantes à détecter et à explorer dans le but de mettre en évidence ces nouveaux facteurs génétiques.

II.3.1. Déterminants génétiques dans l'obésité

Dans le but de déterminer les facteurs génétiques impliqués dans l'obésité, différentes stratégies d'approche moléculaire ont été utilisées (Figure 7, page 48).

L'approche 'gène candidat' a été l'une des premières utilisées. Elle est basée sur des connaissances biochimiques préexistantes ou sur des expérimentations animales et consiste à étudier des gènes codant pour des protéines susceptibles d'intervenir dans la physiopathologie de la maladie. La réalisation d'études d'association (recherche d'une relation entre le phénotype étudié et le génotype des sujets pour le variant étudié) ou la recherche systématique de mutations dans le gène suspecté permet alors de le mettre en cause ou non dans la maladie étudiée. Le choix d'un candidat repose sur plusieurs arguments, incluant le rôle physiologique de son produit protéique dans les mécanismes de l'obésité, sa localisation chromosomique dans une région du génome liée à l'obésité chez l'homme ou l'animal (régions dites QTL (quantitative trait loci)), les conséquences de son invalidation génique (KO, knock-out) ou de sa surexpression (transgénèse) chez le rongeur ou encore les caractéristiques fonctionnelles *in vitro* des mutations ou des variations de l'ADN étudiées. Cette approche a permis, en association avec l'analyse clinique fine de sujets souffrant d'obésité extrême à début précoce (avant l'âge de 6 ans), de décrire des obésités monogéniques rares par altération de la voie leptine-mélanocortines (Figure 6, page 40) [85-88] mais a été moins efficace pour identifier des gènes candidats d'obésité commune.

A partir de 2005, l'étude du génome entier ou approche à haut débit (GWAS, genome wide scan association study) a été utilisée. Elle consiste à tester l'association entre un phénotype donné (obésité) et des variants répartis sur tout le génome dans de larges populations. Elle a permis l'identification 'au hasard' de 119 loci indépendants associés à l'IMC et contribuant à l'obésité commune, et en particulier celle du gène *FTO* (fat mass and obesity) chez l'enfant et

l'adulte obèses [89, 90]. Cependant, aucun lien direct n'a été mis en évidence entre les variants associés à l'obésité et la fonction ou l'expression de *FTO*. Récemment, il a été démontré que ces variants situés dans le gène *FTO* sont en fait connectés, à des mégabases de distance, au gène *IRX3* (iroquois homeobox 3) et sont associés à l'expression génique d'*IRX3* dans le cerveau humain. De plus, les souris KO *IRX3*^{-/-} présentent une réduction de 25-30% de leur poids, principalement par perte de masse grasse. Le gène *IRX3* semble donc être la cible des variants du gène *FTO* liés à l'obésité et représente un nouveau déterminant de la masse et de la composition corporelles [91]. Toutefois, l'allèle de *FTO* associé à l'obésité pourrait orienter la différenciation adipocytaire précoce vers le développement des adipocytes blancs de stockage d'énergie, aux dépens des adipocytes bruns, ce qui entraîne une réduction de la thermogénèse mitochondriale et une augmentation du stockage des lipides [92]. De plus, les études GWAS ont montré, de façon intéressante, que la plupart des gènes impliqués dans les obésités monogéniques et oligogéniques (*LEPR*, *POMC*, *MC4R*, *BDNF* (brain-derived neurotrophic factor), *PCSK1* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1)) présentent également des variants communs associés à l'IMC et à l'obésité polygénique [90].

Plus récemment, de nouveaux outils de biologie moléculaire, de plus en plus rapides, précis et efficaces, ont été développés. En particulier, le séquençage à haut débit ciblé à l'exome a montré sa puissance pour identifier des mutations responsables de maladies rares chez un petit nombre de sujets atteints (8 à 10 selon les études) [93]. Cet outil a également été utile dans l'identification de nouvelles anomalies moléculaires dans l'obésité génétique. Il a notamment permis de mettre en évidence 2 nouvelles mutations homozygotes du gène *LEPR* [94] et 5 nouvelles mutations des gènes *BBS* (Bardet-Biedl syndrome) [95]. Cette technique du séquençage d'exome a aussi été utile pour identifier une délétion paternelle des gènes *ACP1* (acid phosphatase 1, soluble), *TMEM18* (transmembrane protein 18) et *MYT1L* (myelin transcription factor 1-like) chez 5 patients non apparentés présentant une obésité sévère à début précoce associée à une hyperphagie, un retard mental et des troubles sévères du comportement [2]. Il a aussi permis d'identifier de nouveaux variants rares dans le gène *KSR2* (kinase suppressor of Ras 2) chez 45 sujets souffrant d'une obésité sévère associée à une hyperphagie, une réduction du rythme cardiaque et du métabolisme de base et une insulino-résistance sévère [96]. Une mutation homozygote du gène *TUB* (tubby like protein) a aussi été mise en évidence par le séquençage d'exome chez un sujet présentant une obésité, une cécité nocturne et une dystrophie rétinienne [97] (Tableau 3, page 72). Le séquençage d'exome

semble donc être une technique efficace pour identifier de nouvelles anomalies moléculaires chez les sujets ayant une obésité monogénique ou syndromique.

Enfin, la contribution des CNV (copy number variant) dans la susceptibilité aux pathologies complexes, telles que l'obésité sévère, a été le sujet de nombreux débats ces dernières années. Les VNTR (variable number of tandem repeat) constituent une classe relativement sous-explorée des variants génomiques intervenant dans les pathologies complexes. Des études ont montré que de rares CNV pouvaient être responsables de formes sévères d'obésité, notamment chez 31 sujets porteurs de délétions hétérozygotes d'au moins 593 kb (kilobases) du locus 16p11.2. Ces sujets présentaient des malformations congénitales et/ou un retard de développement en association à l'obésité. Ce phénotype pourrait résulter de l'insuffisance haploïde de multiples gènes ayant un impact sur le développement central de l'obésité [98]. L'étude de la région chromosomique 8p21.2 comprenant le gène *DOCK5* (dedicator of cytokinesis 5) a également mis en évidence une association significative des VNTR de *DOCK5* avec l'obésité sévère de l'enfant et de l'adulte [99]. Des investigations complémentaires sur le rôle des VNTR et des CNV dans l'obésité sont cependant nécessaires pour confirmer ou non leur éventuelle contribution à cette pathologie et leur lien potentiel avec le système leptine-mélanocortines.

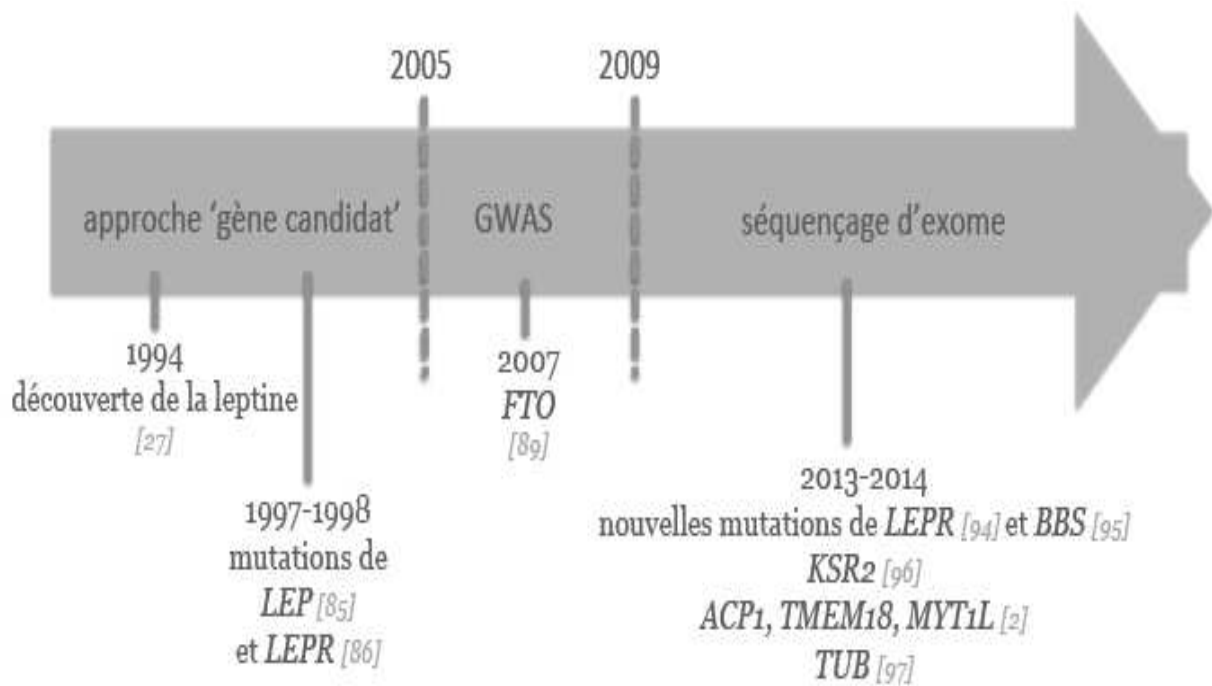


Figure 7: Evolution des différentes stratégies d'approche moléculaire utilisées dans l'obésité et principales anomalies génétiques mises en évidence.

ACP1: acid phosphatase 1, soluble ; BBS: Bardet-Biedl syndrome ; FTO: fat mass and obesity ; GWAS: genome wide scan association study ; KSR2: kinase supressor of Ras 2 ; LEP: leptine ; LEPR: récepteur de la leptine ; MYT1L: myelin transcription factor 1-like ; TMEM18: transmembrane protein 18 ; TUB: tubby-like protein

Revue 1 (page 159): Obésités génétiques rares: Diagnostics clinique et biologique en 2015.

H Huvenne, B Dubern, K Clément, C Poitou. Diabète & Obésité 2015 (10); 86: 42-9.

II.3.2. Les obésités monogéniques

a. Les obésités monogéniques par mutation des gènes de la voie leptine-mélanocortines

Chez l'homme, des mutations rares affectant les gènes de la voie leptine-mélanocortines (Figure 6, page 40), facteur-clé de la régulation de la balance énergétique, sont responsables d'obésité monogénique à pénétrance complète. Plusieurs mutations des gènes de la leptine (*LEP*) [85], de son récepteur (*LEPR*) [86], de la proopiomélanocortine (*POMC*) [87], et de la proconvertase 1 (*PC1/PCSK1* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1)) [88], ont été identifiées et ont permis de progresser dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de régulation centrale du poids (Tableau 2, page 56). Elles associent une obésité sévère dès les premiers mois de vie, sans rebond d'adiposité (Figure 8, page 50), à une faim insatiable et des anomalies endocriniennes. L'évaluation de la composition corporelle chez les sujets porteurs d'une mutation des gènes *LEP* ou *LEPR* montre un pourcentage de masse grasse totale très élevé (>50%) et une dépense énergétique de repos en lien avec le niveau de corpulence. Le comportement alimentaire est caractérisé par une hyperphagie majeure et une faim insatiable [100]. De façon surprenante, une jeune patiente autrichienne porteuse d'un déficit en leptine a récemment été décrite avec une obésité moins sévère (IMC à 31,5 kg/m²) et des prises alimentaires très faibles dans la vie quotidienne malgré une augmentation de la consommation calorique lors d'un repas-test [101]. Même s'il ne s'agit que d'une seule observation, ceci peut suggérer que, malgré le déficit en leptine, il est possible de contrôler la prise alimentaire et ainsi prévenir l'obésité extrême, principalement en cas d'environnement favorable contrôlant le comportement alimentaire du patient dès la plus jeune enfance. Cependant, en dehors de ce cas particulier, l'obésité sévère à début précoce associée à une hyperphagie majeure reste la présentation clinique principale des déficits en leptine ou en son récepteur.

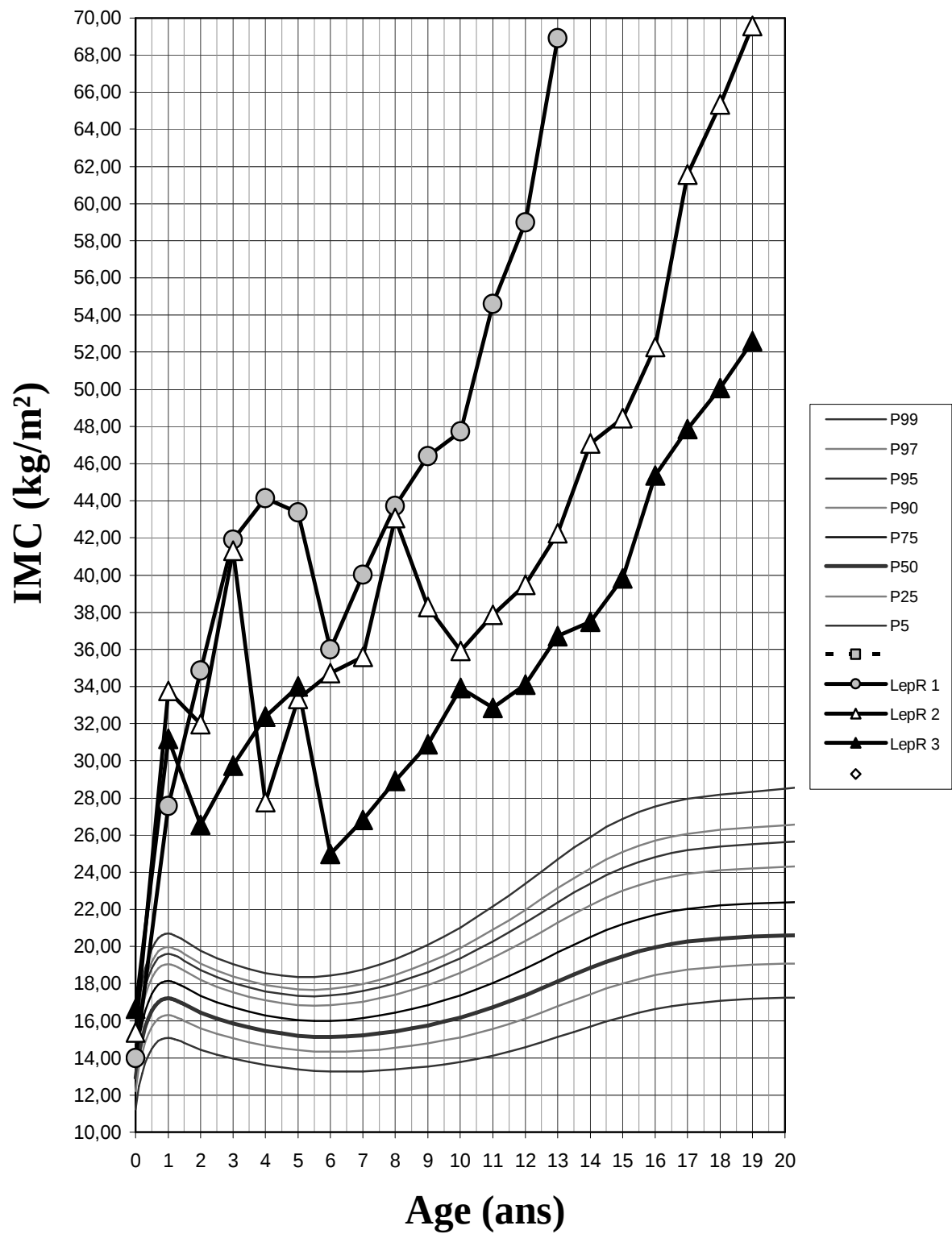


Figure 8: Evolution de l'IMC (indice de masse corporelle) chez trois sujets ayant une mutation du gène du récepteur de la leptine (LepR 1, LepR 2 et LepR 3) [86].

En plus de l'obésité sévère à début très précoce associée à une hyperphagie majeure et à un défaut de satiété, les patients porteurs d'une mutation du gène *LEP* ou *LEPR* présentent un impubérisme ou un retard pubertaire par hypogonadisme hypogonadotrope [86, 101, 102, 103]. Une insuffisance de sécrétion somatotrope, entraînant un retard de croissance modéré, et une insuffisance thyroïdienne d'origine centrale ont également été observées chez certains patients porteurs d'une mutation de *LEPR*, tout comme une augmentation du risque d'infections, notamment des infections récurrentes respiratoires, associée à un déficit du nombre et de la fonction des cellules T [86, 103]. Cependant, chez certains sujets avec un déficit en leptine secondaire à une mutation soit du gène *LEP* soit du gène *LEPR*, un développement pubertaire spontané a été observé. En effet, le suivi à long terme d'une patiente ayant un déficit en *LEPR* a permis d'observer la normalisation spontanée à l'âge adulte du déficit thyroïdien modéré et la naissance d'un enfant en bonne santé après une grossesse spontanée normale [104].

A ce jour, la prévalence des mutations de *LEPR* est peu connue et n'a actuellement été estimée que dans 2 populations très spécifiques marquées par un taux élevé de consanguinité. Elle était de 3% chez 300 sujets Anglais présentant une obésité sévère à début précoce avec hyperphagie, dont 90 étaient issus de familles consanguines [103], et plus récemment dans une population sélectionnée d'enfants sévèrement obèses d'origine Pakistanaise [105]. Récemment, la prévalence des mutations dans les gènes *LEP*, *LEPR* et *MC4R* a été estimée à 30% dans une cohorte de 73 enfants d'origine Pakistanaise, ayant une obésité sévère (Z-score d'IMC > 3 DS), tous issus de familles consanguines [105]. Les mutations des gènes *LEPR* et *LEP* sont donc à rechercher en cas d'obésité extrême à début précoce associée à des anomalies endocriniennes, d'autant plus dans des populations où le taux de consanguinité est élevé. Récemment, un phénotype clinique classique de déficit en leptine, associant une obésité extrême à début précoce et une hyperphagie, a été décrit chez un jeune garçon avec une leptinémie élevée et pour lequel une nouvelle mutation homozygote du gène *LEP* entraînant une leptine mutée biologiquement inactive (pas de fixation ni d'activation de *LEPR*) mais présente à de fortes concentrations dans la circulation [106] a été mise en évidence. Cette observation suggère qu'un déficit en leptine peut toujours être suspecté devant une présentation clinique évocatrice et ce malgré une leptinémie corrélée à la masse grasse et à l'IMC.

Les sujets déficients en leptine par mutations du gène *LEP* peuvent bénéficier d'un traitement substitutif par leptine recombinante permettant une perte de poids, principalement de masse

grasse, avec un effet majeur de réduction de la prise alimentaire [106, 107]. Chez 3 sujets ayant une mutation homozygote du gène *LEP*, l'injection journalière sous-cutanée de leptine recombinante (0,01 mg/kg) a entraîné une réduction significative de la prise alimentaire après 2 mois de traitement (patient 1: apports caloriques diminués de 180 KJ/kg de masse maigre à 100 KJ/kg de masse maigre ; patient 2: diminution de 250 KJ/kg de masse maigre à 40 KJ/kg de masse maigre ; patient 3: diminution de 250 KJ/kg de masse maigre à 180 KJ/kg de masse maigre ; $p < 0,005$). Parallèlement, une perte de poids significative a été notée avec réduction du Z-score de l'IMC de -6,5 DS à -3 DS après 2 ans de traitement. Cette évolution pondérale favorable a aussi été décrite chez l'enfant ayant une leptine inactive [106]. De plus, ce traitement permet le déclenchement de la puberté, par correction de l'hypogonadisme hypogonadotrope, même chez l'adulte [100, 107, 108]. En revanche, la prise en charge des sujets porteurs de mutations de *LEPR* reste à ce jour difficile, sans thérapeutique actuellement disponible chez l'homme. Des traitements qui pourraient contre-carrer le système de la leptine sans effets secondaires notables sont en cours de développement mais ne sont pas encore disponibles chez l'homme [109]. De plus, la perte de poids après chirurgie bariatrique chez les 2 premiers patients décrits à ce jour est variable et limitée [110]. Une gastroplastie a permis d'induire et de maintenir une perte de poids de 40 kg (-20% par rapport au poids pré-opératoire) après un suivi régulier de 8 ans chez un premier patient [110]. Ce résultat positif est en opposition avec l'échec de la prise en charge chirurgicale chez une patiente présentant une obésité morbide secondaire à une autre mutation du gène *LEPR*, illustré par une reprise pondérale rapide à 1 an d'un bypass. Mais cette patiente d'un faible niveau socio-économique a été peu compliant aux recommandations post-chirurgicales, avec un suivi médical très irrégulier [110]. Ces deux observations illustrent le rôle majeur de l'environnement médico-socio-économique dans le bénéfice éventuel de la chirurgie bariatrique en cas d'obésité monogénique et soulignent notamment la faible efficacité de cette prise en charge chez ces patients.

Un déficit en POMC, par mutation du gène *POMC*, entraîne, en plus de l'obésité sévère à début précoce, une insuffisance surrénalienne aiguë dès la naissance liée au déficit en ACTH et inconstamment des cheveux roux du fait de l'absence d' α -MSH. Les modifications dans la pigmentation des cheveux, la fonction surrénalienne et le poids corporel sont cohérentes avec le manque de ligands dérivés de POMC pour les récepteurs MC1R, MC2R et MC4R, respectivement [87, 111, 112].

Enfin, en cas de mutation du gène *PC1/PCSK1*, l'obésité infantile est associée à des malaises hypoglycémiques post-prandiaux, secondaires à l'accumulation de pro-insuline, à des troubles de la fertilité par hypogonadisme hypogonadotrope, à une hypothyroïdie centrale, à une insuffisance surrénalienne, secondaire à un défaut de maturation de POMC, et à un défaut d'absorption intestinale entraînant une diarrhée sévère et rebelle dépendant de la nutrition parentérale les premières années de vie par déficit en GLP-1 [88, 113]. Récemment, chez un sujet hétérozygote composite pour une mutation de *PCSK1* et chez 13 enfants ayant un déficit en PC1 par mutations de *PCSK1*, un syndrome polyuro-polydypsique a été décrit, secondaire au développement d'un diabète insipide central. Ces observations suggèrent que PCSK1 pourrait être impliqué dans le contrôle central de l'osmolalité chez l'homme. Mais le mécanisme reste inconnu: le diabète insipide serait dû soit à une anomalie dans le processus de la provasopressine, soit à une autre anomalie dans la fonction d'osmoréception ou dans la production ou la sécrétion de vasopressine. Un déficit en GH (growth hormone) a également été observé chez 13 enfants ayant un déficit en PC1 [114, 115]. La prise en charge des patients ayant un déficit en POMC ou PC1 est actuellement complexe, du fait de l'absence de thérapeutique spécifique efficace.

Dans tous ces cas d'obésité monogénique, il s'agit de mutation de transmission autosomique récessive à l'état homozygote ou hétérozygote composite. La mise en évidence de la cause moléculaire de l'obésité a permis d'informer les familles sur le risque de récurrence qui était de 25% dans l'ensemble de ces situations.

b. Les autres obésités monogéniques

Parallèlement aux mutations des gènes de la voie leptine-mélanocortines, d'autres cas isolés d'obésité génétique rare ont été décrits chez l'homme. Ils étaient secondaires à des mutations dans des gènes impliqués dans le développement de l'hypothalamus et du système nerveux central et ont ainsi permis d'identifier de nouvelles pistes physiopathologiques (Tableau 2, page 56). C'est le cas d'une délétion du gène *SIM1* (single-minded homolog 1), situé sur le chromosome 6q, secondaire à une translocation *de novo* entre les chromosomes 1p22.1 et 6q16.2, qui a été identifiée chez une petite fille présentant une obésité sévère dès les premiers mois de vie associée à une hyperphagie avec impulsivité alimentaire [116]. Ce gène code pour un facteur de transcription impliqué dans le développement du noyau paraventriculaire de l'hypothalamus. Les modèles animaux ont montré que les souris hétérozygotes pour un allèle nul du gène *SIM1* présentent une obésité précoce et une hyperphagie associées à un

hypodéveloppement du NPV et que les souris homozygotes décèdent dès la naissance avec absence de développement du NPV [117]. Une délétion interstitielle, localisée en 6q et incluant le gène *SIM1*, a également été mise en évidence chez un sujet présentant, en plus d'une obésité précoce et sévère associée à une hyperphagie et à une impulsivité alimentaire, des signes cliniques proches de ceux du syndrome de Prader-Willi (SPW) (hypotonie néonatale, dysmorphie, retard de développement, obésité à début précoce, retard statural par déficit en GH, hypopituitarisme) [118, 119]. Un séquençage de la région codante de *SIM1*, réalisé chez 2100 patients non apparentés présentant une obésité sévère à début précoce et chez 1680 sujets contrôles non apparentés issus de la population générale, a également permis d'identifier 13 variants à l'état hétérozygote chez 28 patients sévèrement obèses. Les sujets porteurs de ces variants présentent une obésité sévère associée à une dysfonction autonome (diminution de la pression artérielle et augmentation atténuée du rythme cardiaque) et inconstamment à des anomalies neuro-comportementales (troubles de la concentration, déficit mnésique, labilité émotionnelle ou syndrome autistique). Les similarités phénotypiques entre les patients présentant un déficit de *SIM1* et ceux présentant un déficit de *MC4R* suggèrent que certains des effets du déficit en *SIM1* sur l'homéostasie énergétique seraient médiés par une altération du signal mélanocortinergique [120]. Un autre séquençage de *SIM1*, réalisé chez 44 enfants présentant des signes cliniques proches de ceux du SPW, chez 198 enfants ayant une obésité sévère à début précoce, chez 568 adultes ayant une obésité morbide et chez 383 sujets contrôles, a permis d'identifier 4 variants rares chez 4 enfants présentant des signes cliniques proches du SPW (notamment obésité sévère débutant dès l'âge de 1-2 ans) et 4 autres variants chez 7 adultes ayant une obésité morbide. Ces variants contribuent significativement au risque intra-familial d'obésité. Cette étude confirme le lien solide entre la perte de fonction de *SIM1* et l'obésité, sévère à morbide, associée ou non à des signes cliniques proches du SPW (notamment retard de développement, ou déficience intellectuelle, et dysmorphie faciale) [121]. Les variants rares de *SIM1* doivent donc être recherchés chez les sujets ayant une obésité hyperphagique à début précoce. De plus, une analyse par puce à ADN a mis en évidence une variabilité du nombre de copies (CNV) de *SIM1* chez 9 enfants, non apparentés, présentant une obésité sévère et précoce associée à des difficultés d'apprentissage ou à un retard de développement [122].

Une mutation hétérozygote du gène *NTRK2* (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2) a été mise en évidence chez un jeune garçon de 8 ans présentant une obésité sévère et précoce associée à une hyperphagie, un retard mental et des anomalies des fonctions neurologiques

[123]. Ce gène code pour le TRKB (tyrosine kinase receptor B) qui est le récepteur du facteur BDNF (brain-derived neurotrophic factor), exprimé dans le SNC et impliqué dans la régulation de la prise alimentaire [124]. D'autres mutations de *NTRK2* ont été retrouvées chez des patients présentant une obésité précoce et un retard de développement, mais leurs conséquences fonctionnelles et leur implication dans l'obésité restent à démontrer [125]. Une inversion chromosomique *de novo*, entraînant une perte de fonction d'une copie du gène *BDNF*, a été mise en évidence chez une jeune fille de 8 ans et cette haplo-insuffisance est associée à une augmentation de la prise alimentaire, une obésité sévère à début précoce et des troubles neuro-comportementaux (hyperactivité, anomalies des fonctions cognitives et de la mémoire) [126]. La capacité de la leptine à activer les neurones hypothalamiques et à inhiber la prise alimentaire semble compromise en cas de déficit en BDNF, malgré une activation normale de LEPR. Le gène *BDNF* apparaît donc nécessaire pour la régulation de la balance énergétique médiée par la leptine [127].

Tableau 2: Formes rares d'obésité monogénique.

Gène	Type de mutation	Obésité	Phénotype associé
Leptine (<i>LEP</i>)	Homozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisances gonadotrope et thyroïdienne
Récepteur de la leptine (<i>LEPR</i>)	Homozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisances gonadotrope, thyroïdienne et somatotrope
Proopiomélanocortine (<i>POMC</i>)	Homozygote ou hétérozygote composite	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisance surrénalienne Hypothyroïdie modérée +/- Cheveux roux
Proprotéine convertase subtilisine/kexin type 1 (<i>PCSK1</i>)	Homozygote ou hétérozygote composite	Sévère, apparaissant dans l'enfance	Insuffisance surrénalienne, gonadotrope, somatotrope et thyroïdienne Malaises hypoglycémiques postprandiaux Diabète insipide central Diarrhée néonatale

Single-minded homolog 1 (<i>SIM1</i>)	Délétions	Sévère, apparaissant dans l'enfance	Troubles neuro- comportementaux inconstants (labilité émotionnelle ou syndrome autistique)
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (<i>NTRK2</i>)	Mutation <i>de novo</i> hétérozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Retard de développement Troubles du comportement

Revue 2 (page 167): Monogenic forms of obesity.

H Huvenne, B Dubern. In: Nobrega C, Rodriguez-Lopez R, eds. Molecular Mechanisms Underpinning the Development of Obesity. Springer International Publishing AG 2014; chapter 2: 9-21.

II.3.3. Les obésités syndromiques

Tout comme les obésités monogéniques, les obésités syndromiques sont des formes particulières d'obésité associant une obésité sévère à début précoce à des anomalies du développement (retard mental, dysmorphies, malformations, atteintes neurosensorielles et/ou endocriniennes) (Tableau 3, page 72). Parmi ces obésités syndromiques, les syndromes de Prader-Willi (SPW) et de Bardet-Biedl (BBS) sont les moins rares et les mieux connus.

Le SPW, dont la fréquence se situe entre 1/15000 à 1/25000 naissances, est caractérisé par une hypotonie néonatale sévère, des troubles alimentaires évoluant en plusieurs phases (de l'anorexie avec troubles de succion dans les premiers mois de vie jusqu'à une hyperphagie avec impulsivité alimentaire majeure apparaissant vers 4-8 ans) [128], des anomalies de la composition corporelle avec une distribution des graisses à prédominance sous-cutanée [129], des anomalies endocriniennes (déficit en GH, hypogonadisme), une déficience intellectuelle de sévérité variable, des difficultés d'apprentissage ou des troubles du comportement et des traits dysmorphiques [130]. En comparaison aux sujets ayant une obésité commune, les sujets atteints de SPW ont un pourcentage de masse grasse tronculaire plus faible et un meilleur profil métabolique avec une insulino-résistance moindre [131]. Ce syndrome est lié à une anomalie de l'empreinte génomique parentale avec absence physique ou fonctionnelle du segment chromosomique 15q11-q13 d'origine paternelle. Au moins 5 gènes, localisés dans cette région chromosomique et exprimés dans l'hypothalamus, ont été identifiés et codent pour différentes protéines dont les fonctions ne sont pas complètement décrites: *MRKN3* (makorin 3), *MAGEL2* (MAGE-like 2), *NDN* (necdin), *NPAP1* (nuclear pore associated protein 1), *SNURF-SNRPN* (small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N upstream reading frame – small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N) [132, 133]. Les gènes affectés codent pour de petites protéines des ribosomes impliquées dans la transcription des gènes (*ZNF127AS* (zinc finger protein 127, antisense), *PAR5* (Prader-Willi/Angelman region RNA 5), *IPW* (imprinted in Prader-Willi syndrome) et *PAR1* (Prader-Willi/Angelman region RNA 1)) et pour la necdine, protéine impliquée dans la croissance axonale. Il est probable que plusieurs gènes soient affectés et expliquent le phénotype multiple des sujets atteints de SPW. Mais les mécanismes génétiques précis amenant à l'apparition d'une obésité dans le SPW sont encore actuellement à définir. Toutefois, des mutations tronquantes de l'allèle paternel du gène *MAGEL2*, gène compris dans le domaine chromosomique SPW, ont été mis en évidence chez 4 individus présentant des troubles autistiques, un retard de développement ou une déficience intellectuelle et des signes cliniques du SPW de degré variable (hypotonie

néonatale, obésité sévère à début précoce, hypogonadisme, défaut d'articulation du langage). Le gène *MAGEL2* pourrait donc être un nouveau gène causant des désordres complexes d'autisme et la perte de fonction de *MAGEL2* pourrait contribuer à différents aspects du phénotype du SPW [133].

ARTICLE 1 (page 60): Metabolic and adipose tissue signatures in adults with Prader-Willi syndrome: a model of extreme adiposity.

Lacroix D, Moutel S, Coupaye M, Huvenne H, Faucher P, Pelloux V, Rouault C, Bastard JP, Cagnard N, Dubern B, Clément K, Poitou C. J Clin Endocrinol Metab 2015; 100: 850-9.

Metabolic and Adipose Tissue Signatures in Adults With Prader-Willi Syndrome: A Model of Extreme Adiposity

Delphine Lacroix,* Sandrine Moutel,* Muriel Coupaye, Hélène Huvenne, Pauline Faucher, Véronique Pelloux, Christine Rouault, Jean-Philippe Bastard, Nicolas Cagnard, Béatrice Dubern, Karine Clément, and Christine Poitou

INSERM, U1166, Nutriomic team 6 (D.L., H.H., V.P., C.R., B.D., K.C., C.P.), Sorbonne Universities (D.L., H.H., V.P., C.R., B.D., K.C., C.P.), University Pierre et Marie Curie-Paris 6, Unité Mixte de Recherche en Santé Unité 1166, and Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN) (S.M., M.C., P.F., K.C., C.P.), Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Department of Nutrition, and French Reference Centre for Prader-Willi Syndrome, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, F-75013 France; Functional Unit of Inflammatory and Metabolic Biomarkers (J.-P.B.), Department of Biochemistry and Hormonology, Tenon Hospital, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris, F-75970 Paris, France; Bioinformatics Platform (N.C.), Plateforme de Bioinformatique, SFR Necker, University Paris V, F-75015 Paris, France; and Department of Pediatric Nutrition and Gastroenterology (B.D.), Trousseau Hospital, Assistance Publique Hôpitaux de Paris, F-37044 Paris, France

Context: Prader-Willi syndrome (PWS), the most frequent syndrome of obesity, is a model of early fat mass (FM) development, but scarce data exist on adipose tissue characteristics.

Objective: The objective of the study was to compare metabolic, fat distribution, and transcriptomic signatures of sc adipose tissue (scAT) in PWS adults, with matched obese adults with primary obesities.

Main Outcomes and Measures: Hormonal and metabolic assessments, systemic inflammation, and gene expression in scAT were compared between PWS patients and obese controls (OCs). Each 42nd PWS patient was matched with one randomly paired control with primary obesity. Matching factors were age, gender, fat mass (percentage), and diabetic status.

Results: Compared with OCs, the PWS group had a decreased percentage of trunk FM and a better metabolic profile with decreased insulin and homeostasis model assessment, an index of insulin-resistance, and increased concentrations of serum adiponectin and ghrelin. Adipocyte size relative to body fat was significantly higher in PWS vs OCs. scAT in PWS patients was characterized by a transcriptomic functional signature with enrichment of themes related to immunoinflammation, the extracellular matrix, and angiogenesis. A RT-PCR targeted study revealed that candidate genes encoding proinflammatory markers and remodeling molecules, CD68, CD3e, IL-1 β , chemokine (C-C motif) ligand 5, collagen type 4- α , and lysyl oxidase, were down-regulated.

Conclusion: Matched for FM, PWS subjects have a better metabolic profile, a phenotype that could be linked to changes in scAT remodeling and promotion of adipocyte growth. (*J Clin Endocrinol Metab* 100: 850–859, 2015)

ISSN Print 0021-972X ISSN Online 1945-7197

Printed in U.S.A.

Copyright © 2015 by the Endocrine Society

Received August 5, 2014; Accepted November 11, 2014.

First Published Online December 5, 2014

* D.L. and S.M. contributed equally to this work.

Abbreviations: AT, adipose tissue; CH3L1, chitinase 3-like 1; COL4, collagen type 4; COL6, collagen type 6; FM, fat mass; GIP, glucose-dependent insulinotropic polypeptide; GLP-1, glucagon-like peptide-1; GO, Gene Ontology; HbA1c, glycated hemoglobin; HDL, high-density lipoprotein; HOMA-IR, homeostasis model assessment, an index of insulin-resistance; hs-CRP, high-sensitivity C-reactive protein; LOX, lysyl oxidase; LPA, lysophosphatidic acid; LPAR1, LPA receptor 1; OC, obese control; PWS, Prader-Willi syndrome; scAT, sc AT; UPD, parental disomy.

Praeder-Willi Syndrome (PWS), caused by a lack of expression of paternal-origin imprinted alleles on chromosome 15, is the most frequent syndrome with obesity. PWS is characterized by severe neonatal hypotonia and suckling deficiency, with feeding problems in infancy and excessive weight gain at an early age. This leads to obesity with hyperphagia and deficit of satiety that persist in adulthood (1, 2). Subjects with PWS display endocrine disorders, such as hypogonadism and GH deficiency. Obesity remains a critical problem in PWS teenagers and adults because it leads to severe complications, such as limb edema, cardiac or respiratory failure, and physical disabilities (1).

Studies also focused on the metabolic outcomes of PWS adults. An early study reported that mechanisms of glucose homeostasis are different in PWS compared with non-PWS subjects (3). Others report that PWS patients had a better metabolic profile, ie, lower insulin resistance, than the subjects with primary obesity (4–6). However, Grugni et al (7) reported that, when matched for body mass index (BMI), PWS adults had the same prevalence of metabolic syndrome (41.4%) and insulin resistance index as obese controls.

Obesity in PWS is characterized by modified body composition with reduced muscle mass and increased adiposity, as reviewed by Reus et al (8). The development of adipose tissue (AT) occurs early in PWS infants before the onset of weight gain (9). PWS subjects have a specific fat distribution with increased fat mass (FM) in the limbs, decreased FM in the trunk (10–12), and diminished visceral adiposity compared with obese patients matched for BMI and age (4, 11, 13, 14). To this extent, PWS can be seen as an exceptional model of early and massive AT development, notably in subcutaneous depots. This condition is thus of particular interest to explore the links between metabolic and inflammatory profiles and proneness to FM inflation. Despite higher FM, PWS subjects displayed increased adiponectin concentration and lower systemic inflammation (6, 11, 15). However, to our knowledge, only one study has compared the metabolic profiles in PWS vs non-PWS subjects and reported improved metabolic traits in PWS after FM adjustment (13). This suggests that, beyond FM development and distribution, qualitative intrinsic characteristics of AT could be different in PWS subjects. For example, adipocyte hypertrophy and inflammatory status of AT are thought to contribute to metabolic complications (16, 17), but this has not been explored in PWS patients. Up until now, no data exist concerning the structure and functions of AT in PWS, except for a recent study in children with PWS, which reported that decreased progenitor cell content and decreased lipolysis induced by β -adrenergic agonists were partially restored by GH treatment (18).

Hence, the aims of our study were to compare body fat distribution and metabolic and adipokine profiles as well as the transcriptomic gene and functional signatures of AT in adults with PWS compared with obese controls, who were matched according to percentage total FM, age, gender, and type 2 diabetes.

Patients and Methods

Patients with PWS

Between July 2007 and May 2013, 76 adults (aged > 16 y) with genetically confirmed PWS were examined in the Nutrition Department (French Reference Centre for PWS, La Pitié-Salpêtrière Hospital, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Paris). The inclusion criteria for this study were a BMI greater than 30 kg/m² and having been assessed for body composition and metabolic parameters.

Forty-two of these patients fulfilled the inclusion criteria. Twenty-seven had a chromosomal deletion, 14 had parental disomy (UPD), and one had an imprinting mutation. Thirty-nine patients displayed hypogonadism: among them, 23 were receiving hormonal replacement therapy. Seven patients had been treated with GH in childhood or adolescence (median duration of treatment 4.3 y). Fourteen patients were being treated for hypothyroidism. Thirteen patients (31%) were being treated with antipsychotic medications. For a subgroup (n = 17), a needle sample of AT was performed.

Obese control (OC) population

Between 2007 and 2013, 1100 patients, who were candidates for bariatric surgery with a BMI of greater than 30 kg/m² and aged between 16 and 60 years, were admitted to the same Nutrition Department. Preoperative assessment included a detailed medical history, including a history of sexual development, a physical examination, and assessment of biological factors including testosterone and gonadotropins in men. All had a normal reproductive status for their age. All controls were assessed for body composition and metabolic outcomes. Each PWS subject was matched with one OC patient who was randomly selected using the following covariates: age (± 5 y), gender, percentage ($\pm 2\%$), and diabetic status (n = 42). None was treated with any antipsychotic medication.

Ethical approval was obtained from the Research Ethics Committee of Hotel-Dieu Hospital (CPP Ile de France). All patients or guardians/parents gave their informed consent for inclusion within the study.

Clinical and biological assessments

All subjects underwent systematic explorations that included a thorough medical interview, a routine physical examination, and fasting biological analyses. The presence of diabetes, hypertension, dyslipidemia, metabolic syndrome, metabolically healthy obese status, hepatic cytolysis (defined by alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase being increased by >1.5-fold), hypogonadism, and treatments with sex hormones and/or GH were systematically recorded, as described (19, 20).

Body composition

Body composition was assessed using a whole-body fan-beam DXA scan (Hologic Discovery W, software version 12.6, 2; Hologic) (12, 21). Body regions (arms, legs, trunk, and head) were delineated with the use of specific anatomical landmarks, as described elsewhere (22). Body fat repartition between the trunk and extremities was assessed by computing the trunk FM to appendicular ratio (21). The FM index was calculated as FM divided by height squared (kilograms per square meter).

Inflammatory and metabolic markers

Venous blood samples were collected in the fasting state: serum samples without protease inhibitor were immediately transported in ice, centrifuged, frozen, and then stored at -80°C for assessment of other biological components [adiponectin, high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and the multiplexed assays of metabolic markers described below]. Biochemical parameters, including fasting glycemia, glycated hemoglobin (HbA1c), insulinemia, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL) cholesterol, and triglycerides, were measured using routine techniques. Serum insulin was assessed by immunochemiluminescence (Diasorin). The homeostasis model assessment, an index of insulin-resistance (HOMA-IR), was calculated as follows: fasting insulin (milliinternational units per milliliter) $\times$ fasting glycemia (millimoles per liter)/22.5. Serum adiponectin and hs-CRP were quantified as previously described (23). The sensitivity used was $0.8 \mu\text{g/mL}$ and 0.3 mg/L for adiponectin and hs-CRP, respectively. Intraassay and interassay coefficients of variation were less than 9% and 10% for adiponectin and hs-CRP, respectively.

In 17 PWS and their OCs, two cytometric bead arrays (Bio-Plex Pro human diabetes assay and Bio-Plex human cytokine group 1 assay; Bio-Rad Laboratories) were used to assess serum concentrations of C-peptide, glucagon, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), glucagon-like peptide-1 (GLP-1), ghrelin, leptin, visfatin, resistin, plasminogen-activating inhibitor-1, eotaxin, IL-1b, IL-6, IL-8, IL-9, IL-10, IL-1 receptor antagonists, interferon γ -induced protein-10, monocyte chemoattractant protein-1, macrophage inflammatory protein- α and - β , vascular endothelial growth factor, granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor, as described elsewhere (23). According to the manufacturer, the intraassay and interassay coefficients of variation for each of the 10-plex assays were both 6% or less, and the recovery range was 80%–120%. The sensitivity was 14.5 pg/mL for C-peptide, 1.2 pg/mL for ghrelin, 0.8 pg/mL for GIP, 5.3 pg/mL for GLP-1, 4.9 pg/mL for glucagon, 1 pg/mL for insulin, 3.1 pg/mL for leptin, 2.2 pg/mL for plasminogen activator inhibitor-1, 1.3 pg/mL for resistin, and 37.1 pg/mL for visfatin.

Adipocyte size

Seventeen subjects in both groups (PWS and OC) underwent needle aspiration of abdominal subcutaneous adipose tissue (scAT). None were receiving GH therapy at the time of evaluation. Adipocyte volume was measured as previously described (24). Based on the equation proposed by Spalding et al (25), linking total FM (in kilograms) and adipocyte volume, we reestimated the parameters of the curvilinear equation in a French cohort of 36 nonobese and 389 obese subjects. Thus, adipocyte theoretical volume, expected for the total FM, was defined as follows: adipocyte theoretical volume = $(40.740 - 0.51 \times$

$\text{FM.KG})/[1 + (0.025 - 0.310 \times \text{FM.KG})]$. Both the measured and theoretical adipocyte volumes were then compared.

RT-PCR analysis

Total RNA was extracted using an RNeasy total RNA minikit (QIAGEN). RNA quality and concentration were assessed using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies). Real-time quantitative RT-PCR for selected genes was performed on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems).

mRNA amplification and microarrays

Fourteen patients with PWS and their matched controls were considered for microarray experiments. An Illumina RNA amplification kit (Ambion) was used according to the manufacturer's instructions to obtain biotin-labeled complementary RNA from 250 ng of total RNA. Hybridization processes were performed with Illumina human HT-12 version 4.0 Expression BeadChips (Illumina Inc). Hybridized probes were detected with cyanin-3-streptavidin (1 mg/mL ; Amersham Biosciences, GE HealthCare) and scanned using an Illumina BeadArray Reader.

Microarray data analysis

Raw data (average probe signals) were extracted using the numerical results obtained with Illumina GenomeStudio 2011.1 software with default settings. The background for each bead was estimated by calculating the average of the five dimmest pixels in the area around the bead in question, and outliers of transcript replicates greater than three deviations from the replicate median were removed. Unexpressed genes were not removed and no log transformations were performed. Flags were inferred from the signal detection P values at a threshold of $P = .05$. Three working probe lists were used for each comparison according to the flagged measurement in the relevant chips. A P50 list was created by filtering probes flagged as present for at least half of the chips. The group comparisons were done using a Student's t test. To estimate the false discovery rate, we filtered the resulting P values at 5% and used the Benjamini and Hochberg procedure. Cluster analyses and signature validations were performed by hierarchical clustering using the Ward-correlation similarity measure and average linkage algorithm.

All analyses were conducted using the R project for Statistical Computing (<http://www.r-project.org/>). Data were subsequently submitted to Ingenuity Pathway Analysis to retrieve relevant biological processes and Ingenuity Pathways (<http://www.ingenuity.com>). An automated annotation procedure of the differentially expressed genes was also performed with the FunNet tool using a two-list nondiscriminant analysis and Gene Ontology (GO) annotation database, as described by Henegar et al (26).

Statistical analyses

Data are expressed as means $\pm$ SD. Contingency tables were performed for the analysis of the categorical data. Nonparametric Wilcoxon or χ^2 tests (or Fisher's exact test for small sample sizes) were used to obtain the mean values from comparisons of continuous data (bioclinical parameters) or from noncontinuous data in both groups, respectively. A two-sided significance level was fixed at 5%. The relationships between the different quantitative variables were determined by calculating the Spearman correlation coefficients. All analyses were conducted using JMP statistical software (SAS Institute Inc).

Results

Body composition and metabolic profile in PWS

We compared the profile of patients with PWS with those who had primary obesity (OC group) matched for age, gender, percentage FM, and presence of type 2 diabetes. Comparisons of participants are shown in Table 1. Percentage of lean mass was similar in both groups. As expected when compared with OC subjects, PWS patients' heights were significantly smaller, and these subjects had

Table 1. Bioclinical Characteristics of Subjects With PWS and Obese Controls With Primary Obesity (OC)

	OC (n = 42)	PWS (n = 42)	P Value
Age, y	27.5 ± 9.0	25.5 ± 8.9	.18
Female gender, %	26 (61.9)	26 (61.9)	1.0
Type 2 diabetes, n, %	10 (23.8)	10 (23.8)	1.0
Weight, kg	142.0 ± 21.8	104 ± 25.5	<10 ⁻⁴
Height, cm	168.6 ± 8.9	152.7 ± 11.3	<10 ⁻⁴
BMI, kg/m ²	49.9 ± 6.8	44.4 ± 8.6	2.10 ⁻³
Body composition			
Lean mass, %	47.9 ± 4.6	46.6 ± 4.2	.11
Lean mass, kg	66.5 ± 11.9	46.5 ± 11.6	<10 ⁻⁴
FM, %	50.5 ± 4.2	52.2 ± 4.3	.10
FM, kg	69.9 ± 12.4	52.8 ± 15.0	<10 ⁻⁴
FMI, kg/m ²	24.6 ± 4.6	23.4 ± 7.4	.15
Android FM, %	63.2 ± 6.2	59.0 ± 5.3	1.10 ⁻³
Trunk, g, to appendicular FM ratio, g	1.2 ± 0.24	0.98 ± 0.23	<10 ⁻⁴
Metabolic parameters			
Glycemia, mM	5.4 ± 1.2	5.0 ± 1.8	3.10 ⁻³
HbA1c, %, ND	5.5 ± 0.3	5.6 ± 0.4	.26
HbA1c, %, D	7.8 ± 2.3	7.4 ± 1.1	1.0
Insulinemia, μ U/mL ^a	24.3 ± 24.0	18.8 ± 20.8	.01
HOMA-IR ^a	5.8 ± 5.5	3.8 ± 3.8	5.10 ⁻³
Total cholesterol, mmol/L	4.4 ± 0.7	4.5 ± 0.8	.59
HDL-cholesterol, mmol/L	± 0.3	1.05 ± 0.3	.47
LDL-cholesterol, mmol/L	2.7 ± 0.7	2.7 ± 0.8	.82
Triglycerides, L	1.4 ± 0.6	1.3 ± 0.9	.07
ASAT, U/L	32.4 ± 16.8	28.7 ± 11.6	.20
ALAT, U/L	39.3 ± 25.7	34.6 ± 27.6	.15
Systolic blood pressure, mm Hg	124.1 ± 15.5	119.3 ± 13.1	.11
Diastolic blood pressure, mm Hg	68.5 ± 11.8	68.3 ± 11.5	.90

Abbreviations: ALAT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; D, diabetic subjects; FMI, FM index [fat mass (kilograms)/height² (square meters)]; LDL, low-density lipoprotein; ND, nondiabetic subjects. All values are expressed as mean ± SD. Comparisons between the OC and PWS groups were obtained using a Wilcoxon's rank test for quantitative variables and the χ^2 or Fisher's exact test for qualitative variables.

^a Evaluated in nondiabetic subjects or diabetic subjects without antidiabetic treatment.

lower BMIs. Body composition differed significantly between the two groups, with a lower percentage of android FM and trunk FM to appendicular FM ratio in the PWS group compared with OCs. The same results were observed when men and women were analyzed separately (Supplemental Table 1).

In the nondiabetic subgroups, glycemia, insulinemia, and HOMA-IR were significantly decreased in the PWS compared with the OC group. As shown in Figure 1, the prevalence of metabolic syndrome features was lower in PWS compared with OCs ($P = .03$). The prevalence of hepatic cytolysis was 2-fold lower in the PWS group than in the C group ($P = .004$). Thus, the percentage of those with a defined metabolically healthy obese phenotype was 3-fold higher in the PWS than in OCs ($P = .03$). Other metabolic comorbidities, lipid profiles, and arterial blood

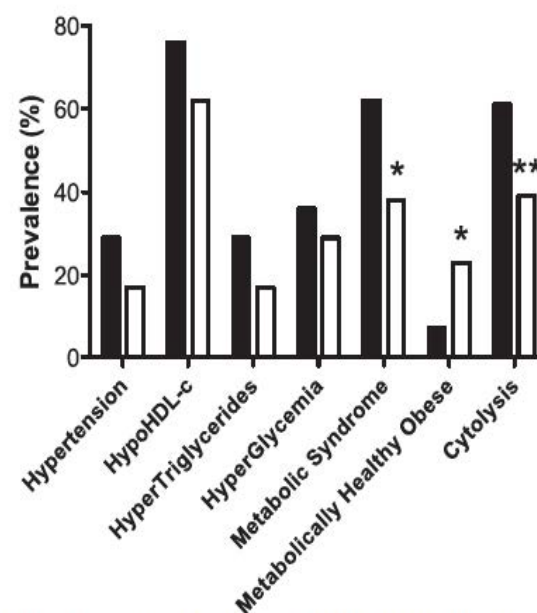


Figure 1. Prevalence of cardiometabolic features in Prader-Willi subjects (PWS group) and in subjects with primary obesity (OC group). Cardiometabolic features were defined as described in *Materials and Methods*. We used the biological definition of metabolic syndrome, established by the International Diabetes Federation (2005). Subjects were considered as metabolically healthy obese (MHO) if they did not have any two of the four factors: 1) raised triglyceride level (≥ 1.7 mmol/L or specific treatment for raised levels); 2) reduced HDL-cholesterol (< 1.03 mmol/L in males and < 1.29 mmol/L in females) or specific treatment for this lipid abnormality; 3) raised blood pressure (BP) (systolic ≥ 130 or diastolic BP ≥ 85 mm Hg) or treatment of previously diagnosed hypertension; and 4) raised fasting plasma glucose (≥ 5.6 mmol/L) or previously diagnosed type 2 diabetes. To take into account insulin sensitivity, we added the criteria of insulinemia of less than 20μ U/mL to include subjects within the MHO group. Liver cytolysis means alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase were increased by greater than 1.5-fold. Black bars represent the OC group and white bars the PWS group. Data show the percentages of individuals with risk factors. Comparisons between the two groups were performed using a Fisher's exact test. *, $P < .05$; **, $P < .001$.

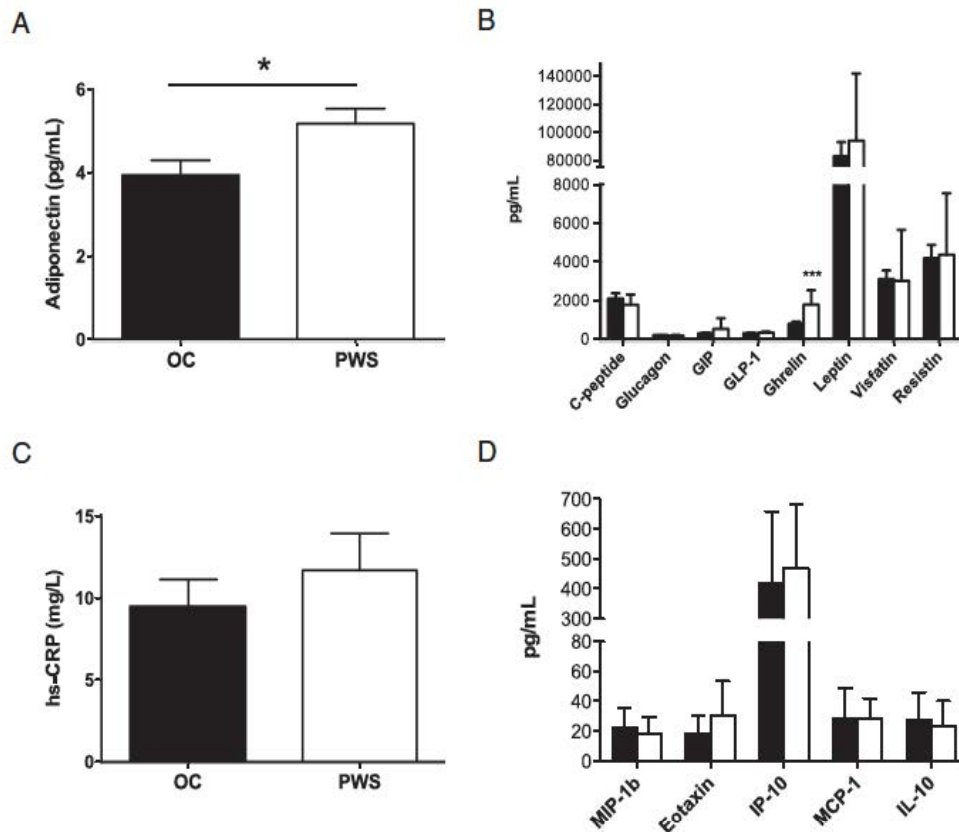


Figure 2. Serum concentrations of hormonal and inflammatory mediators in PWS and primary obese (OC) groups. A, Adiponectin concentration measured in 17 PWS subjects and their obese controls matched for age, FM (percentage), gender, and type 2 diabetes. B, Serum concentrations of C-peptide, glucagon, GIP, GLP-1, ghrelin, leptin, visfatin, and resistin measured by a multiplex assay in 17 PWS subjects and their matched OCs. C, hs-CRP concentration in 17 PWS subjects compared with their controls matched for age, FM (percentage), gender, and type 2 diabetes. D, Concentration of macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1b), eotaxin, interferon- γ -induced protein-10 (IP-10), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and interleukin-10 (IL-10) measured by a multiplex assay in 17 PWS subjects and their matched OCs. The OC group is represented by black bars and the PWS group by white bars. Values are expressed as means $\pm$ SD. Comparisons between the groups were performed using a Wilcoxon's test. *, $P < .05$.

pressure statuses were not markedly different between the two groups. The same results in terms of metabolic phenotype were observed when men and women were analyzed separately (Supplemental Table 1).

In the PWS group, metabolic phenotype did not differ between patients with hypogonadism and those without hypogonadism or receiving current sex hormone-replacement therapy.

Although PWS subjects with UPD had a lower BMI compared with those with a deletion, there were no differences in the metabolic phenotypes or body compositions between the genotypes (Supplemental Table 2).

PWS have higher concentrations of adiponectin and ghrelin

We examined the circulating profiles of hormones and inflammatory mediators, which included C-peptide, glucagon, GIP, GLP-1, ghrelin, leptin, visfatin, and resistin in a subgroup of 17 PWS (5 men and 12 women) and their

controls. Adiponectin serum concentration was significantly higher in the PWS group (5.2 ± 1.5 vs 3.9 ± 1.6 ng/mL, $P = 0.03$) (Figure 2A). The serum concentrations of ghrelin were significantly higher in the PWS than in the OC subgroup (1781 ± 744 vs 792 ± 447 pg/mL, $P < .0001$) (Figure 2B). No difference was found between men and women. A trend toward a higher serum concentration of GIP in PWS compared with the OC group was observed (513.9 ± 558.9 vs 298.8 ± 90.7 pg/mL, $P = .06$). There was no significant difference regarding systemic inflammation between the two groups, at least for hs-CRP or cytokines measured in a multiplex assay (Figure 2, C and D).

PWS is associated with increased adipocyte size relative to fat mass

We analyzed scAT samples from 17 PWS subjects (5 men and 12 women) and their matched OCs. The mean adipocyte volume did not significantly differ between the

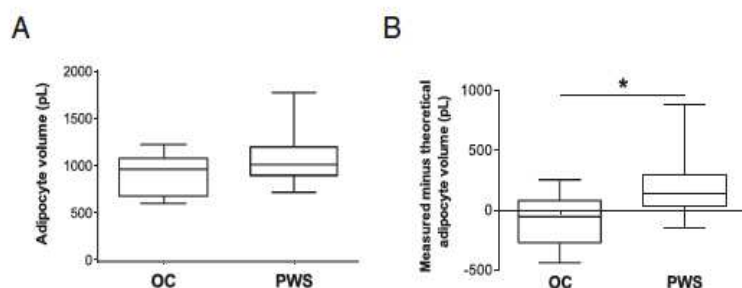


Figure 3. Measured and theoretical adipocyte size in subjects with PWS and in subjects with primary obesity (OC). Comparisons of adults with PWS ($n = 17$) and adult OC ($n = 17$ matched for age, FM (percentage), gender, and type 2 diabetes). A, Adipocyte volume (picoliters) was measured manually after adipocyte isolation and collagenase digestion. B, Measured adipocyte volume minus theoretical adipocyte volume (picoliters). The theoretical adipocyte volume was calculated according to the following equation: $[40.740\ 051 \times \text{FM.KG}] / [1 + (0.025\ 310 \times \text{FM.KG})]$, adapted from Spalding et al (25). Values are expressed as mean $\pm$ SD. Comparisons between the groups were performed using a Wilcoxon's test. *, $P < .05$.

two groups (1093 ± 269 vs 935 ± 211 pL, for PWS and OC, respectively; $P = .19$) (Figure 3A), even when men and women were analyzed separately. We then evaluated the theoretical expected adipocyte volume for total FM (ie, adipocyte morphology; see *Materials and Methods*). We found that the difference between adipocyte volume measured manually, and the theoretical adipocyte volume expected for total FM was higher in PWS individuals ($P = .01$) (Figure 3B). This suggests that adipocyte volume relative to FM is increased in PWS.

Adipocyte volume did not differ between the genotypes (deletion vs UPD) or between PWS patients treated or not with GH in childhood ($n = 6$ vs $n = 11$) or those receiving current sex hormone-replacement therapy or not ($n = 6$ vs

$n = 11$). In the PWS group, the adipocyte volume was significantly and positively correlated with BMI ($r = 0.46$, $P = .05$), total FM (kilograms) ($r = 0.47$, $P = .05$), and HbA1c ($r = 0.49$, $P = .05$). In multiple regression analyses, taking into account adipocyte volume, gender, age, FM, HbA1c, sex hormone-replacement therapy, and GH in childhood, the adipocyte volume was significantly associated only with gender (R^2 of the model = 0.67 , $P = 8. \times 10^{-3}$).

Transcriptomic functional signatures of adipose tissue in PWS subjects

We performed microarray experiments and searched for GO functions, which may discriminate PWS obese subjects and their matched controls.

First, cluster analysis showed that individuals with PWS were grouped together (Figure 4B). Second, using a 5% false discovery rate, we detected 96 up-regulated cDNAs (fold change 1.2–1.8) and 108 down-regulated cDNAs (fold change 0.8–0.07) in 14 PWS compared with matched OCs. Figure 4B shows the most significant GO themes among the annotated genes, ranked according to their functional coverage of the transcriptional domain (FunNet tool analysis). Overrepresented biological processes in PWS included defense and immune responses,

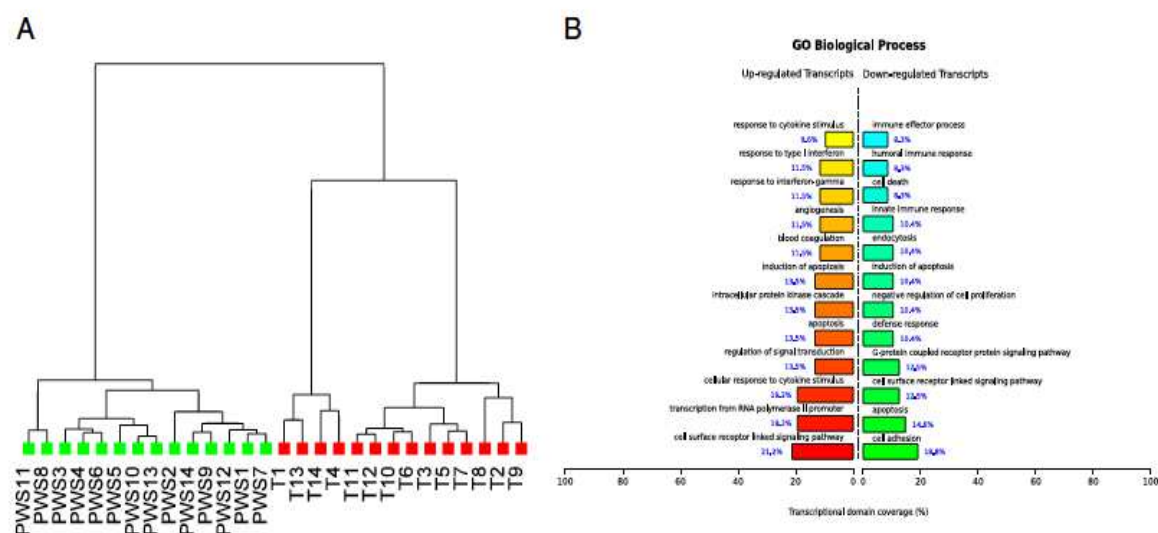


Figure 4. Functional transcriptomic signature of scAT in PWS subjects. A, Cluster analysis and signature validations were performed by hierarchical clustering using the Ward-correlation similarity measure and the average linkage algorithm. B, GO biological process annotation categories showing a significant enrichment in genes that are up- or down-regulated in the scAT of PWS subjects [$n = 14$ subjects in PWS groups and $n = 14$ control subjects (OC) matched for FM (percentage), age, gender, and type 2 diabetes]. Using the FunNet tool, genes whose expression changed between PWS and OC were grouped with the GO biological process annotations at specificity level 5. The bar plots represent the percentage of transcripts annotated by each theme among transcripts differentially expressed in the scAT of PWS subjects.

response to cytokine and interferon, cell surface receptor, cell adhesion, cell proliferation, and apoptosis. Using the Ingenuity tool, the first four enriched functional themes were connective tissue disorder, inflammatory disease, skeletal and muscular disorders, and immunological disease. No difference in transcriptomic signature was found between the genotypes (deletion vs UPD) or between PWS patients treated or not with GH in childhood or receiving current sex hormone-replacement therapy or not. However, because there was a small number of subjects in each subgroup, these results do not exclude a biological impact of such treatments on adipose tissue gene profile.

PWS is associated with changes in adipose tissue remodeling and inflammatory genes

Based on our microarray data, we observed that, among the most differentially genes expressed in the scAT of PWS, several encoded proteins were related to the extracellular matrix and immunoinflammation. Thus, collagen type VIII- α 1 (fold change 0.57), fibronectin type III (fold change 0.62), fibulin 1 (fold change 0.70), chitinase 3-like 1 (CHI3L1; fold change 0.63), or IL-7 receptor (fold change 0.60), synuclein (fold change 0.57), and versican (fold change 0.69) were significantly down-regulated (Supplemental Table 3). In contrast, another collagen, collagen type XV- α 1 (fold change 1.26), was up-regulated in the scAT of PWS. Some inflammatory mediators, such as chemokine (C-X-C motif) ligands 9 and 10 [chemokines (C-X-C motif) ligand 9, fold change 1.80; chemokine (C-X-C motif) ligand 10, fold change 1.50], were also up-regulated. These results were confirmed by RT-PCR for most of the genes (Figure 5).

We further extended this analysis by exploring the AT mRNA expression of a candidate gene that encodes known proteins involved in metabolic pathways, inflammation, and tissue remodeling (fibrosis). Among the extracellular matrix genes, we found that lysyl oxidase (LOX) and collagen type 4 (COL4 α 1) gene expression were down-regulated in PWS vs OC scAT, whereas collagen type-6 (COL6)- α isoforms were unchanged (Figure 5). Interestingly, lysophosphatidic acid receptor 1 (LPAR1), a gene encoding a receptor involved in the promotion of fibrosis in a different model was also down-regulated in the scAT of PWS. We also found decreased adipose expression in inflammatory genes such as CD68, CD3e, IL1 β , and chemokine (C-C motif) ligand-5 (CCL5), whereas CD40 and CD11c gene expression was unchanged. The adipose expression of metabolic genes such as, leptin, adiponectin, and perilipin was similar in both groups.

Gene expression did not differ significantly between the genotypes (deletion vs UPD) or between PWS patients

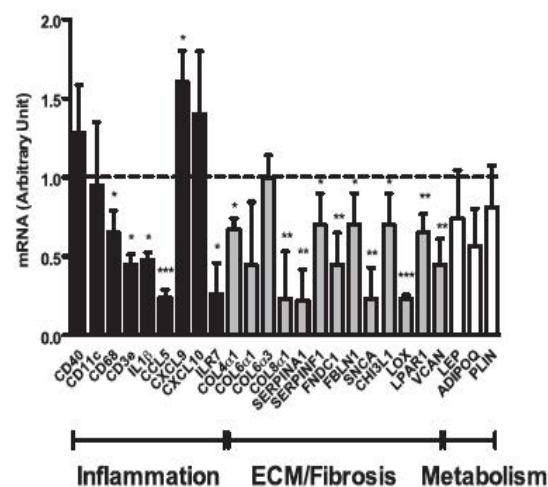


Figure 5. Comparison of mRNA gene expression of 25 genes in subjects with PWS and in subjects with primary obesity (OC). Gene expression quantified by real-time PCR of CD40, CD11c, CD68, CD3e, IL-1 β , chemokine (C-C motif) ligand-5 (CCL5), chemokine (C-X-C motif) ligands 9 and 10, collagen type IV- α 1 (COL4 α 1), COL6 α 1, COL8 α 1, SERPINA1 and SERPINF1 (serpin peptidase inhibitor A1 and F1), fibronectin type III (FNDC1; fibronectin), fibulin 1 (FBLN1; fibulin), SNCA (synuclein), CHI3L1, LOX, LPAR1, VCAN (versican), LEP (leptin), ADIPOQ (adiponectin), and PLIN (perilipin) in PWS (n = 17) and OC (n = 17). Values are expressed as mean $\pm$ SD. Comparisons between the groups were assessed using a Student's *t* test after log transformation of the values. *, *P* < .05; **, *P* < .001; ***, *P* < .0001.

treated or not with GH in childhood or those receiving current sex hormone-replacement therapy.

To evaluate the clinical relevance of changes in gene expression, we performed a correlation analysis between gene expression of all the aforementioned genes and phenotypes related to corpulence (BMI, FM), adipocyte size, and metabolic status (lipid and diabetes related traits). We found that age was significantly and positively correlated with markers of inflammation and negatively correlated with COL4 α 1 and COL6 α isoforms and adipocyte-related proteins (leptin, adiponectin, and perilipin) (data not shown). Adipocyte volume was positively correlated with IL-1 β ($r = 0.59$, $P = .011$), COL6 α 1 ($r = 0.66$, $P = .004$), leptin ($r = 0.57$, $P = .012$), and perilipin ($r = 0.67$, $P = .003$). Interestingly, metabolic traits (glycemia and/or HbA1c) were positively correlated with markers of inflammation, ie, CD68, CD3, IL-1 β , and IL-7 receptor in this population.

Discussion

Herein we have confirmed that PWS adults displayed a specific distribution of AT associated with a better metabolic and adipokine profile, with these features being independent of PWS genotype. Additionally, we have described, for the first time, a distinct pattern of AT gene

function with signatures that favor modified AT remodeling. Along these lines, we may speculate that scAT has functional characteristics that could favor its expandability in PWS.

In agreement with several studies (10–12) performed in subjects aged from 10 to 50 years, we confirm that body composition of PWS subjects was characterized by a decreased percentage of android FM and a lower trunk to appendicular FM ratio, a situation that is beneficial for metabolic complications (27). PWS subjects had a better metabolic profile, ie, a decreased insulin resistance index and increased circulating adiponectin. This was observed despite similar systemic inflammation in PWS and in subjects with primary obesity matched for total FM.

We have described that the improved metabolic profile was associated with a series of characteristics of scAT. The measured adipocyte volume compared with the theoretical volume expected for total FM was increased in PWS. One may suggest that, in PWS, sc adipocytes could have a higher capacity to increase in size, without the adverse consequences on the metabolic and inflammatory signals found in primary obesity. This observation can be linked with the AT expandability hypothesis developed by Vidal-Puig (28) and Virtue and Vidal-Puig (29), which states that the failure of AT expansion is one of the key factors linking positive energy balance and cardiometabolic risks and not obesity per se. Conversely, subcutaneous adipocytes with a higher capacity for growth, for facilitating storage and for decreased overflow of fatty acids, are associated with a lesser risk of lipotoxicity and metabolic syndrome (28).

Moreover, we observed that a series of AT genes, such as *SERPINF1*, *CHI3L1*, and *FIBULIN1*, were underexpressed in the AT of PWS patients. Interestingly these genes encode proteins that are increased at the systemic level in models of insulin resistance. Serpin peptidase inhibitor F1 or pigment epithelium-derived factor is a metabolic regulatory protein that was increased in the plasma of insulin-resistant adults (30–32) and was positively associated with the insulin resistance index. Circulating levels of *CHI3L1* (or YKL-40) were elevated in insulin-resistant compared with non-insulin-resistant individuals after adjustment for age and BMI (33). Fibulin1 levels, a component of the basal membrane, was increased in type 2 diabetes and might be involved in the pathophysiological process of arterial stiffness (34–36). This observation may stimulate interest in measuring the circulating levels of these molecules in PWS individuals.

We also identified transcriptomic functional signatures of AT in adults with PWS, which was characterized by changes in the expression of genes coding for inflammation and tissue-remodeling factors. In association with these functions, we observed modification of

genes involved in extracellular matrix (ECM) remodeling or the promotion of fibrosis, with the majority being down-regulated.

Regarding genes encoding for inflammation markers, we found a decreased expression of *CD68*, *CD3*, and *IL-1 β* , suggesting that low-grade inflammation was lower within the AT of PWS subjects. Furthermore, we found associations between glycemic status and expression of markers for inflammation in subjects with PWS. Given that numerous studies have shown that increased AT inflammation is related to impairment of insulin sensitivity, this observation is consistent with the assumption that the better metabolic profile present in PWS could be related to AT-specific characteristics.

We also found that modified mRNA expression of collagen IV and fibronectin, which are major components in the basal membrane of adipocytes and ECM (37), was also decreased in the AT of PWS patients as well as mRNA expression of LOX and has a role in stabilizing the collagen network. LPAR1, the receptor of lysophosphatidic acid (LPA), a profibrotic mediator involved in inhibition of adipogenesis, was also down-regulated in PWS subjects. It was shown that the stimulation of LPAR1 signaling inhibits the differentiation of preadipocytes by down-regulating peroxisomal proliferator-activated receptor- γ 2. Despite a lower body weight, *LPAR1*^{-/-} mice had higher adiposity than wild-type littermates, and their AT contained more preadipocytes that could be differentiated in culture, which is consistent with an antiadipogenic role for LPAR1 (38). Endogenous and exogenous LPA exerts a profibrotic activity in AT in vivo and in vitro, which could be mediated by an LPA1R-dependent pathway (39).

Pericellular fibrosis is increased in the AT of obese subjects (26, 40) and is considered a major player in AT dysfunction, as reviewed by Sun et al (41). Although we did not quantify collagen accumulation, it is tempting to speculate that changes in ECM genes in PWS may be associated with modified AT stiffness, a phenomenon that could promote adipocyte expansion. Overall, modified adipocyte size and gene expression in AT support the idea that scAT expandability may have a role in these differences in terms of the metabolic state observed between PWS and subjects with primary obesity.

What the potential origins of such modifications are remains an open question. Gene expression variations could be related to GH or sex hormone deficiency or to precocious developmental abnormalities. The absence of differences in terms of AT characteristics between PWS subjects receiving current sex hormone-replacement therapy or not, and GH treatment received previously or not, supports the idea that AT could have intrinsic develop-

mental abnormalities independently of endocrine deficiencies. We observed in our microarray data that expression of necdin, one of several genes located on 15q11-q13 region, was very low in the adipose tissue of PWS subjects compared with controls. Necdin is a pleiotropic protein that possesses antimitotic and prosurvival activities. It has been shown previously that loss of necdin expression promoted preadipocyte differentiation (42) and expansion of adipose tissue in necdin-null mutant mice during a high-fat diet (43). Based on this observation, it is tempting to speculate that altered necdin could in vivo play a role early in AT development and growth in these patients. Recently it has been shown that abnormalities in the AT of children with PWS, aged from 1 to 10 years, such as decreased progenitor cell content or impairment of lipolytic response to β -adrenergic agonists, were resolved by GH treatment (18). We failed to find an impact of GH treatment on adults' AT. However, no patient was receiving GH treatment at the time of AT sampling, and few had been treated previously in childhood. If they had, then treatment had been introduced later on and was not long term. We can also suppose that AT characteristics differed during kinetic childhood development compared with the stable situation in adulthood.

One of the limitations of our study is the lack of histological quantification of AT fibrosis. Due to tissue unavailability, we could not substantiate our observations by evaluating protein expression in the AT. It would have been of interest to improve the descriptions of the different compartments of AT within PWS subjects, especially the visceral depots. Unfortunately, these experiments would have required an abdominal magnetic resonance imaging or invasive surgery to obtain a sample of visceral adipose tissue, which we did not perform in PWS subjects.

In conclusion, PWS subjects, matched for FM percentage, have a better metabolic profile with regard to insulin resistance status and adipokine balance. AT in PWS is characterized by increased adipocyte size and changes in inflammation and ECM genes, features that could be related to the increased capacity of adipocyte cell expansion. This study opens up new perspectives in understanding the links between changes in AT development and the PWS phenotypes but also for metabolic obesity-related complications in primary obesity.

Acknowledgments

We thank Rohia Alili, who was involved in the recruitment of patients, the data collection, and sampling at the Center for Research on Human Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital (Paris,

France). We sincerely thank the PWS patients, the caregivers, and their families for their participation in this study.

We thank the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; the Direction of Clinical Research for their support, which promoted this clinical investigation, and INSERM for providing funds for the biological experiments.

Authors' contributions to the manuscript include the following: C.P., M.C., S.M., and D.L. designed the research; D.L., S.M., V.P., P.F., J.-P.B., and H.H. conducted the research; M.C. participated in the care and recruitment of the PWS subjects; C.P., S.M., and D.L. analyzed the data; C.P., D.L., and S.M. wrote the manuscript; K.C. and B.D. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript; and C.P. had primary responsibility for the final content. All authors have read and approved the final manuscript.

Address all correspondence and requests for reprints to: Christine Poitou, MD, French Reference Centre for Prader-Willi Syndrome, Department of Nutrition, Institute of Cardiology, Metabolism, and Nutrition, Pitié-Salpêtrière Hospital, 47-83 Boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris Cedex 13, France. E-mail: christine.poitou-bernert@psl.aphp.fr.

This work was supported by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris; the Direction of Clinical Research, which promoted this clinical investigation (Grant CRC P050318); and INSERM.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Goldstone AP, Holland AJ, Hauffa BP, Hokken-Koelega AC, Tauber M, speakers contributors at the Second Expert Meeting of the Comprehensive Care of Patients with PWS. Recommendations for the diagnosis and management of Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(11):4183–4197.
- Miller JL, Lynn CH, Driscoll DC, et al. Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A*. 2011;155A(5):1040–1049.
- Schuster DP, Osci K, Zipf WB. Characterization of alterations in glucose and insulin metabolism in Prader-Willi subjects. *Metabolism*. 1996;45(12):1514–1520.
- Talczizadeh Z, Butler MG. Insulin resistance and obesity-related factors in Prader-Willi syndrome: comparison with obese subjects. *Clin Genet*. 2005;67(3):230–239.
- Faienza MF, Ventura A, Lauciello R, et al. Analysis of endothelial protein C receptor gene and metabolic profile in Prader-Willi syndrome and obese subjects. *Obesity (Silver Spring Md)*. 2012;20(9):1866–1870.
- Haqq AM, Muchlbauer MJ, Newgard CB, Grambow S, Freemark M. The metabolic phenotype of Prader-Willi syndrome (PWS) in childhood: heightened insulin sensitivity relative to body mass index. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(1):E225–E232.
- Grugni G, Crinò A, Bedogni G, et al. Metabolic syndrome in adult patients with Prader-Willi syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis NMCD*. 2013;23(11):1134–1140.
- Reus L, Zwarts M, van Vlimmeren LA, Willemsen MA, Otten BJ, Nijhuis-van der Sanden MWG. Motor problems in Prader-Willi syndrome: a systematic review on body composition and neuromuscular functioning. *Neurosci Biobehav Rev*. 2011;35(3):956–969.
- Eiholzer U, Blum WF, Molinari L. Body fat determined by skinfold measurements is elevated despite underweight in infants with Prader-Labhart-Willi syndrome. *J Pediatr*. 1999;134(2):222–225.
- Theodoro MF, Talczizadeh Z, Butler MG. Body composition and

- fatness patterns in Prader-Willi syndrome: comparison with simple obesity. *Obesity (Silver Spring Md)*. 2006;14(10):1685–1690.
11. Sode-Carlson R, Farholt S, Rabben KF, et al. Body composition, endocrine and metabolic profiles in adults with Prader-Willi syndrome. *Growth Horm IGF Res*. 2010;20(3):179–184.
 12. Lloret-Linares C, Faucher P, Coupaye M, et al. Comparison of body composition, basal metabolic rate and metabolic outcomes of adults with Prader-Willi syndrome or lesional hypothalamic disease, with primary obesity. *Int J Obes* 2013;37(9):1198–1203.
 13. Goldstone AP, Thomas EL, Brynes AE, et al. Visceral adipose tissue and metabolic complications of obesity are reduced in Prader-Willi syndrome female adults: evidence for novel influences on body fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(9):4330–4338.
 14. Goldstone AP, Brynes AE, Thomas EL, et al. Resting metabolic rate, plasma leptin concentrations, leptin receptor expression, and adipose tissue measured by whole-body magnetic resonance imaging in women with Prader-Willi syndrome. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(3):468–475.
 15. Kennedy L, Bittel DC, Kibiryeve N, Kalra SP, Torto R, Butler MG. Circulating adiponectin levels, body composition and obesity-related variables in Prader-Willi syndrome: comparison with obese subjects. *Int J Obes* 2005. 2006;30(2):382–387.
 16. Patel P, Abate N. Role of subcutaneous adipose tissue in the pathogenesis of insulin resistance. *J Obes*. 2013;2013:489187.
 17. Chmcler J, Chung K-J, Chavakis T. The role of innate immune cells in obese adipose tissue inflammation and development of insulin resistance. *Thromb Haemost*. 2013;109(3):399–406.
 18. Cadoudal T, Bulcón M, Sengenès C, et al. Impairment of adipose tissue in Prader-Willi syndrome rescued by growth hormone treatment. *Int J Obes*. 2014;38(9):1234–1240.
 19. Coupaye M, Lorenzini F, Lloret-Linares C, et al. Growth hormone therapy for children and adolescents with Prader-Willi syndrome is associated with improved body composition and metabolic status in adulthood. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(2):E328–E335.
 20. Dalmás E, Kahn J-F, Giral P, et al. Intima-media thickness in severe obesity: links with BMI and metabolic status but not with systemic or adipose tissue inflammation. *Diabetes Care*. 2013;36(11):3793–3802.
 21. Ciagura C, Bouillot J-L, Lloret-Linares C, et al. Dynamics of change in total and regional body composition after gastric bypass in obese patients. *Obesity (Silver Spring Md)*. 2010;18(4):760–765.
 22. Ferreira I, Snijder MB, Twisk JWR, et al. Central fat mass versus peripheral fat and lean mass: opposite (adverse versus favorable) associations with arterial stiffness? The Amsterdam Growth and Health Longitudinal Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2632–2639.
 23. Dalmás E, Rouault C, Abdenour M, et al. Variations in circulating inflammatory factors are related to changes in caloric and carbohydrate intakes early in the course of surgery-induced weight reduction. *Am J Clin Nutr*. 2011;94(2):450–458.
 24. Cotillard A, Poitou C, Torcivia A, et al. Adipocyte size threshold matters: link with risk of type 2 diabetes and improved insulin-resistance after gastric bypass. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; jc20141074.
 25. Spalding KL, Arner E, Westermark PO, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783–787.
 26. Henegar C, Tordjman J, Achard V, et al. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol*. 2008;9(1):R14.
 27. Garg A. Regional adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(9):4206–4210.
 28. Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome. *Endocrinol Nutr Órgano Soc Esp Endocrinol Nutr*. 2013;60(suppl 1):39–43.
 29. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(3):338–349.
 30. Crowe S, Wu LE, Economou C, et al. Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity. *Cell Metab*. 2009; 10(1):40–47.
 31. Sabater M, Moreno-Navarrete JM, Ortega FJ, et al. Circulating pigment epithelium-derived factor levels are associated with insulin resistance and decrease after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):4720–4728.
 32. Gattu AK, Birkenfeld AL, Jornayvaz F, et al. Insulin resistance is associated with elevated serum pigment epithelium-derived factor (PEDF) levels in morbidly obese patients. *Acta Diabetol*. 2012; 49(suppl 1):S161–S169.
 33. Kyrgios I, Galli-Tsinopoulou A, Stylianou C, Papakonstantinou E, Arvanitidou M, Haidich A-B. Elevated circulating levels of the serum acute-phase protein YKL-40 (chitinase 3-like protein 1) are a marker of obesity and insulin resistance in prepubertal children. *Metabolism*. 2012;61(4):562–568.
 34. Cangemi C, Skov V, Poulsen MK, et al. Fibulin-1 is a marker for arterial extracellular matrix alterations in type 2 diabetes. *Clin Chem*. 2011;57(11):1556–1565.
 35. Laugesen E, Høyem P, Christiansen JS, et al. Plasma levels of the arterial wall protein fibulin-1 are associated with carotid-femoral pulse wave velocity: a cross-sectional study. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12(1):107.
 36. Scholze A, Bladbjerg E-M, Sidelmann JJ, et al. Plasma concentrations of extracellular matrix protein fibulin-1 are related to cardiovascular risk markers in chronic kidney disease and diabetes. *Cardiovasc Diabetol*. 2013;12:6.
 37. Pierleoni C, Verdenelli F, Castellucci M, Cinti S. Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. *Eur J Histochem EJH*. 1998;42(3):183–188.
 38. Choi JW, Herr DR, Noguchi K, et al. LPA receptors: subtypes and biological actions. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50:157–186.
 39. Rancoule C, Viaud M, Gres S, et al. Pro-fibrotic activity of lysophosphatidic acid in adipose tissue: in vivo and in vitro evidence. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1841(1):88–96.
 40. Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, et al. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 2010;59(11):2817–2825.
 41. Sun K, Tordjman J, Clément K, Scherer PE. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab*. 2013;18(4):470–477.
 42. Bush JR, Wevrick R. Loss of the Prader-Willi obesity syndrome protein necdin promotes adipogenesis. *Gene*. 2012;497(1):45–51.
 43. Fujiwara K, Hasegawa K, Ohkumo T, Miyoshi H, Tscng Y-H, Yoshikawa K. Necdin controls proliferation of white adipocyte progenitor cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30948.

Le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) est, quant à lui, plus hétérogène sur les plans clinique et génétique. Peuvent s'associer à l'obésité sévère et précoce, une dystrophie rétinienne, des anomalies des extrémités (syndactylie, polydactylie), des anomalies rénales, un hypogonadisme, une dysmorphie et des difficultés d'apprentissage. Au moins 19 gènes différents ont été identifiés, codant tous pour des protéines impliquées dans le fonctionnement des cils primaires ce qui définit le BBS comme une ciliopathie [134, 135]. Les cellules ciliées sont impliquées dans le développement des mammifères, contribuant notamment à la symétrie droite/gauche, et permettent de transmettre des messages de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. On comprend que des dysfonctionnements dans ces processus mettant en jeu les cellules ciliées puissent contribuer aux altérations des épithéliums pigmentaires essentiels à la vision et aux anomalies de certains organes comme le rein. Mais les mécanismes précis menant à l'obésité dans le BBS sont encore mal compris. Plusieurs hypothèses ont été émises. Premièrement, l'hypothèse d'une origine centrale à l'obésité par dysfonctionnement hypothalamique, associée à une hyperphagie, a été développée. Il a été montré que le cil primaire pouvait être impliqué dans la voie leptine-mélanocortines. En effet, les souris qui avaient des cils primaires courts au niveau hypothalamique présentaient une augmentation de leur prise alimentaire et une réduction de leur dépense énergétique, amenant à un bilan énergétique positif avec obésité. De plus, la réponse de ces souris au signal anorectique de la leptine était atténuée. Le cil primaire semble donc jouer un rôle dans la sensibilité des neurones hypothalamiques au signal satiétogène de la leptine [136]. Il interviendrait également dans le transport et le trafic intracellulaire de LEPR [137]. Les protéines BBS semblent nécessaires pour la bonne localisation de LEPR dans l'hypothalamus [135]. D'autres hypothèses d'une origine périphérique à l'obésité impliquant le tissu adipeux et la prolifération adipocytaire ou d'autres tissus endocriniens (pancréas, estomac, intestin) ont aussi été proposées [138].

Outre le SPW, d'autres syndromes associent une obésité et un retard mental, tels que le syndrome de Cohen, l'ostéodystrophie héréditaire d'Albright (ou pseudohypoparathyroïdie de type 1A), le syndrome de Borjeson-Forssman-Lehman ou le syndrome de l'X fragile (Tableau 3, page 72). Dans le syndrome de Cohen, notamment, l'obésité est le plus souvent tronculaire et débute dans l'enfance (vers l'âge de 10 ans). Elle est associée à un retard mental, léger à modéré, une dystrophie rétinienne, une hypotonie néonatale et infantile, un comportement avenant et sympathique, des anomalies cranio-faciales caractéristiques (incisives centrales de grande taille, philtrum court, bouche ouverte), des anomalies des extrémités (pieds et mains

fins, doigts et orteils longs et fuselés, hyperlaxité articulaire), une neutropénie inconstante et des anomalies endocriniennes (hypogonadisme, retard statural) [130]. Ce syndrome est de transmission autosomique récessive, lié à une mutation du gène *COH1* (Cohen syndrome 1) (8q22-q23) codant pour une protéine transmembranaire ubiquitaire ayant un rôle dans le trafic intracellulaire.

Outre le BBS, l'obésité peut aussi être associée à des anomalies ophtalmologiques dans le syndrome d'Alström. Ce syndrome est caractérisé par une obésité précoce, une dystrophie rétinienne, une surdité de perception, un diabète de type 2, une insuffisance rénale et cardiaque (cardiomyopathie dilatée). D'autres manifestations cliniques sont parfois observées incluant un acanthosis nigricans, une alopécie, une petite taille, une cyphoscoliose ou une cataracte [130]. Sur le plan hormonal, il existe parfois une hypothyroïdie, un hypogonadisme, un déficit en GH, un diabète insipide ou un hyperinsulinisme. Le gène *ALMS1* (Alström syndrome 1), localisé sur le chromosome 2p13-p14, code pour une protéine d'expression ubiquitaire mais de fonction inconnue. Du fait de sa localisation particulière dans le centrosome et le corps ciliaire, il a également été suggéré que le syndrome d'Alström, comme le BBS, fasse partie des ciliopathies [139].

Tableau 3: Signes cliniques et anomalies génétiques des principaux syndromes génétiques rares avec obésité.

Syndrome	Signes associés à l'obésité	Génétique
Prader-Willi	Hypotonie néonatale, retard mental, hyperphagie, dysmorphie faciale, retard statural, hypogonadisme hypogonadotrope	Défaut de la région 15q11-q13 d'origine paternelle (microdélétion, disomie maternelle, défaut d'empreinte ou translocation réciproque)
Bardet-Biedl	Retard mental, dystrophie rétinienne ou rétinite pigmentaire, anomalies des extrémités, hypogonadisme, atteinte rénale	BBS1 (11q13) ; BBS2 (16q12.2) ; BBS3 (<i>ARL6</i> , 3q11) ; BBS4 (15q24.1) ; BBS5 (2q31.1); BBS6 (<i>MKKS</i> , 20p12) ; BBS7 (4q27) ; BBS8 (<i>TTC8</i> , 14q31) ; BBS9 (<i>PTHB1</i> , 7p14) ; BBS10 (<i>C12orf58</i> , 12q21.2) ; BBS 11 (<i>TRIM32</i> , 9q33.1) ; BBS12 (4q27) ; BBS13 (<i>MKS1</i> , 17q23) ; BBS14 (<i>CEP290</i> , 12q21.3) ; BBS15 (<i>WDPCP</i> , 2p15) ; BBS16 (<i>SDCCAG8</i> , 1q43) ; BBS17 (<i>LZTFL1</i> , 3p21) ; BBS18 (<i>BBIP1</i> , 10q25) ; BBS19 (<i>IFT27</i> , 22q12)
Cohen	Dystrophie rétinienne, dysmorphie, microcéphalie, retard mental, neutropénie cyclique	Autosomique récessif gène <i>COH1</i> (chr 8q22-q23)
Alström	Dystrophie rétinienne, surdité de perception, cardiomyopathie dilatée,	Autosomique récessif gène <i>ALMS1</i> (chr 2p13-p14)

	atteintes rénale, pulmonaire et hépatique	
X fragile	Déficit intellectuel modéré à sévère, hyperactivité, dysmorphie faciale, macro-orchidie post-pubertaire	Dominant lié à l’X gène <i>FMR1</i> (Xq27.3)
Borjeson- Forssman- Lehmann	Retard mental sévère, hypotonie, microcéphalie, dysmorphie faciale, hypogonadisme, épilepsie	Récessif lié à l’X gène <i>PHF6</i> (Xq26-q27)
Ostéodystrophie d’Albright (pseudo- hypoparathyroïdie de type 1a)	Dysmorphie faciale, brachymétacarpie et brachymétatarsie, retard psychomoteur variable, tableau de résistance hormonale (hypocalcémie, hypothyroïdie, retard pubertaire)	Autosomique dominant gène <i>GNAS1</i> (20q13.2) Mutations inactivatrices de la sous-unité α -activatrice associée à la protéine G
Délétion 16p11.2	Retard de développement, déficience intellectuelle, troubles autistiques	Autosomique dominant Microdélétion de la région 16p11.2
Variants de <i>KSR2</i>	Hyperphagie dans l’enfance, diminution de la fréquence cardiaque et du métabolisme de base, insulino-résistance sévère	Rare variants du gène <i>KSR2</i> (12q24.22-q24.23)
Mutation de <i>TUB</i>	Cécité nocturne, dystrophie rétinienne	Mutation homozygote du gène <i>TUB</i> (11p15.4)
Délétion des gènes <i>ACP1</i>, <i>TMEM18</i>, <i>MYT1L</i>	Hyperphagie, déficit intellectuel, troubles du comportement sévères	Délétion paternelle des gènes <i>ACP1</i> , <i>TMEM18</i> , <i>MYT1L</i> (2p25)

ACP1: acid phosphatase 1, soluble ; ALMS1: Alström syndrome 1 ; ARL6: ADP-ribosylation factor-like 6 ; BBIP1: BBS protein complex-interacting protein 1 ; BBS: Bardet-Biedl syndrome ; C12orf58: chromosome 12 open reading frame 58 ; CEP290: centrosomal protein, 290-kd ; COH1: Cohen syndrome 1 ; FMR1: fragile X mental retardation 1 ;

GNAS1: guanine nucleotide-binding protein, alpha-stimulating activity polypeptide 1 ; IFT27: intraflagellar transport 27, chlamydomonas, homolog of ; KSR2: kinase supressor of Ras 2 ; LZTFL1: leucine zipper transcription factor-like 1 ; MKKS: McKusick-Kauffman syndrome ; MKS1: Meckel syndrome, type 1 ; MYT1L: myelin transcription factor 1-like ; PHF6: PHD finger protein 6 ; PTHB1: parathyroid hormone-responsive B1 gene ; SDCCAG8: serologically defined colon cancer antigen 8 ; TMEM18: transmembrane protein 18 ; TRIM32: tripartite motif-containing protein 32 ; TTC8: tetratricopeptide repeat domain-containing protein 8 ; TUB: tubby-like protein ; WDPCP: WD repeat-containing planar cell polarity effector

Revue 3 (page 181): Obésités rares d'origine génétique.

H Huvenne, B Dubern, K Clément, C Poitou. Feuillet de Biologie 2014; 321: 23-31.

Aucun traitement spécifique n'est actuellement disponible dans les obésités syndromiques, à l'exception d'une prise en charge globale, spécialisée et multidisciplinaire (diététique alimentaire et activité physique, psychomotricité, traitement substitutif hormonal,...), à mettre en place le plus précocement possible, dès la petite enfance. Dans le SPW, le traitement par GH doit être discuté. En effet, les essais thérapeutiques ont montré que ce traitement, débuté avant l'âge d'un an, à des posologies utilisées habituellement dans le retard de croissance de l'enfant, améliore la croissance, la composition corporelle, la force musculaire, les capacités et l'agilité physiques, les performances motrices et le métabolisme lipidique chez l'enfant et l'adulte présentant un SPW [140-142]. Différentes molécules (béloranibe, ocytocine, topiramate, ghréline non acylée) sont actuellement en cours de développement et semblent très prometteuses pour la prise en charge future du SPW.

L'indication de la chirurgie bariatrique dans le cadre des obésités syndromiques reste largement discutée en raison des données limitées dans la littérature. Ainsi, la perte de poids moyenne et le pourcentage de perte de poids à 2 ans était respectivement de 32,5 kg et 63,2%, sans complications majeures chez 3 patients ayant un SPW (2 sleeve gastrectomies et 1 bypass) [143]. Dans une autre étude, 23 patients avec obésité syndromique ayant eu une sleeve gastrectomie par laparoscopie ont été décrits (16 SPW, 6 BBS et 1 syndrome d'Alström). La réduction moyenne de l'IMC à 4 ans de suivi était de 60,2% avec résolution de plus de 90% des comorbidités et sans complications majeures [144]. Ces 2 observations sont toutefois en opposition avec la description rétrospective de 60 patients avec un SPW et ayant eu une chirurgie bariatrique. Dans ce travail, les différentes procédures chirurgicales n'ont entraîné que de faibles résultats chez les sujets ayant un SPW en comparaison aux individus ayant une obésité commune. A 5 ans, la perte de poids moyenne après bypass n'était que de 2,4% et après anneau gastrique il existait même une prise de poids de 3,5% par rapport au poids pré-opératoire. En plus de ces faibles résultats, de nombreuses complications post-opératoires étaient reportées: décès, embolie pulmonaire, infection de la plaie post-opératoire, perforation gastrique [145]. De même, dans le cadre du BBS, les résultats de la chirurgie bariatrique sont limités et contradictoires. Un bypass gastrique a entraîné chez un adolescent de 16 ans, ayant un BBS, une diminution de l'IMC de 52,28 jusque 34,85 kg/m², à 42 mois de la chirurgie, sans complications post-opératoires [146]. Cet effet bénéfique a également été observé chez une femme de 33 ans, qui a subi une sleeve gastrectomie, permettant une perte de poids de 23,9% à 1 an [147]. Par contre, la pose d'un anneau gastrique chez un homme de

35 ans ayant un BBS n'a entraîné qu'une perte de poids très limitée de 9% sans amélioration de son diabète de type 2 [147].

Au vu du nombre limité de cas décrits dans la littérature, l'efficacité à long terme de la chirurgie bariatrique dans les obésités génétiques (syndromiques et monogéniques) nécessite de plus amples évaluations. La décision de chirurgie bariatrique dans ce contexte doit donc toujours être discutée par une équipe pluridisciplinaire, d'autant que les troubles sévères du comportement alimentaire sont habituellement une contre-indication à la chirurgie bariatrique. La position actuelle du centre de référence du SPW est prudente et ne recommande pas la pratique de la chirurgie bariatrique en cas d'obésité syndromique avec impulsivité alimentaire. De même, la société ESPGHAN (European society for pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition) demande d'autres études sur l'analyse du risque de la chirurgie bariatrique chez les adolescents présentant une obésité extrême, notamment une obésité syndromique, et reste donc prudente sur l'indication de cette thérapeutique dans l'obésité sévère chez l'adolescent [148].

Revue 4 (page 191): Obesity.

H Huvenne, P Tounian, K Clément, B Dubern. In: Weiss RE, Refetoff S. Genetic diagnosis of endocrine disorders, Second edition. Elsevier 2015. En cours de publication.

Même si les progrès des études moléculaires ont permis d'identifier quelques gènes impliqués principalement dans les obésités extrêmes, à ce jour, les anomalies génétiques en cause ne sont identifiées que dans moins de 5% des cas. Or, la précocité et la sévérité de ces obésités monogéniques et syndromiques sont en faveur d'une origine génétique très peu dépendante de l'environnement. Si les mutations dans la voie leptine-mélanocortines, et en particulier dans le gène *LEPR*, semblent jouer un rôle important dans la survenue des obésités extrêmes, leur fréquence n'est pas connue à ce jour dans la population obèse française. De plus, d'autres anomalies génétiques sont probablement en cause dans ces formes extrêmes d'obésité. Ainsi l'identification de nouveaux gènes pourrait permettre de mieux comprendre la physiopathologie de l'obésité et les mécanismes de régulation du poids, afin d'améliorer la prise en charge des sujets atteints.

III. RÉSULTATS. APPROCHE GÈNE CANDIDAT: ÉTUDE DE L'IMPLICATION DU GÈNE *LEPR* DANS UNE POPULATION D'OBÉSITÉ EXTRÊME

III.1. Etat actuel des connaissances

Le récepteur de la leptine joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire. Seules quelques mutations du gène *LEPR* ont été décrites chez des sujets ayant une obésité massive à début précoce associée à des anomalies endocriniennes [86, 103]. A ce jour, le phénotype des sujets porteurs de mutations hétérozygotes de *LEPR* est peu décrit [103, 105].

La prévalence des mutations de *LEPR* est peu connue et n'a actuellement été estimée que dans 2 populations très spécifiques marquées par un taux élevé de consanguinité [103, 105]. A ce jour, leur prévalence dans la population obèse française n'est pas connue.

Si les sujets déficients en leptine par mutations du gène *LEP* peuvent bénéficier d'un traitement substitutif de leptine [107], la prise en charge des sujets porteurs de mutations de *LEPR* reste à ce jour difficile, sans thérapeutique actuellement disponible chez l'homme [109]. Les effets de la chirurgie bariatrique sont aussi peu connus, avec une perte de poids variable et limitée décrite uniquement chez 2 patients [110].

III.2. Matériel et Méthodes

Afin de répondre à la question : « **Quelle est l'implication des mutations du gène *LEPR* dans l'obésité précoce en France ?** », nous avons étudié une population composée de 535 sujets Français (180 enfants et 355 adultes) présentant une obésité sévère définie par un IMC $> 35 \text{ kg/m}^2$ chez l'adulte ou un Z-score d'IMC $> 3 \text{ DS}$ chez l'enfant. Le service de Nutrition adulte de la Pitié-Salpêtrière (Dr Poitou, Pr Clément), centre de référence pour les obésités rares, et le service de Nutrition pédiatrique de l'hôpital Trousseau (Dr Dubern, Pr Tounian), en collaboration avec le service de Nutrigénétique de la Pitié-Salpêtrière (Dr Le Bihan), ont reçu les demandes d'analyses clinique et génétique de sujets suivis dans différents hôpitaux en France (Paris (Robert Debré et St Vincent de Paul), Amiens, Bordeaux, Lyon, Marseille, Reims et St Denis de La Réunion).

Pour déterminer la fréquence des mutations du gène *LEPR* dans cette large population française, un séquençage direct de *LEPR* (18 régions codantes) a été réalisé pour l'ensemble des sujets. L'effet délétère des mutations a été prédit *in silico* par le logiciel Alamut (Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware, Rouen, France)) et via les sites

internet Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), Sift (<http://sift.jcvi.org/>) et Mutation Taster (<http://doro.charite.de/MutationTaster/index>). En cas de mutation du gène *LEPR* mise en évidence, nous avons réalisé une caractérisation phénotypique détaillée des sujets porteurs de mutations à l'état homozygote et des sujets hétérozygotes apparentés. Elle comprenait l'histoire pondérale, la composition corporelle, la dépense énergétique de repos, les paramètres métaboliques et des explorations hormonales. Enfin, pour évaluer les effets de la chirurgie bariatrique, j'ai étudié l'évolution pondérale post-chirurgicale des 3 patients porteurs d'une mutation de *LEPR* à l'état homozygote ayant été opérés.

III.3. Résultats

III.3.1. Identification de 7 nouvelles mutations du gène *LEPR*

Douze patients porteurs de 7 nouvelles mutations du gène *LEPR* (c.1871A>G, c.1810T>G, c.2357T>C, c.2491G>A, c.Δexon6-8, c.1604-1G>A, c.1264T>C, c.2131dup) ont été identifiés (9 homozygotes et 3 hétérozygotes composites) (Figure 9, page 81). La fréquence des mutations de *LEPR* dans notre population obèse française est donc de 2,24%. D'après les logiciels de prédiction, les 7 mutations altèrent la séquence protéique de LEPR (p.C604G, p.L786P, p.H800_N831del, p.P166CfsX7, p.535-1G>A, p.Y422H, p.T711NfsX18). Cinq mutations résultent en une protéine LEPR tronquée non-fonctionnelle et 2 mutations ont une forte prédiction d'altération de la fonction du récepteur LEPR.

III.3.2. Identification d'une même mutation chez des patients originaires de l'île de La Réunion

De façon surprenante, 6 sujets, non apparentés, étaient porteurs de la même mutation (p.P166CfsX7) (Figure 9, page 81) provoquant une large délétion des exons 6 à 8, Δexon6-8 (Figure 10, page 82), à l'état homozygote (n=5) ou hétérozygote composite (n=1). Ces 6 sujets étaient tous originaires de l'île de La Réunion. Cette mutation n'a pas été détectée par un test qPCR (PCR (polymerase chain reaction) quantitative) ou par séquençage direct dans 2 autres populations indépendantes: 189 sujets témoins issus de la cohorte SU.VI.MAX (supplémentation en vitamines et minéraux anti-oxydants) (âge moyen 50.1 ± 6.3 ans, IMC moyen 23.8 ± 3.4 kg/m²) [149] et 500 sujets sévèrement obèses non originaires de La Réunion. La découverte d'un groupe de 6 sujets non apparentés porteurs de la même mutation dans une région géographique spécifique, constituée d'une population génétiquement isolée,

amène à s'interroger sur l'origine de cette mutation, probablement à partir d'un ancêtre commun et suggère donc un effet isolat. L'effet isolat est un mécanisme physiopathologique bien connu décrit dans des pathologies génétiques rares, telles que la mutation du gène *ALDH7A1* (aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1) chez des patients Tunisiens présentant une épilepsie pyridoxino-dépendante [150] ou la mutation du gène *LMNA* (lamine A/C) chez des femmes originaires de La Réunion présentant une lipodystrophie sévère [151].

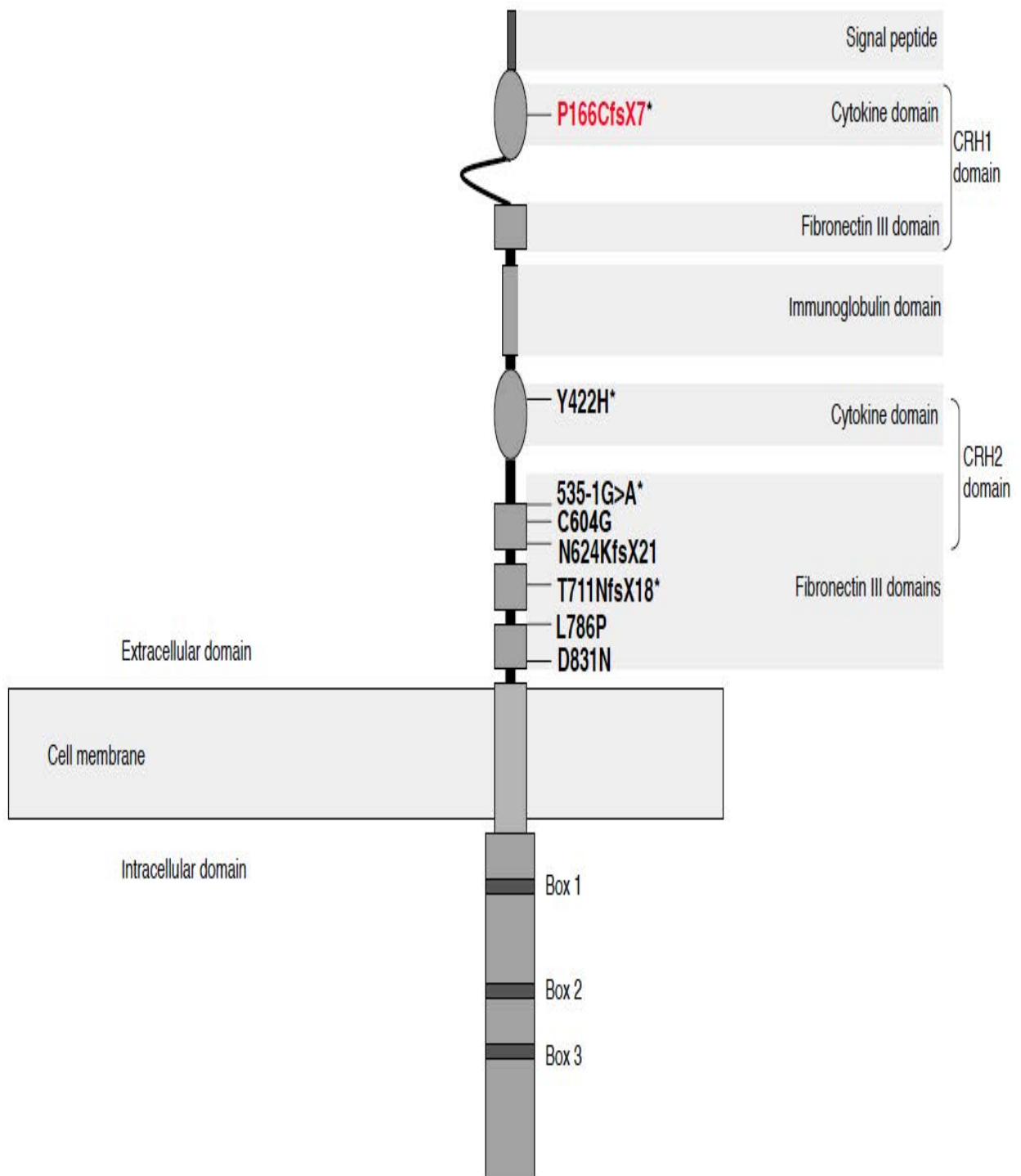


Figure 9: Position des mutations identifiées dans la protéine LEPR.

5 mutations homozygotes ont été mises en évidence chez 9 sujets obèses. Les mutations marquées par un astérisque* sont observées chez les sujets hétérozygotes composites. La mutation indiquée en rouge est la mutation de l'île de La Réunion.

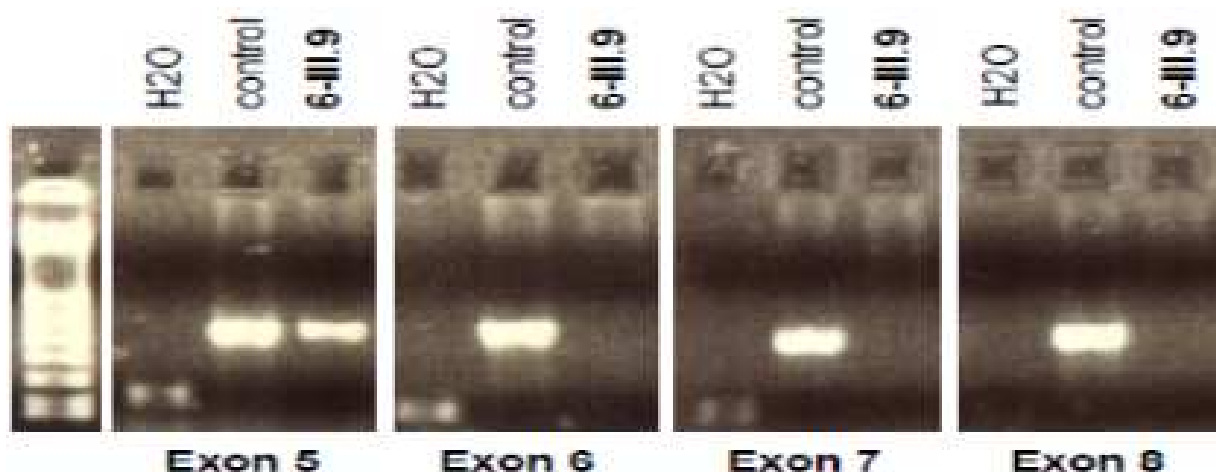


Figure 10: Produit de l'amplification PCR (polymerase chain reaction) des exons 5, 6, 7 et 8 du gène *LEPR* d'un sujet porteur homozygote de la mutation $\Delta exon6-8$ (6-III.9) et d'un sujet témoin (control).

Ces résultats montrent l'absence de produit d'amplification PCR des exons 6, 7 et 8 chez le sujet porteur de la mutation $\Delta exon6-8$.

III.3.3. Phénotypes cliniques et biologiques des sujets porteurs de mutations homozygotes de *LEPR*

Nous avons ensuite analysé le phénotype des sujets porteurs d'une mutation du gène *LEPR* à l'état homozygote. Ils présentaient une obésité sévère (Z-score d'IMC moyen au diagnostic 6,6 DS) à début précoce (âge moyen de début de l'obésité: 4 mois) (Figures 11A et 11B, page 83). Le pourcentage de masse grasse moyen (51,9%) était en accord avec la sévérité de l'obésité. Tous les sujets présentaient une hyperphagie, avec impulsivité alimentaire dans 73% des cas. La concentration circulante moyenne de leptine (100,3 ng/mL) était environ 1,5 fois plus élevée que celle attendue pour la masse grasse. Un hypogonadisme hypogonadotrope a été diagnostiqué chez 6 adultes sur 9 (67% des cas), un déficit en hormone de croissance chez 4 sujets (36%) et une hypothyroïdie centrale chez un seul de ces sujets. Le phénotype des 6 sujets porteurs de la mutation $\Delta exon6-8$ ne différait pas de celui des autres sujets homozygotes, hormis la présence plus fréquente de déficit en hormone de croissance (60%).

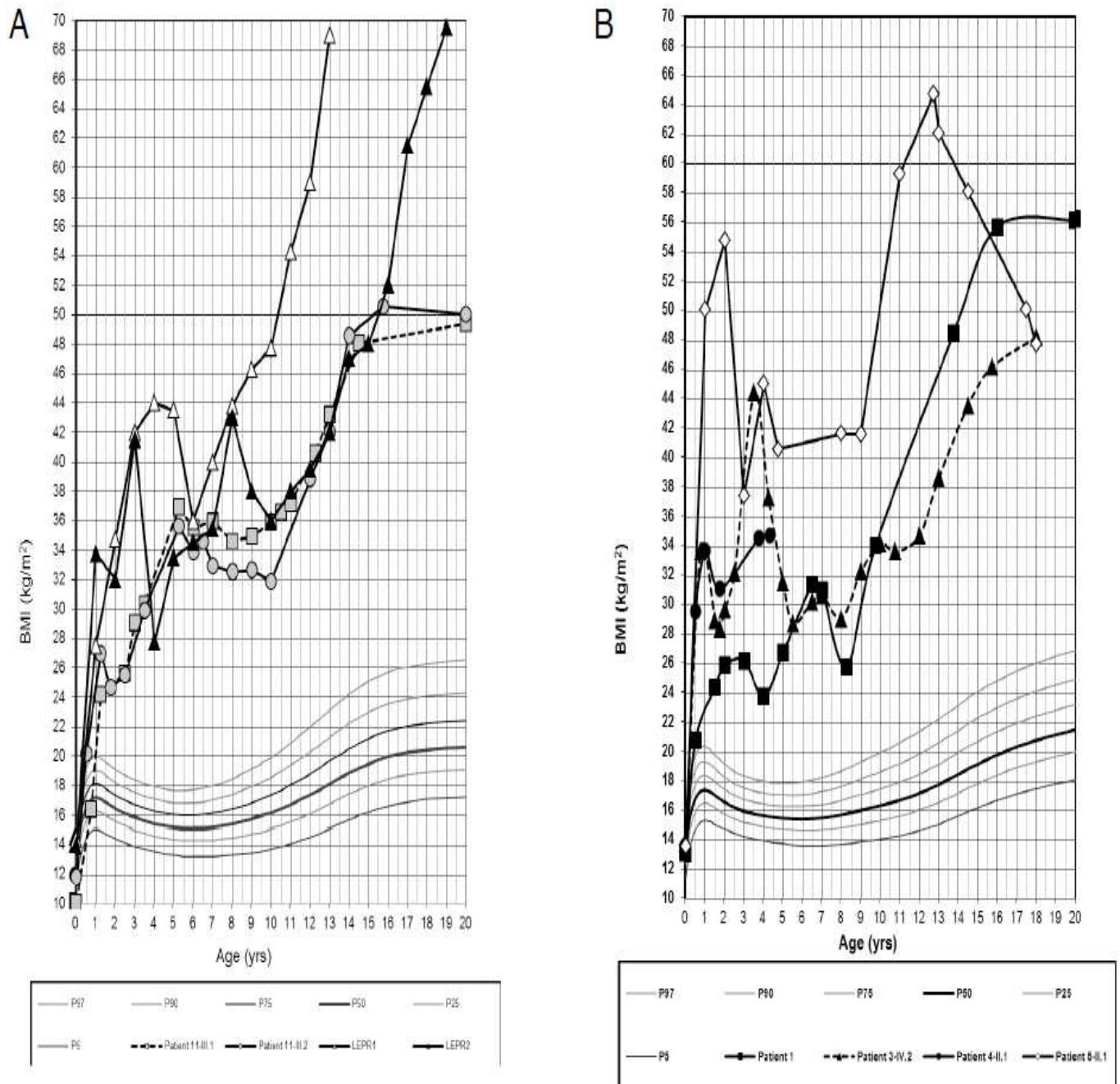


Figure 11: Courbes d'IMC des patients porteurs de mutations de *LEPR* de la naissance à l'âge adulte.

A: Courbes d'IMC de 2 sœurs hétérozygotes composites pour les mutations c.1264T>C et c.2131 dup (patients 11-III.1 et 11-III.2) et des 2 sœurs présentant un déficit en *LEPR* initialement décrites par Clément et al [86].

B: Courbes d'IMC des garçons porteurs de mutations de *LEPR*: patients 1 (mutation c.1871A dup), 3-IV.2 (mutation c.2357T>C), 4-II.1 (mutation c.2491G>A) and 5-II.1 (*Δ*exon6-8).

La prise en charge habituelle des patients obèses (régimes restrictifs et programmes d'activité physique) n'était que faiblement et transitoirement efficace chez les sujets porteurs de mutation homozygote de *LEPR* et était toujours suivie d'une reprise pondérale, à l'exception d'un sujet (patient 5-II.1 (*Δexon6-8*)) qui poursuit un régime restrictif extrêmement contrôlé permettant une diminution de son IMC (Figure 11B, page 83). Les résultats de la chirurgie bariatrique chez 3 de ces sujets étaient inconstants. Deux gastroplasties ont permis une perte de poids à long terme après 8 ans de suivi chez un premier patient [110] et une perte de poids initiale significative (-44% de perte de poids à 9 mois de suivi) chez un autre patient. Par contre, un bypass n'a pas eu d'effets significatifs à long terme chez un troisième sujet (-7% à 5 ans de suivi). Ces observations suggèrent qu'en plus de l'approche multidisciplinaire globale, l'environnement social et familial et la situation psychologique doivent être prudemment évalués avant d'envisager toute chirurgie bariatrique chez les sujets ayant une obésité massive et précoce en rapport avec une anomalie génétique identifiée.

III.3.4. Phénotypes cliniques et biologiques des sujets hétérozygotes pour la mutation de *LEPR* et originaires de l'île de La Réunion

Les 21 sujets apparentés porteurs de mutations du gène *LEPR* à l'état hétérozygote ne présentaient pas de phénotype intermédiaire (Figure 12, page 85). L'obésité était de sévérité variable dans 80% des cas (Z-score d'IMC moyen 3,3 DS) (Figure 13, page 86) et n'était jamais associée ni à une impulsivité alimentaire et ni à des anomalies endocriniennes. Comme précédemment décrit pour les gènes *MC4R* et *POMC*, la pénétrance de l'obésité secondaire à la perte d'une copie fonctionnelle de *LEPR* peut être incomplète avec une expression clinique variable, sous-tendant le rôle de la localisation et du type de la mutation, de l'environnement et d'autres facteurs génétiques potentiellement modulateurs [152, 153].

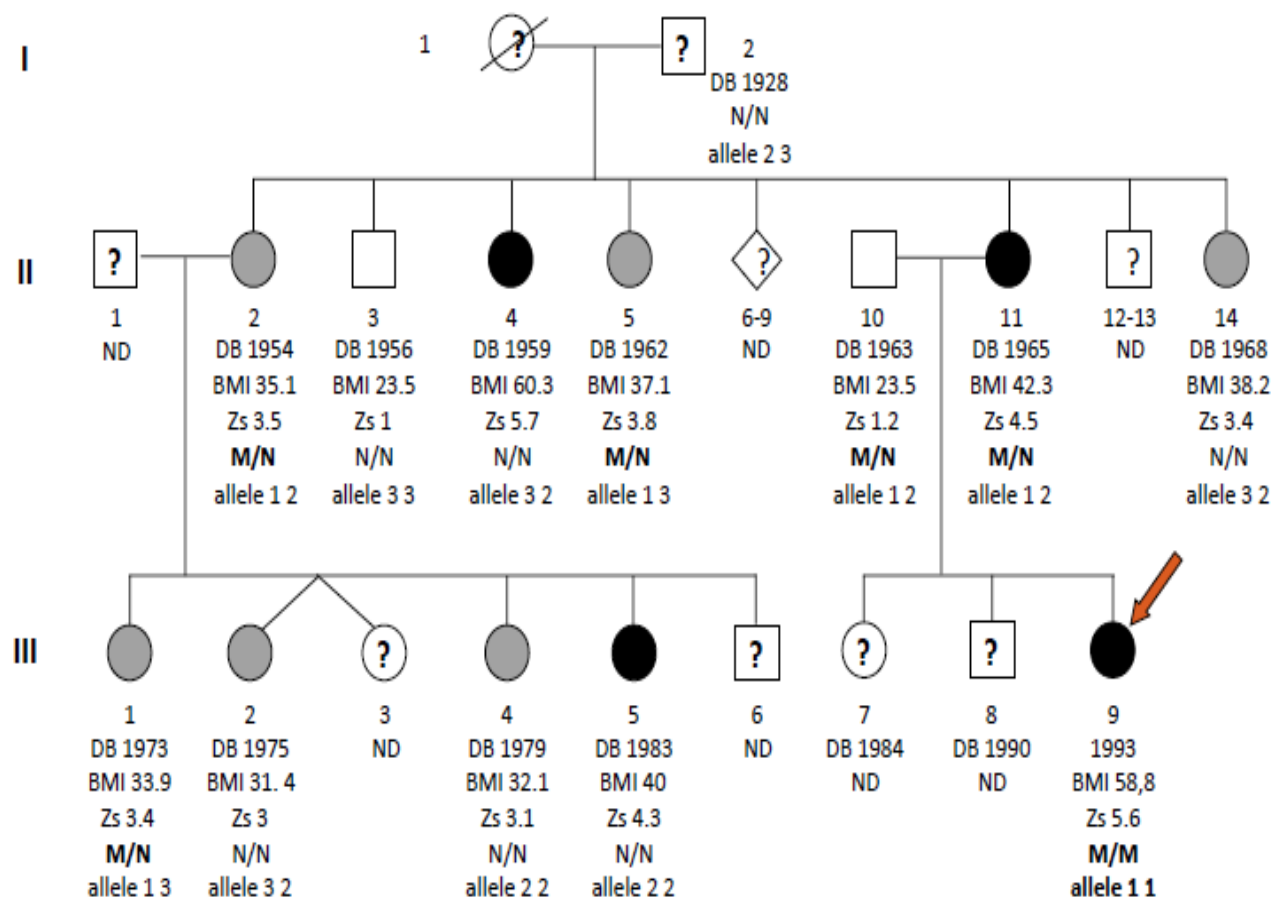


Figure 12: Arbre généalogique d'une famille Réunionnaise porteuse de la mutation Δ exon6-8 du gène *LEPR*.

Les carrés et les cercles indiquent les hommes et les femmes, respectivement. Le proband est indiqué par une flèche. Les symboles blancs représentent les membres de la famille non atteints, les symboles gris indiquent les membres ayant une obésité (chez l'adulte, définie par un IMC (indice de masse corporelle) compris entre 30 et 39 kg/m² ; chez l'enfant, définie par un Z-score d'IMC entre 2 et 3 DS (déviations-standard)) et les symboles noirs indiquent les membres ayant une obésité sévère (chez l'adulte, définie par un IMC supérieur à 40 kg/m² ; chez l'enfant, définie par un Z-score d'IMC supérieur à 3 DS). Un point d'interrogation représente un membre de la famille dont on ne connaît pas l'IMC. Un symbole barré indique un membre de la famille décédé. La date de naissance (DB), l'IMC (BMI) et le Z-score d'IMC (Zs) sont indiqués sous le symbole d'un individu avec son génotype. M désigne l'allèle muté et N l'allèle normal. ND indique un génotype indéterminé. Différents allèles sont identifiés sur la base de polymorphismes communs génotypés dans la région codante du gène *LEPR*.

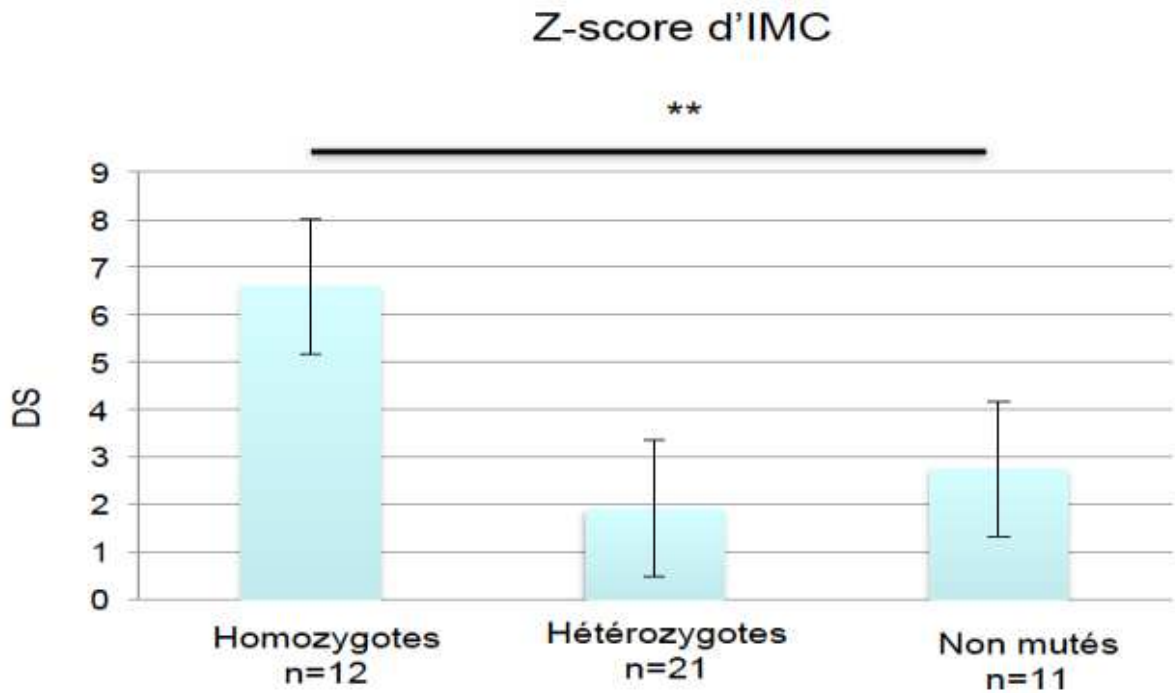


Figure 13: Z-score d'IMC moyen des sujets homozygotes, hétérozygotes et non mutés pour les mutations du gène *LEPR* dans les familles étudiées.

Les Z-scores d'IMC (indice de masse corporelle) étaient disponibles pour tous les sujets homozygotes et pour les sujets hétérozygotes et non mutés de 6 familles. Les Z-scores d'IMC sont représentés par la moyenne $\pm$ l'écart-type.

Le Z-score d'IMC est significativement supérieur chez les sujets porteurs de mutation du gène *LEPR* à l'état homozygote, en comparaison aux sujets apparentés hétérozygotes et non mutés (** $p=0,0002$).

III.4. Conclusion

Notre étude a permis de montrer que les mutations du gène *LEPR* à l'état homozygote ne sont pas rares en France (2,24% dans la population obèse française étudiée) et le plus souvent associées à un phénotype spécifique. En particulier, nous avons identifié une nouvelle mutation de *LEPR*, Δ exon6-8, partagée par 6 sujets non apparentés tous originaires de l'île de La Réunion, suggérant un effet isolat. Enfin, les sujets hétérozygotes ne présentent pas de phénotype intermédiaire, comme initialement décrit chez la souris [154].

Devant la fréquence non négligeable des mutations de *LEPR*, la mise au point d'une puce qui étudierait simultanément plusieurs gènes de la voie leptine-mélanocortine (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *SIM1*) pourrait permettre de rechercher systématiquement des mutations dans

le cadre d'obésité extrême et d'identifier ces patients avant discussion d'une chirurgie bariatrique pour obésité massive par exemple.

En ce qui concerne la mutation Δ exon6-8, son dépistage systématique peut se discuter chez les patients ayant une obésité morbide à La Réunion. En effet, la prévalence de l'obésité y étant particulièrement élevée (20%), la question du rôle de la mutation Δ exon6-8 à l'état hétérozygote se pose dans cette population fortement prédisposée à l'obésité.

Enfin, l'expression clinique variable des sujets hétérozygotes suggère que le cumul de plusieurs mutations hétérozygotes sur différents gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique pourrait être un mécanisme commun de l'obésité, comme dans les modèles animaux [154]. Les nouvelles approches moléculaires, telles que le séquençage d'exome, pourraient probablement aider à identifier de telles interactions de mutations hétérozygotes et permettre de progresser dans la compréhension de la génétique de l'obésité.

ARTICLE 2 (page 88): Seven novel deleterious *LEPR* mutations found in early-onset obesity: a Δ exon6-8 shared by subjects from Reunion Island, France suggests a founder effect. Huvenne H, Le Beyec J, Pépin D, Alili R, Pigeon Kherchiche P, Jeannic E, Frelut ML, Lacorte JM, Nicolino M, Viard A, Laville M, Ledoux S, Tounian P, Poitou C, Clément K, Dubern B. J Clin Endocrinol Metab 2015; 100: 757-66.

Seven Novel Deleterious *LEPR* Mutations Found in Early-Onset Obesity: a Δ Exon6–8 Shared by Subjects From Reunion Island, France, Suggests a Founder Effect

Hélène Huvenne,* Johanne Le Beyec,* Dominique Pépin, Rohia Alili, Patricia Pigeon Kherchiche, Erwan Jeannic, Marie-Laure Frelut, Jean-Marc Lacorte, Marc Nicolino, Amélie Viard, Martine Laville, Séverine Ledoux, Patrick Tounian, Christine Poitou, Béatrice Dubern,** and Karine Clément**†

Context: Infrequent mutations have been reported in the leptin receptor (*LEPR*) gene in humans with morbid obesity and endocrine disorders. However *LEPR* mutations are rarely examined in large populations from different ethnicities in a given country.

Objective: We estimated the prevalence of *LEPR* mutations in French patients with severe obesity and evaluated mutated patients' phenotype.

Design and Patients: We sequenced the *LEPR* gene in 535 morbidly obese French participants. We conducted clinical investigations to determine whether individuals with a novel shared mutation display particular characteristics relative to obesity history, body composition, hormonal functions, and the outcome of bariatric surgery.

Results: We identified 12 patients with a novel *LEPR* mutation (p.C604G, p.L786P, p.H800_N831del, p.Y422H, p.T711NfsX18, p.535–1G>A, p.P166CfsX7). Six unrelated subjects were carriers of the p.P166CfsX7 mutation leading to deletion overlapping exons 6 to 8. All subjects originated from Reunion Island (France). Their clinical features (severe early-onset obesity, food impulsivity, and hypogonadotropic hypogonadism) did not differ from other new *LEPR* mutation carriers. Results concerning weight loss surgery were inconsistent in homozygous *LEPR* mutation carriers. Heterozygous *LEPR* mutation carriers exhibited variable severity of obesity and no endocrine abnormality.

Conclusion: Among seven newly discovered *LEPR* mutations in this French obese population, we identified a *LEPR* frameshift mutation shared by six subjects from Reunion Island. This observation suggests a founder effect in this Indian Ocean island with high prevalence of obesity and supports a recommendation for systematic screening for this mutation in morbidly obese subjects in this population. (*J Clin Endocrinol Metab* 100: E757–E766, 2015)

The genetic screening to identify causal mutations in obesity (1) appeared particularly successful in extreme obesities with the discovery of monogenic forms resulting from homozygous mutations that mostly affect genes of the leptin-melanocortin pathway (2). This pathway plays a pivotal role in the hypothalamic control of food intake (3). Complete leptin or leptin receptor (*LEPR*) deficiency is rare, and patients with *LEPR* mutations are characterized by severe early-onset obesity (before the age of 3 y) with hyperphagia and hypogonadotropic hypogonadism (4–11). Today, the phenotype of patients with heterozygous *LEPR* mutation in regard to body compo-

sition and endocrine anomalies still needs to be investigated (9, 11).

Whereas leptin-deficient patients can be treated by hormone replacement (12), medical treatment of *LEPR* deficiency is challenging. Drugs that could safely bypass normal leptin delivery systems are not available for humans (13), and outcomes after bariatric surgery in the first two reported patients showed limited and variable responses (14).

Few studies have investigated the prevalence of *LEPR* mutations occurring generally in subject groups with high levels of consanguinity. Prevalence was estimated to be

ISSN Print 0021-972X · ISSN Online 1945-7197
Printed in U.S.A.
Copyright © 2015 by the Endocrine Society
Received January 6, 2015. Accepted March 3, 2015.
First Published Online March 9, 2015

* H.H. and J.L.B. contributed equally to this article.

** B.D. and K.C. contributed equally to this work.

† Author Affiliations are shown at the bottom of the next page.

Abbreviations: BMI, body mass index; HB, Harris and Benedict (equation); HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; *LEPR*, leptin receptor; MC4R, melanocortin 4 receptor; qPCR, quantitative PCR; REE, resting energy expenditure.

3% in 300 severely obese British subjects that included 90 probands from consanguineous families (9) and in a highly selected population of Pakistani children with severe obesity (11). The prevalence of *LEPR* mutations in patients with morbid obesity from other countries is not known. We addressed this question by systematically searching for *LEPR* mutations in 535 severely obese French patients, not parentally related. We discovered seven novel deleterious *LEPR* mutations, including one large deletion shared by six unrelated patients, all originating from Reunion Island (Indian Ocean, France). We subsequently examined clinical history and phenotypes in comparison to other mutation carriers.

Subjects and Methods

Study population

The study was conducted in 535 unrelated obese French subjects (children and adults) who were prospectively screened from 2007 for *LEPR* mutations because of severe obesity. The baseline characteristics of this population are described in Supplemental Table 1. For children, severe obesity was defined as an SD score for body mass index (BMI) of more than 3 SD values above the mean age and sex-specific BMI values in children in France (15). For adults, the criterion for inclusion was BMI of at least 35 kg/m². Informed consent was obtained for all subjects. Mutations in known obesity genes were ruled out using direct sequencing (*LEP* [leptin], *PCSK1* [proprotein convertase subtilisin/kexin type 1], *POMC* [pro-opiomelanocortin], *MC4R* [melanocortin 4 receptor]). Four subjects were heterozygous for a *MC4R* frameshift mutation. In the case of *LEPR* mutations, the subject's relatives were invited to participate in the study. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee (Comités Consultatifs de Protection des Personnes dans la Recherche Biomedicale, Hôtel-Dieu, Paris).

Phenotypic characterization

We examined patients harboring mutations for a series of clinical phenotypes using anthropometric measurements (weight, height, BMI) and body composition. During patient medical interviews, the physician recorded the ancestry of the patient and parents. We obtained weight history from the childhood health records when available. A pediatrician determined pubertal stage from secondary sexual characteristics. A registered dietician conducted a structured interview examining quantitative and qualitative food intake and eating behavior in each proband individually. We estimated body composition

(percentage of fat and lean mass) by whole-body fan-beam dual-energy x-ray absorptiometry scanning (Hologic Discovery W, software version 12.6.2; Hologic Inc) as previously described (16). The percentage of body fat mass was calculated as the ratio of total body fat mass over total body mass. Basal resting metabolic rate was obtained using indirect calorimetry, after a 12-hour overnight fast, by an open-circuit ventilated-hood system (Deltatrac II MBM 200, Datex Instrumentarium Corp). We calculated basal metabolic rate by the equation supplied by the manufacturer and the predicted basal metabolic rate using the Harris and Benedict (HB) equation.

Blood samples were collected in the morning after an overnight fast. Plasma lipid levels were measured by standardized enzymatic assays (Roche Diagnostics for total cholesterol, ThermoElectron for triglycerides). High-density lipoprotein-cholesterol levels were determined by a direct method (ThermoElectron). We calculated plasma low-density lipoprotein-cholesterol using the Friedewald formula. Plasma leptin concentrations were measured by RIA (Linco Research, Inc). With the aim of determining whether plasma leptin concentrations were correlated with fat mass, we calculated the following ratio: leptin concentration (ng/mL)/fat mass (kg). A score around 1 indicated that plasma leptin concentrations were in correlation with fat mass. Plasma glucose and insulin concentrations were measured using the glucose oxidase method and a commercial immunoradiometric assay kit (Bi-INSULINE IRMA; CisBio International), respectively. The insulin resistance was estimated by the homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index [glucose (mmol/L) × insulin (mU/L)/22.5]. In morbidly obese subjects, the mean value of HOMA-IR was 2 (17). We also defined insulin resistance as a value of the HOMA-IR > 2.

Direct nucleotide sequencing of the *LEPR* gene

We sequenced the *LEPR* gene as described in Ref. 14. We examined the in silico prediction of the deleterious effect of mutation with the Alamut Mutation Interpretation Software (Interactive Biosoftware), the PolyPhen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), the Sift (<http://sift.jcvi.org/>), and the Mutation Taster (<http://doro.charite.de/MutationTaster/index>) web sites.

Characterization of the Δ exon6–8 *LEPR* mutation

In families carrying the Δ exon6–8 *LEPR* mutation, direct PCR amplification of the 18 coding *LEPR* exons from patient genomic DNA revealed the absence or presence of each *LEPR* gene exon sequence in the tested DNA. We used the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) technique to confirm and/or detect large homozygous or heterozygous genomic deletions from probands and DNA samples from relatives (Supplemental Data).

DNA samples from 189 controls and families of subjects were further analyzed for the presence of this large *LEPR* deletion

Institute of Cardiometabolism and Nutrition (H.H., R.A., J.-M.L., P.T., C.P., B.D., K.C.), Pitié-Salpêtrière Hospital, Nutrition Department, Paris F-75013, France; Sorbonne Universities (H.H., J.L.B., J.-M.L., C.P., K.C.), University Pierre et Marie Curie-Paris 6, Paris F-75006, France; INSERM (H.H., R.A., P.T., C.P., B.D., K.C.), Unité Mixte de Recherche (UMR) S U1166, Nutrimics, Paris F-75013, France; Groupement des Hôpitaux de l'Institut Catholique de Lille (H.H.), St-Vincent de Paul Hospital, Department of Pediatrics, Lille F-59000, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (J.L.B., D.P., J.-M.L.), Pitié-Salpêtrière Hospital, Department of Biochemical Endocrinology and Oncology, Nutrigénétique, Paris F-75013, France; INSERM (J.L.B.), UMR S U1149, Université François-Rabelais de Médecine Paris Diderot, Paris F-75018, France; Félix-Guyon-Bellepierre Hospital (P.P.K.), Department of Pediatrics, St-Denis F-97405, Reunion, France; St François d'Assise Association (E.J.), Department of Pediatric Nutrition, St-Denis F-97405, Reunion, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (M.-L.F.), Bicêtre Hospital, Department of Pediatric Endocrinology and Diabetology, Kremlin-Bicêtre F-94270, France; INSERM (J.-M.L.), Integrative Biology of Atherosclerosis, UMR S U1166, Paris F-75013, France; Mother and Child Hospital (M.N.), Department of Pediatric Endocrinology, Lyon F-69000, France; Robert Debré Hospital (A.V.), Department of Endocrinology, Reims F-51100, France; Lyon-Sud Hospital (M.L.), Department of Endocrinology, Diabetology, and Nutrition, Lyon F-69000, France; Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (S.L.), Functional Explorations, Louis Mourier Hospital, Obesity Center, Colombes F-92700, France; and Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (P.T., B.D.), Department of Pediatric Nutrition and Gastroenterology, Armand-Trousseau Hospital, Paris F-75571, France

encompassing exons 6 to 8 by a quantitative PCR (qPCR) screening assay (Supplemental Data). The 189 controls (114 women, 75 men) were from the SU.VI.MAX cohort that is composed of 12 735 men and women in the general population aged from 35 to 60 years, as previously described (18). The mean age of the controls at inclusion was 50.1 ± 6.3 years, and their mean BMI was 23.8 ± 3.4 kg/m².

Hormonal testing

Using standard immunoassays, we tested the hypothalamic-pituitary axis of the *LEPR* mutation carriers, including measurements of serum cortisol and ACTH for the adrenal axis and of serum free T₄ and TSH for the thyroid axis. Serum FSH, LH, estradiol, and testosterone according to sex were measured for the gonadotrophic axis. When necessary, we search for hypogonadotropic hypogonadism by an LHRH test. IGF-1 measurement was performed for the GH axis. In the case of low serum IGF-1, we search for GH insufficiency by a GH dynamic test.

Statistical analyses

Clinical data were expressed as medians and [ranges] or means $\pm$ SD. Statistical analysis was performed with the Kruskal-Wallis test on JMP statistics software (SAS Institute Inc). A $P < .05$ was considered as significant.

Results

Seven novel *LEPR* gene mutations in French morbidly obese subjects

Sequence analysis of the whole coding region of the *LEPR* gene revealed eight mutations (c.1871A>G, c.1810T>G, c.2357T>C, c.2491G>A, c. Δ exon6–8, c.1604–1G>A, c.1264T>C, c.2131dup) in 12 unrelated subjects (2.24%

of the cohort) (Supplemental Figure 1). These mutations were predicted to alter the *LEPR* protein sequence (p.N624KfsX21, p.C604G, p.L786P, p.H800_N831del, p.P166CfsX7, p.535–1G>A, p.Y422H, p.T711NfsX18) and were new except for p.N624KfsX21, previously found in a French patient (14). Subjects were homozygous ($n = 9$) or compound heterozygous ($n = 3$) for each mutation (Table 1). So, 1.68% of the 535 participants were homozygous carriers of a *LEPR* mutation, and 0.56% were compound heterozygous. According to prediction software or RT-PCR analysis (Supplemental Data), five of eight mutations led to a nonfunctional truncated protein. The three others were highly predicted to be deleterious for the receptor function (Table 1).

Parents of the probands were heterozygous for the *LEPR* mutation, except for the p.N624KfsX21 mutation as described (14) (Table 1, Figure 1, and Figure 2, A–C). Familial consanguinity was noted in three families.

Identification of the same frameshift mutation in patients from Reunion Island

Surprisingly, we observed that six unrelated subjects displayed the same large deletion overlapping exons 6, 7, and 8 (Δ exon6–8) (families 5 to 10). By exploring the patient and family origin, we found that all of them originated from Reunion Island. The Δ exon6–8 was predicted to lead to a frameshift in exon 9 starting at proline 165+1 and to generate a stop codon seven positions further (p.P166CfsX7). This mutation was predicted, if synthesized, to result in a truncated *LEPR* of 172 amino acids, lacking a large part of its extracellular domain

Table 1. *LEPR* Mutations in Subjects With Severe Obesity and in Their Relatives

Mutation	Amino Acid Changes	Predicted Protein	Family ID	No. of Carriers	Ancestry
Homozygous					
c.1871A dup	p.N624KfsX21	Truncated protein	1	1	French
c.1810T>G	p.C604G	Probably damaging	2	1	French
c.2357T>C	p.L786P	Probably damaging	3	1	Portuguese
c.2491G>A	Splicing defect, p.H800_N831del	Probably truncated protein	4	1	Turkish
c. Δ exon6–8	p.P166CfsX7	Truncated protein	5 to 9	5	French (Reunion Island)
Compound heterozygous					
c.1604–1G>A and c. Δ exon6–8	p.535–1G>A (probably exon 12 skipping) and p.P166CfsX7	Probably truncated protein and truncated protein	10	1	French (Reunion Island)
c.1264T>C and c.2131 dup	p.Y422H and p.T711NfsX18	Probably damaging and truncated protein	11	2	French
Heterozygous in relatives					
c.1810T>G	p.C604G	Probably damaging	2	2	French
c.2357T>C	p.L786P	Probably damaging	3	4	Portuguese
c.2491G>A	Splicing defect, p.H800_N831del	Probably truncated protein	4	2	Turkish
c. Δ exon6–8	p.P166CfsX7	Truncated protein	5 to 9	8	French (Reunion Island)
c.1264T>C	p.Y422H	Probably damaging	11	3	French
c.2131 dup	p.T711NfsX18	Truncated protein	11	5	French

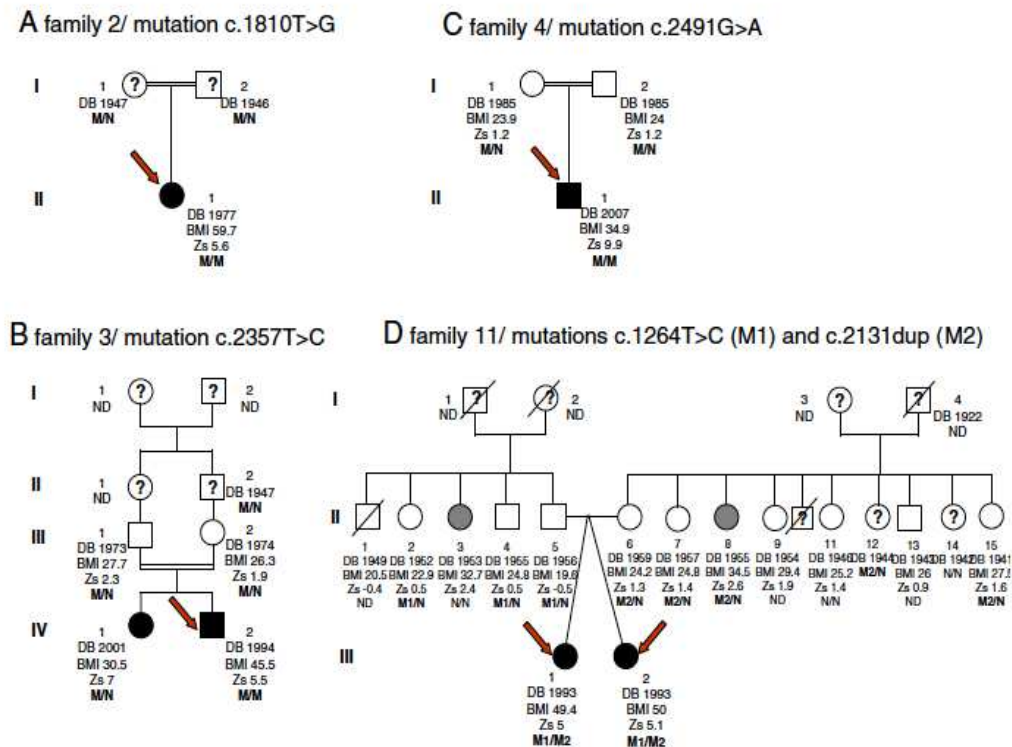


Figure 1. Pedigrees and segregation analysis of the *LEPR* gene alleles in four families not originating from Reunion Island. Squares and circles indicate men and women, respectively. The proband is indicated in each family by an arrow. Open symbols represent unaffected family members, filled gray symbols indicate family members with obesity (in adults, defined as a BMI between 30 and 39 kg/m²; in children, defined as a BMI Z-score [Zs] between 2 and 3 SD), and filled black symbols indicate family members with severe obesity (in adults, defined as a BMI of 40 kg/m² or more; in children, defined as a BMI Zs of 3 SD or more). A question mark represents family members with unknown BMI. A slash indicates a family member who has died. Age, BMI, and Zs, when they are known, are indicated below the individuals' symbols along with the genotype. M, M1, M2 denote the mutated allele and N the wild-type (normal) allele. ND indicates the members with nondetermined genotype.

as well as transmembrane and intracellular domains. This deletion was homozygous in five of the six subjects (Table 1) and led to the absence of any PCR amplification product for exons 6, 7, and 8 (Figure 2D). All the other coding regions were amplified easily, excluding the presence of a PCR inhibitor in the DNA sample (Figure 2D, and data not shown). The sixth proband was heterozygous for this mutation and for another novel mutation (c.1604–1G>A) that was predicted to alter mRNA splicing with exon 12 skipping. Parent DNA was not available, and it was therefore not possible to confirm his real compound heterozygosity.

Genetic exploration of families from Reunion Island

To further understand the segregation of *LEPR* alleles in patients from Reunion Island, the *LEPR* coding region was sequenced in relatives of three families who agreed to participate in the study (Figure 2, A–C). None of the relatives were homozygous carriers of the mutation. The degree of inbreeding in our six homozygous subjects originated from Reunion Island is one of six (16.7%). We examined six known polymorphisms of the *LEPR* gene coding region (c.326A>G, c.668A>G, c.1029T>C,

c.1968G>C, c.3057G>A, and insertion in 3' untranslated region) to define the *LEPR* alleles segregation. Because no homozygous deletion was observed in the relatives' DNA samples and classic sequencing cannot reveal large heterozygous deletion, DNA samples were further analyzed by MLPA (Figure 2E) and through a dual color qPCR screening (data not shown). In family 6, the Δ exon6–8 variant (in allele1) was inherited from both parents, suggesting either consanguinity or coancestry between the father and the mother because they were non-consanguineous to their knowledge. The grandfather did not carry the mutation, indicating inheritance from the grandmother (Figure 2B). In family 9, the mother was the only other family member available and was a carrier of the deleted allele (Figure 2C).

Clinical and biological phenotypes in homozygous carriers of *LEPR* mutations

We examined clinical and biological phenotypes of the subjects homozygous for a *LEPR* mutation (Table 2; data available for 11 subjects) and searched for differences between patients originating or not from Reunion Island.

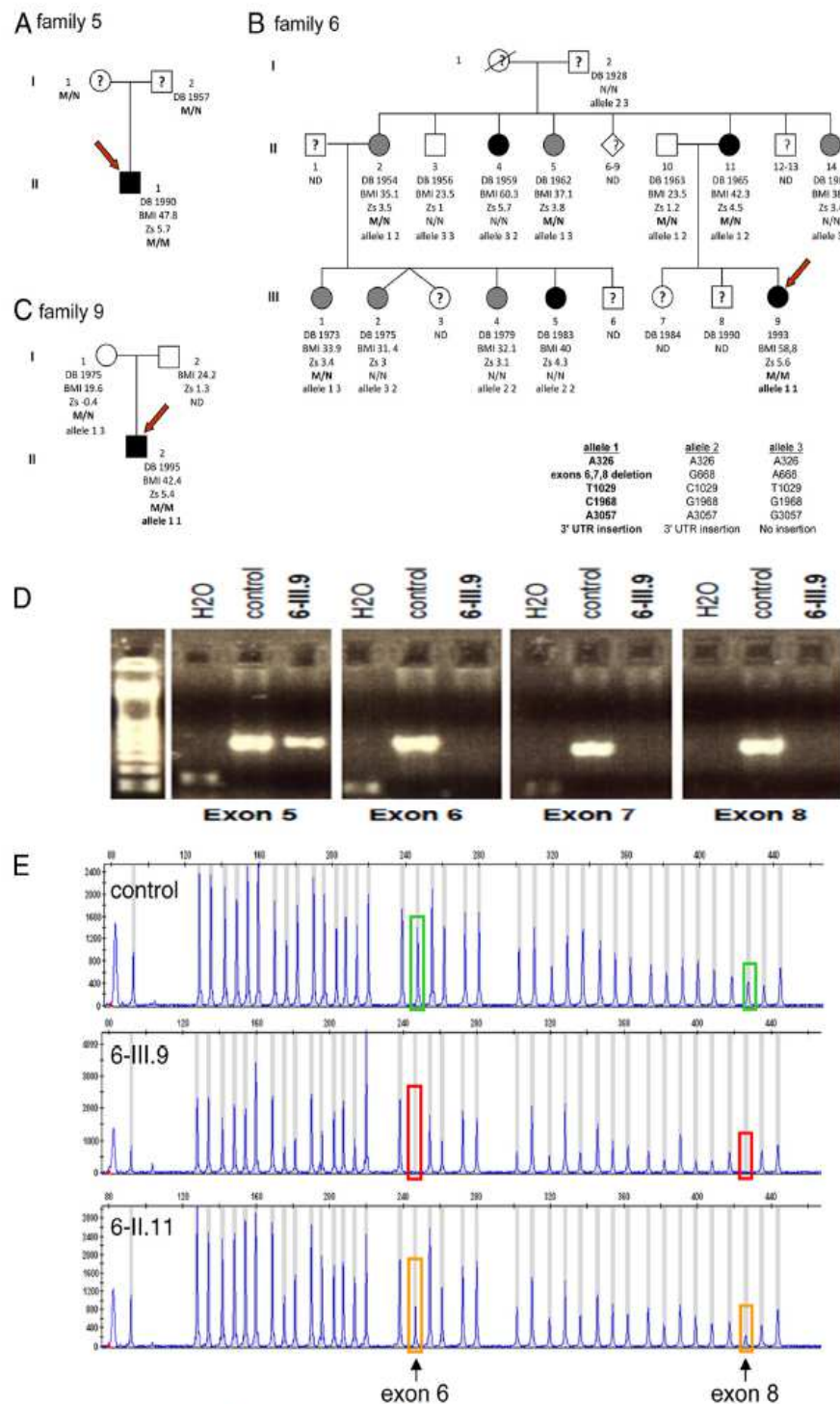


Figure 2. Characterization of the Δ exon6–8 *LEPR* mutation. A–C, Pedigrees and segregation analysis of the *LEPR* gene alleles in three families originating from Reunion Island. Squares and circles indicate men and women, respectively. The proband is indicated in each family by an arrow. Open symbols represent unaffected family members, filled gray symbols indicate family members with obesity (in adults, defined as a BMI between 30 and 39 kg/m²; in children, defined as a BMI Z-score [Zs] between 2 and 3 SD), and filled black symbols indicate family members with severe obesity (in adults, defined as a BMI of 40 kg/m² or more; in children, defined as a BMI Zs of 3 SD or more). A question mark represents family members with unknown BMI. A slash indicates a family member who has died. Age, BMI, and Zs, when they are known, are indicated below the individuals' symbols along with the genotype. M denotes the mutated allele, and N the wild-type (normal) allele. ND indicates the members with nondetermined genotype. Different alleles are identified based on common polymorphisms genotyped in the coding region of the *LEPR* gene. D, PCR amplification product of exons 5, 6, 7, 8, of the *LEPR* gene, of the proband in family 6 (6-III.9), and one control. These results show the

Table 2. Phenotypic Characterization of Subjects With *LEPR* Mutations

Mutation	Subjects										
	N624KX21	C604G	L786P	D831N	Δ exon6–8 p.P166CfsX7						Y422H and T711NfsX18
Family/patient ID	1	2/II.1	3/IV.2	4/II.1	5/II.1	6/III.9	7	8	9/II.2	10	11/III.1 11/III.2
Age, y	26	36	18	4	18	20	4	31	14	16	20 20
Sex	M	F	M	M	M	F	M	F	M	M	F F
Onset of obesity, mo	6	2	18	3	2	3	2	4	5		6 4
BMI, kg/m ²	56.2	59.7	45.4	34.9	47.8	58.7	43.6	62.9	42.4	43.8	49.4 50
BMI Z-score, SD	6.5	5.6	5.5	9.9	5.7	5.6	12.3	5.8	5.3		5 5.1
Fat mass, %	ND	56.6	36.3	65	48.7	54.7	ND	51.8	ND		50.7 51.8
Lean mass, %	ND	41.8	NA	12	51.3	43.8	ND	46.6	ND		47.5 46.4
Truncal fat mass, %	ND	38.8	29.3	ND	ND	47.2	ND	49.4	ND		46.8 46.4
REE, kcal	2580	1759	ND	ND	ND	1835	ND	2049	ND		2023 2375
GH insufficiency	No	Yes	No	NA	No	Yes	NA	Yes	Yes		No No
Hypogonadism	Yes	Yes	Yes	NA	No	Yes	NA	Yes	Yes		No No
Hypothyroidism	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes		No No
Adrenal insufficiency	No	No	No	No	No	No	No	No	No		No No
Serum leptin, ng/mL	162	136.1	162.4	36.4	53	100	83.1	73	100		ND 97
Glucose, mmol/L	4.7	5.2	4.6	4.9	5	3.8	4.1	6.3	4.6		16.2 4.4
HOMA-IR	ND	2.2	1.6	5.2	1.5	2.6	1.7	9.5	1.4		ND 3.4
Total cholesterol, mmol/L	4.1	5.2	3.6	3.6	3.3	3.9	3.2	4.1	5.4		4.4 4.1
Triglycerides, mmol/L	0.7	0.9	0.9	1.5	1.5	1.1	0.8	1	1.6		1.9 1
IGF-1, μ g/L	265	170	297	83	188	ND	144	77	75		ND 307
Estradiol, pmol/L	ND	140	ND	ND	ND	40	ND	130	30		280 190
T, nmol/L	1.4	1.4	14.7	ND	8.8	ND	ND	ND	0.4		ND ND
FSH, U/L	2	5.3	4	ND	0.2	1.9	ND	6.2	0.4		7.3 7.5
LH, U/L	0.8	6.1	7.7	ND	0.2	0.1	ND	3.6	0.1		4.2 4.5
TSH, mU/L	0.9	2.6	2.5	3.4	2.6	2.7	2.2	5.2	0.8		1.7 4
Free T ₄ , pmol/L	13.2	14.8	13	11.3	9.9	14.8	16	12.3	9.6		13.2 11.4

Abbreviations: ID, identity; F, female; M, male; NA, not applicable; ND, not determined.

The mean age at genetic diagnosis was 18 years 6 months [4–36 years]. All subjects with *LEPR* mutations had normal birth weight. Severe obesity rapidly developed within the first months of life (mean age of obesity onset, 4.1 mo [1–6 mo]) (Figure 3, A and B). There was no history of neonatal hypotonia or mental retardation. At diagnosis, mean BMI was 49.6 kg/m² [34.9–62.9], corresponding to a mean BMI Z-score at +6.6 SD [5–12.3]. The mean percentage of fat mass was in accordance with the severity of obesity (51.9% [36.3–65%]). The mean resting energy expenditure (REE) measured by indirect calorimetry was 11% lower than the HB estimation (measured REE, 2103 $\pm$ 316 vs. 2362 $\pm$ 372 kcal by HB; P = .26, nonsignificant).

All subjects had severe hyperphagia during childhood and adulthood, and food impulsivity was present in eight of 11 cases (73%) at diagnosis. Mean circulating leptin

measurement (100.3 ng/mL [36.4–162.4]) was around 1.5 times higher than expected for fat mass. No elevated circulating receptor was detected for the Δ exon6–8 subjects, suggesting that this protein is not secreted (data not shown), unlike the first published case of *LEPR* mutation (8).

Hypogonadotropic hypogonadism was diagnosed in six of nine subjects (67%), and GH insufficiency in four of 11 cases (36%). Thyroid and adrenal axis were normal in all subjects, except for one subject with central hypothyroidism (subject 9-II.1). Most subjects had normal glucose concentrations, except for one subject with type 2 diabetes needing oral hypoglycemic medication (subject 11-III.1). Five subjects had an insulin resistance with a HOMA-IR index of more than 2. Fasting total lipids were within the normal range in all subjects.

In the six carriers of the Δ exon6–8, although no specific phenotype was associated, endocrine abnormalities seemed to be more severe, with GH insufficiency noted in three of five subjects (60%).

Extremely controlled, restrictive diets and physical activity programs were transiently effective and led to later weight regain in almost all homozygous *LEPR*-mutated patients, except for patient 5-II.1 who had been on a re-

Figure 2 (Continued). absence of any PCR amplification product for exons 6, 7, and 8. E. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) analysis in order to reveal possible exon 6 or 8 hemizygous carriers. Results of the MLPA analysis are shown for one control, the proband in family 6 (6-III.9), and her heterozygous mother (6-II.11). The arrows depict exon 6 and 8 deletion in the homozygous or heterozygous state.

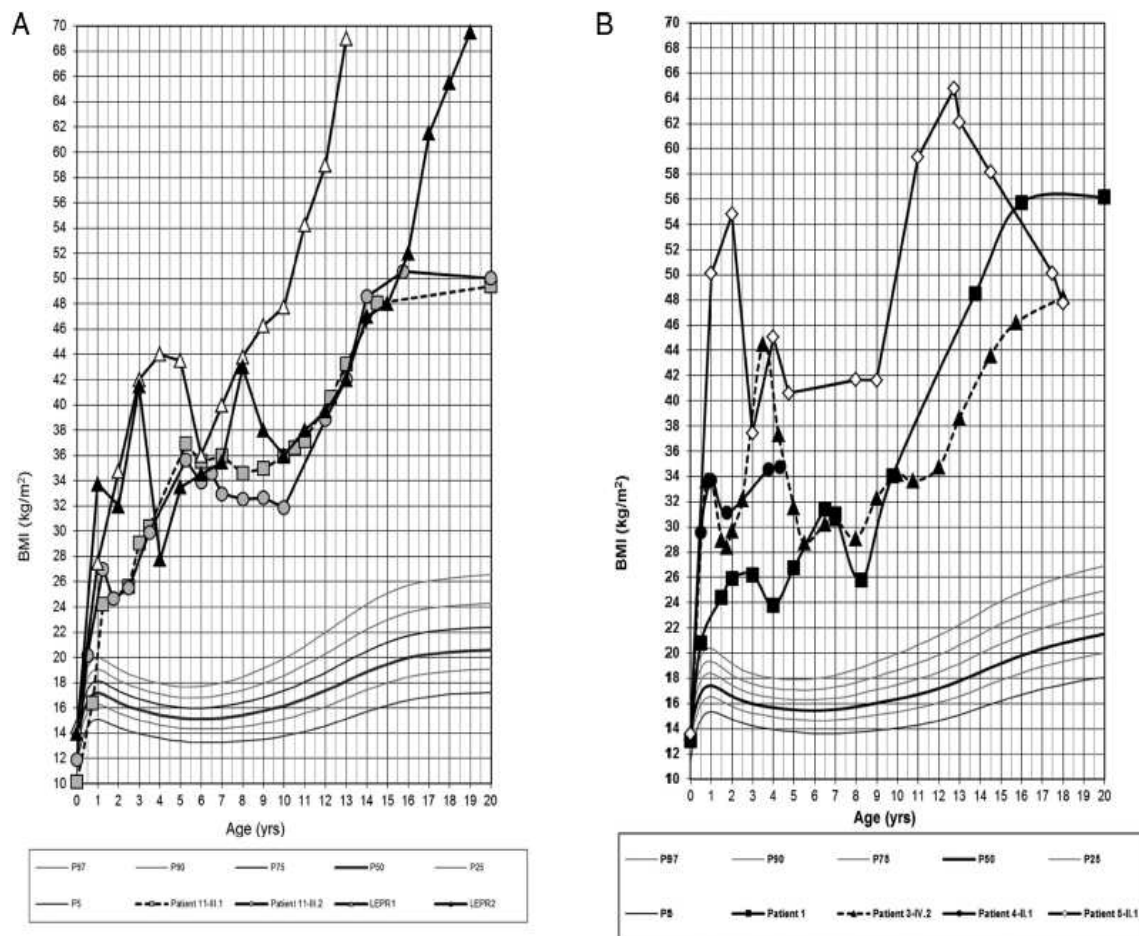


Figure 3. BMI curves for *LEPR*-deficient subjects from birth to adult age. A, BMI changes of the two sisters compound heterozygous for the *LEPR* c.1264T>C and c.2131 dup mutations (patients 11-III.1 and 11-III.2) and the two *LEPR*-deficient sisters (*LEPR*1 and *LEPR*2) initially described by Clément et al (8). B, BMI changes of boys: patients 1 (mutation c.1871A dup), 3-IV.2 (mutation c.2357T>C), 4-II.1 (mutation c.2491G>A), and 5-II.1 (Dexon6–8). The variations in BMI changes correspond to periods with extremely controlled restrictive diets.

strictive control diet for several years (Figure 3, A and B). We compared the result of bariatric surgery procedures in patient 3-IV.2 (p.L786P mutation, gastroplasty) and patient 2-II.1 (p.C604G mutation, gastric bypass) to that of a previously published patient (14) who benefited from an adjustable gastroplasty (patient 1, p.N624KfsX21 mutation). As previously described, maintained weight loss was observed after 8 years of follow-up in this patient (14). In patient 3-IV.2, gastroplasty also led to significant initial weight loss (44% of weight loss after 9 mo). On the contrary, in patient 2-II.1, gastric bypass did not induce significant weight loss long term. Her weight was 162 kg (BMI 64.1 kg/m²) at the time of surgery. She had lost 45 kg (BMI 46.3 kg/m²) 17 months later, but then she progressively started to regain weight. Five years after surgery, her weight was 151 kg (BMI 59.7 kg/m²) corresponding to moderate weight loss (7%). No patient originating from Reunion Island underwent surgery.

Clinical and biological phenotypes in heterozygous *LEPR* mutation carriers from Reunion Island

In all subjects, the severity of obesity (BMI Z-score at diagnosis) was significantly higher in homozygous mutation carriers when compared to heterozygous and not mutated relatives ($P = .0002$) (Supplemental Figure 2). We compared the phenotype of heterozygous mutation carriers to homozygous subjects in the large family 6 bearing the Δ exon6–8 (Table 3). Most of the heterozygous subjects were less obese (mean BMI 34.5 ± 7.1 kg/m²; mean BMI Z-score $+3.3 \pm 1.2$ SD). In addition, obesity developed later in life during adulthood (mean age of obesity onset 24.5 y). Neither food impulsivity nor endocrine abnormalities were reported.

Discussion

We identified a novel deletion (Δ exon6–8 *LEPR* gene) in half (six of 12) of the studied French subjects with early-

Table 3. Body Composition and Biological and Hormonal Characteristics in Family 6 Carrying the Δ exon6–8 Mutation

Subject	II-2	II-3	II-4	II-5	II-10	II-11	II-14	III-1	III-2	III-4	III-5	III-9
Genotype	M/N	N/N	N/N	M/N	M/N	M/N	N/N	M/N	N/N	N/N	N/N	M/M
Age at onset of obesity, y	19	ND	20	ND	ND	25	ND	30	ND	19	18	0.2
BMI, kg/m ²	35.1	23.5	60.3	37.1	23.5	42.9	38.2	33.9	31.4	32.1	40	58.7
BMI Z-score, SD	3.5	1	5.7	3.8	1.2	4.5	4	3.4	3	3.1	4.3	5.6
Fat mass, %	40.7	20.2	51.7	38.6	ND	48.2	38.5	44	38.6	46.4	49.8	54.7
GH insufficiency	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Yes
Hypogonadism	No	No	No	No	No	No	No	ND	No	No	No	Yes
Hypothyroidism	No	No	No	No	ND	No	No	ND	No	No	No	No
Glucose, mmol/L	4.4	4.8	4.8	6.2	ND	5.3	5.4	ND	4.6	4.8	4.9	3.8
Total cholesterol, mmol/L	5.7	6.2	4.6	5.4	ND	5.2	4.1	ND	5.9	6.2	4.9	3.9
Triglycerides, mmol/L	2	1.1	1	2.3	ND	1.1	0.8	ND	1.7	1.7	0.8	1.1
TSH, mIU/L	1.7	1	5.7	1.6	ND	1.6	0.5	ND	2.5	1.2	1.5	2.7

Abbreviations: M/M, homozygous mutated subject; M/N, heterozygous subject; N/N, not mutated subject; ND, not determined.

onset morbid obesity carrying new *LEPR* mutations. These six subjects originated from Reunion Island. We did not detect this deletion in 500 severely obese patients who were not from Reunion Island and 189 controls. The discovery of a cluster of six unrelated individuals with the same phenotype and carrying the same deletion in a specific geographic area raises the question of its origin from a common ancestor and suggests a founder effect.

Founder effect is a well-known pathophysiological mechanism described in rare genetic diseases (19). It has been described in Reunion Island in other metabolic diseases, such as severe lipodystrophy (20). Reunion Island is a French administrative department located in the Indian Ocean and was unoccupied until immigrants from Europe, Africa, and Asia settled there during the 17th century. The ethnic groups in the Reunion Island also include peoples of European, African, Malagasy, Indian, and Chinese origin as well as many of mixed origin. Its inhabitants constitute a genetically isolated population favoring a founder effect, but the fraction of people of each ethnicity in the Reunion Island is not known exactly.

Because we identified six homozygous and eight heterozygous carriers of this deletion among 49 subjects originated from Reunion Island screened for *LEPR* mutations, we could hypothesize that the frequency of the mutated allele would be around 20.4% [10.6–30.2]. So, frequency of homozygous *LEPR* mutation subjects would probably be far higher than its prevalence found in other specific populations (3%) (9, 11). To confirm the high frequency of the Δ exon6–8 *LEPR* gene in the Reunion Island population, we developed a qPCR assay to diagnose heterozygous carriers in the future, because obesity affects 20% of adults and children in this population. Our observation also raises the question of screening for *LEPR* mutations in other French overseas departments and territories also characterized by a high prevalence of obesity.

The phenotype of patients with the Δ exon6–8 *LEPR*

mutation did not differ markedly from other *LEPR* mutations carriers. Patients share common characteristics with early-onset morbid obesity, severe hyperphagia, and inconsistent hypogonadotropic hypogonadism (8, 9). The variability of hypogonadism (Table 2) and the recent description of normal spontaneous pregnancy in one *LEPR*-deficient woman (21) call into question the role of leptin in reproductive function (22, 23). The control of pubertal maturation results in synergistic action, besides leptin, of peripheral and central hormones acting on the reproductive axis, such as ghrelin and insulin as well as other epigenetic or genetic mechanisms (24, 25). The interruption of the leptin signal due to *LEPR* deficiency may thus be counteracted in some individuals with time.

Usual care management (controlled restrictive diets and physical activity programs) for *LEPR*-deficient patients is poorly and transiently effective in most cases, particularly in regions with a strong obesogenic environment such as in Reunion Island. Severe hyperphagia and uncontrolled weight gain are observed in all patients with the Δ exon6–8 *LEPR* mutation. However, the fact that hyperphagia can be controlled in some other mutation carriers suggests the determinant effect of the patient (familial) environment and/or the possibility that voluntary caloric restriction may sometimes counteract the consequence of lacking leptin signal (patient 5-II and Ref. 26). This aspect is also illustrated by the variable responses to bariatric surgery (patients 2-II.1 and 3-IV.2 and Ref. 14). Together with the overall multidisciplinary approach, the social environment and the psychological situation need to be very carefully evaluated before considering bariatric surgery in these *LEPR*-deficient patients.

Another aspect of our report is the description of 21 relatives who are heterozygous carriers of *LEPR* gene mutations. Among them, eight belong to Reunion Island families. Even in these families prone to obesity (Figure 2B), obesity was not constant. No endocrine abnormality was

described in heterozygous subjects at discrepancy from homozygous carriers. This variability of BMI in heterozygous subjects is also described for other genes of the leptin/melanocortin pathway (27–31). As described for the *MC4R* or *POMC* genes, the penetrance of obesity due to the loss of one copy of the *LEPR* functional gene can be incomplete, with variable clinical expression depending on the localization and type of mutations and on the role of the environment and other potentially modulating genetic factors (32, 33). Cumulative mutation heterozygosity at several genes implicated in energy homeostasis with relatively subtle effects on gene expression and function may also be a common mechanism for obesity (34). New molecular approaches such as whole-exome sequencing could probably be helpful in identifying these interactions of heterozygous mutations and in making progress toward understanding the genetics of human obesity.

In conclusion, we describe a novel mutation (Δ exon6–8 *LEPR* gene) in a cluster of six severely obese patients apparently unrelated but all originating from Reunion Island, suggesting a founder effect. Systematic mutation screening of this specific population, in whom obesity frequency is particularly high, may be necessary to evaluate the impact of heterozygous *LEPR* mutations on obesity predisposition.

Acknowledgments

We thank the patients and their families for their cooperation, Dr D. A. Trégouët for critical review of the manuscript, and Mr Craig Stevens for language correction.

Address all correspondence and requests for reprints to: Karine Clément, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, boulevard de l'hôpital, Paris 75013, France. E-mail: karine.clement@psl.aphp.fr.

This work was supported by grants from Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, INSERM, and the French National Agency of Research (French government "Investments for the Future" grant no. ANR-10-IAHU).

Author Contributions: J.L.B., B.D., and K.C. designed the research; J.L.B., J.-M.L., R.A., and D.P. conducted the genetic screening; P.P.K., E.J., M.-L.F., M.N., A.V., M.L., S.L., P.T., C.P., B.D., and K.C. participated in the care and recruitment of obese patients with *LEPR* mutations; H.H. and J.L.B. analyzed the data; H.H. and J.L.B. wrote the manuscript; K.C. and B.D. contributed to the discussion and reviewed/edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Disclosure Summary: The authors have nothing to disclose.

References

- Day FR, Loos RJ. Developments in obesity genetics in the era of genome-wide association studies. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2011;4:222–238.
- Farooqi IS. Genetic, molecular and physiological insights into human obesity. *Eur J Clin Invest*. 2011;41:451–455.
- Harrold JA, Williams G. Melanocortin-4 receptors, β -MSH and leptin: key elements in the satiety pathway. *Peptides*. 2006;27:365–371.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*. 1997;387:903–908.
- Fatima W, Shahid A, Imran M, et al. Leptin deficiency and leptin gene mutations in obese children from Pakistan. *Int J Pediatr Obes*. 2011;6:419–427.
- Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, Amr K. A novel homozygous missense mutation of the leptin gene (N103K) in an obese Egyptian patient. *Mol Genet Metab*. 2009;97:305–308.
- Saeed S, Butt TA, Anwer M, Arslan M, Froguel P. High prevalence of leptin and melanocortin-4 receptor gene mutations in children with severe obesity from Pakistani consanguineous families. *Mol Genet Metab*. 2012;106:121–126.
- Clément K, Vaisse C, Lahlou N, et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature*. 1998;392:398–401.
- Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med*. 2007;356:237–247.
- Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, Farooqi IS, Amr K. Homozygosity for a novel missense mutation in the leptin receptor gene (P316T) in two Egyptian cousins with severe early onset obesity. *Mol Genet Metab*. 2011;102:461–464.
- Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, et al. Novel *LEPR* mutations in obese Pakistani children identified by PCR-based enrichment and next generation sequencing. *Obesity*. 2014;22:1112–1117.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest*. 2002;110:1093–1103.
- Boughton CK, Murphy KG. Can neuropeptides treat obesity? A review of neuropeptides and their potential role in the treatment of obesity. *Br J Pharmacol*. 2013;170:1333–1348.
- Le Beyec J, Cugnet-Anceau C, Pépin D, et al. Homozygous leptin receptor mutation due to uniparental disomy of chromosome 1: response to bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98:E397–E402.
- Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr*. 1991;45:13–21.
- Ciangua C, Bouillot JL, Lloret-Linares C, et al. Dynamics of change in total and regional body composition after gastric bypass in obese patients. *Obesity*. 2010;18:760–765.
- Mutch DM, Fuhrmann JC, Rein D, et al. Metabolite profiling identifies candidate markers reflecting the clinical adaptations associated with Roux-en-Y gastric bypass surgery. *PLoS One*. 2009;4:e7905.
- Hercberg S, Preziosi P, Briançon S, et al. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study—design, methods, and participant characteristics. *Supplementation en Vitamines et Minéraux Antioxydants. Control Clin Trials*. 1998;19:336–351.
- Tlili A, Hamida Hentati N, Chaabane R, Gargouri A, Fakhfakh F. Pyridoxine-dependent epilepsy in Tunisia is caused by a founder missense mutation of the *ALDH7A1* gene. *Gene*. 2013;518:242–245.
- Le Dour C, Schneebeli S, Bakiri F, et al. A homozygous mutation of prelamins A preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of nonfarnesylated prelamins A. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:E856–E862.

21. Nizard J, Dommergues M, Clément K. Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation. *N Engl J Med*. 2012;366:1064–1065.
22. Strobel A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet*. 1998;18:213–215.
23. Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, et al. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 1996;137:3144–3147.
24. Sanchez-Garrido MA, Tena-Sempere M. Metabolic control of puberty: roles of leptin and kisspeptins. *Horm Behav*. 2013;64:187–194.
25. Tena-Sempere M. Keeping puberty on time: novel signals and mechanisms involved. *Curr Top Dev Biol*. 2013;105:299–329.
26. Fischer-Posovszky P, von Schnurbein J, Moepps B, et al. A new missense mutation in the leptin gene causes mild obesity and hypogonadism without affecting T cell responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:2836–2840.
27. Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1811–1818.
28. Creemers JW, Lee YS, Oliver RL, et al. Mutations in the amino-terminal region of proopiomelanocortin (POMC) in patients with early-onset obesity impair POMC sorting to the regulated secretory pathway. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:4494–4499.
29. Dubern B, Bisbis S, Talbaoui H, et al. Homozygous null mutation of the melanocortin-4 receptor and severe early-onset obesity. *J Pediatr*. 2007;150:613–617, 617.e1.
30. Krude H, Biebermann H, Schnabel D, et al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4–10. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:4633–4640.
31. Park KS, Shin HD, Park BL, et al. Polymorphisms in the leptin receptor (LEPR)—putative association with obesity and T2DM. *J Hum Genet*. 2006;51:85–91.
32. Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, et al. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:1761–1769.
33. Farooqi IS, Drop S, Clements A, et al. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes*. 2006;55:2549–2553.
34. Chung WK, Belfi K, Chua M, et al. Heterozygosity for *Lep(ob)* or *Lep(rdb)* affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol*. 1998;274:R985–R990.

IV. RÉSULTATS. APPROCHE PAR SÉQUENÇAGE D'EXOME DANS L'OBÉSITÉ SYNDROMIQUE

IV.1. Etat actuel des connaissances

Le développement de nouveaux outils de biologie moléculaire, et notamment le séquençage à haut débit ciblé à l'exome, a montré sa puissance pour identifier des mutations responsables de maladies rares chez un petit nombre de sujets atteints (8 à 10 selon les études) [93, 155]. Il permet donc la recherche de l'étiologie génétique de maladies avec phénotypes complexes ou mettant en cause de multiples gènes dont certains peuvent être inconnus. Cette approche peut être utilisée dans un contexte de maladies à transmission héréditaire ou de cas sporadiques (mutations *de novo*).

Le séquençage d'exome est une technique qui a pour but de séquencer tous les gènes codant pour des protéines, connus sous le nom d'exome. Le génome humain contient 180000 exons, qui représentent environ 1% de la totalité du génome mais les mutations de ces séquences sont plus à même d'avoir de sévères conséquences que des mutations dans les 99% restants.

La technique du séquençage d'exome a été testée et validée dans l'obésité, notamment dans une étude ciblée sur le diagnostic moléculaire de 43 formes de diabète et d'obésité monogéniques. Quarante patients (19 diabètes monogéniques et 21 obésités monogéniques), porteurs d'une mutation causale identifiée pour ces pathologies ont été ré-analysés à l'aveugle. A l'exception d'un variant, toutes les mutations ont été ré-identifiées (98,6%). De plus, chez 3 sujets, d'autres mutations délétères ont été détectées, en association avec les mutations déjà reportées [156].

La technique du séquençage d'exome a aussi permis de mettre en évidence de nouvelles mutations responsables d'obésité monogénique et syndromique. En effet, dans une étude réalisée chez les membres extrêmement obèses de 4 familles consanguines, le séquençage d'exome a révélé 2 nouvelles mutations homozygotes du gène *LEPR*, entraînant une protéine tronquée sans domaine de fixation nécessaire au signal de la leptine, chez 3 sujets ayant le même phénotype que les sujets du même âge atteints d'un déficit en leptine [157]. Cet outil a également permis de mettre en évidence 5 nouvelles mutations des gènes *BBS* [95]. Il a aussi été utile dans d'autres situations d'obésité syndromique comme l'identification d'une délétion paternelle de la région chromosomique 2pter, comprenant les gènes *ACP1*, *TMEM18* et *MYT1L* chez 5 sujets non apparentés présentant une obésité sévère à début précoce, une hyperphagie, un déficit intellectuel et des troubles sévères du comportement [2] ou celle de

nouveaux variants rares du gène *KSR2* chez 45 patients ayant une obésité sévère avec hyperphagie dans l'enfance, réduction du métabolisme de base et insulino-résistance sévère [96]. Une mutation homozygote du gène *TUB* a aussi été identifiée grâce à cette technique chez un sujet ayant une obésité, une cécité nocturne et une dystrophie rétinienne [97]. Enfin, le séquençage d'exome a également permis d'identifier une mutation homozygote tronquante du gène *CPE* (carboxypeptidase E) chez une femme présentant une obésité morbide, à début dans l'enfance, associée à une déficience intellectuelle, un diabète de type 2 et un hypogonadisme hypogonadotrope [158] ou une mutation *de novo* du gène *RAI1* (retinoic acid-induced 1) chez un enfant présentant une obésité morbide à début précoce, une hypoventilation, des troubles du comportement et une dysfonction autonome [159].

Dans la mesure où l'obésité syndromique est caractérisée par une obésité sévère à début précoce associée à des anomalies de développement, notamment une déficience intellectuelle, notre hypothèse est qu'il existe d'autres gènes, non encore identifiés, codant pour des protéines impliquées dans le développement cérébral et dans le contrôle central de la balance énergétique. Notre objectif est donc d'identifier, grâce à la technique du séquençage d'exome, des variants dans de nouveaux gènes chez des sujets atteints d'obésité syndromique (définie comme une obésité sévère à début précoce associée à une impulsivité alimentaire et une déficience intellectuelle) mais pas chez leurs apparentés non atteints. Ces variants pourraient avoir un retentissement fonctionnel mettant en évidence de nouvelles pistes physiopathologiques dans l'obésité. L'identification de nouveaux gènes dans ces formes extrêmes d'obésité pourrait donc permettre de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et les mécanismes de régulation du poids, afin d'améliorer la prise en charge des sujets atteints d'obésité.

IV.2. Matériel et Méthodes

IV.2.1. Populations étudiées

Pour ce travail, nous avons à notre disposition trois cohortes différentes:

- une cohorte de sujets présentant une obésité syndromique,
- une cohorte de sujets ayant une obésité commune non syndromique,
- une cohorte de sujets de corpulence normale

a. Cohorte des sujets présentant une obésité syndromique

Afin de répondre à la question: « **Quels sont les autres gènes impliqués dans les obésités syndromiques avec anomalies du développement ?** », nous avons constitué une large cohorte de patients ayant une obésité syndromique. Elle était composée de 41 enfants suivis dans le service de Nutrition et Gastroentérologie Pédiatriques de l'hôpital Trousseau (Dr Dubern, Pr Tounian) et de 74 adultes suivis dans le service de Nutrition adulte de l'hôpital La Pitié-Salpêtrière (Dr Poitou).

Une caractérisation phénotypique complète (histoire pondérale familiale, analyse rétrospective de l'histoire personnelle pondérale, examen clinique, anthropométrie, consultation diététique, questionnaires alimentaires et sur l'activité physique, mesures de la composition corporelle et de la dépense énergétique de repos, bilans endocrinien et métabolique) et un prélèvement sanguin à visée génétique ont été effectués pour chaque patient. J'ai recueilli l'ensemble des données phénotypiques de cette cohorte puis je les ai analysées dans le but de sélectionner les patients obèses ayant un phénotype clinique et biologique le plus similaire possible.

J'ai sélectionné 8 patients, 3 enfants et 5 adultes, qui présentaient un phénotype le plus homogène possible (Tableau 4, page 101) et pour lesquels nous disposions de l'ADN ainsi que de l'ADN de leurs deux parents sains. Les 8 sujets présentaient tous une obésité sévère (Z-score de l'IMC > 3 DS) à début précoce (avant l'âge de 6 ans) associée à une déficience intellectuelle et une impulsivité alimentaire. Aucune anomalie génétique n'avait été préalablement identifiée (caryotype haute résolution et puce CGH (comparative genomic hybridization) normaux, absence d'X fragile, de syndrome de Prader-Willi et de mutations dans les gènes de la voie leptine-mélanocortines (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PC1*, *MC4R* et *SIM1*) ou dans d'autres gènes impliqués dans les déficiences intellectuelles (dossiers discutés avec les généticiens cliniciens)). Huit trios composés du patient atteint d'obésité syndromique et de ses 2 parents sains ont été sélectionnés dans le but d'augmenter la capacité discriminative de détection des anomalies moléculaires. Le séquençage d'exome a ensuite été réalisé chez ces 8 trios.

Afin de confirmer les résultats du séquençage d'exome, nous avons sélectionné 43 sujets, 23 enfants et 20 adultes, issus de la cohorte d'obésité syndromique et présentant une obésité sévère à début précoce associée à une déficience intellectuelle. Un génotypage a été réalisé chez ces 43 sujets.

Tableau 4: Description clinique des 8 sujets sélectionnés pour le séquençage d'exome.

Sujet	1	2	3	4	5	6	7	8
Age (ans)	24	30	37	20	19	13,5	17	10
Sexe	F	F	M	M	M	M	F	F
Age de début de l'obésité (mois)	24	30	24	6	33	30	60	48
IMC (kg/m ²)	34,9	41,3	49,1	71,3	49,9	37,5	42,7	27,8
Z-score d'IMC (DS)	5,5	7	9,5	20,9	12,3	6,3	9,2	6,9
Masse grasse (%)	41,5	48,9	47,3	ND	51	ND	ND	ND
Impulsivité alimentaire	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Retard mental	Modéré	Léger	Modéré	Léger	Léger	Modéré	Modéré	Sévère
Troubles du comportement				Intolérance à la frustration, auto-agressivité, dépression, anxiété		Agressivité, agitation		
Dysmorphie	Visage lunaire et plat, nez bulbeux	Prognathisme	Petite bouche, grandes oreilles mal ourlées		Front haut bombé, nez fin, petite bouche, lèvres fines, philtrum court, prognathisme			Fentes palpébrales obliques en bas, grandes incisives médianes, oreilles petites et mal ourlées
Anomalies hormonales			Insuffisance somatotrope	Hypogonadisme central, insuffisances corticotrope et somatotrope	Panhypopituitarisme, diabète insipide			Insuffisance somatotrope
Glycémie à jeûn (mmol/L)	4,8	5,1	5,2	4,4	5,9	4	4	5,1
Insulinémie à jeûn (µU/L)	ND	ND	27,5	ND	64,8	15	33	ND

Cholestérol total (mmol/L)	6,4	4,5	5	ND	4,9	ND	4,1	ND
Triglycérides (mmol/L)	2	1	1,5	ND	2,5	ND	1,8	ND

DS: déviation-standard ; F: féminin ; IMC: indice de masse corporelle ; M: masculin ; ND: non déterminé

b. Cohorte des sujets ayant une obésité commune non syndromique

Ce groupe incluait 178 enfants et adolescents obèses suivis dans le cadre d'un projet Génétique/Obésité à l'hôpital Trousseau (Dr Dubern, Pr Tounian, Pr Clément). Nous disposons de données cliniques et paracliniques à l'inclusion de ces enfants.

c. Cohorte des sujets de corpulence normale sans déficience intellectuelle

Ce groupe était issu de l'étude d'intervention ICAPS (intervention auprès des collégiens centrée sur l'activité physique et la sédentarité) qui a été menée dans huit collèges du Bas-Rhin, pendant quatre ans. Cette étude, coordonnée par le Pr Simon (Laboratoire Carmen, INSERM U1060, Université de Lyon), a porté sur 954 élèves de la population générale, admis en classe de 6^{ème} à la rentrée 2002, répartis par tirage au sort en 2 groupes après stratification sur le niveau sociodémographique, et suivis pendant 4 ans. La prévalence du surpoids dans la cohorte globale était de 23,2%. Dans les 4 collèges "témoin", les élèves ont conservé leur activité physique habituelle. Dans les 4 collèges "action", un programme de promotion de l'activité physique a été mis en place. Des questionnaires remplis chaque année (portant sur l'activité physique, les habitudes de vie et les attitudes vis-à-vis de l'activité physique), un examen médical annuel (poids, taille, pression artérielle, masse grasse) et une prise de sang (tous les 2 ans) ont permis de suivre et de comparer les habitudes de vie, les comportements d'activité et l'état de santé des adolescents des deux groupes [160].

Le génotypage a été réalisé pour 195 enfants de cette cohorte, ne présentant ni un surpoids ni une obésité, et pour lesquels nous disposons de l'ADN.

d. Caractérisation phénotypique

Dans chaque cohorte, les sujets avaient une caractérisation phénotypique détaillée (anthropométrie, composition corporelle, tension artérielle, bilan métabolique glucido-lipidique).

Le poids, la taille et l'IMC étaient mesurés et calculés à l'inclusion. Les Z-scores de poids, de taille et d'IMC ont été calculés en déviation standard par rapport aux valeurs spécifiques pour l'âge et le sexe en France [6]. La composition corporelle (pourcentage de masse grasse et de masse maigre) a été estimée, quand cela était possible, par absorptiométrie biphotonique corps entier (DEXA, dual-energy x-ray absorptiometry (Hologic, Bedford, MA, USA)), selon la technique précédemment décrite [161]. Le pourcentage de masse grasse a été calculé: masse grasse corporelle totale / masse corporelle totale. La dépense énergétique de repos (DER) a été calculée en utilisant la calorimétrie indirecte, après une nuit de jeûne de 12 heures (Deltatrac II MBM 200, Datex Instrumentarium Corp., Helsinki, Finland). La DER a également été estimée par l'équation de Harris et Benedict (DER HB).

Les prélèvements sanguins ont été effectués le matin après une nuit de jeûne. Les concentrations plasmatiques de lipides ont été mesurées par des techniques enzymatiques standardisées (Roche Diagnostics pour le cholestérol total et ThermoElectron (Courtabeuf, France) pour les triglycérides). Les concentrations de HDL-cholestérol ont été déterminées par méthode directe (ThermoElectron) et celles de LDL-cholestérol ont été calculées à l'aide de la formule de Friedewald. Les concentrations plasmatiques de leptine ont été mesurées par radio-immunologie (LINCO Research Inc., St Louis, Mo, USA). La glycémie et l'insulinémie ont été mesurées par la technique de glucose oxydase et par un kit IRMA (immunoradiometric assay) (Bi-INSULINE IRMA CisBio International, Gif-sur-Yvette, France), respectivement. L'insulinorésistance a été estimée par l'index HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance): $(\text{glucose (mmol/L)} \times \text{insulin (mU/L)}) / 22,5$.

L'axe hypothalamo-hypophysaire a été évalué par dosages standard radio-immunologiques du cortisol et de l'ACTH pour l'axe surrénalien, de la TSH (thyroid stimulating hormone) et de la FT4 (free tetraiodothyronine) pour l'axe thyroïdien, de la FSH (follicle-stimulating hormone), la LH (luteinizing hormone), l'oestradiol et la testostérone pour l'axe gonadotrope. La concentration plasmatique d'IGF1 (insulin-like growth factor-1) a été mesurée pour explorer l'axe somatotrope.

Les principaux paramètres cliniques et biologiques de ces 3 cohortes, 51 sujets atteints d'obésité syndromique (les 8 sujets pour lesquels le séquençage d'exome a été réalisé et les 43

sujets pour lesquels un génotypage a été réalisé), 178 sujets ayant une obésité commune et 195 sujets témoins, sont présentés dans le Tableau 5 (page 105).

Tableau 5: Description des trois cohortes étudiées.

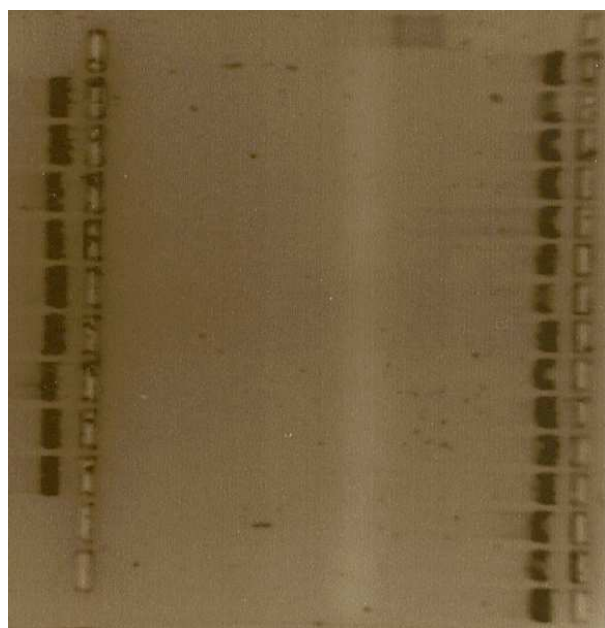
	Obésité syndromique (n=51)	Obésité commune (n=178)	ICAPS (n=195)
Patients obèses	51 (100%)	178 (100%)	0
Sexe	27 M (52,9%) / 24 F (47,1%)	75 M (42,1%) / 103 F (57,9%)	90 M (46,2%) / 105 F (53,8%)
Age à l'entrée (ans)	19,61 ± 11,37 (1-48)	13,87 ± 4,28 (4-25)	11,44 ± 0,54 (9,74-13,54)
Age de début de l'obésité	2,8 ± 1,63 (0,5-6)	5,57 ± 3,76 (0,5-18)	-
Poids à l'entrée (kg)	100,59 ± 46,43 (13,7-206)	80,63 ± 28,87 (25,4-168)	38,61 ± 6,51 (23,4-61,3)
Z-score de poids (DS)	4,95 ± 1,52 (1,44-10,55)	3,72 ± 1,21 (0,75-7,55)	0,79 ± 1,03 (-2,51-3,7)
Taille à l'entrée (cm)	153,6 ± 25,4 (74-197)	155,81 ± 16,2 (104-186)	148,7 ± 7,08 (126,9-167)
Z-score de taille (DS)	0,44 ± 1,72 (-3-4)	0,95 ± 1,29 (-2,63-3,85)	1,27 ± 1,11 (-2,31-3,82)
IMC à l'entrée (kg/m ²)	39,72 ± 10,93 (22,54-71,28)	32,1 ± 7,12 (18,88-55,06)	17,2 ± 1,82 (12,66-21,6)
Z-score de l'IMC à l'entrée (DS)	9,42 ± 3,94 (2,98-20,91)	3,98 ± 1,08 (2,01-7,72)	0,1 ± 0,96 (-2,96-1,89)
Masse grasse (%)	45,56 ± 6,86 (23,84-55,9)	42,46 ± 6,39 (25,29-61,08)	15,71 ± 6,87 (1-40)
Glycémie à jeûn (mmol/l)	5,21 ± 1,89 (3,6-15,2)	4,78 ± 0,49 (3,3-7)	5 ± 0,31 (4,05-5,72)
Insulinémie à jeûn (µU/L)	22,69 ± 18,92 (1,8-72,1)	13,96 ± 12,65 (1,8-126)	6,86 ± 3,64 (1,63-27,59)
HOMA-IR	5,87 ± 8,5 (0,37-48,71)	2 ± 1,6 (0,26-14,71)	1,02 ± 0,53 (0,24-4,05)
Cholestérol sanguin (mmol/L)	4,47 ± 0,95 (2,98-7,25)	4,56 ± 0,87 (2,59-7,1)	4,06 ± 0,62 (2,61-6,17)
HDL-cholestérol (mmol/L)	1,11 ± 0,34 (0,47-2,12)	1,35 ± 0,37 (0,62-3,13)	1,29 ± 0,3 (0,7-2,61)
Triglycérides (mmol/L)	1,3 ± 1,02 (0,39-5,62)	1,05 ± 0,59 (0,23-3,2)	0,78 ± 0,27 (0,28-1,88)

DS: déviation-standard ; HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance ;
IMC: indice de masse corporelle

IV.2.2. Séquençage d'exome

Afin d'identifier de nouveaux gènes responsables d'obésité syndromique, nous avons utilisé une technique de séquençage d'exome à haut débit chez les 8 trios sélectionnés. L'ADN génomique a été extrait des leucocytes du sang périphérique. La quantité d'ADN nécessaire était de 5 µg. Un contrôle de la qualité et de la pureté de l'ADN a été réalisé pour chaque échantillon par un profil de migration de chaque ADN sur gel d'agarose, à 30 minutes et 1 heure de migration (Figure 14, page 106), et par mesure au NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) avec des ratios 260/280 et 260/230.

A



B

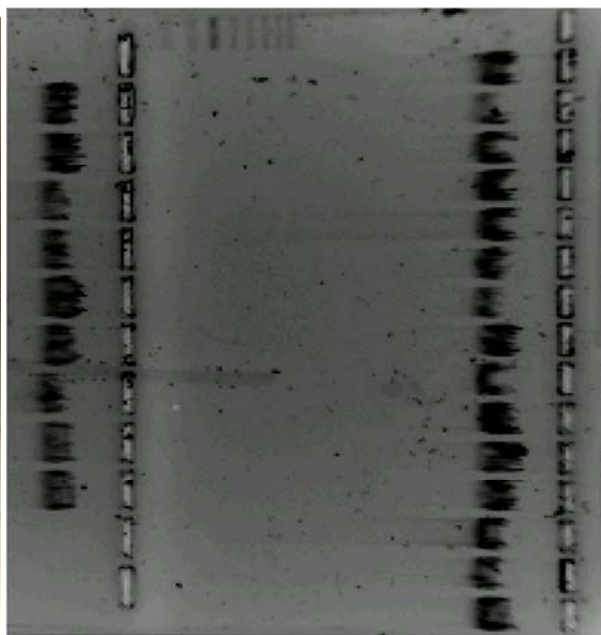


Figure 14: Photographies des profils de migration de l'ADN des 8 trios sur gel d'agarose par électrophorèse.

A: Photographie du profil de migration de l'ADN des 8 trios à 30 minutes.

B: Photographie du profil de migration de l'ADN des 8 trios à 1 heure.

A partir de l'ADN génomique, une capture Agilent 75 Mb (mégabase) des 24 échantillons d'ADN, comprenant l'exome et les UTR (untranslated region), a été réalisée à l'aide du SureSelect Targeted Enrichment Workflow (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Figure 15, page 108). Au cours de cette étape, l'ADN génomique a été fragmenté et lié à des oligonucléotides adaptateurs spécifiques de séquence. Puis les fragments d'ADN ont été hybridés avec des milliers d'oligonucléotides amorces biotinylés (sondes ARN longues de 120 pb (paire de bases) pour une meilleure spécificité) qui assurent collectivement la couverture de l'ensemble de l'exome. Les complexes fragments d'ADN-oligonucléotides biotinylés ont été purifiés à l'aide de billes magnétiques recouvertes de streptavidine, permettant une sélection des régions cibles. S'est ensuit l'élution de l'ADN capturé, les fragments d'ADN non liés ont été éliminés.

Préparation de la librairie

Hybridation/Capture

Séparation

Lavage/Elution/Amplification

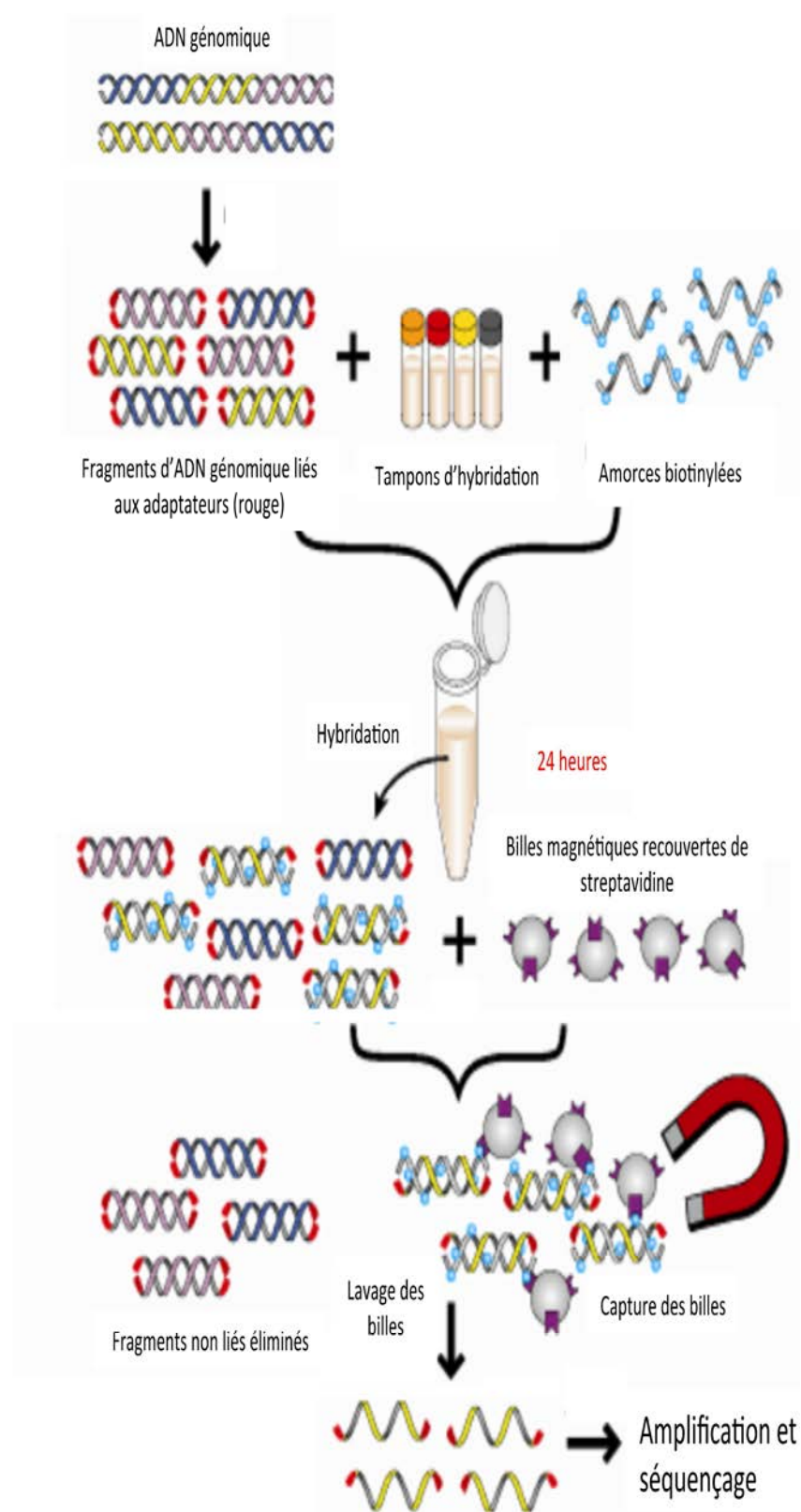


Figure 15: Procédure de capture des exons selon le SureSelect Targeted Enrichment Workflow (Agilent Technologies, California, USA).

Puis cette capture a été séquencée en ‘paired end’ (2 X 100 pb) sur le séquenceur à haut débit HiSeq 2500 Instrument (Illumina, San Diego, CA, USA) de la plateforme génomique de la Pitié-Salpêtrière (P3S, Pr Soubrier, Dr Trégouët), selon le protocole fourni par les fabricants. A partir des séquences brutes, des contrôles qualité ont été réalisés. Les séquences de haute qualité ont ensuite été alignées sur le génome de référence humain (UCSC hg19, human genome assembly 19 (<http://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/hg19/chromosomes/>) (University of California Santa Cruz)) à l’aide du logiciel BWA (Burrows-Wheeler Aligner, <http://bio-bwa.sourceforge.net/>) [162]. Les duplicats ont été éliminés, ainsi que les séquences mal alignées (‘Q-score’ < 20). Les séquences alignées ont ensuite été recalibrées à l’aide du logiciel GATK (genome analysis toolkit) software [163] afin d’améliorer la détection et la dénomination des variants. Enfin, les variants ont été identifiés après d’autres contrôles qualités, grâce au logiciel SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) [164] puis annotés à l’aide du logiciel ANNOVAR (<http://www.openbioinformatics.org/annovar/>) [165] et priorisés (Figure 16, page 110).

L’analyse bioinformatique des données générées a été coordonnée par l’équipe de bioinformatique/biostatistiques de la plateforme P3S sous la direction du Dr David-Alexandre Trégouët. L’ensemble du travail a été réalisé au sein de l’IHU (Institut hospitalo-universitaire) ICAN (Institut de Cardiométabolisme et Nutrition, Pr Clément), en collaboration avec l’équipe INSERM Nutriomique, UMR_S U1166 (Pr Clément).

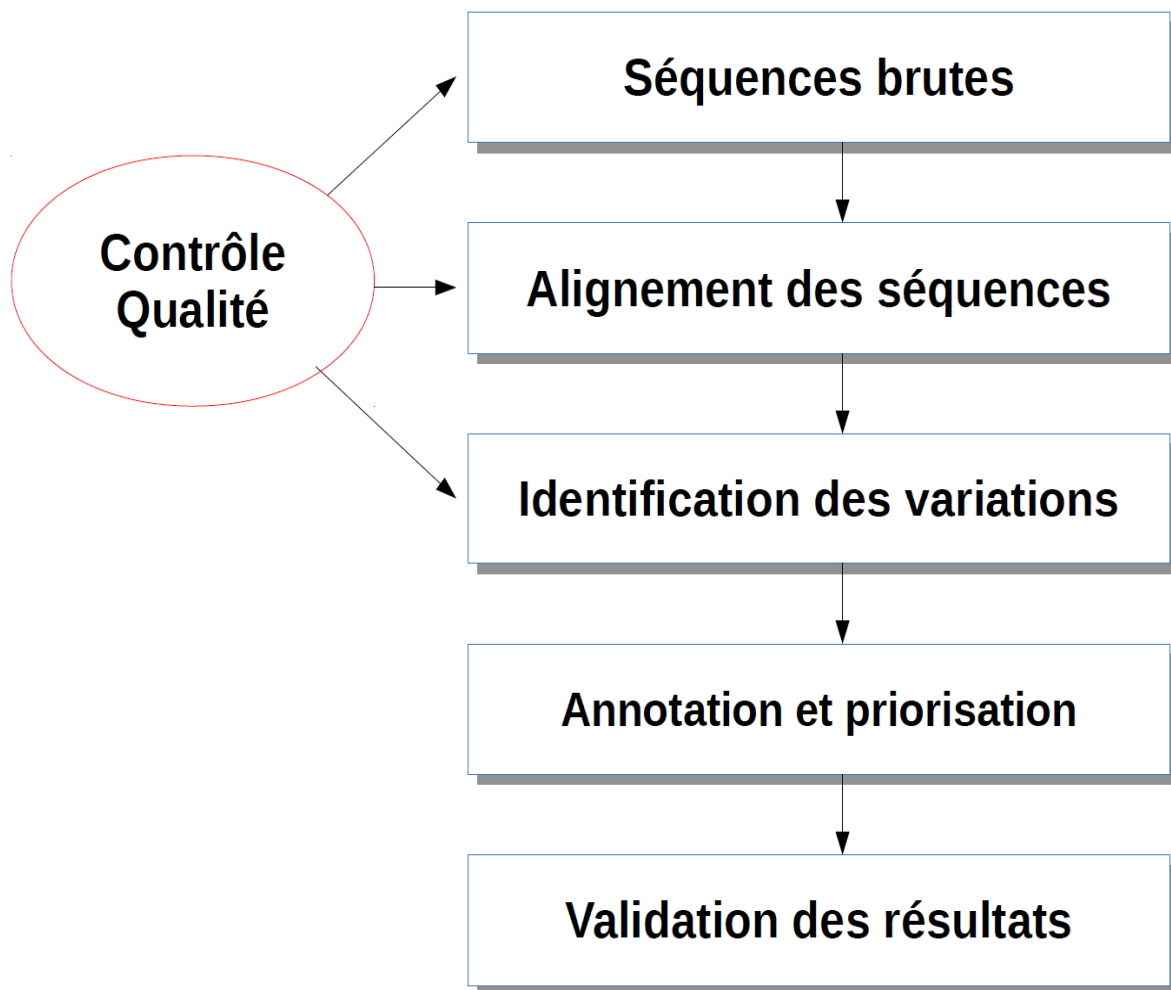


Figure 16: Etapes d'analyse des séquences générées par le séquençage d'exome.

Pour analyser les données, au vu du type de mutations connues dans les formes syndromiques d'obésité, nous avons choisi d'effectuer un premier tri des variants en incluant uniquement les variants considérés comme fonctionnels, c'est-à-dire: 1/ les variants 'stop loss/stop gain', entraînant la perte ou l'ajout d'un codon stop, respectivement ; 2/ les insertions et les délétions dans le cadre de lecture ; 3/ les variants non-synonymes ; et enfin 4/ les variants d'épissage. Une deuxième étape de filtration s'est concentrée sur les variants non encore reportés dans les bases de données publiques (dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), 1000 Genomes (<http://www.1000genomes.org>), NHLBI Exome Variant Server (EVS; <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) et base du Broad Institute reprenant les résultats d'exome de 61000 sujets apparemment sains (<http://exac.broadinstitute.org/>)) ou ayant une fréquence allélique connue inférieure à 1‰ dans la population générale. Les variants candidats ont aussi été annotés avec l'outil CADD

(combined annotation dependent depletion) (<http://cadd.gs.washington.edu/score>) fournissant un score de prédiction fonctionnel. Plus ce score est élevé, plus le variant est considéré comme délétère.

Ensuite, 3 modèles génétiques ont été investigués à partir des variants issus des 2 précédentes étapes de filtration: les modèles récessif, *de novo* et hétérozygote composite. Dans le modèle récessif, les variants trouvés à l'état homozygote chez le patient et à l'état hétérozygote chez ses parents non atteints ont été considérés comme candidats. Dans le modèle *de novo*, les variants présents uniquement chez le patient mais pas chez ses parents ont été considérés comme candidats. Enfin, dans le modèle hétérozygote composite, toute paire de variants composée de variants situés dans un même gène présents à l'état hétérozygote chez le sujet atteint alors que ses parents non atteints sont hétérozygotes pour un seul variant a été considérée comme candidate.

Puis, une analyse bibliographique détaillée des différents gènes mis en évidence a été réalisée, afin d'identifier les gènes ayant potentiellement un rôle causal dans le phénotype d'obésité syndromique, soit une obésité sévère et précoce associée à une déficience intellectuelle.

IV.2.3. Génotypage

Afin de valider les variants géniques mis en évidence lors du séquençage d'exome chez le proband mais aussi de confirmer que ces variants ne sont pas présents chez les 2 parents sains, la technique de génotypage TaqMan® Mutation Detection Assays (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) a été réalisée chez le proband et ses 2 parents.

Dans un deuxième temps, afin de déterminer la fréquence du variant et son implication potentielle dans les obésités syndromiques avec déficience intellectuelle et d'éliminer un éventuel polymorphisme, le génotypage a été réalisé dans 3 autres groupes de sujets:

- Sujets répondant aux critères cliniques d'obésité syndromique: obésité à début précoce (avant l'âge de 6 ans) et sévère (Z-score de l'IMC > 3 DS) associée à une déficience intellectuelle et une impulsivité alimentaire (n=43),
- Sujets ayant une obésité commune non syndromique (n=178),
- Sujets de corpulence normale sans déficience intellectuelle (n=195).

Le génotypage a été réalisé, au CNRH (Centre de Recherche en Nutrition Humaine) Ile de France site de l'hôpital La Pitié-Salpêtrière, par la technique de PCR semi-quantitative utilisant des sondes Taqman (qPCR), sur l'appareil Step One Plus d'Applied Biosystems.

La technique des sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman (Perkin-Elmer-Applied Biosystems) a pour principe d'utiliser l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde fluorescente fixée sur sa cible, qui est le fragment d'intérêt. La sonde, qui est un oligonucléotide complémentaire de la zone contenant le variant à étudier, présente un fluo-rapporteur à son extrémité 5' dont l'émission est "quenchée", c'est-à-dire éteinte, par un second fluorophore situé à l'extrémité 3'. Si la zone comprenant le variant est correctement amplifiée par les 2 amorces PCR et uniquement si la complémentarité de la sonde avec l'ADN cible est parfaite, la sonde Taqman va s'hybrider sur sa cible. Lorsque la Taq polymérase atteint cette sonde hybridée, son activité exonucléasique va la déplacer puis la dégrader, ce qui entraîne la séparation du fluo-rapporteur du fluo-quencher et donc une augmentation de la fluorescence de ce rapporteur.

La réaction d'amplification fait intervenir une solution (Taqman Universal PCR Master Mix) contenant l'Ampli Taq Gold polymérase, des dNTPs (mélange des quatre désoxyribonucléotides), du MgCl₂ et une référence passive Rox dye qui permet de standardiser les valeurs de fluorescence obtenues et une autre solution (Taqman Assays) contenant les amorces ainsi que deux sondes, chacune spécifiquement complémentaire d'un allèle et fixée à un fluorochrome différent (FAM et VIC) (Figure 17, page 113).

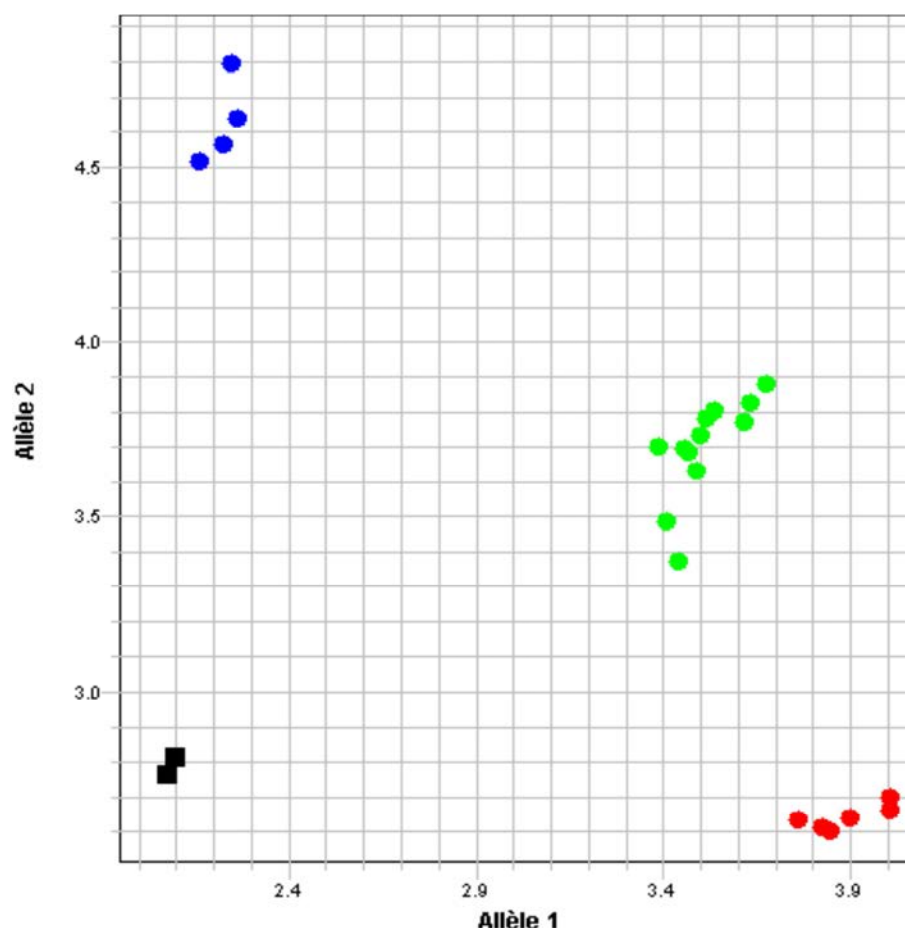


Figure 17: Présentation des résultats d'un génotypage TaqMan® Mutation Detection Assays.

Le nuage de points de données peut s'étaler sur l'axe horizontal (allèle 1), l'axe vertical (allèle 2) ou en diagonale (allèle 1/allèle 2). Cette variation provient des différences d'intensité de la fluorescence des rapporteurs après amplification par PCR (polymerase chain reaction).

IV.2.4. Méthodologie statistique

Des études d'association entre les variants géniques mis en évidence par le séquençage d'exome et les caractéristiques phénotypiques dans les 3 cohortes ont été réalisées à partir du logiciel JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Les fréquences des génotypes et l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été étudiés dans les trois cohortes. Le principe de Hardy-Weinberg affirme que la fréquence des allèles et du génotype dans une population donnée demeure constante. En d'autres termes, ils sont en équilibre de génération en génération, à moins que des influences spécifiques confondantes (sélection naturelle, mélange des populations) soient introduites. La loi de Hardy-Weinberg établit donc

que, pour un variant biallélique donné avec des allèles A et a, si dans une population donnée la fréquence de l'allèle A est égale à P et la fréquence de l'allèle a est égale à Q, les fréquences des génotypes doivent être P^2 pour AA, $2PQ$ pour Aa et Q^2 pour aa. Le test de l'équilibre de Hardy-Weinberg a été réalisé par un test chi-carré entre les fréquences observées de chaque variant dans chaque population et les fréquences théoriques.

Les résultats ont été exprimés en moyennes, écarts-types et extrêmes. Un $p < 0,05$ était considéré comme significatif.

IV.3. Résultats

IV.3.1. Modèle *de novo*

Dans le modèle *de novo*, nous avons identifié 13 variants localisés dans 12 gènes différents (Tableau 6, page 115).

Tableau 6: Gènes et type de variants, avec leur qualité de séquençage et leur score de prédiction d'effets délétères CADD (combined annotation dependent depletion) respectifs, mis en évidence lors du séquençage d'exome des 8 trios dans le cadre des obésités syndromiques

Gène	Type de variants mis en évidence	Score CADD	Qualité de séquençage
<i>MYT1L</i> (myelin transcription factor 1-like)	Variant 'stopgain'	41	99%
<i>GPRIN2</i> (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2)	2 variants 'stopgain'	40 12,1	57% 99%
<i>KCNN3</i> (potassium channel, calcium-activated, intermediate/small conductance, subfamily N, member 3)	Variant 'stopgain'	39	91%
<i>GLB1</i> (galactosidase beta-1)	Variant 'stopgain'	38	41%
<i>PHF21A</i> (PHD finger protein 21A)	Délétion dans le cadre de lecture	25,7	99%
<i>ARID1A</i> (AT rich interactive domain-containing protein 1A)	Variant 'stopgain'	22,5	99%
<i>FAM189A1</i> (family with sequence similarity 189, member A1)	Variant 'stopgain'	18,2	48%
<i>ADRA2B</i> (adrenoreceptor alpha 2B)	Variant 'stopgain'	17,6	99%

<i>ASCL1</i> (<i>achaete-scute complex, drosophila, homolog 1</i>)	Variant 'stopgain'	16,8	99%
<i>NOTCH2</i> (<i>NOTCH, drosophila, homolog of, 2</i>)	Délétion dans le cadre de lecture	14,5	44%
<i>FRMD4A</i> (<i>FERM domain containing 4A</i>)	Délétion dans le cadre de lecture	14,4	99%
<i>JRK</i> (<i>jerky, mouse, homolog of</i>)	Délétion dans le cadre de lecture	6	99%

variant 'stop gain': variant entraînant l'ajout d'un codon stop

Après analyse de la littérature, les 12 gènes mis en évidence par le séquençage d'exome ont pu être impliqués et regroupés dans 5 grandes voies physiopathologiques ou leur fonction reste à ce jour inconnue (Tableau 7, page 117).

Tableau 7: Voies physiopathologiques et gènes identifiés lors du séquençage d'exome des 8 trios dans le cadre des obésités syndromiques.

Neurogénèse	Excitabilité neuronale / Neurotransmission	Remodelage de la chromatine	Fonction ciliaire	Enzyme lysosomale	Fonction inconnue
<i>MYT1L</i> (myelin transcription factor 1-like)	<i>KCNN3</i> (potassium channel, calcium-activated, intermediate/small conductance, subfamily N, member 3)	<i>PHF21A</i> (PHD finger protein 21A)	<i>NOTCH2</i> (NOTCH, drosophila, homolog of, 2)	<i>GLB1</i> (galactosidase beta-1)	<i>FAM189A1</i> (family with sequence similarity 189, member A1)
<i>GPRIN2</i> (G protein- regulated inducer of neurite outgrowth 2)	<i>ADRA2B</i> (adrenoreceptor alpha 2B)	<i>ARID1A</i> (AT rich interactive domain- containing protein 1A)			<i>JRK</i> (jerky, mouse, homolog of)
<i>ASCL1</i> (achaete-scute complex, drosophila, homolog 1)					
<i>FRMD4A</i> (FERM domain containing 4A)					

a. Gènes de la voie de la neurogénèse

Cinq variants, localisés dans 4 gènes différents de la voie de la neurogénèse, ont été mis en évidence dans le modèle *de novo*, chez 3 probands. Ces gènes interviennent dans la transformation des fibroblastes en neurones fonctionnels, la croissance neuronale, la polarité cellulaire des neurones ou leur différenciation.

- Gène *MYT1L*

Un variant ‘stopgain’ du gène *MYT1L* (myelin transcription factor 1-like) a été mis en évidence chez un proband d’un trio. Ce gène, localisé dans la région chromosomique 2p25.3, code pour un facteur de transcription neuronal et intervient dans la transformation des fibroblastes embryonnaires et post-nataux en neurones fonctionnels. Il possède un rôle dans l’affectation de l’identité cellulaire neuronale, la différenciation et la plasticité. L’expression de *MYT1L* est très importante dans le cerveau en développement, avec une augmentation de cette expression génique pendant les premières étapes de l’embryogénèse et des pics lors de la neurogénèse [1]. *MYT1L* est également exprimé dans le cerveau adulte, avec une expression maximale dans les neurones du SNC, mais à des taux plus faibles, ainsi que dans la rétine. Il est suggéré un rôle de *MYT1L* dans le développement des fonctions cognitives [1]. Des aberrations submicroscopiques (délétions ou duplications) de la bande chromosomique 2p25.3, avec une région minimale de chevauchement contenant uniquement le gène *MYT1L*, ou des mutations *de novo* avec perte de fonction de *MYT1L*, ont été décrites chez environ 40 patients. Ces anomalies génétiques sont associées à une obésité centrale, à début précoce, à une déficience intellectuelle, le plus souvent modérée avec retard de langage, et à des troubles du comportement d’intensité variable (agressivité, hyperactivité) [1-4]. Une étude récente a démontré que *MYT1L* est le seul gène délété ou tronqué chez l’ensemble des sujets présentant ce phénotype [1]. *MYT1L* a également été associé à l’autisme [166] ou à d’autres pathologies neuropsychiatriques, telles que la schizophrénie ou la dépression [167].

- Gène *GPRIN2*

Un variant ‘stopgain’ dans le gène *GPRIN2* (G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 2), localisé sur le chromosome 10, a été identifié chez un autre proband. Ce gène régule la croissance neuronale et est exprimé principalement dans le cerveau. Des CNV de *GPRIN2* ont été détectés chez des sujets présentant un déficit intellectuel, modéré à sévère, un retard de langage, des troubles du comportement de type autistique, une dysmorphie et des anomalies des extrémités [168, 169].

- Gène *ASCL1*

Un variant ‘stopgain’ du gène *ASCL1* (achaete-scute complex, drosophila, homolog 1) a été mis en évidence chez le proband porteur du variant de *MYT1L*. Ce gène intervient dans le

développement du SNC et dans l'initiation de la différenciation des neurones. Il est exprimé dans le neuro-épithélium rétro-chiasmatique. La perte de *ASCL1* génère une hypoplasie des noyaux arqué et ventro-médial. *ASCL1* supprime l'expression du neuropeptide NPY [170]. En cas de régulation négative du facteur de neuro-différenciation *ASCL1*, la neurogénèse est dirigée vers les neurones orexigènes, plutôt qu'anorexigènes, résultant en une augmentation de l'appétit, une diminution de la satiété et le développement d'une obésité. Le facteur *ASCL1* est requis pour le bon développement des neurones POMC. Les souris *ASCL1*^{-/-} présentent une hypoplasie du noyau arqué avec une expression minimale des neurones POMC, tandis que les souris *ASCL1*^{+/-} surexpriment les neurones NPY [171].

- Gène *FRMD4A*

Enfin, une délétion du gène *FRMD4A* (FERM domain containing 4A) a été mise en évidence chez un autre proband. Ce gène joue un rôle dans la structure, le transport et la signalisation des cellules. *FRMD4A* module la polarité cellulaire des neurones, régule le réseau dendritique des neurones de l'hippocampe et la croissance neuronale. Une duplication homozygote de 13 nucléotides de la région codante de *FRMD4A* a été identifiée chez des enfants consanguins israéliens présentant un déficit intellectuel sévère, un retard de langage, une dysmorphie et des anomalies de l'imagerie cérébrale (agénésie du corps calleux de différents degrés, hypoplasie du vermis et du cervelet) [172].

b. Gènes de la voie de l'excitabilité neuronale et de la neurotransmission

Deux variants, situés dans 2 gènes de la piste physiopathologique de l'excitabilité neuronale et de la neurotransmission, ont été identifiés, sur le mode *de novo*, chez 2 probands. Cette voie semble jouer un rôle dans la plasticité synaptique et dans les fonctions cognitives supérieures, telles que la capacité à discriminer, à sélectionner et à exécuter [173].

- Gène *KCNN3*

Nous avons mis en évidence un variant 'stopgain' dans le gène *KCNN3* (potassium channel, calcium-activated, intermediate/small conductance, subfamily N, member 3) chez un proband. Ce gène *KCNN3* est largement exprimé dans tout le cerveau et le SNC mais prédomine dans

l'hypothalamus et code pour le canal potassique SK3 (small conductance potassium channel 3) qui régule l'excitabilité neuronale. Ce gène est caractérisé par une répétition polymorphique CAG dans la région codante N-terminale. Les longues répétitions de CAG dans *KCNN3*, entraînant une réduction de la fonction du canal SK3, sont spécifiquement associées à de meilleures performances dans les fonctions cognitives supérieures tandis que les souris surexprimant *KCNN3* avec hyperactivation de SK3 présentent des déficits sélectifs dans les fonctions cérébrales supérieures. Il apparaît donc que les génotypes de *KCNN3* modifient les performances cognitives et que la fonction du canal SK3 est inversement corrélée à une meilleure fonction cognitive [174].

- Gène *ADRA2B*

Un variant 'stopgain' dans le gène *ADRA2B* (adrenoreceptor alpha 2B) a également été mis en évidence chez un autre proband. *ADRA2B* est un membre de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G et joue un rôle dans la modulation de la neuro-transmission et dans la régulation de la libération des neuro-transmetteurs à partir des neurones adrénergiques du SNC et à partir des nerfs sympathiques. Un variant du gène *ADRA2B* a été associé à une diminution du métabolisme de base chez les sujets obèses et pourrait contribuer à la physiopathologie de l'obésité [175].

c. Gènes de la voie du remodelage de la chromatine

Une autre voie physiopathologique mise en évidence est celle du remodelage de la chromatine, avec 2 variants localisés dans 2 gènes différents chez 2 probands sur le mode *de novo* [176]. Cette voie en cas d'altération peut provoquer des dysfonctionnements au niveau cérébral et neurologique.

- Gène *PHF21A*

Une délétion du gène *PHF21A* (PHD finger protein 21A) a été identifiée chez un proband. Ce gène modifie la chromatine en jouant un rôle dans la régulation de la déméthylation des histones. Il intervient dans le développement neuro-facial et cranio-facial de la souris et du poisson-zèbre. En cas de suppression de *PHF21A*, apparaissent des anomalies cranio-faciales et une apoptose neuronale [177]. Des micro-délétions interstitielles du gène *PHF21A* ont été

prises en évidence chez l'homme dans le cadre du syndrome de Potocki-Shaffer, associant des exostoses multiples, une déficience intellectuelle, une hypotonie profonde, des anomalies cranio-faciales avec dysmorphie, des anomalies des extrémités, des atteintes oculaires avec dystrophie rétinienne, et de façon inconstante une obésité et des troubles du comportement [177, 178].

- Gène *ARID1A*

Un variant a également été mis en évidence chez un autre proband dans le gène *ARID1A* (AT rich interactive domain-containing protein 1A). Ce gène est impliqué dans l'activation et la répression de la transcription de certains gènes par remodelage de la chromatine. Il appartient au complexe BAF (BRG1-associated factor) de remodelage de la chromatine qui est composé de différentes sous-unités: *ARID1A*, *ARID1B* (AT rich interactive domain-containing protein 1B), *SMARCA4* (SWI/SNF (switch mutants/sucrose non-fermenting)-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4), *SMARCB1* (SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1), *SMARCA2* (SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 2) et *SMARCE1* (SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily E, member 1) (Figure 18, page 122).

Des mutations hétérozygotes du gène *ARID1A*, avec probable effet de perte de fonction, ont été identifiées chez l'homme comme responsables du syndrome de Coffin-Siris caractérisé par un retard mental sévère, une dysmorphie, des anomalies des extrémités et un retard de croissance staturo-pondérale [179]. Une microduplication *de novo* incluant le gène *ARID1A* a également été identifiée chez des sujets présentant un retard de langage, un retard de développement psycho-moteur, une dysmorphie et un sixième doigt ou orteil surnuméraire [180].

Appartenant également au complexe BAF de remodelage de la chromatine, une mutation *de novo* hétérozygote du gène *ARID1B*, provoquant un codon stop prématuré, a été identifiée par séquençage d'exome chez un patient présentant une obésité extrême à début précoce (avant 6 ans), un retard mental modéré, avec retard de langage, et un hyperinsulinisme [181].

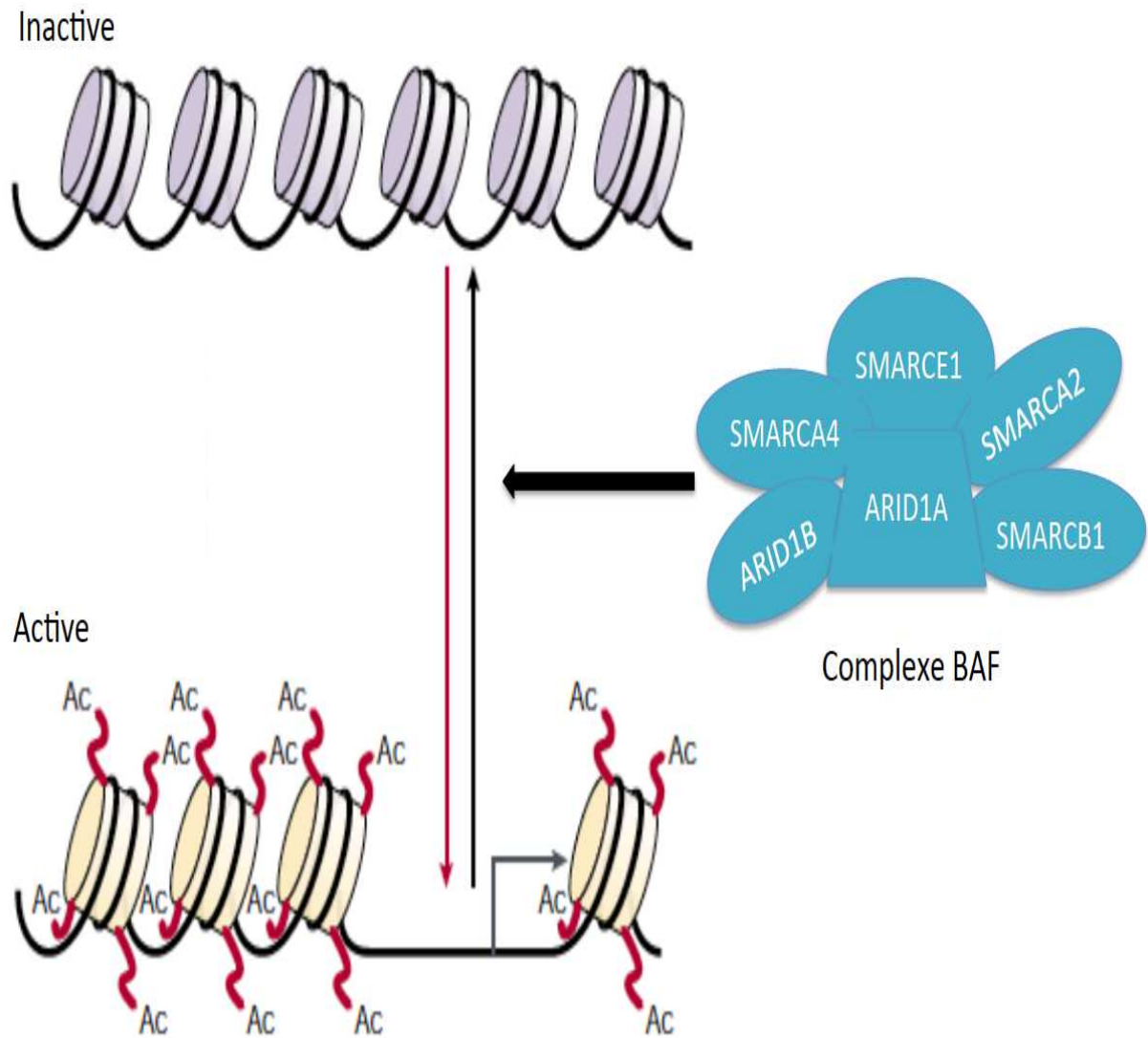


Figure 18: Rôle du complexe BAF dans le remodelage de la chromatine.

Le complexe BAF (BRG1-associated factor) intervient, en association avec d'autres facteurs, dans la formation des structures actives et inactives de la chromatine.

Ac: groupement acétyle ; ARID1A: AT rich interactive domain-containing protein 1A ; ARID1B: AT rich interactive domain-containing protein 1B ; SMARCA2: SWI/SNF(switch mutants/sucrose non-fermenting)-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 2 ; SMARCA4: SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 4 ; SMARCB1: SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily B, member 1 ; SMARCE1: SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily E, member 1

d. Gène de la voie de signalisation NOTCH

La voie suivante identifiée est la voie de signalisation NOTCH qui intervient, entre autre, dans la morphogénèse du corps ciliaire [182]. En effet, une délétion du gène *NOTCH2* (*NOTCH*, *drosophila*, homolog of, 2) a été mise en évidence chez un proband dans le modèle *de novo*. Ce gène joue un rôle dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose au cours du développement, contrôle l'orientation vers une lignée cellulaire et régule l'expression génique. Il a de plus un rôle dans le contrôle de la morphogénèse du corps ciliaire oculaire en régulant la prolifération cellulaire. En effet, l'inactivation du gène *NOTCH2* dans le corps ciliaire en développement en abolit la morphogénèse [182]. Il a aussi été impliqué dans le syndrome d'Alagille, caractérisé par une cholestase chronique associée à des pathologies squelettiques, rénales et ophtalmologiques, une dysmorphie faciale et inconstamment un retard de développement et une malabsorption des graisses. Des mutations hétérozygotes de *NOTCH2* ont également été associées au syndrome Hadju-Cheney qui est une affection très rare du tissu conjonctif responsable d'une ostéoporose, d'une dysmorphie, d'un retard mental modéré et parfois d'un diabète de type 1 [183]. Enfin, des mutations de *NOTCH2* ont été mises en évidence chez des enfants atteints d'hyperinsulinisme congénital [184] ou de diabète MODY (maturity onset diabetes of the young) [185].

e. Gène de la voie des enzymes lysosomales

Enfin, la dernière voie identifiée est la voie des enzymes lysosomales avec la mise en évidence d'un variant 'stopgain' dans le gène *GLB1* (galactosidase beta-1) chez un proband. Ce gène code pour la β -galactosidase-1 qui est une enzyme lysosomale hydrolysant les substrats gangliosides et d'autres substrats glyco-conjugués. Des mutations du gène *GLB1* sont responsables de la gangliosidose à GM1 (ganglioside M1), maladie de surcharge lysosomale, associant des anomalies neuro-viscérales, ophtalmologiques et dysmorphiques. Elles peuvent aussi causer la mucopolysaccharidose de type 4b, ou syndrome de Morquio, qui est une accumulation anormale de glycosaminoglycanes dans les cellules et provoque une dysplasie squelettique, des anomalies ophtalmologiques et une petite taille.

f. Gènes de fonction inconnue

- Gène *FAM189A1*

Un variant ‘stopgain’ du gène *FAM189A1* (family with sequence similarity 189, member A1) a été identifié chez un proband par le séquençage d’exome. Or, un CNV de type ‘gain’ dans la région chromosomique 15q13.2-q13.3 contenant le gène *FAM189A1* a été mis en évidence chez 2 sujets présentant une obésité sévère à début précoce associée à un retard de développement psychomoteur, un retard de langage, une dyspraxie et des troubles de la mémoire [186].

- Gène *JRK*

De même, une délétion dans le gène *JRK* (jerky, mouse, homolog of) a également été mise en évidence chez un proband dans le modèle *de novo*. Ce gène est exprimé dans le cerveau. Chez la souris, l’inactivation homozygote de ce gène par insertion transgénique provoque une épilepsie, un nanisme, une cyphose vertébrale thoracique et une stérilité chez les mâles. Chez l’homme, un CNV de type ‘gain’ a été identifié dans la région chromosomique 8q24.3 contenant le gène *JRK* chez 2 sujets présentant une obésité sévère à début précoce avec hyperinsulinémie disproportionnée [186].

Au total, ces 12 gènes mis en évidence par le séquençage d’exome semblent intéressants pour expliquer la physiopathologie du développement de l’obésité d’origine centrale et/ou de la déficience intellectuelle.

IV.3.2. Modèles récessif et hétérozygote composite

Aucun variant n’a été mis en évidence par le séquençage d’exome ni sur le mode récessif ni sur le mode hétérozygote composite.

IV.3.3. Validation des gènes identifiés dans le modèle *de novo*

Nous avons voulu valider les données du séquençage d’exome sur le modèle *de novo*. Pour cela, nous avons dans un premier temps effectué un génotypage du variant mis en évidence dans le gène *MYT1L* dans trois populations différentes: obésité syndromique, obésité commune et sujets témoins non obèses. Nous avons ensuite, dans un deuxième temps, réalisé

un séquençage de l'ensemble des 12 gènes identifiés par le séquençage d'exome, dans une population de sujets atteints d'obésité syndromique.

a. Gène *MYT1L*

Parmi les 12 gènes mis en évidence sur le modèle *de novo*, le gène *MYT1L* nous a paru particulièrement intéressant du fait de la très bonne qualité de son séquençage (99%) et de son score prédictif d'effet délétère CADD élevé (41). De plus, il intervient dans la voie physiopathologique de la neurogénèse et pourrait jouer un rôle dans la physiopathologie de l'obésité extrême et de la déficience intellectuelle.

Le proband, porteur hétérozygote du variant du gène *MYT1L* mis en évidence par le séquençage d'exome, est suivi à l'hôpital Trousseau, depuis l'âge de 13 ans et demi, pour une obésité sévère, associée à une impulsivité alimentaire et des troubles du comportement (agitation et agressivité), d'étiologie inconnue à ce jour. Ce garçon est issu de parents non consanguins, sans antécédents familiaux notables et de poids et taille normaux. La période périnatale s'est déroulée sans particularité, notamment sans hypotonie néonatale. Il existe un retard de développement psychomoteur noté dès la petite enfance avec une déficience intellectuelle et un retard de langage, nécessitant une scolarité spécialisée, sans dysmorphie ni anomalie des extrémités. L'obésité s'est développée dès la petite enfance, sans rebond d'adiposité. A l'inclusion, son poids était de 98,9 kg (>> 4DS), sa taille de 162,5 cm (1 DS) et son IMC de 37,45 kg/m² (9,8 DS). Il ne présentait ni endocrinopathie ni anomalies neurosensorielles (Figure 19, page 126).



Figure 19: Photographie du proband porteur du variant du gène *MYT1L* (myelin transcription factor 1-like).

Dans un premier temps, le génotypage a été réalisé pour le gène *MYT1L* chez le trio pour lequel le variant avait été mis en évidence par le séquençage d'exome, confirmant que seul le proband était hétérozygote alors que ses parents n'étaient pas porteurs de la mutation. Le génotypage a ensuite été réalisé dans 3 populations différentes: 43 sujets atteints d'obésité syndromique, 178 sujets ayant une obésité commune et 195 sujets de corpulence normale. Le

variant de *MYT1L* a également été mis en évidence, à l'état hétérozygote, chez 6 autres sujets de la cohorte d'obésité syndromique (11,76%), chez 35 sujets ayant une obésité commune (19,66%) et chez 13 sujets de corpulence normale (6,67%).

La distribution du génotype de *MYT1L* et l'équilibre de Hardy-Weinberg sont représentés dans le tableau 8 (page 127). La distribution du génotype *MYT1L* était en accord avec l'équilibre de la loi Hardy-Weinberg dans les trois cohortes étudiées, ce qui signifie que le génotype de *MYT1L* atteint l'équilibre génétique à la fois dans la cohorte des sujets atteints d'obésité syndromique mais aussi dans les cohortes des sujets ayant une obésité commune et des sujets témoins non obèses. Les trois cohortes sont donc représentatives pour le génotype de *MYT1L*.

Tableau 8: Distribution du génotype *MYT1L* dans les 3 cohortes.

	Obésité syndromique (n=51)	Obésité commune (n=178)	ICAPS (n=195)
Fréquence de l'allèle muté T	5,88%	9,83%	3,33%
Homozygote sain C/C	88,24%	80,34%	93,33%
Hétérozygote C/T	11,76%	19,66%	6,67%
Homozygote muté T/T	0%	0%	0%
Hardy-Weinberg	0,66	0,15	0,63

La présence du variant du gène *MYT1L* dans différentes populations de sujets ayant une obésité non syndromique et de sujets non obèses suggérait que ce variant était un polymorphisme fréquent.

Aucune association significative n'était observée entre le génotype de *MYT1L* et le phénotype des sujets des trois cohortes étudiées (obésité syndromique, obésité commune, corpulence normale).

Toutefois, la probabilité d'avoir un IMC normal, pour l'âge et le sexe, était plus élevée chez les sujets ne présentant pas le variant de *MYT1L*, en comparaison aux sujets hétérozygotes ($p=0,0003$). L'odds ratio était alors de 3,09. Le risque relatif d'être obèse si le sujet est porteur du variant à l'état hétérozygote était de 1,51 par rapport au sujet non porteur. Le risque relatif de ne pas être obèse si le sujet n'est pas porteur du variant était de 2,04 par rapport au sujet hétérozygote. Ces résultats suggéraient le rôle potentiel de *MYT1L* dans le développement de l'obésité.

b. Perspectives

En complément de *MYT1L* et afin d'explorer la pertinence des autres variants, un séquençage des gènes, en entier, mis en évidence par le séquençage d'exome sera réalisé dans 2 populations différentes:

- une population de 50 sujets atteints d'obésité syndromique,
- et une population de 100 sujets témoins de corpulence normale et sans déficience intellectuelle.

La taille de la région génomique de l'ensemble des gènes à capturer est de 2,5 Mb. D'après l'application NimbleDesign (<http://design.nimblegen.com>), 93% de la région est capturable, soit 2,3 Mb. L'ADN génomique a été extrait des leucocytes du sang périphérique. La quantité d'ADN nécessaire sera de 2 à 4 µg, avec contrôles de la qualité et de la pureté de l'ADN pour chaque échantillon. La préparation des librairies et des captures sera réalisée à l'aide des réactifs SureSelect Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Le séquençage sera ensuite réalisé sur le séquenceur à haut débit HiSeq 2500 Instrument (Illumina, San Diego, CA, USA), selon le protocole fourni par les fabricants.

Le séquençage sera réalisé sur la plateforme génomique de la Pitié-Salpêtrière (P3S, Pr Soubrier, Dr Trégouët).

IV.4. Conclusion

Nous avons utilisé la technique de séquençage d'exome dans des formes d'obésité rare et sévère. Nous avons identifié des variants de gènes impliqués dans des voies physiopathologiques d'intérêt. En particulier, nous avons identifié un variant dans le gène *MYT1L* à l'état hétérozygote chez un proband présentant une obésité sévère, à début précoce

associée à une déficience intellectuelle, un retard de langage, une impulsivité alimentaire et des troubles du comportement (agitation et agressivité). Les résultats du génotypage de ce variant suggèrent qu'il s'agit d'un polymorphisme fréquent mais avec toutefois un rôle potentiel de *MYT1L* dans le développement de l'obésité.

En complément de *MYT1L*, nous allons explorer la pertinence des autres variants dans d'autres populations de patients atteints d'obésité syndromique et de sujets témoins de corpulence normale et sans déficience intellectuelle.

En cas de validation de(s) gène(s) identifié(s), le séquençage d'exome pourrait alors devenir un outil diagnostique majeur pour les obésités sévères, aider à la compréhension des mécanismes de régulation du poids, et même aider à progresser dans l'élaboration de pistes thérapeutiques dans le cadre de l'obésité commune.

V. DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Même si les progrès des études moléculaires ont permis d'identifier quelques gènes impliqués dans l'obésité, à ce jour, les anomalies génétiques en cause ne sont que très rarement identifiées et les mécanismes à l'origine du déséquilibre de la balance énergétique restent mal connus. L'absence d'identification des anomalies moléculaires en cause empêche d'informer précisément les familles sur le risque de récurrence mais aussi de prendre en charge de façon optimale les patients. Il est donc indispensable d'avancer dans leur compréhension afin de pouvoir développer des mesures thérapeutiques adaptées et préventives précoces. De plus, les obésités génétiques sont importantes à diagnostiquer car il existe une prise en charge spécifique, relevant d'équipes spécialisées et multidisciplinaires, à mettre en place le plus rapidement possible (dès la petite enfance). Enfin, la mise en évidence de l'anomalie génétique en cause pourrait permettre de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de l'obésité, monogénique, syndromique mais aussi commune, en identifiant de nouvelles pistes moléculaires. Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés aux gènes qui pourraient potentiellement être impliqués dans le développement de l'obésité sévère à début précoce.

Du fait de l'hétérogénéité clinique de l'obésité et des nombreux facteurs potentiellement confondants pour l'approche génétique, nous avons choisi d'étudier 2 populations différentes, présentant toutes deux une obésité sévère, par 2 études complémentaires: 1/ une approche 'gène candidat' dans une population de 535 sujets présentant une obésité sévère ; 2/ une analyse 'sans a priori' par séquençage d'exome dans une deuxième population constituée de patients présentant une obésité syndromique. En effet, la précocité et la sévérité de ces obésités sont en faveur d'une origine génétique majeure, très peu dépendante de la pression environnementale (environnement culturel, social, économique, psychologique,...). Ainsi, le rôle contributif des gènes est théoriquement plus aisé à mettre en évidence dans ce type de populations. Nous avons de plus choisi de réaliser une caractérisation phénotypique la plus complète possible des sujets obèses afin de pouvoir préciser au mieux les phénotypes associés aux facteurs génétiques étudiés. Grâce à cette démarche, la mise en évidence de l'effet du génotype dans la variabilité individuelle des différents traits associés à l'obésité est en théorie plus aisée. Peu d'équipes travaillant dans ce domaine de recherche ont fait le choix d'une caractérisation phénotypique détaillée des enfants obèses ce qui rend notre approche originale.

Comme dans n'importe quelle maladie multifactorielle telle que l'obésité, l'hétérogénéité clinique s'associe à une hétérogénéité génétique. Nous ne savons toujours pas à ce jour

combien de gènes sont impliqués dans l'obésité humaine. Les phénotypes associés à l'obésité dépendent d'une interaction complexe entre facteurs héréditaires et facteurs de l'environnement (apports énergétiques et activités physiques) et ne peuvent être réduits à une transmission mendélienne simple dans la majorité des cas. La contribution monogénique existe dans le développement de l'obésité. Ces formes monogéniques d'obésité de transmission autosomique récessive [85-88] sont des situations rares avec un phénotype exceptionnel proche des modèles animaux d'obésité [32, 64, 87]. La mutation sur le gène est alors responsable à elle seule du tableau clinique et cela (presque) quelque soit l'environnement. Les sujets porteurs de telles mutations se caractérisent quasiment tous par une hyperphagie précoce entraînant une prise de poids rapide et une efficacité énergétique extraordinaire, comme cela est rencontré dans les modèles animaux. Si la description de ces formes a permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'obésité et en particulier du contrôle de la prise alimentaire, elles ne représentent pas la majorité des obésités de l'enfant. Dans l'obésité plus commune, la mise en évidence des gènes impliqués est beaucoup plus complexe. En effet, l'allèle de susceptibilité peut augmenter la probabilité que le porteur devienne obèse mais la présence de cet allèle n'est pas suffisante pour expliquer à elle seule l'apparition de la maladie. Il existe alors un effet cumulatif de facteurs de prédisposition génétique et de facteurs environnementaux. Ainsi, dans cette situation la plus fréquente d'obésité, chaque gène de susceptibilité pris individuellement n'a que de faibles effets sur le poids, et la contribution cumulative de ces gènes ne deviendrait significative qu'en interaction avec des facteurs environnementaux prédisposant à leur expression phénotypique.

Dans ce travail, nous avons tout d'abord choisi une approche 'gène candidat' orientée sur le gène *LEPR*, appartenant à la voie leptine-mélanocortines, qui joue un rôle clé dans le contrôle de la prise alimentaire. La première partie de ce travail était donc la recherche systématique de mutations du gène *LEPR* dans une population de sujets présentant une obésité sévère. Mon travail de thèse a permis de clarifier le rôle des mutations de *LEPR* dans le développement précoce de l'obésité en précisant notamment leur fréquence chez les sujets obèses et le phénotype associé aux mutations homozygote, hétérozygote composite et hétérozygote. De plus, nous avons précisé les effets de la chirurgie bariatrique chez les 3 sujets porteurs de mutations homozygotes de *LEPR*. Ce travail a permis de montrer que les mutations du gène *LEPR* ne sont pas si rares en France chez les sujets présentant une obésité sévère (2,24% de notre population). Cette fréquence est en rapport avec les 2 autres études réalisées dans des

populations hautement sélectives marquées par un taux élevé de consanguinité [103, 105]. Cela pose donc la question du dépistage systématique de ces mutations chez les patients présentant une obésité sévère dans le but de mettre en place une prise en charge la plus adaptée possible. Or, si les sujets déficients en leptine par mutations du gène *LEP* peuvent bénéficier d'un traitement substitutif de leptine [107], la prise en charge des sujets porteurs de mutations de *LEPR* reste à ce jour difficile, sans thérapeutique actuellement disponible chez l'homme [109]. De plus, la perte de poids après chirurgie bariatrique chez les premiers patients déjà décrits à ce jour [110] ainsi que dans notre étude est variable et limitée. Or, la chirurgie bariatrique représente à ce jour le seul traitement efficace à long terme de l'obésité sévère [20], grâce à différentes techniques opératoires (bypass gastrique, anneau gastrique ou sleeve gastrectomie). Les mutations de *LEPR* pourraient donc être recherchées en cas d'obésité extrême et précoce, de façon systématique, tout comme les mutations d'autres gènes du système leptine-mélanocortines (*LEP*, *POMC*, *PCSK1*, *SIM1*), notamment avant discussion de chirurgie bariatrique, ce qui pourrait amener à contre-indiquer cette thérapeutique en cas de mutations homozygotes mises en évidence.

En raison des effets médiocres de la chirurgie bariatrique décrits dans les quelques cas d'obésité monogénique et syndromique de la littérature, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques est indispensable en raison des obésités massives et précoces développées par ces patients. L'utilisation d'agonistes de MC4R hautement sélectifs chez les patients ayant une interruption du signal mélanocortine en amont de MC4R, telles que ceux porteurs de mutations de *LEPR*, *POMC* ou *PCSK1* par exemple, pourrait devenir une option thérapeutique en restituant le signal mélanocortine en aval de la mutation [187]. Des essais thérapeutiques ont d'ailleurs débuté avec le composé RM-493, agoniste de l' α -MSH, chez le sujet volontaire sain, chez les patients présentant des mutations de gènes impliqués dans la voie leptine-mélanocortines mais également dans le cadre du syndrome de Prader-Willi. RM-493 augmenterait la dépense énergétique de repos chez les sujets obèses, sans effets secondaires sur la fréquence cardiaque et la pression artérielle [188]. De même, des essais de stimulation cérébrale profonde via une électrode implantée dans la partie antérieure du troisième ventricule adjacente au noyau hypothalamique ventromédian sont actuellement en cours. Chez le singe, ce type de stimulation durant huit semaines a permis une réduction de la corpulence avec diminution significative de 8% du poids corporel et de 18% de la masse grasse ($p < 0,05$), sans effets secondaires [189]. Si un effet bénéfique de ce type de prise en charge est démontré chez l'homme (PHRC en cours, investigateur principal Pr Chabardes,

Clinique de Neurochirurgie, Grenoble), elle pourrait alors se discuter chez les patients ayant une obésité syndromique avec interruption du signal mélanocortine. Les patients ayant un SPW pourraient représenter de bons candidats pour le traitement par stimulation cérébrale profonde, du fait du lien étroit entre l'obésité secondaire à une hyperphagie et la dysrégulation du rétrocontrôle hypothalamique (activité basale anormale de l'hypothalamus latéral) [190].

Notre travail a permis de confirmer le phénotype déjà décrit des patients porteurs de mutations homozygotes de *LEPR* [86, 103]. Ces patients ont comme caractéristiques communes de développer précocement une obésité extrême, associée à une hyperphagie et fréquemment à des anomalies endocriniennes, le plus souvent un hypogonadisme hypogonadotrope. Ce phénotype spécifique a également été décrit chez les patients porteurs de mutations des gènes de la voie leptine-mélanocortines, et en particulier du gène *LEP* [85]. Dans notre étude, les dosages de la leptine circulante n'étaient que modérément élevés, 1,5 fois plus élevés que la leptinémie attendue pour la masse grasse, contrairement aux premiers cas publiés de mutations de *LEPR* [86]. Récemment, un déficit congénital en leptine, secondaire à une leptine biologiquement inactive, a été décrit chez un jeune garçon présentant un phénotype spécifique, avec obésité extrême à début précoce et hyperphagie, mais une leptine circulante élevée [106]. Ces observations suggèrent donc que des concentrations circulantes de leptine considérées comme 'normales' pour l'IMC et la masse grasse n'éliminent pas le diagnostic de mutation des gènes *LEP* ou *LEPR*. La mise au point d'une puce qui étudierait simultanément plusieurs gènes du système leptine-mélanocortine (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*, *SIM1*) pourrait permettre de rechercher systématiquement ces mutations dans le cadre d'obésités extrêmes à début précoce, quelque soit les valeurs de la leptinémie. Cette puce pourrait également permettre d'identifier ces patients avant toute discussion de chirurgie bariatrique pour obésité massive et précoce.

Une des particularités de ce travail est la mise en évidence d'une même mutation du gène *LEPR*, Δ exon6-8, partagée par 6 sujets ayant comme particularité commune d'être tous originaires de l'île de La Réunion. La découverte d'un groupe de 6 individus, non apparentés, ayant le même phénotype et porteurs de la même mutation, dans une zone géographique spécifique, pose la question de son origine à partir d'un ancêtre commun et suggère un effet isolat. La fréquence des mutations homozygotes de *LEPR* pourrait probablement être plus élevée sur l'île de La Réunion ou dans d'autres départements et territoires d'outre-mer français, caractérisés par une prévalence élevée de l'obésité, que dans d'autres populations spécifiques (3%) [103, 105]. Le développement du test de qPCR, au cours de notre étude,

pourrait permettre de confirmer cette fréquence plus élevée et de diagnostiquer les sujets porteurs de la mutation *Δexon6-8* à l'état homozygote et hétérozygote, dans un futur proche, grâce à un dépistage systématique de la population de l'île de La Réunion. Le but de cette prochaine étude serait d'évaluer l'impact des mutations hétérozygotes du gène *LEPR* sur la prédisposition à l'obésité. En effet, lors de notre travail, la description phénotypique de 21 sujets porteurs de mutations hétérozygotes de *LEPR*, dont huit porteurs de la mutation *Δexon6-8*, a montré que l'obésité était inconstante, significativement moins sévère que celle des sujets homozygotes et se développait plus tardivement, à l'âge adulte. Aucune anomalie endocrinienne n'était alors associée. Cette variabilité de l'IMC chez les sujets hétérozygotes a également été décrite pour d'autres gènes de la voie leptine-mélanocortines [111, 191, 192, 193]. L'étude ultérieure de l'impact des mutations hétérozygotes de *LEPR* pourrait également permettre de savoir si la chirurgie bariatrique peut être proposée à ces sujets, en cas d'obésité sévère. En effet, comme précédemment décrit pour les mutations du gène *MC4R*, les résultats de la chirurgie bariatrique peuvent être opposés en cas de mutation homozygote ou hétérozygote. La perte de poids après bypass gastrique chez les sujets porteurs de mutations hétérozygotes de *MC4R* est identique à celle de sujets témoins sans mutation de *MC4R*, suggérant que l'hétérozygotie pour les mutations de *MC4R* ne doit pas influencer la décision de réaliser une chirurgie bariatrique [194, 195]. Mais, par contraste, un adolescent présentant une perte de fonction complète de *MC4R* n'a pas perdu de poids à long terme (12 mois après la pose d'un anneau gastrique), suggérant que l'interruption totale du signal mélanocortinergique ne peut pas être contrecarrée par la chirurgie bariatrique [196]. Est-ce le même contraste des effets de la chirurgie bariatrique chez les sujets porteurs de mutations homozygote ou hétérozygote de *LEPR*? D'autres études sur les effets de la chirurgie bariatrique à long terme sont donc nécessaires chez les patients ayant une mutation de *LEPR*, à la fois à l'état homozygote et hétérozygote.

Outre les mutations des gènes de la voie leptine-mélanocortines, d'autres anomalies génétiques sont probablement en cause dans les formes extrêmes d'obésité. L'identification de nouveaux gènes pourrait alors permettre de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie et les mécanismes de régulation du poids, afin d'améliorer la prise en charge des sujets atteints d'obésité. La deuxième partie de ce travail consistait à rechercher de nouveaux gènes candidats par séquençage d'exome dans les formes extrêmes d'obésité syndromique, pour lesquelles l'impact de la génétique est probablement déterminant et très peu dépendant de l'environnement. La caractérisation phénotypique détaillée a permis de sélectionner 8

patients partageant le même phénotype caractérisé par une obésité sévère associée à une déficience intellectuelle et une impulsivité alimentaire. Cette étude a permis d'identifier principalement 9 gènes candidats qui peuvent être regroupés au sein de 4 voies physiopathologiques intéressantes: la neurogénèse, l'excitabilité neuronale/la neurotransmission, le remodelage de la chromatine et la fonction ciliaire. Ces gènes apparaissent comme importants, principalement, dans le fonctionnement cérébral et ciliaire. Ils pourraient donc jouer un rôle dans la physiopathologie à la fois de la déficience intellectuelle mais aussi de l'obésité extrême avec troubles du comportement alimentaire. Notamment, il a été montré que le cil primaire pouvait être impliqué dans la voie leptine/mélanocortines. En effet, les souris qui avaient des cils primaires courts au niveau hypothalamique présentaient une augmentation de leur prise alimentaire et une réduction de leur dépense énergétique, amenant à un bilan énergétique positif avec obésité. De plus, la réponse de ces souris au signal anorexique de la leptine était atténuée. Le cil primaire semble donc jouer un rôle dans la sensibilité des neurones hypothalamiques au signal satiétogène de la leptine [136]. Il interviendrait également dans le transport et le trafic intracellulaire de LEPR [137]. Ces observations pourraient expliquer une partie du phénotype d'obésité extrême observé dans notre étude. Des études complémentaires devront donc être réalisées pour essayer de confirmer l'implication des gènes, que nous avons mis en évidence par le séquençage d'exome, dans les formes extrêmes d'obésité syndromique et de vérifier s'ils sont des gènes candidats intéressants pour ces obésités. Tout d'abord, un séquençage des gènes identifiés sera pratiqué chez 50 sujets de notre cohorte d'obésité syndromique afin de valider le gène impliqué. Ensuite, dans le but de déterminer la fréquence du variant et de confirmer son implication potentielle dans l'obésité syndromique, un séquençage sera réalisé chez des sujets témoins de corpulence normale et sans déficience intellectuelle. Enfin, en cas de mutation pathologique mise en évidence, des études fonctionnelles *in vitro* seront mises en place grâce à la plateforme du centre de recherche des Cordeliers (Paris VI) et des laboratoires d'ICAN afin de rechercher les conséquences fonctionnelles du variant.

Un des points importants de ce travail est la mise en évidence, par le séquençage d'exome, d'un variant du gène *MYT1L* chez un patient présentant une obésité sévère à début précoce, associée à une déficience intellectuelle, des troubles du comportement et une impulsivité alimentaire. De façon intéressante, ce variant présente une bonne qualité de séquençage ainsi qu'un score de prédiction d'effet délétère CADD élevé. De plus, il appartient à la voie physiopathologique de la neurogénèse. En effet, chez l'homme, l'expression de *MYT1L* est

spécifiquement limitée au cerveau, avec une expression prédominante dans le cerveau fœtal en développement, suggérant un rôle de *MYT1L* dans le développement des fonctions cognitives [1]. De plus, la mise en évidence d'aberrations génétiques submicroscopiques de la région chromosomique 2p25.3 ou de mutations *de novo* de *MYT1L* chez des sujets présentant une obésité associée à une déficience intellectuelle et des troubles du comportement [1-4] suggère que *MYT1L* est le gène responsable de cette déficience intellectuelle syndromique et que l'insuffisance haploïde de *MYT1L* prédispose aux problèmes de poids à début précoce [1]. Cependant, dans notre travail, le génotypage de *MYT1L*, dans les 3 populations d'obésité syndromique, d'obésité commune sans déficience intellectuelle et de témoins minces, a montré que 12,74% de nos populations étaient porteurs, à l'état hétérozygote, du variant de *MYT1L*. Cette fréquence est particulièrement élevée, suggérant que ce variant de *MYT1L* est un polymorphisme fréquent. Cependant, les sujets n'étant pas porteurs du variant de *MYT1L* ont plus de probabilité d'avoir un IMC normal pour l'âge et le sexe que les sujets hétérozygotes, suggérant le rôle potentiel de *MYT1L* dans le développement de l'obésité. Le mécanisme physiopathologique exact expliquant que la dysfonction de *MYT1L* peut être un facteur prédisposant au surpoids et à l'obésité demeure, à ce jour, inconnu [1]. D'autres études moléculaires et fonctionnelles sur le rôle de *MYT1L* dans le développement neuronal et au sein de la balance énergétique sont nécessaires, afin de déterminer les voies physiopathologiques dans lesquelles cette protéine est impliquée.

Une des particularités de ce travail est d'avoir réalisé une caractérisation phénotypique détaillée, à la fois clinique et biologique, comprenant l'analyse rétrospective de l'histoire personnelle pondérale, les antécédents familiaux d'obésité, un examen clinique complet, une évaluation diététique, des mesures de la composition corporelle et de la dépense énergétique de repos et des bilans endocrinien et métabolique. Le but était de sélectionner des patients partageant le phénotype, clinique et biologique, le plus similaire possible. Ce phénotype commun était caractérisé par une obésité sévère (Z-score de l'IMC > 3 DS) à début précoce (avant l'âge de 6 ans) associée de façon constante à une déficience intellectuelle et une impulsivité alimentaire. Le séquençage d'exome nous a alors permis de mettre en évidence des gènes intervenant dans le fonctionnement cérébral, la neurogénèse et l'excitabilité neuronale/la neurotransmission. Ces gènes semblent donc surtout être impliqués dans le phénotype de déficience intellectuelle de nos sujets. Mais expliquent-ils aussi leur phénotype d'obésité sévère et précoce ? Nous pouvons donc nous demander si notre méthode de sélection de patients était la plus appropriée dans le but d'identifier de nouveaux gènes

impliqués dans la genèse de l'obésité. N'aurait-il pas mieux valu sélectionner des sujets ayant toujours une obésité sévère (Z-score de l'IMC > 3 DS) à début précoce (avant l'âge de 6 ans), mais avec une atteinte neurologique moindre, dans le but de cibler des gènes influençant la prise alimentaire et le gain pondéral ? Par exemple, une étude récente par séquençage d'exome a mis en évidence une relation intéressante entre des variants délétères des gènes des récepteurs olfactifs localisés sur le chromosome 1q et des variants des gènes de la protocadhérine localisés sur le chromosome 5q31, qui prédispose à l'obésité extrême, suggérant un effet de la voie de signalisation olfactive dans la prise de poids sévère et la possibilité de manipuler les saveurs de la nourriture dans le but de réduire le risque de sur-alimentation et d'obésité extrême chez les sujets génétiquement prédisposés. Cette association a été identifiée grâce à la sélection de 30 sujets présentant comme seule caractéristique clinique une obésité extrême (IMC 45-65 kg/m²) [197]. Un PHRCI (programme hospitalier de recherche clinique interrégional), nommé OBEXOME (investigateur principal: Dr B Dubern), a été accepté dans le but de réaliser une étude par séquençage d'exome de 10 sujets présentant une obésité syndromique, leurs 2 parents et un membre de la fratrie sains. Au vu des résultats de ce travail de doctorat, il nous semble intéressant de nous orienter vers l'étude de sujets présentant une obésité sévère (Z-score de l'IMC > 3 DS) à début précoce (avant l'âge de 6 ans), sans atteinte neuro-développementale (déficience intellectuelle, troubles neuropsychologiques), dans le but d'identifier de nouveaux gènes jouant un rôle prépondérant dans le phénotype de l'obésité extrême.

Les progrès des études moléculaires ces dernières années, principalement grâce au développement du séquençage d'exome, ont fait évoluer les protocoles de diagnostic moléculaire pour les pathologies présentant une forte hétérogénéité clinique et génétique, telles que l'obésité syndromique. Cependant, à notre connaissance, il n'existe, à ce jour, que peu d'études ayant mis en évidence des variants associés à l'obésité extrême par le séquençage d'exome [95, 97, 157, 158, 159, 181, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205]. Grâce à la réduction des coûts de fonctionnement, cette technique du séquençage d'exome pourrait devenir une des méthodes de diagnostic génétique avec le 'meilleur rapport qualité/prix' pour les pathologies rares mendéliennes. Notre travail représente donc une étude préliminaire de l'intérêt que représente le séquençage d'exome dans les formes extrêmes d'obésité syndromique. Cependant, une des limites de notre étude est la faible taille de notre population d'obésité syndromique, chez laquelle le séquençage d'exome a été réalisé (8 trios), ce qui a probablement entraîné une perte de puissance. Donc, comme notre travail était basé

sur un nombre limité de sujets, nos résultats nécessitent d'être confirmés dans d'autres études similaires, indépendantes et plus larges.

Dans la pratique clinique, l'importance de ce travail de poser le diagnostic d'obésité génétique est qu'il existe une prise en charge spécifique de ces patients, relevant d'équipes spécialisées et multidisciplinaires, à instaurer le plus rapidement possible (dès la petite enfance). La mise en place des Centres de Référence Maladies Rares (CRMR), et très récemment des Filières Maladies Rares, a permis de mieux prendre en charge ces pathologies qui sont complexes, avec souvent des atteintes multiples: rédaction de protocoles nationaux de diagnostic et de soins pour le SPW et le BBS, élaboration de guide d'informations à l'usage des accompagnants (<http://guide-prader-willi.fr/>), élaboration de cartes d'urgence (<http://www.chu-toulouse.fr/-centre-de-reference-du-syndrome-de,892->). Dans ces centres, des essais thérapeutiques peuvent être proposés au patient. De plus, le diagnostic permet dans un certain nombre de cas de déculpabiliser le patient et sa famille et d'orienter au mieux la prise en charge médico-sociale en fonction des incapacités décrites dans la maladie. Le contact avec les associations de patients est primordial pour l'acceptation de la maladie et l'accompagnement au quotidien.

La recherche des déterminants génétiques de l'obésité a rapidement progressé depuis la description des premières formes d'obésité monogénique et grâce au développement de nouveaux outils de biologie moléculaire. Cependant, l'utilité du dépistage et du conseil génétique (génétique prédictive) dans la prise en charge du patient atteint de maladie complexe, telle que l'obésité commune, n'est actuellement pas établie. Avant d'envisager cette pratique et en sus des aspects psychologiques, sociaux et éthiques, il est nécessaire de répondre à plusieurs questions soulevées par le dépistage génétique en général. D'une part, sommes-nous capables de définir un risque prédictif d'obésité chez un sujet porteur d'une mutation dans un gène donné ? Alors que la prédiction génétique pour les formes monogéniques est très élevée et peut être calculée, ce risque prédictif est généralement petit et difficile à évaluer dans les formes communes d'obésité. Se pose alors la question de l'impact des variants géniques à l'échelle individuelle sur la corpulence et les paramètres métaboliques. En effet, les variants géniques identifiés par les études du génome entier n'expliqueraient qu'une faible proportion de la variation totale du Z-score d'IMC (environ 1,1%) [206]. Ces variants, seuls, ne pourraient donc pas expliquer la susceptibilité individuelle à l'obésité commune. Ils seraient associés à d'autres facteurs pré- et post-nataux environnementaux et comportementaux (Figure 20, page 139). Des études complémentaires

sont donc nécessaires pour identifier d'éventuels autres variants géniques et ces facteurs associés. D'autre part, sommes-nous capables de traiter ou de prévenir l'obésité chez des patients porteurs de variations génétiques, quand bien même nous aurions défini un risque ? La prise en charge thérapeutique habituelle repose sur l'éducation nutritionnelle, l'augmentation de l'activité physique, et souvent un soutien comportemental, psychologique et social. Une pression excessive, qui risquerait d'être exercée sur des patients dépistés, risque de conduire à la prise de poids voire à l'aggravation de l'obésité. Il faudra donc être particulièrement prudent dans la prise en charge préventive d'une obésité dans des populations ciblées.

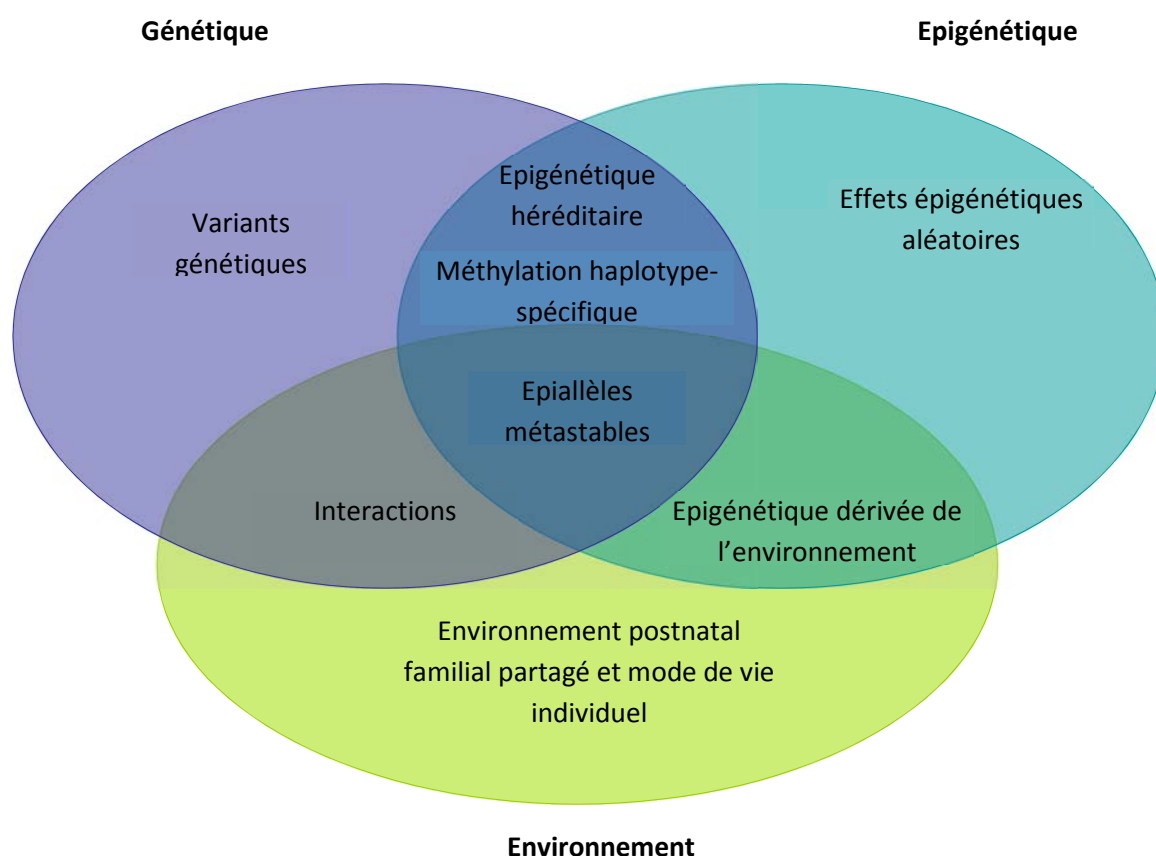


Figure 20: Relation complexe entre la génétique, l'épigénétique et l'environnement pour la susceptibilité à l'obésité (d'après [207, 208]).

BIBLIOGRAPHIE

- 1: De Rocker N, Vergult S, Koolen D, Jacobs E, Holschen A, Zeesman S et al. Refinement of the critical 2p25.3 deletion region: the role of MYT1L in intellectual disability and obesity. *Genet Med* 2015; 17: 460-6.
- 2: Doco-Fenzy M, Leroy C, Schneider A, Petit F, Delrue MA, Andrieux J et al. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 471-9.
- 3: Bonaglia MC, Giorda R, Zanini S. A new patient with a terminal de novo 2p25.3 deletion of 1.9 Mb associated with early-onset of obesity, intellectual disabilities and hyperkinetic disorder. *Mol Cytogenet* 2014; 7: 53.
- 4: Stevens SJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Janssen JW, Klein Wassink-Ruiter JS, van Essen AJ, Dijkhuizen T et al. MYT1L is a candidate gene for intellectual disability in patients with 2p25.3 (2pter) deletions. *Am J Med Genet A* 2011; 155A: 2739-45.
- 5: Farooqi SI. Genetic, molecular and physiological mechanisms involved in human obesity: Society for Endocrinology Medal Lecture 2012. *Clin Endocrinol (Oxf.)* 2015; 82: 23-8.
- 6: Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempé M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A. Body mass index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991; 45: 13-21.
- 7: Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320: 1240-3.
- 8: Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; 384: 766-81.
- 9: Van Eyck A, Van Hoorenbeeck K, De Winter BY, Van Gaal L, De Backer W, Verhulst SL. Sleep-disordered breathing and pulmonary function in obese children and adolescents. *Sleep Med* 2014; 15: 929-33.
- 10: Gettys FK, Jackson JB, Frick SL. Obesity in pediatric orthopaedics. *Orthop Clin North Am* 2011; 42: 95-105.
- 11: Dannemann A, Ernert A, Rücker P, Bau AM, Martus P, Krude H et al. Ethnicity and comorbidities in an overweight and obese multiethnic childhood cohort in Berlin. *Acta Paediatr* 2011; 100: 578-84.

- 12: Owens S, Galloway R. Childhood obesity and the metabolic syndrome. *Curr Atheroscler Rep* 2014; 16: 436.
- 13: Druet C, Dabbas M, Baltakse V, Payen C, Jouret B, Baud C et al. Insulin resistance and the metabolic syndrome in obese French children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2006; 64: 672-8.
- 14: Mimoun E, Aggoun Y, Pousset M, Dubern B, Bouglé D, Girardet JP et al. Association of arterial stiffness and endothelial dysfunction with metabolic syndrome in obese children. *J Pediatr* 2008; 153: 65-70.
- 15: Ahrens W, Moreno LA, Marild S, Molnar D, Siani A, De Henauw S et al. Metabolic syndrome in young children: definitions and results of the IDEFICS study. *Int J Obes* 2014; 38: 4-14.
- 16: Whitaker RC, Wright JA, Pepe MS, Seidel KD, Dietz WH. Predicting obesity in young adulthood from childhood and parental obesity. *N Engl J Med* 1997; 337: 869-73.
- 17: Liu Y, Chen HJ, Liang L, Wang Y. Parent-child resemblance in weight status and its correlates in the United States. *PLoS One* 2013; 8: e65361.
- 18: Su TC, Liao CC, Chien KL, Hsu SH, Sung FC. An overweight or obese status in childhood predicts subclinical atherosclerosis and prehypertension/hypertension in young adults. *J Atheroscler Thromb* 2014; 21: 1170-82.
- 19: Kelsey MM, Zaepfel A, Bjornstad P, Nadeau KJ. Age-related consequences of childhood obesity. *Gerontology* 2014; 60: 222-8.
- 20: Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 2013; 273: 219-34.
- 21: Begg DP, Woods SC. The endocrinology of food intake. *Nat Rev Endocrinol* 2013; 9: 584-97.
- 22: Schneeberger M, Gomis R, Claret M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol* 2014; 220: 25-46.
- 23: Rui L. Brain regulation of energy balance and body weight. *Rev Endocr Metab Disord* 2013; 14: 387-407.
- 24: Schwartz MW, Woods SC, Seeley RJ, Barsh GS, Baskin DG, Leibel RL. Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* 2003; 52: 232-8.

- 25: Myers MG Jr, Simerly RB. The neuroendocrinology and neuroscience of energy balance. *Front Neuroendocrinol* 2010; 31: 1-3.
- 26: Williams KW, Elmquist JK. Lighting up the hypothalamus: coordinated control of feeding behavior. *Nat Neurosci* 2011; 14: 277-8.
- 27: Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372: 425-32.
- 28: Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature* 2000; 404: 661-71.
- 29: Oswal A, Yeo G. Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity* 2010; 18: 221-9.
- 30: Vaisse C, Halaas JL, Horvath CM, Darnell JE Jr, Stoffel M, Friedman JM. Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice. *Nat Genet* 1996; 14: 95-7.
- 31: Xu AW, Kaelin CB, Takeda K, Akira S, Schwartz MW, Barsh GS. PI3K integrates the action of insulin and leptin on hypothalamic neurons. *J Clin Invest* 2005; 115: 951-8.
- 32: Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 1996; 84: 491-5.
- 33: Chehab FF, Lim ME, Lu R. Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12: 318-20.
- 34: Soliman AT, Yasin M, Kassem A. Leptin in pediatrics: A hormone from adipocyte that wheels several functions in children. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16: 577-87.
- 35: Friedman JM. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. *Am J Clin Nutr* 2009; 89: 973-79.
- 36: Dalamaga M, Chou SH, Shields K, Papageorgiou P, Polyzos SA, Mantzoros CS. Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives. *Cell Metab* 2013; 18: 29-42.
- 37: Hill JW. PVN pathways controlling energy homeostasis. *Indian J Endocrinol Metab* 2012; 16: 627-36.

- 38: Varela L, Horvath TL. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep* 2012; 13: 1079-86.
- 39: Air EL, Benoit SC, Blake Smith KA, Clegg DJ, Woods SC. Acute third ventricular administration of insulin decreases food intake in two paradigms. *Pharmacol Biochem Behav* 2002; 72: 423-9.
- 40: Plum L, Schubert M, Brüning JC. The role of insulin receptor signaling in the brain. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 59-65.
- 41: Claret M, Smith MA, Batterham RL, Selman C, Choudhury AI, Fryer LG et al. AMPK is essential for energy homeostasis regulation and glucose sensing by POMC and AgRP neurons. *J Clin Invest* 2007; 117: 2325-36.
- 42: Dagon Y, Hur E, Zheng B, Wellenstein K, Cantley LC, Kahn BB. P70S6 kinase phosphorylates AMPK on serine 491 to mediate leptin's effect on food intake. *Cell Metab* 2012; 16: 104-12.
- 43: Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, Breen PA, Ma MK, Dellinger EP et al. Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery. *N Engl J Med* 2002; 346: 1623-30.
- 44: Nakazato M, Murakami N, Date Y, Kojima M, Matsuo H, Kangawa K et al. A role for ghrelin in the central regulation of feeding. *Nature* 2001; 409: 194-8.
- 45: Wren AM, Seal LJ, Cohen MA, Brynes AE, Frost GS, Murphy KG et al. Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 5992.
- 46: Cowley MA, Smith RG, Diano S, Tschöp M, Pronchuk N, Grove KL et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron* 2003; 37: 649-61.
- 47: Guan HZ, Li QC, Jiang ZY. Ghrelin acts on rat dorsal vagal complex to stimulate feeding via arcuate neuropeptide Y/agouti-related peptide neurons activation. *Sheng Li Xue Bao* 2010; 62: 357-64.
- 48: Stanley S, Wynne K, McGovan B, Bloom S. Hormonal regulation of food intake. *Physiol Rev* 2005; 85: 1131-58.

- 49: Strader AD, Woods SC. Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* 2005; 128: 175-91.
- 50: Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA. The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 2012; 63: 46-56.
- 51: Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci* 2005; 8: 571-8.
- 52: Garfield AS, Lam DD, Marston OJ, Przydzial MJ, Heisler LK. Role of central melanocortin pathways in energy homeostasis. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20: 203-15.
- 53: Bicknell AB. The tissue-specific processing of pro-opiomelanocortin. *J Neuroendocrinol* 2008; 20: 692-9.
- 54: Hinney A, Volckmar AL, Knoll N. Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 114: 147-91.
- 55: Nijenhuis WA, Oosterom J, Adan RA. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 164-71.
- 56: Tolle V, Low MJ. *In vivo* evidence for inverse agonism of agouti-related peptide in the central nervous system of proopiomelanocortin-deficient mice. *Diabetes* 2008; 57: 86-94.
- 57: Begriche K, Girardet C, McDonald P, Butler AA. Melanocortin-3 receptors and metabolic homeostasis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 114: 109-46.
- 58: Horvath TL. The hardship of obesity: a soft-wired hypothalamus. *Nat Neurosci* 2005; 8: 561-5.
- 59: Wu Q, Palmiter RD. GABAergic signaling by AgRP neurons prevents anorexia via a melanocortin-independent mechanism. *Eur J Pharmacol* 2011; 660: 21-27.
- 60: Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, Cerdan MG, Diano S, Horvath TL et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature* 2001; 411: 480-4.
- 61: Vong L, Ye C, Yang Z, Choi B, Chua S Jr, Lowell BB. Leptin action on GABAergic neurons prevents obesity and reduces inhibitory tone to POMC neurons. *Neuron* 2011; 71: 142-54.
- 62: Yang Y, Atasoy D, Su HH, Sternson SM. Hunger states switch a flip-flop memory circuit via a synaptic AMPK-dependent positive feedback loop. *Cell* 2011; 146: 992-1003.

- 63: Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit of hunger. *Nature* 2012; 488: 172-7.
- 64: Yaswen L, Diehl N, Brennan MB, Hochgeschwender U. Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat Med* 1999; 5: 1066-70.
- 65: Graham M, Shutter JR, Sarmiento U, Sarosi I, Stark KL. Overexpression of Agrt leads to obesity in transgenic mice. *Nat Genet* 1997; 17:273-4.
- 66: Bewick GA, Gardiner JV, Dhillon WS, Kent AS, White NE, Webster Z et al. Post-embryonic ablation of AgRP neurons in mice leads to a lean, hypophagic phenotype. *FASEB J* 2005; 19: 1680-2.
- 67: Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR et al. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997; 88: 131-41.
- 68: Siljee-Wong JE. Melanocortin MC₄ receptor expression sites and local function. *Eur J Pharmacol* 2011; 660: 234-40.
- 69: Vaudry H, Nahon JL. Melanin-concentrating hormone. Editorial. *Peptides* 2009; 30: 1965-6.
- 70: Campbell RE, Grove KL, Smith RS. Distribution of corticotropin releasing hormone receptor immunoreactivity in the rat hypothalamus: coexpression in neuropeptide Y and dopamine neurons in the arcuate nucleus. *Brain Res* 2003; 973: 223-32.
- 71: Marston OJ, Garfield AS, Heisler LK. Role of central serotonin and melanocortin systems in the control of energy balance. *Eur J Pharmacol* 2011; 660: 70-9.
- 72: Ramos EJ, Meguid MM, Campos AC, Coelho JC. Neuropeptide Y, alpha-melanocyte-stimulating hormone, and monoamines in food intake regulation. *Nutrition* 2005; 21: 269-79.
- 73: Hansen HH, Jensen MM, Overgaard A, Welkop P, Mikkelsen JD. Tesofensine induces appetite suppression and weight loss with reversal of low forebrain dopamine levels in the diet-induced obese rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2013; 110: 265-71.
- 74: Higgins GA, Desnoyer J, Van Niekerk A, Silenieux LB, Lau W, Thevarkunnel S et al. Characterization of the 5-HT_{2C} receptor agonist lorcaserin on efficacy and safety measures in a rat model of diet-induced obesity. *Pharmacol Res Perspect* 2015; 3: e00084.

- 75: Shyh G, Cheng-Lai A. New antiobesity agents: lorcaserin (Belviq) and phentermine/topiramate ER (Qsymia). *Cardiol Rev* 2014; 22: 43-50.
- 76: Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab* 2013; 17: 475-90.
- 77: Gamage TF, Lichtman AH. The endocannabinoid system: role in energy regulation. *Pediatr Blood Cancer* 2012; 58: 144-8.
- 78: Bouchard C, Tremblay A, Després JP, Nadeau A, Lupien PJ, Thériault G et al. The response to long-term overfeeding in identical twins. *N Engl J Med* 1990; 322: 1477-82.
- 79: Skidmore PM, Cassidy A, Swaminathan R, Richards JB, Mangino M, Spector TD et al. An obesogenic postnatal environment is more important than the fetal environment for the development of adult adiposity: a study of female twins. *Am J Clin Nutr* 2009; 90: 401-6.
- 80: Horn EE, Turkheimer E, Strachan E, Duncan GE. Behavioral and environmental modification of the genetic influence on body mass index: a twin study. *Behav Genet* 2015; 45: 409-26.
- 81: Choquet H, Meyre D. Genetics of obesity: what have we learned? *Curr Genomics* 2011; 12: 169-79.
- 82: Farooqi IS. Genetic aspects of severe childhood obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006; 3 Suppl 4: 528-36.
- 83: Dubern B, Clément K. Aspects génétiques de l'obésité. *Presse Med* 2007; 36: 1568-605.
- 84: Poitou C, Dubern B, Clément K. Génétique des obésités monogéniques. *MmM* 2011; 5: 492-6.
- 85: Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-8.
- 86: Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398-401.
- 87: Krude H, Biebermann H, Luck W, Horn R, Brabant G, Grüters A. Severe early-onset obesity, adrenal insufficiency and red hair pigmentation caused by POMC mutations in humans. *Nat Genet* 1998; 19:155-7.

- 88: Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997; 16: 303-6.
- 89: Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN, Zeggini E, Freathy RM, Lindgren CM et al. A common variant in the *FTO* gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316: 889-94.
- 90: Yazdi FT, Clee SM, Meyre D. Obesity genetics in mouse and human: back and forth, and back again. *Peer J* 2015; 3: e856.
- 91: Smemo S, Tena JJ, Kim KH, Gamazon ER, Sakabe NJ, Gomez-Marin C et al. Obesity-associated variants within *FTO* form long-range functional connections with *IRX3*. *Nature* 2014; 507: 371-5.
- 92: Claussnitzer M, Dankel SN, Kim KH, Quon G, Meuleman W, Haugen C et al. *FTO* obesity variant circuitry and adipocyte browning in humans. *N Engl J Med* 2015; 373: 895-907.
- 93: Musunuru K, Pirruccello JP, Do R, Peloso GM, Guiducci C, Sougnez C et al. Exome sequencing, *ANGPTL3* mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2220-7.
- 94: Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Philippe J, Durand E, Arshad M et al. Novel *LEPR* mutations in obese Pakistani children identified by PCR-based enrichment and next generation sequencing. *Obesity* 2014; 22: 1112-7.
- 95: Xing DJ, Zhang HX, Huang N, Wu KC, Huang XF, Huang F et al. Comprehensive molecular diagnosis of Bardet-Biedl syndrome by high-throughput targeted exome sequencing. *PLoS One* 2014; 9: e90599.
- 96: Pearce LR, Atanassova N, Banton MC, Bottomley B, van der Klaauw AA, Revelli JP et al. *KSR2* mutations are associated with obesity, insulin resistance, and impaired cellular fuel oxidation. *Cell* 2013; 155: 765-77.
- 97: Borman AD, Pearce LR, Mackay DS, Nagel-Wolfrum K, Davidson AE, Henderson R et al. A homozygous mutation in the *TUB* gene associated with retinal dystrophy and obesity. *Hum Mutat* 2014; 35: 289-93.

- 98: Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, Andersson J et al. A novel highly-penetrant form of obesity due to microdeletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 2010; 463: 671-5.
- 99: El-Sayed Moustapha JS, Eleftherohorinou H, de Smith AJ, Andersson-Assarsson JC, Alves AC, Hadjigeorgiou E et al. Novel association approach for variable number tandem repeats (VNTRs) identifies *DOCK5* as a susceptibility gene for severe obesity. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3727-38.
- 100: Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F et al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4531-6.
- 101: Fischer-Posovszky P, von Schnurbein J, Moepps B, Lahr G, Strauss G, Barth TF et al. A new missense mutation in the leptin gene causes mild obesity and hypogonadism without affecting T cell responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2836-40.
- 102: Strobil A, Issad T, Camoin L, Ozata M, Strosberg AD. A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nat Genet* 1998; 18: 213-5.
- 103: Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007; 356: 237-47.
- 104: Nizard J, Dommergues M, Clément K. Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation. *N Engl J Med* 2012; 366: 1064-5.
- 105: Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Shabir F, Ayesha H, Philippe J et al. Genetic variants in *LEP*, *LEPR*, and *MC4R* explain 30% of severe obesity in children from a consanguineous population. *Obesity* 2015; 23: 1687-95.
- 106: Wabitsch M, Funcke JB, Lennerz B, Kuhnle-Krahl U, Lahr G, Debatin KM et al. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med* 2015; 372: 48-54.
- 107: Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C et al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110: 1093-103.
- 108: Gibson WT, Farooqi IS, Moreau M, DePaoli AM, Lawrence E, O'Rahilly S et al. Congenital leptin deficiency due to homozygosity for the Delta133G mutation: report of

another case and evaluation of response to four years of leptin therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4821-6.

109: Boughton CK, Murphy KG. Can neuropeptides treat obesity? A review of neuropeptides and their potential role in the treatment of obesity. *Br J Pharmacol* 2013; 170: 1333-48.

110: Le Beyec J, Cugnet-Anceau C, Pépin D, Alili R, Cotillard A, Lacorte JM et al. Homozygous leptin receptor mutation due to uniparental disomy of chromosome 1: response to bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 397-402.

111: Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE et al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4633-40.

112: Clément K, Dubern B, Mencarelli M, Czernichow P, Ito S, Wakamatsu K et al. Unexpected endocrine features and normal pigmentation in a young adult patient carrying a novel homozygous mutation in the POMC gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4955-62.

113: Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ et al. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 2003; 112: 1550-60.

114: Frank GR, Fox J, Candela N, Jovanovic Z, Bochukova E, Levine J et al. Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Mol Genet Metab* 2013; 110: 191-4.

115: Martin MG, Lindberg I, Solorzano-Vargas RS, Wang J, Avitzur Y, Bandsma R et al. Congenital proprotein convertase 1/3 deficiency causes malabsorptive diarrhea and other endocrinopathies in a pediatric cohort. *Gastroenterology* 2013; 145: 138-48.

116: Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 101-8.

117: Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E et al. Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1465-73.

118: Izumi K, Housam R, Kapadia C, Stallings VA, Medne L, Shaikh TH et al. Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving *SIM1* and Prader-Willi syndrome-like features. *Am J Med Genet* 2013; 161A: 3137-43.

- 119: Montagne L, Raimondo A, Delobel B, Duban-Bedu B, Noblet FS, Dechaume A et al. Identification of two novel loss-of-function SIM1 mutations in two overweight children with developmental delay. *Obesity* 2014; 22: 2621-4.
- 120: Ramachandrappa S, Raimondo A, Cali AM, Keogh JM, Henning E, Saeed S et al. Rare variants in single-minded 1 (SIM1) are associated with severe obesity. *J Clin Invest* 2013; 123: 3042-50.
- 121: Bonnefond A, Raimondo A, Stutzmann F, Ghossaini M, Ramachandrappa S, Bersten DC et al. Loss-of-function mutations in SIM1 contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J Clin Invest* 2013; 123: 3037-41.
- 122: D'Angelo CS, Kohl I, Varela MC, de Castro CI, Kim CA, Bertola DR et al. Obesity with associated developmental delay and/or learning disability in patients exhibiting additional features: report of novel pathogenic copy number variants. *Am J Med Genet A* 2013; 161A: 479-86.
- 123: Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S et al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1187-9.
- 124: Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 2003; 6: 736-42.
- 125: Gray J, Yeo G, Hung C, Keogh J, Clayton P, Banerjee K et al. Functional characterization of human NTRK2 mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 359-64.
- 126: Gray J, Yeo GSH, Cox JJ, Morton J, Adlam ALR, Keogh JM et al. Hyperphagia, severe obesity, impaired cognitive function, and hyperactivity associated with functional loss of one copy of the brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) gene. *Diabetes* 2006; 55: 3366-71.
- 127: Liao GY, An JJ, Gharami K, Waterhouse EG, Vanevski F, Jones KR et al. Dendritically targeted *Bdnf* mRNA is essential for energy balance and response to leptin. *Nat Med* 2012; 18: 564-71.

- 128: Miller JL, Lynn CH, Driscoll DC, Goldstone AP, Gold JA, Kimonis V et al. Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2011; 155: 1040-9.
- 129: Lloret-Linares C, Faucher P, Coupaye M, Alili R, Green A, Basdevant A et al. Comparison of body composition, basal metabolic rate and metabolic outcomes of adults with Prader Willi syndrome or lesional hypothalamic disease, with primary obesity. *Int J Obes* 2013; 37: 1198-203.
- 130: Goldstone AP, Beales PL. Genetic obesity syndromes. *Front Horm Res* 2008; 36: 37-60.
- 131: Lacroix D, Moutel S, Coupaye M, Huvenne H, Faucher P, Pelloux V et al. Metabolic and adipose tissue signatures in adults with Prader-Willi syndrome: a model of extreme adiposity. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 850-9.
- 132: Horsthemke B, Buiting K. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113: 292-9.
- 133: Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B et al. Truncating mutations of *MAGEL2* cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet* 2013; 45: 1405-9.
- 134: Zaghloul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 2009; 119: 428-37.
- 135: M'hamdi O, Ouertani I, Chaabouni-Bouhamed H. Update on the genetics of Bardet-Biedl syndrome. *Mol Syndromol* 2014; 5: 51-6.
- 136: Han YM, Kang GM, Byun K, Ko HW, Kim J, Shin MS et al. Leptin-promoted cilia assembly is critical for normal energy balance. *J Clin Invest* 2014; 124: 2193-7.
- 137: Seo S, Guo DF, Bugge K, Morgan DA, Rahmouni K, Sheffield VC. Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1323-31.
- 138: Chennen K, Scerbo MJ, Dollfus H, Poch O, Marion V. Bardet-Biedl syndrome: cilia and obesity - From genes to integrative approaches. *Med Sci (Paris)* 2014; 30: 1034-9.
- 139: Marshall JD, Hinman EG, Collin GB, Beck S, Cerqueira R, Maffei P et al. Spectrum of *ALMS1* variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alström syndrome. *Hum Mutat* 2007; 28: 1114-23.

- 140: Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Elckhoff J, Allen DB. Long-term growth hormone therapy changes the natural history of body composition and motor function in children with prader-willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1131-6.
- 141: Sanchez-Ortiga R, Klibanski A, Tritos NA. Effects of recombinant human growth hormone therapy in adults with Prader-Willi syndrome: a meta-analysis. *Clin Endocrinol* 2012; 77: 86-93.
- 142: Reus L, Pilen S, Pelzer BJ, van Alfen-van der Velden JA, Hokken-Koelega AC, Zwarts M et al. Growth hormone therapy, muscle thickness, and motor development in Prader-Willi syndrome: an RCT. *Pediatrics* 2014; 134: 1619-27.
- 143: Fong AK, Wong SK, Lam CC, Ng EK. Ghrelin level and weight loss after laparoscopic sleeve gastrectomy and gastric mini-bypass for Prader-Willi syndrome in Chinese. *Obes Surg* 2012; 22: 1742-5.
- 144: Alqahtani AR, Elahmedi M, Alqahtani YA. Bariatric surgery in monogenic and syndromic forms of obesity. *Semin Pediatr Surg* 2014; 23: 37-42.
- 145: Scheimann AO, Butler MG, Gourash L, Cuffari C, Klish W. Critical analysis of bariatric procedures in Prader-Willi syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 80-3.
- 146: Daskalakis M, Tili H, Kiess W, Weiner RA. Roux-en-Y gastric bypass in an adolescent patient with Bardet-Biedl syndrome, a monogenic obesity disorder. *Obes Surg* 2010; 20: 121-5.
- 147: Mujahid S, Huda MS, Beales P, Carroll PV, McGowan BM. Adjustable gastric banding and sleeve gastrectomy in Bardet-Biedl syndrome. *Obes Surg* 2014; 24: 1746-8.
- 148: Nobili V, Vajro P, Dezsofi A, Fischler B, Hadzic N, Jahnel J et al. Indications and limitations of bariatric intervention in severely obese children and adolescents with and without nonalcoholic steatohepatitis: ESPGHAN Hepatology Committee Position Statement. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015; 60: 550-61.
- 149: Hercberg S, Preziosi P, Briançon S, Galan P, Triol I, Malvy D et al. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population: the SU.VI.MAX study—design, methods, and participant characteristics. *SUPplementation en Vitamines et Minéraux AntioXydants. Control Clin Trials* 1998; 19: 336-51.

- 150: Tlili A, Hentati NH, Chaabane R, Gargouri A, Fakhfakh F. Pyridoxine-dependent epilepsy in Tunisia is caused by a founder missense mutation of the *ALDH7A1* gene. *Gene* 2013; 518: 242-5.
- 151: Le Dour C, Schneebeli S, Bakiri F, Darcel F, Jacquemont ML, Maubert MA et al. A homozygous mutation of prelamins preventing its farnesylation and maturation leads to a severe lipodystrophic phenotype: new insights into the pathogenicity of nonfarnesylated prelamins. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 856-62.
- 152: Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P et al. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1761-9.
- 153: Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S et al. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* 2006; 55: 2549-53.
- 154: Chung WK, Belfi K, Chua M, Wiley J, Mackintosh R, Nicolson M et al. Heterozygosity for *Lep(ob)* or *Lep(rdb)* affects body composition and leptin homeostasis in adult mice. *Am J Physiol* 1998; 274: 985-90.
- 155: Chen WJ, Lin Y, Xiong ZQ, Wei W, Ni W, Tan GH et al. Exome sequencing identifies truncating mutations in *PRRT2* that cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia. *Nat Genet* 2011; 43: 1252-6.
- 156: Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Muller J, Saeed S, Arslan M et al. Highly sensitive diagnosis of 43 monogenic forms of diabetes or obesity, through one step PCR-based enrichment in combination with next-generation sequencing. *Diabetes Care* 2014; 37: 460-7.
- 157: Gill R, Cheung YH, Shen Y, Lanzano P, Mirza NM, Ten S et al. Whole-exome sequencing identifies novel *LEPR* mutations in individuals with severe early onset obesity. *Obesity* 2014; 22: 576-84.
- 158: Alsters SI, Goldstone AP, Buxton JL, Zekavati A, Sosinsky A, Yiorkas AM et al. Truncating homozygous mutation of carboxypeptidase E (*CPE*) in a morbidly obese female with type 2 diabetes mellitus, intellectual disability and hypogonadotropic hypogonadism. *PLoS One* 2015; 10: e0131417.

- 159: Thaker VV, Esteves KM, Towne MC, Brownstein CA, James PM, Crowley L et al. Whole exome sequencing identifies RAI1 mutation in a morbidly obese child diagnosed with ROHHAD syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1723-30.
- 160: Simon C, Schweitzer B, Oujaa M, Wagner A, Arveiler D, Tribby E et al. Successful overweight prevention in adolescents by increasing physical activity: a 4-year randomized controlled intervention. *Int J Obes* 2008; 32: 1489-98.
- 161: Ciangura C, Bouillot JL, Lloret-Linares C, Poitou C, Veyrie N, Basdevant A et al. Dynamics of change in total and regional body composition after gastric bypass in obese patients. *Obesity* 2010; 18: 760-5.
- 162: Li H, Durbin R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2010; 26: 589-95.
- 163: McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kemytsky A et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010; 20: 1297-303.
- 164: Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009; 25: 2078-9.
- 165: Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e164.
- 166: Meyer KJ, Axelsen MS, Sheffield VC, Patil SR, Wassink TH. Germline mosaic transmission of a novel duplication of *PDXN* and *MYT1L* to two male half-siblings with autism. *Psychiatr Genet* 2012; 22: 137-40.
- 167: Lee Y, Mattai A, Long R, Rapoport JL, Gogtay N, Addington AM. Microduplications disrupting the *MYT1L* gene (2p25.3) are associated with schizophrenia. *Psychiatr Genet* 2012; 22: 206-9.
- 168: Barber JC, Hall V, Maloney VK, Huang S, Roberts AM, Brady AF et al. 16p11.2-p12.2 duplication syndrome; a genomic condition differentiated from euchromatic variation of 16p11.2. *Eur J Hum Genet* 2013; 21: 182-9.
- 169: Chilian B, Abdollahpour H, Bierhals T, Haltrich I, Fekete G, Nagel I et al. Dysfunction of *SHANK2* and *CHRNA7* in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clin Genet* 2013; 84: 560-5.

- 170: McNay DE, Pelling M, Claxton S, Guillemot F, Ang SL. Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 1623-32.
- 171: Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/satiety. *Ann Nutr Metab* 2014; 64: 36-44.
- 172: Fine D, Flusser H, Markus B, Shorer Z, Gradstein L, Khateeb S et al. A syndrome of congenital microcephaly, intellectual disability and dysmorphism with a homozygous mutation in FRMD4A. *Eur J Hum Genet* 2014. doi: 10.1038/ejhg.2014.241.
- 173: Blank T, Nijholt I, Kye MJ, Radulovic J, Spiess J. Small-conductance, Ca(2+)-activated K⁺ channel SK3 generates age-related memory and LTP deficits. *Nature Neurosci* 2003; 6: 911-2.
- 174: Grube S, Gerchen MF, Adamcio B, Pardo LA, Martin S, Malzahn D et al. A CAG repeat polymorphism of KCNN3 predicts SK3 channel function and cognitive performance in schizophrenia. *EMBO Mol Med* 2011; 3: 309-19.
- 175: Heinonen P, Koulu M, Pesonen U, Karvonen MK, Rissanen A, Laakso M et al. Identification of a three-amino acid deletion in the alpha2B-adrenergic receptor that is associated with reduced basal metabolic rate in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 2429-33.
- 176: Shi YJ, Matson C, Lan F, Iwase S, Baba T, Shi Y. Regulation of LSD1 histone demethylase activity by its associated factors. *Mol Cell* 2005; 19: 857-64.
- 177: Kim HG, Kim HT, Leach NT, Lan F, Ullmann R, Silahtaroglu A et al. Translocations disrupting PHF21A in the Potocki-Shaffer-syndrome region are associated with intellectual disability and craniofacial anomalies. *Am J Hum Genet* 2012; 91: 56-72.
- 178: Montgomery ND, Turcott CM, Tepperberg JH, McDonald MT, Aylsworth AS. A 137-kb deletion within the Potocki-Shaffer syndrome interval on chromosome 11p11.2 associated with developmental delay and hypotonia. *Am J Med Genet A* 2013; 161A: 198-202.
- 179: Santen GW, Aten E, Vulto-van Silfhout AT, Pottinger C, van Bon BW, van Minderhout IJ et al. Coffin-Siris syndrome and the BAF complex: genotype-phenotype study in 63 patients. *Hum Mutat* 2013; 34: 1519-28.

- 180: Coutton C, Bidart M, Rendu J, Devillard F, Vieville G, Amblard F et al. 190-kb duplication in 1p36.11 including PIGV and ARID1A genes in a girl with intellectual disability and hexadactyly. *Clin Genet* 2013; 84: 596-9.
- 181: Vals MA, Oiglane-Shlik E, Noukas M, Shor R, Peet A, Kals M et al. Coffin-Siris Syndrome with obesity, macrocephaly, hepatomegaly and hyperinsulinism caused by a mutation in the ARID1B gene. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 1327-9.
- 182: Zhou Y, Tanzie C, Yan Z, Chen S, Duncan M, Gaudenz K et al. Notch2 regulates BMP signaling and epithelial morphogenesis in the ciliary body of mouse eye. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110: 8966-71.
- 183: Lee GH, An SY, Sohn YB, Jeong SY, Chung YS. An unusual presentation of diabetic ketoacidosis in familial hajdu-cheney syndrome: a case report. *J Korean Med Sci* 2013; 28: 1682-6.
- 184: Proverbio MC, Mangano E, Gessi A, Bordoni R, Spinelli R, Asselta R et al. Whole genome SNP genotyping and exome sequencing reveal novel genetic variants and putative causative genes in congenital hyperinsulinism. *PLoS One* 2013; 8: e68740.
- 185: Johansson S, Irgens H, Chudasama KK, Molnes J, Aerts J, Roque FS et al. Exome sequencing and genetic testing for MODY. *PLoS One* 2012; 7: e38050.
- 186: Bochukova EG, Huang N, Keogh J, Henning E, Purmann C, Blaszczyk K et al. Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature* 2010; 463: 666-70.
- 187: Kievit P, Halem H, Marks DL, Dong JZ, Glavas MM, Sinnayah P et al. Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. *Diabetes* 2013; 62: 490-7.
- 188: Chen KY, Muniyappa R, Abel BS, Mullins KP, Staker P, Brychta RJ et al. RM-493, a melanocortin-4 receptor (MC4R) agonist, increases resting energy expenditure in obese individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: 1639-45.
- 189: Torres N, Chabardes S, Piallat B, Devergnas A, Benabid AL. Body fat and body weight reduction following hypothalamic deep brain stimulation in monkeys: an intraventricular approach. *Int J Obes* 2012; 36: 1537-44.

- 190: Ho AL, Sussman ES, Pendharkar AV, Azagury DE, Bohon C, Halpern CH. Deepbrain stimulation for obesity: rationale and approach to trial design. *Neurosurg Focus* 2015; 38: E8.
- 191: Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1811-8.
- 192: Creemers JW, Lee YS, Oliver RL, Bahceci M, Tuzcu A, Gokalp D et al. Mutations in the amino-terminal region of proopiomelanocortin (POMC) in patients with early-onset obesity impair POMC sorting to the regulated secretory pathway. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4494-9.
- 193: Dubern B, Bisbis S, Talbaoul H, Le Beyec J, Tounian P, Lacorte JM et al. Homozygous null mutation of the melanocortin-4 receptor and severe early-onset obesity. *J Pediatr* 2007; 150: 613-7.
- 194: Aslan IR, Campos GM, Calton MA, Evans DS, Merriman RB, Vaisse C. Weight loss after Roux-en-Y gastric bypass in obese patients heterozygous for MC4R mutations. *Obes Surg* 2011; 21: 930-4.
- 195: Valette M, Poitou C, Le Beyec J, Bouillot JL, Clement K, Czernichow S. Melanocortin-4 receptor mutations and polymorphisms do not affect weight loss after bariatric surgery. *PLoS One* 2012; 7: e48221.
- 196: Aslan IR, Ranadive SA, Ersoy BA, Rogers SJ, Lustig RH, Vaisse C. Bariatric surgery in a patient with complete MC4R deficiency. *Int J Obes* 2011; 35: 457-61.
- 197: Mariman EC, Szklarczyk R, Bouwman FG, Aller EE, van Baak MA, Wang P. Olfactory receptor genes cooperate with protocadherin genes in human extreme obesity. *Genes Nutr* 2015; 10: 465.
- 198: Bee YM, Chawla M, Zhao Y. Whole exome sequencing identifies a novel and a recurrent mutation in BBS2 gene in a family with Bardet-Biedl syndrome. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 524754.
- 199: Langouët M, Siquier-Pernet K, Sanguer S, Bole-Feysot C, Nitschke P, Boddaert N et al. Contiguous mutation syndrome in the era of high-throughput sequencing. *Mol Genet Genomic Med* 2015; 3: 215-20.

- 200: Jiao H, Arner P, Gerdhem P, Strawbridge RJ, Näslund E, Thorell A et al. Exome sequencing followed by genotyping suggests SYPL2 as a susceptibility gene for morbid obesity. *Eur J Hum Genet* 2015; 23: 1216-22.
- 201: Paz-Filho G, Boguszewski MC, Mastronardi CA, Patel HR, Johar AS, Chuah A et al. Whole exome sequencing of extreme morbid obesity patients: translational implications for obesity and related disorders. *Genes* 2014; 5: 709-25.
- 202: Katagiri S, Yoshitake Y, Akahori M, Hayashi T, Furuno M, Nishino J et al. Whole-exome sequencing identifies a novel ALMS1 mutation (p.Q2051X) in two Japanese brothers with Alström syndrome. *Mol Vis* 2013; 19: 2393-406.
- 203: Scheidecker S, Etard C, Pierce NW, Geoffroy V, Schaefer E, Muller J et al. Exome sequencing of Bardet-Biedl syndrome patient identifies a null mutation in the BBSome subunit BBIP1 (BBS18). *J Med Genet* 2014; 51: 132-6.
- 204: Ajmal M, Khan MI, Neveling K, Tayyab A, Jaffar S, Sadeque A et al. Exome sequencing identifies a novel and a recurrent BBS1 mutation in Pakistani families with Bardet-Biedl syndrome. *Mol Vis* 2013; 19: 644-53.
- 205: Marion V, Stutzmann F, Gérard M, De Melo C, Schaefer E, Claussmann A et al. Exome sequencing identifies mutations in LZTFL1, a BBSome and smoothened trafficking regulator, in a family with Bardet-Biedl syndrome with situs inversus and insertional polydactyly. *J Med Genet* 2012; 49: 317-21.
- 206: Zhao J, Bradfield JP, Li M, Wang K, Zhang H, Kim CE et al. The role of obesity-associated loci identified in genome wide association studies in the determination of pediatric BMI. *Obesity* 2009; 17: 2254-7.
- 207: Drong AW, Lindgren CM, McCarthy MI. The genetic and epigenetic basis of type 2 diabetes and obesity. *Clin Pharmacol Ther* 2012; 92: 707-15.
- 208: Burgio E, Lopomo A, Migliore L. Obesity and diabetes: from genetics to epigenetics. *Mol Biol Rep* 2015; 42: 799-818.

ANNEXES

Revue 1: Obésités génétiques rares: Diagnostics clinique et biologique en 2015.

H Huvenne, B Dubern, K Clément, C Poitou. Diabète & Obésité 2015 (10); 86: 42-9.

Obésités génétiques rares

Diagnostique clinique et biologique en 2015

Dr Hélène Huvenne^{1,2,3}, Dr Béatrice Dubern^{1,2,4}, Pr Karine Clément^{1,3}, Dr Christine Poitou^{1,2,5}

INTRODUCTION

L'obésité, définie par un excès de masse grasse, est une maladie complexe causée par l'interaction de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. L'expression phénotypique des facteurs génétiques impliqués dans l'obésité est variable, permettant de distinguer différentes situations cliniques d'obésité en fonction des gènes impliqués (obésité monogénique ou syndromes génétiques rares, obésités oligogéniques et polygéniques). Les différents types d'obésité, en particulier les obésités monogéniques ou syndromiques, sont importants à diagnostiquer car il existe une prise en charge spécifique, relevant d'équipes spécialisées et multidisciplinaires, à mettre en place le plus rapidement possible (dès la petite enfance).

QUEL EST LE CONTEXTE ?

L'obésité est une maladie complexe, multifactorielle résultant de l'interaction de nombreux facteurs génétiques et non génétiques environnementaux. Les aspects comportementaux sont essentiels (apports énergétiques et activité physique). L'expression phénotypique des facteurs génétiques impliqués dans l'obésité permet de distinguer différentes situations cliniques.

1. Institut de Cardiométabolisme et Nutrition, ICAN, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris
2. INSERM, UMR S U1166, Nutrimomique, Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris
3. Service de Pédiatrie, Hôpital Saint-Vincent de Paul, Lille
4. Service de Nutrition et Gastroentérologie pédiatriques, Hôpitaux Universitaires de l'Est Parisien, Hôpital Trousseau, Paris
5. Centre de Référence Prader Willi Adulte, Pôle Cœur et Métabolisme, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris

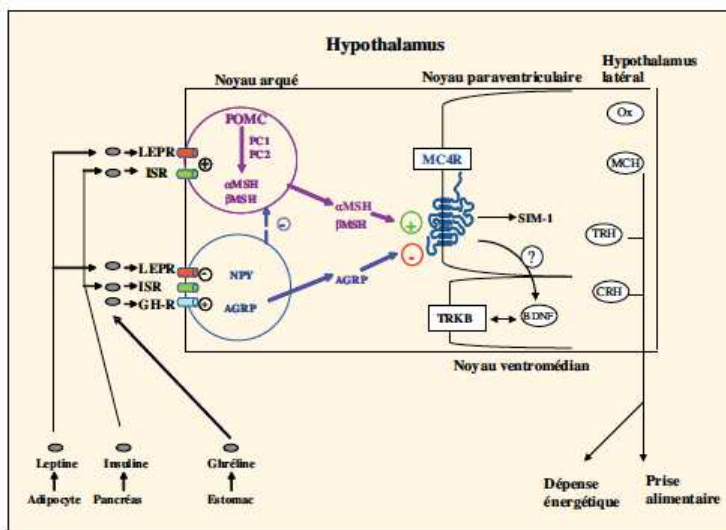


Figure 1 – La voie leptine/mélanocortines.

Les signaux d'adiposité (leptine et insuline) et la ghréline se lient sur leurs récepteurs spécifiques au niveau des neurones POMC/CART et des neurones NPY/AGRP du noyau arqué. La variation du rapport α MSH/AGRP au niveau de l'hypothalamus module l'activité de MC4R. Ce dernier régule l'activité de plusieurs populations neuronales en aval qui agissent sur les systèmes effecteurs modulant la balance énergétique. Plusieurs mutations des gènes impliqués dans cette voie leptine/mélanocortines sont responsables d'obésité sévère et précoce. AGRP : agouti related peptide ; BDNF : brain-derived neurotrophic factor ; CRH : corticotrophin-releasing hormone ; GH-R : récepteur de la ghréline ; ISR : récepteur de l'insuline ; LEPR : récepteur de la leptine ; MCH : melanin concentrating hormone ; MC4R : récepteur de type 4 aux mélanocortines ; α -, β -MSH : α -, β -melanocyte stimulating hormone ; NPY : neuropeptide Y ; Ox : orexines ; PC1 et 2 : proconvertases 1 et 2 ; POMC : proopiomélanocortine ; SIM-1 : single-minded 1 ; TRKB : tyrosine kinase receptor ; TRH : thyrotropin-releasing hormone.

- **Obésité monogénique** définie par une obésité rare (< 5 % des obésités), sévère, à début précoce associée à des anomalies endocriniennes. L'impact de la génétique y est majeur et très peu dépendant des facteurs environnementaux. Elle est le plus souvent causée par des mutations des gènes de la voie leptine-mélanocortines impliquée dans la régulation de la prise alimentaire (gènes de la leptine [LEP] et de son récepteur [LEPR] par exemple) (Fig. 1).

- **Obésité syndromique** qui associe une obésité sévère à début précoce à une atteinte multior-ganes (déficience intellectuelle, troubles neuropsychologiques, éléments dysmorphiques, anomalies développementales, atteintes neurosensorielles et/ou endocriniennes).

- **Obésité oligogénique**, comme celle due aux mutations du gène MC4R (melanocortin 4 receptor), caractérisée par une expression

phénotypique variable dépendante en partie des facteurs environnementaux avec peu de spécificités dans les phénotypes.

Ces formes rares d'obésité se distinguent de l'obésité à hérédité polygénique, dite obésité commune, situation clinique la plus fréquente (95 % des cas). Dans ce cas, il existe un effet cumulatif de facteurs de prédisposition génétique et de facteurs environnementaux. Ainsi, chaque gène de susceptibilité pris individuellement n'a que de faibles effets sur le poids et la contribution cumulative de ces gènes ne devient significative qu'en interaction avec des facteurs environnementaux prédisposant à leur expression phénotypique (suralimentation, sédentarité, stress) (1). Ce type d'obésité ne sera pas développé dans cette revue.

QUOI DE NOUVEAU EN 2015 ?

Différentes stratégies d'approche moléculaire ont été utilisées afin de déterminer les facteurs génétiques impliqués dans l'obésité (Fig. 2). L'approche "gène candidat" a été l'une des premières et a permis, en association avec l'analyse clinique fine de sujets souffrant d'obésité extrême à début précoce, de décrire des obésités monogéniques rares par altération de la voie leptine-mélanocortines (Fig. 1) (2-5). À partir de 2005, l'étude du génome entier à haut débit (GWAS, *genome wide scan association study*) a permis l'identification "au hasard" de nombreux loci contribuant à l'obésité commune grâce aux larges populations étudiées, et en particulier celle du gène *FTO* (*fat mass and obesity*) chez l'enfant et l'adulte obèses (6).

Plus récemment, de nouveaux outils de biologie moléculaire, de plus en plus rapides, précis et

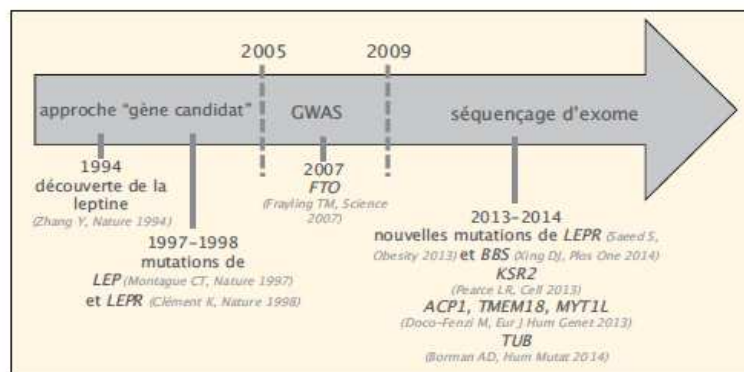


Figure 2 – Évolution des différentes stratégies d'approche moléculaire utilisées dans l'obésité et principales anomalies génétiques mises en évidence.

ACP1 : acid phosphatase 1, soluble ; BBS : Bardet-Biedl syndrome ; FTO : fat mass and obesity ; GWAS : genome wide scan association study ; KSR2 : kinase suppressor of Ras 2 ; LEP : leptine ; LEPR : récepteur de la leptine ; MYT1L : myelin transcription factor 1-like ; TMEM18 : transmembrane protein 18 ; TUB : tubby bipartite transcription factor.

efficaces, ont été développés. Le séquençage à haut débit ciblé à l'exome a montré sa puissance pour identifier des mutations responsables de maladies rares chez un petit nombre de sujets atteints (8 à 10 selon les études) (7). Il a notamment permis de mettre en évidence 5 nouvelles mutations des gènes *BBS* (8). Il a aussi été utile pour identifier de nouveaux variants et mutations dans les gènes *KSR2* (*kinase suppressor of Ras 2*) (9) et *TUB* (*tubby bipartite transcription factor*) (10) ou une délétion paternelle des gènes *ACP1* (*acid phosphatase 1, soluble*), *TMEM18* (*transmembrane protein 18*) et *MYT1L* (*myelin transcription factor 1-like*) (11) chez des sujets présentant une obésité syndromique (Tab. 1).

Enfin, la contribution des CNV (*copy number variants*) dans la susceptibilité aux pathologies complexes, telles que l'obésité sévère, a été le sujet de nombreux débats ces dernières années. Les VNTR (*variable number tandem repeats*) constituent une classe relativement sous-explorée des variants génomiques intervenant dans les pathologies complexes. Des études ont montré que de rares CNV pouvaient être responsables de formes

sévères d'obésité, notamment chez 31 sujets porteurs de délétions hétérozygotes d'au moins 593 kb (kilobases) du locus 16p11.2. Ces sujets présentaient des malformations congénitales et/ou un retard de développement, en association à l'obésité. Ce phénotype pourrait résulter de l'insuffisance haploïde de multiples gènes ayant un impact sur le développement central de l'obésité (12). L'étude de la région chromosomique 8p21.2 comprenant le gène *DOCK5* (*dedicator of cytokinesis 5*) a également mis en évidence une association significative des VNTR de *DOCK5* avec l'obésité sévère de l'enfant et de l'adulte (13). Des investigations complémentaires sur le rôle des VNTR et des CNV dans l'obésité devront être réalisées pour étudier leur éventuelle contribution dans cette pathologie et leur lien potentiel avec le système leptine-mélanocortines.

QUAND Y PENSER ?

Devant toute obésité chez l'enfant ou chez l'adulte présentant une obésité massive ayant débuté précocement (début de l'obésité avant l'âge de 6 ans) et/ou associée à une déficience intellectuelle, des troubles neuropsychologiques, un

Tableau 1 – Signes cliniques et anomalies génétiques impliqués dans les principaux syndromes génétiques rares avec obésité.

	Signes associés à l'obésité	Génétique
Prader-Willi	Hypotonie néonatale, retard mental, hyperphagie, dysmorphie faciale, retard statural, hypogonadisme	Région 15q11-q13 d'origine paternelle (micro-délétion, disomie maternelle, défaut d'empreinte ou translocation réciproque)
Bardet-Biedl	Retard mental, dystrophie rétinienne, polydactylie, hypogonadisme, atteinte rénale	BBS1 (11q13); BBS2 (16q12.2); BBS3 (ARL6, 3q11); BBS4 (15q24.1); BBS5 (2q31.1); BBS6 (MKKS, 20p12); BBS7 (4q27); BBS8 (TTC8, 14q31); BBS9 (PTHB1, 7p14); BBS10 (C12ORF58, 12q21.2); BBS11 (TRIM32, 9q33.1); BBS12 (FLJ35630, 4q27); BBS13 (MKS1, 17q23); BBS14 (CEP290, 12q21.3); BBS15 (WPCP, 2p15); BBS16 (SDCCAG8, 1q43); BBS17 (LZTFL1, 3p21); BBS18 (BBIP1, 10q25); BBS19 (IFT27, 22q12)
Cohen	Dystrophie rétinienne, dysmorphie, microcéphalie, retard mental, neutropénie	Autosomique récessif gène <i>COH1</i> (chr 8q22-q23)
Alström	Dystrophie rétinienne, surdité de perception, cardiomyopathie dilatée, atteintes rénale, pulmonaire et hépatique	Autosomique récessif gène <i>ALMS1</i> (chr 2p13-p14)
X fragile	Déficit intellectuel modéré à sévère, hyperactivité, dysmorphie faciale, macro-orchidie post-pubertaire	Dominant lié à l'X gène <i>FMR1</i> (Xq27.3)
Borjeson-Forssman-Lehmann	Retard mental sévère, hypotonie, microcéphalie, dysmorphie faciale, hypogonadisme, épilepsie	Récessif lié à l'X gène <i>PHF6</i> (Xq26-q27)
Ostéodystrophie d'Albright (pseudo-hypoparathyroïdie de type 1a)	Dysmorphie faciale, brachymétopie et brachymétopie, retard psychomoteur variable, tableau de résistance hormonale (hypocalcémie, hypothyroïdie, retard pubertaire)	Autosomique dominant, mutations inactivatrices de la sous-unité α -activatrice associée à la protéine G
Variants de <i>KSR2</i>	Obésité sévère, hyperphagie dans l'enfance, diminution de la fréquence cardiaque, insulino-résistance sévère	Rares variants du gène <i>KSR2</i> (12q24.22-q24.23)
Mutation de <i>TUB</i>	Obésité, cécité nocturne, dystrophie rétinienne	Mutation homozygote du gène <i>TUB</i> (11p15.4)
Délétion des gènes <i>ACP1</i>, <i>TMEM18</i>, <i>MYT1L</i>	Obésité sévère à début précoce, hyperphagie, déficit intellectuel, troubles du comportement sévères	Délétion paternelle des gènes <i>ACP1</i> , <i>TMEM18</i> , <i>MYT1L</i> (2p25)

syndrome dysmorphique ou polymalformatif, des anomalies neuropsychosensorielles (anomalies ophtalmologiques ou surdité) et/ou des anomalies hypothalamo-hypophysaires, la recherche d'une origine génétique doit être systématique.

Les deux éléments majeurs de l'anamnèse sont la courbe de croissance staturo-pondérale et la courbe d'indice de masse corporelle (IMC). Elles sont en effet caracté-

ristiques avec un début de l'obésité (IMC supérieur au 97^e percentile) très précoce et une évolution rapide de la corpulence (Fig. 3) parfois associée à un retard statural.

L'interrogatoire doit être approfondi à la recherche d'une consanguinité, d'antécédents familiaux similaires, d'une hypotonie ou de troubles de la succion avec difficultés de la prise alimentaire en période néonatale, de troubles du

comportement (impulsivité, agressivité en milieu scolaire, intolérance à la frustration), de troubles du comportement alimentaire (hyperphagie, impulsivité alimentaire, vols ou chapardage alimentaires) ou de troubles cognitifs (retard du développement psychomoteur, difficultés d'apprentissage, déficit intellectuel, troubles du langage). L'histoire de la puberté doit également être renseignée à la recherche d'un retard ou d'une avance pubertaire.

L'examen clinique doit être complet, à la recherche d'éléments dysmorphiques (forme du visage, orientation des fentes palpébrales, nez, philtrum, oreilles), d'anomalies des extrémités, de la peau ou des phanères et d'anomalies endocriniennes (hypogonadisme, signes d'insuffisance hypothalamo-hypophysaire). Des anomalies neurologiques, ophtalmologiques (strabisme, myopie, rétinite pigmentaire) et des troubles de l'audition ou une surdité devront également être recherchés.

QUELS PHÉNOTYPES CLINIQUES ?

Les formes syndromiques les plus fréquentes sont le syndrome de Prader Willi (SPW) et le syndrome de Bardet-Biedl (BBS).

- Le SPW, dont la fréquence se situe entre 1/15 000 à 1/25 000 naissances, est caractérisé par une hypotonie néonatale sévère, des troubles alimentaires évoluant en plusieurs phases (de l'anorexie avec troubles de succion dans les premiers mois de vie jusqu'à une hyperphagie avec impulsivité alimentaire majeure apparaissant vers 4-8 ans) (14), des anomalies de la composition corporelle avec une distribution des graisses à prédominance sous-cutanée (15), des anomalies endocriniennes (déficit en hormone de croissance, hypogonadisme), une déficience intellectuelle variable, des difficultés d'apprentissage ou des troubles du comportement et des traits dysmorphiques (16). Ce syndrome est lié à une anomalie de l'empreinte génomique parentale avec absence physique ou fonctionnelle du segment chromosomique 15q11-q13 d'origine paternelle. Au moins 5 gènes, localisés dans cette région chromosomique et exprimés dans l'hypothalamus, ont été identifiés et codent pour différentes protéines dont les fonctions ne

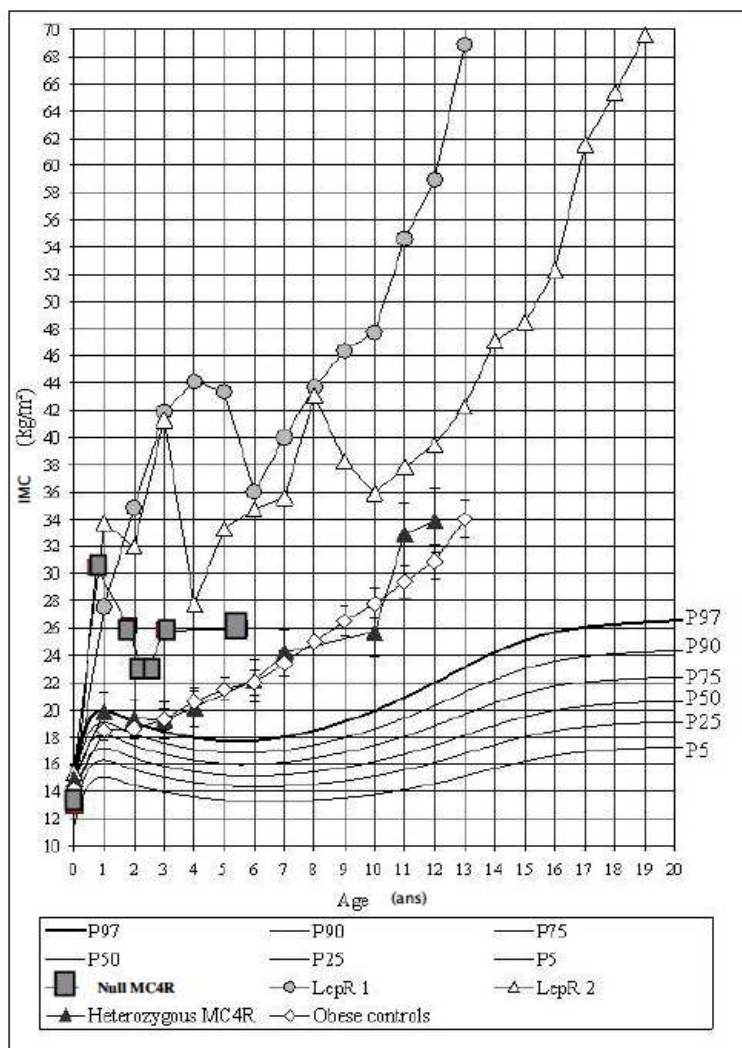


Figure 3 – Courbes d'IMC de 2 sujets porteurs de mutations homozygotes du gène *LEPR* (LepR1 et LepR2), d'un sujet porteur d'une mutation homozygote de *MC4R* (null *MC4R*), de 6 sujets porteurs de mutations hétérozygotes de *MC4R* (heterozygous *MC4R*) et de 40 sujets obèses non mutés (obese controls) (23).

Les courbes de référence sont les courbes françaises standard de percentiles de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.

sont pas complètement décrites : *MRKN3* (*makorin 3*), *MAGEL2* (*MAGE-like 2*), *NDN* (*necdin*), *NPAP1* (*nuclear pore associated protein 1*), *SNURF-SNRPN* (*SNRPN upstream reading frame – small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) (17, 18). Il est probable que plusieurs gènes soient affectés et expliquent le phénotype multiple des sujets atteints de SPW. Les gènes affectés codent par exemple pour des petites protéines des ribosomes, des pro-

téines en doigt de zinc, impliquées dans la transcription des gènes (*ZNF127AS*, *PAR5*, *PARSN*, *IPW* et *PAR1*), et la necdine, protéine impliquée dans la croissance axonale. Mais les mécanismes génétiques précis amenant à l'apparition d'une obésité dans le SPW sont encore actuellement à définir.

- Le phénotype du BBS est très hétérogène. Outre l'obésité sévère à début précoce, peuvent s'y associer une dystrophie rétinienne,

Tableau 2 – Phénotype associé des formes rares d'obésité monogénique.

Gène	Type de mutation	Obésité	Phénotype associé
Leptine (<i>LEP</i>)	Homozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisances gonadotrope et thyroïdienne
Récepteur de la leptine (<i>LEPR</i>)	Homozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisances gonadotrope, thyroïdienne et somatotrope
Proopiomélanocortine (<i>POMC</i>)	Homozygote ou hétérozygote composite	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisance surrénalienne Hypothyroïdie modérée +/- Cheveux roux
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (<i>PCSK1</i>)	Homozygote ou hétérozygote composite	Sévère, apparaissant dans l'enfance	Insuffisance surrénalienne, gonadotrope, somatotrope et thyroïdienne Malaises hypoglycémiques postprandiaux Diabète insipide central, diarrhée néonatale
Single-minded 1 (<i>SIM1</i>)	Délétions	Sévère, apparaissant dans l'enfance	Troubles neuro-comportementaux inconstants (labilité émotionnelle ou syndrome autistique)
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (<i>NTRK2</i>)	Mutation de novo hétérozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Retard de développement Troubles du comportement

une polydactylie, des anomalies rénales, un hypogonadisme, une dysmorphie et des difficultés d'apprentissage. Au moins 19 gènes différents sont impliqués dans le BBS, tous liés au fonctionnement des cils primaires (19). Le concept de ciliopathie a donc été introduit (20). Les cellules ciliées sont impliquées dans le développement des mammifères, contribuant notamment à la symétrie droite/gauche, et permettent de transmettre des messages de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. Les mécanismes précis menant à l'obésité dans le BBS sont encore mal compris. Plusieurs hypothèses ont été émises. Premièrement, l'hypothèse d'une origine centrale à l'obésité par dysfonctionnement hypothalamique, associée à une hyperphagie, a été développée. D'autres hypothèses d'origine périphérique impliquant le tissu adipeux et la prolifération adipocytaire ou d'autres tissus endocriniens (pancréas, estomac, intestin) ont aussi été proposées (21).

D'autres obésités rares syndromiques sont données comme exemples dans le tableau 1.

Des mutations des gènes de la leptine (*LEP*), de son récepteur (*LEPR*), de la proopiomélanocortine (*POMC*) et de la proconvertase 1 (*PC1/PCSK1* [*proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*]), enzyme de clivage de *POMC* entraînent des situations d'obésités sévères parfois associées à des anomalies endocrines (Tab. 2) (2-5). Les courbes de poids et d'IMC des patients affectés sont caractéristiques et doivent attirer l'attention. Elles montrent une évolution pondérale rapide avec une obésité sévère qui se développe dès les premiers mois de vie (Fig. 3). Associée à l'obésité sévère, les patients porteurs d'une mutation des gènes *LEP* ou *LEPR* présentent un retard pubertaire par hypogonadisme hypogonadotrope et inconstamment une insuffisance thyroïdienne d'origine centrale. Une insuffisance de sécrétion somatotrope, entraînant un retard de croissance, peut être également observée chez certains patients porteurs d'une mutation de *LEPR* (3, 22). Un développement pubertaire spontané a cependant été observé chez certains sujets ayant une mutation de *LEPR*, suggérant une restauration des fonctions hormonales avec le temps. En

effet, le suivi de sœurs présentant un déficit en *LEPR* a mis en évidence la normalisation d'un déficit thyroïdien modéré à l'âge adulte et une grossesse spontanée normale (23). Les mutations de *LEPR* chez les sujets présentant une obésité sévère ne sont pas si rares avec une prévalence estimée de 2-3 % (22, 24, 25) et sont donc à rechercher en cas d'obésité extrême à début précoce associée à des anomalies endocriniennes. Récemment, un phénotype clinique classique de déficience en leptine, associant une obésité extrême à début précoce et une hyperphagie, a été décrit chez un jeune garçon avec une leptinémie élevée. Ce phénotype est causé par une nouvelle mutation homozygote du gène *LEP* entraînant une leptine mutée biologiquement inactive (pas de fixation ni d'activation de *LEPR*) mais présente à de fortes concentrations dans la circulation (26). Au vu de cette présentation, en cas de présentation phénotypique évocatrice d'un déficit en leptine, une leptinémie corrélée à la masse grasse n'élimine pas le diagnostic de mutations du gène *LEP*.

Les obésités liées aux mutations du gène *MC4R* se situent entre

les formes exceptionnelles d'obésité monogénique et les formes polygéniques d'obésité commune et représentent 2 à 3 % des obésités de l'enfant et de l'adulte avec plus de 166 mutations différentes décrites dans diverses populations (Européens, Américains, Asiatiques) (27). Elle se caractérise par une transmission le plus souvent autosomique dominante, une pénétrance incomplète et l'absence d'anomalies phénotypiques associées. La sévérité du phénotype (obésité modérée à sévère) est variable, soulignant le rôle de l'environnement et d'autres facteurs génétiques ayant un effet modulateur (28). Les sujets porteurs de mutations de *MC4R* sont généralement hétérozygotes (29) mais parfois les mutations sont identifiées chez de rares sujets homozygotes ou hétérozygotes composites et le phénotype est alors plus sévère (30, 31). En plus de l'obésité, les enfants porteurs de mutations de *MC4R* ont une hyperphagie marquée qui diminue avec l'âge. Cependant, l'association entre des troubles du comportement alimentaire de type *binge eating* et les mutations de *MC4R* (32) n'a pas été confirmée (28, 29). Le diagnostic peut être réalisé par le séquençage du gène dans différents centres français et en Europe (liste des centres faisant le diagnostic http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Clinical-Labs_Search_Simple.php?lng=FR&LnkId=10886&Typ=Pat&fdp=y&from=rightMenu).

QUELLES EXPLORATIONS COMPLÉMENTAIRES ?

Devant une suspicion d'obésité génétique rare, il est recommandé de réaliser un bilan métabolique (recherche d'une insulino-résistance), endocrinien (axes hypophysaires, leptinémie) et morphologique (radiographies des mains,

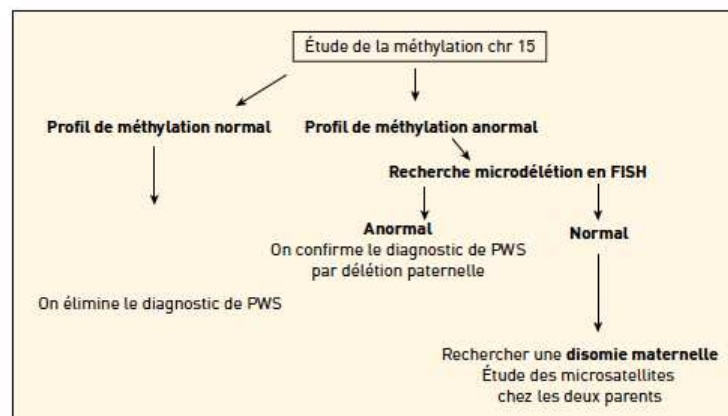


Figure 4 – Explorations génétiques à réaliser en cas de suspicion clinique de syndrome de Prader-Willi (PWS).

des pieds et des avant-bras à la recherche d'anomalies osseuses, IRM cérébrale en cas de déficience intellectuelle et/ou d'anomalies hypothalamo-hypophysaires ou électrorétinogramme en cas de suspicion de dystrophie rétinienne). Le bilan morphologique sera complété par une échographie cardiaque et une échographie abdominale, ainsi qu'une absorptiométrie biphotonique pour déterminer la composition corporelle et une calorimétrie indirecte à la recherche d'une diminution de la dépense énergétique de repos.

Le diagnostic génétique doit ensuite être discuté et éventuellement confié à des spécialistes (généralistes cliniciens ou membres des centres de référence maladies rares [CRM]).

En cas d'obésité associée à une déficience intellectuelle et/ou à des troubles du comportement, le bilan génétique devra comprendre un caryotype haute résolution, une étude de la méthylation du chromosome 15, une recherche d'*X* fragile et une étude par puce *CGH* (*comparative genomic hybridization*) array. La recherche d'autres anomalies monogéniques (*SIM1*, *MAGEL2*, *NTRK2*) doit être discutée en fonction du phénotype. En cas de suspicion clinique de SPW, la démarche stratégique diagnos-

tique est indiquée dans la figure 4 et un avis peut être demandé auprès du Centre de Référence (<http://www.chu-toulouse.fr/-centre-de-referance-du-syndrome-de,892->).

Devant une obésité associée à une dystrophie rétinienne, il faudra rechercher une ciliopathie, principalement un BBS et prendre contact avec les centres de référence (ORPHANET <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php?lng=FR>).

Si l'obésité est associée à des anomalies endocriniennes (retard pubertaire, retard statural), une étude des gènes de la voie leptine-mélanocortines (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, *PCSK1*) devra être réalisée (exemple de centre faisant le diagnostic <http://www.cgmc-psl.fr/spip.php?rubrique45>).

Enfin, en cas d'obésité massive à début précoce et isolée, il faudra rechercher des mutations du gène *MC4R*.

POURQUOI FAIRE UN DIAGNOSTIC ?

Les obésités génétiques sont importantes à diagnostiquer, car il existe une prise en charge spécifique, relevant d'équipes spécialisées et multidisciplinaires, à mettre en place le plus rapidement

possible (dès la petite enfance). La mise en place des CRMR a permis de mieux prendre en charge ces pathologies qui sont complexes, avec souvent des atteintes multiples : rédaction de protocoles nationaux de diagnostic et de soins pour le SPW et le BBS, élaboration de guides d'informations à l'usage des accompagnants (<http://guide-prader-willi.fr/>), élaboration de cartes d'urgence (<http://www.chu-toulouse.fr/-centre-de-referance-du-syndrome-de-892->). Dans ces centres, d'éventuels essais thérapeutiques peuvent être proposés au patient.

De plus, le diagnostic permet, dans un certain nombre de cas, de déculpabiliser le patient et sa

famille et d'orienter au mieux la prise en charge médico-sociale en fonction des incapacités décrites dans la maladie. Le contact avec les associations de patients est primordial pour l'acceptation de la maladie et l'accompagnement au quotidien.

Enfin, la mise en évidence de l'anomalie génétique pourra permettre de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de l'obésité en identifiant de nouvelles pistes moléculaires. ■

Remerciements

Les auteurs remercient les organismes ayant soutenu les projets d'études génétiques, en particulier au travers des

Programmes hospitaliers de recherche clinique (APHP) et les investissements d'Avenir (Agence Nationale de la Recherche "Investissements d'avenir" ANR-10-IAHU-05).

Correspondance

Christine Poitou

Centre de Référence Prader Willi Adulte

Pôle Endocrinologie et Nutrition

Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière

47-83 Boulevard de l'hôpital

75013 Paris

Tél.: 01 42 17 78 97 - Fax: 01 42 17 79 61

christine.poitou-bernet@psl.aphp.fr

Mots-clés : Obésité, Génétique, Prader Willi, Bardet-Biedl

BIBLIOGRAPHIE

- Dubern B, Clément K. Aspects génétiques de l'obésité. *Presse Med* 2007; 36:1568-1605.
- Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP et al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-8.
- Clément K, Vaisse C, Lahlou N et al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398-401.
- Krude H, Biebermann H, Schnabel D et al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4633-40.
- Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S et al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997; 16: 303-6.
- Frayling TM, Timpson NJ, Weedon MN et al. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science* 2007; 316: 889-94.
- Musunuru K, Pirruccello JP, Do R et al. Exome sequencing, ANGPTL3 mutations, and familial combined hypolipidemia. *N Engl J Med* 2010; 363: 2220-7.
- Xing DJ, Zhang HX, Huang N et al. Comprehensive molecular diagnosis of Bardet-Biedl syndrome by high-throughput targeted exome sequencing. *Plos One* 2014; 9: e90599.
- Pearce LR, Atanassova N, Banton MC et al. KSR2 mutations are associated with obesity, insulin resistance, and impaired cellular fuel oxidation. *Cell* 2013; 155: 765-77.
- Borman AD, Pearce LR, Mackay DS et al. A homozygous mutation in the TUB gene associated with retinal dystrophy and obesity. *Hum Mutat* 2014; 35: 289-93.
- Doco-Fenzy M, Leroy C, Schneider A et al. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the ACP1, TMEM18, and MYT1L genes. *Eur J Hum Genet* 2014; 22: 471-9.
- Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A et al. A novel highly-penetrant form of obesity due to microdeletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 2010; 463: 671-5.
- El-Sayed Moustapha JS, Eleftherohorinou H, de Smith AJ et al. Novel association approach for variable number tandem repeats (VNTRs) identifies DOCK5 as a susceptibility gene for severe obesity. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3727-38.
- Miller JL, Lynn CH, Driscoll DC et al. Nutritional phases in Prader-Willi syndrome. *Am J Med Genet A* 2011; 155: 1040-9.
- Loret-Linares C, Faucher P, Coupaye M et al. Comparison of body composition, basal metabolic rate and metabolic outcomes of adults with Prader Willi syndrome or lesional hypothalamic disease, with primary obesity. *Int J Obes* 2013; 37: 1198-1203.
- Goldstone AP, Beales PL. Genetic obesity syndromes. *Front Horm Res* 2008; 36: 37-60.
- Horsthemke B, Buiting K. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113: 292-9.
- Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F et al. Truncating mutations of MAGEL2 cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet* 2013; 45: 1405-9.
- M'hamedi O, Ouertani I, Chaabouni-Bouhamed H. Update on the genetics of Bardet-Biedl syndrome. *Mol Syndromol* 2014; 5: 51-6.
- Zaghloul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 2009; 119: 428-37.
- Chennen K, Scerbo MJ, Dollfus H et al. Bardet-Biedl syndrome: cilia and obesity - From genes to integrative approaches. *Med Sci (Paris)* 2014; 30: 1034-9.
- Huvenne H, Le Beyec J, Pépin D et al. Seven novel deleterious LEPR mutations found in early-onset obesity: a exon6-8 shared by subjects from Reunion Island, France suggests a founder effect. *Soumis*.
- Nizard J, Dommergues M, Clément K. Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation. *N Engl J Med* 2012; 366: 1064-5.
- Farooqi IS, Wangenstein T, Collins S et al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007; 356: 237-47.
- Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J et al. Novel LEPR mutations in obese Pakistani children identified by PCR-based enrichment and next generation sequencing. *Obesity* 2014; 22: 1112-7.
- Wabitsch M, Funcke JB, Lennerz B et al. Biologically inactive leptin and early-onset extreme obesity. *N Engl J Med* 2015; 372: 48-54.
- Hinney A, Volckmar AL, Knoll N. Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 114: 147-91.
- Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM et al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1811-8.
- Valette M, Poitou C, Kesse-Guyot E et al. Association between melanocortin-4 receptor mutations and eating behaviors in obese patients: a case-control study. *Int J Obes* 2014; 38: 883-5.
- Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS et al. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1085-95.
- Dubern B, Bisbis S, Talbaoui H et al. Homozygous null mutation of the melanocortin-4 receptor and severe early-onset obesity. *J Pediatr* 2007; 150: 613-7.
- Branson R, Potoczna N, Kral JG et al. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 2003; 348: 1096-1103.

Revue 2: Monogenic forms of obesity.

H Huvenne, B Dubern. In: Nobrega C, Rodriguez-Lopez R, eds. Molecular Mechanisms Underpinning the Development of Obesity. Springer International Publishing AG 2014; chapter 2: 9-21.

Chapter 2

Monogenic Forms of Obesity

Hélène Huvenne and Béatrice Dubern

Introduction

Obesity, defined as an excess fat mass, is a complex and multifactorial disease resulting from the interaction of numerous environmental and genetic factors. It is characterized by a wide phenotypic heterogeneity. Numerous epidemiological and intervention studies carried out in different cohorts (twins brought up together or separately, adopted children, nuclear families, among others) have recognized the role of individual genetic and biological susceptibilities in response to the current weight-gain promoting environment [1]. There are also individual differences in progression of weight (i.e. different trajectories) and risk of associated comorbidities. It is now well accepted that the development of obesity stems from the interaction of multiple environmental factors (such as overeating and/or reduction in physical activity) with genetic factors. The severity of obesity will be thus determined by the impact of environment on the genetic background of each individual.

B. Dubern (✉)

Nutrition and Gastroenterology Department, Armand-Trousseau Hospital, 26 Avenue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris, France
e-mail: beatrice.dubern@trs.aphp.fr

Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière Hospital,
47-83 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

INSERM, UMR_S U1166, Nutriomics, Pitié-Salpêtrière Hospital,
47-83 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

H. Huvenne

Pediatrics Department, Saint-Vincent de Paul Hospital, Boulevard de Belfort, 59000 Lille, France

Institute of Cardiometabolism and Nutrition, ICAN, Pitié-Salpêtrière Hospital,
47-83 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

INSERM, UMR_S U1166, Nutriomics, Pitié-Salpêtrière Hospital,
47-83 Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

© Springer International Publishing Switzerland 2014

C. Nóbrega, R. Rodríguez-López (eds.), *Molecular Mechanisms Underpinning the Development of Obesity*, DOI 10.1007/978-3-319-12766-8_2

9

Several clinical presentations are described in obesity depending on the involved genes:

- a. Monogenic obesity described as rare and severe early-onset obesity associated with endocrine disorders. There are mainly due to mutations in genes of the leptin/melanocortin axis involved in food intake regulation (genes of leptin (*LEP*) and its receptor (*LEPR*), proopiomelanocortin (*POMC*), proconvertase 1 (*PC1*), etc).
- b. Syndromic obesity corresponding to obesity associated with others genetic syndromes. Patients are clinically severely obese and additionally distinguished by mental retardation, dysmorphic features and organ-specific developmental abnormalities. Prader-Willi and Bardet-Biedl syndromes are the 2 most frequent. But more than 100 syndromes are now associated to obesity.
- c. Melanocortin 4 receptor (*MC4R*) linked obesity characterized by a variable severity of obesity and the absence of specific phenotype. They are responsible for 2–3 % of obesity in adults and children.
- d. Polygenic obesity, which is the more common clinical situation (>95 % of cases). Here each susceptibility gene, taken individually, would only have a slight effect on weight. The cumulative contribution of these genes would become significant only in an 'obesogenic lifestyle' (such as overfeeding, sedentariness, stress).

The comprehension of the obesity molecular mechanisms progressed enormously these last years thanks to the development of faster, precise and effective genetic screening tools. In particular, the whole-exome sequencing showed its power to identify new monogenic obesities due to mutations in the leptin/melanocortin pathway or in other genes. Rare genetic obesities are, in fact, important to clinically detect because it allows to progress in understanding obesity physiopathology and on the other hand there is a specific management of these forms of obesity depending on specific and multidisciplinary teams.

Monogenic Obesity Due to Mutations in the Leptin/Melanocortin Pathway

As described in rodents, monogenic obesities are mainly due to mutations in the genes encoding proteins involved in the leptin/melanocortin pathway that plays a pivotal role in the hypothalamic control of food intake (Fig. 2.1). The hypothalamic leptin/melanocortin pathway is activated following the systemic release of the adipokine LEP and its subsequent interaction with its receptor LEPR located on the surface of neurons of the arcuate nucleus. The downstream signals that regulate satiety and energy homeostasis are then propagated via POMC, cocaine-and-amphetamine-related transcript (CART) and the melanocortin system [2]. While POMC/CART neurons synthesize the anorectic peptide α -melanocyte stimulating hormone

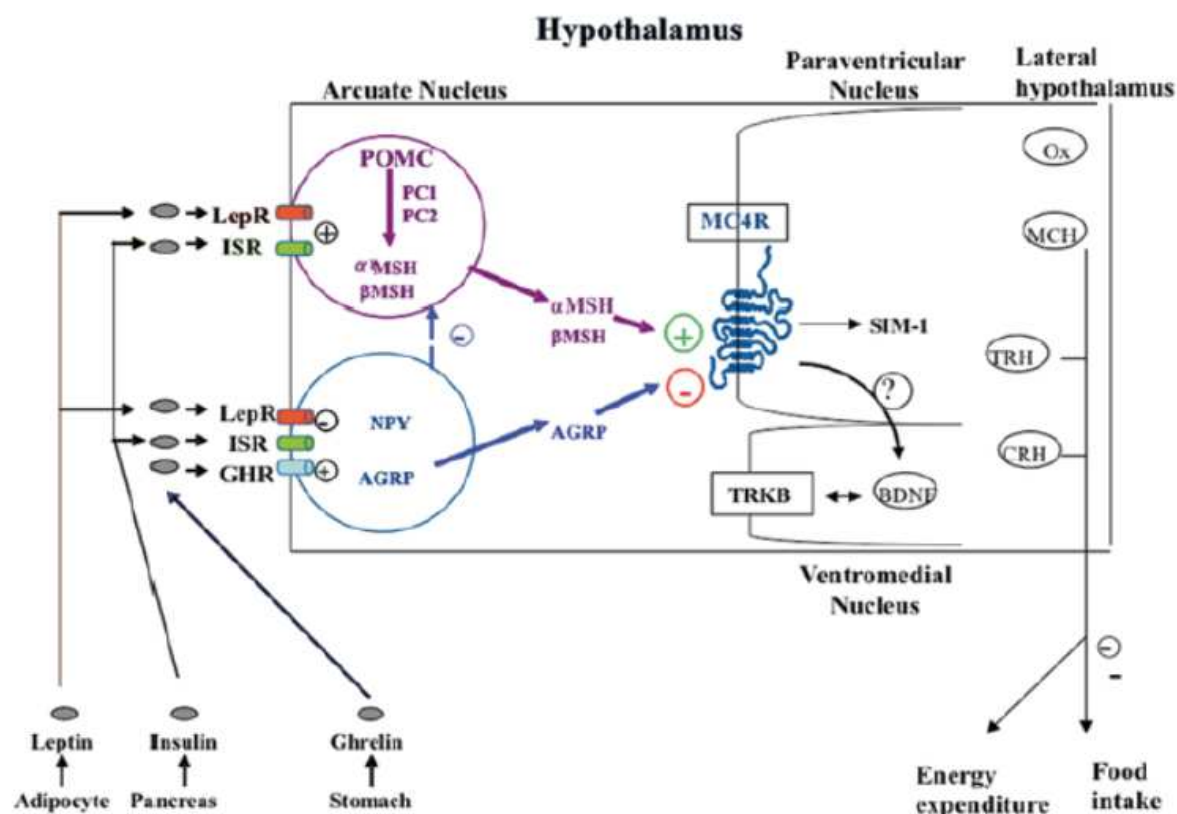


Fig. 2.1 The leptin/melanocortin pathway. Neuronal populations propagate the signaling of various molecules (leptin, insulin, ghrelin) to control food intake and satiety. POMC-neurons in the arcuate nucleus are activated by leptin and insulin and produce the α -MSH, which then activates the MC4R receptor in the paraventricular nucleus resulting in a satiety signal. The downstream roles of SIM1, BDNF and TRKB are currently being explored. A separate group of neurons expressing NPY and AGRP produce molecules that act as potent inhibitors of MC4R signaling. Several mutations of those genes involved in the leptin/melanocortin pathway are responsible for severe early-onset obesity. *AGRP* agouti-related protein, *BDNF* brain-derived neurotrophic factor, *CRH* corticotrophin-releasing hormone, *GHR* ghrelin receptor, *ISR* insulin receptor, *LepR* leptin receptor, *MC4R* melanocortin-4 receptor, *MCH* melanin-concentrating hormone, α -MSH α -melanocyte stimulating hormone, β -MSH β -melanocyte stimulating hormone, *NPY* neuropeptide Y, *Ox* orexins, *PC1* and *2* proconvertase 1 and 2, *POMC* proopiomelanocortin, *SIM1* single-minded 1, *TRH* thyrotropin-releasing hormone, *TRKB* tyrosine kinase receptor

(α -MSH), a separate group of neurons express the orexigenic neuropeptide Y (NPY) and the agouti-related protein (AGRP), which acts as a potent inhibitor of melanocortin 3 (MC3R) and MC4R receptors. The nature of the POMC derived peptides depends on the type of endoproteolytic enzyme present in the specific brain region. In the anterior pituitary, the presence of the PC1 enzyme produces ACTH (adrenocorticotrophic hormone) and β -lipotrophin peptides, while the combined presence of PC1 and PC2 in the hypothalamus controls the production of α -, β -, γ -MSH and β -endorphins. Mutations in human genes coding for LEP [3–5], LEPR [6, 7], POMC [8] and PC1 [9] lead to severe obesity occurring soon after birth, with generally complete penetrance and autosomal recessive transmission (Table 2.1).

Table 2.1 Rare monogenic forms of human obesity

Gene	Mutation type	Obesity	Associated phenotypes
Leptin (LEP)	Homozygous mutation	Severe, from the first days of life	Gonadotropic and thyrotropic insufficiency
Leptin receptor (LEPR)	Homozygous mutation	Severe, from the first days of life	Gonadotropic, thyrotropic and somatotropic insufficiency
Proopiomelanocortin (POMC)	Homozygous or compound heterozygous mutation	Severe, from the first months of life	ACTH insufficiency Mild hypothyroidism and ginger hairs if the mutation leads to the absence of POMC production
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (PCSK1)	Homozygous or compound heterozygous mutation	Severe obesity occurring in childhood	Adrenal, gonadotropic, somatotrophic and thyrotropic insufficiency Postprandial hypoglycemic malaises Central diabetes insipidus
Single-minded 1 (SIM1)	Translocation between chr 1p22.1 and 6q16.2 in the SIM 1 gene	Severe obesity occurring in childhood	Inconstantly, neurobehavioral abnormalities (including emotional lability or autism-like behavior)
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2)	De novo heterozygous mutation	Severe obesity from the first months of life	Developmental delay Behavioral disturbance Blunted response to pain
Dedicator of cytokinesis 5 (DOCK5)	Variable number tandem repeats (VNTRs)	Childhood and adult severe obesity	—
Kinase suppressor of Ras2 (KSR2)	Heterozygous frameshift, nonsense or missense variants	Severe obesity	Hyperphagia in childhood Low heart rate Reduced basal metabolic rate Severe insulin resistance
Tubby-like protein (TUB)	Homozygous frameshift mutation	Early-onset obesity	Night blindness, decreased visual acuity and electrophysiological features of a rod cone dystrophy

Leptin Deficiency

Mutations in the human genes coding for LEP [3–5] and LEPR [6, 7] lead to rapid and dramatic increase in weight since the first months of life, as illustrated by the weight curve of LEPR deficient subjects (Fig. 2.2). Evaluating body composition in some *LEPR* mutation carriers show a large amount of total body fat mass (> 50 %) but resting energy expenditure remains related to the level of body corpulence. Feeding behaviour is characterized by major hyperphagia and ravenous hunger [10]. Surprisingly, one LEP deficient Austrian girl has been recently described with more moderate obesity (BMI 31.5 kg/m²), despite an increased consumption

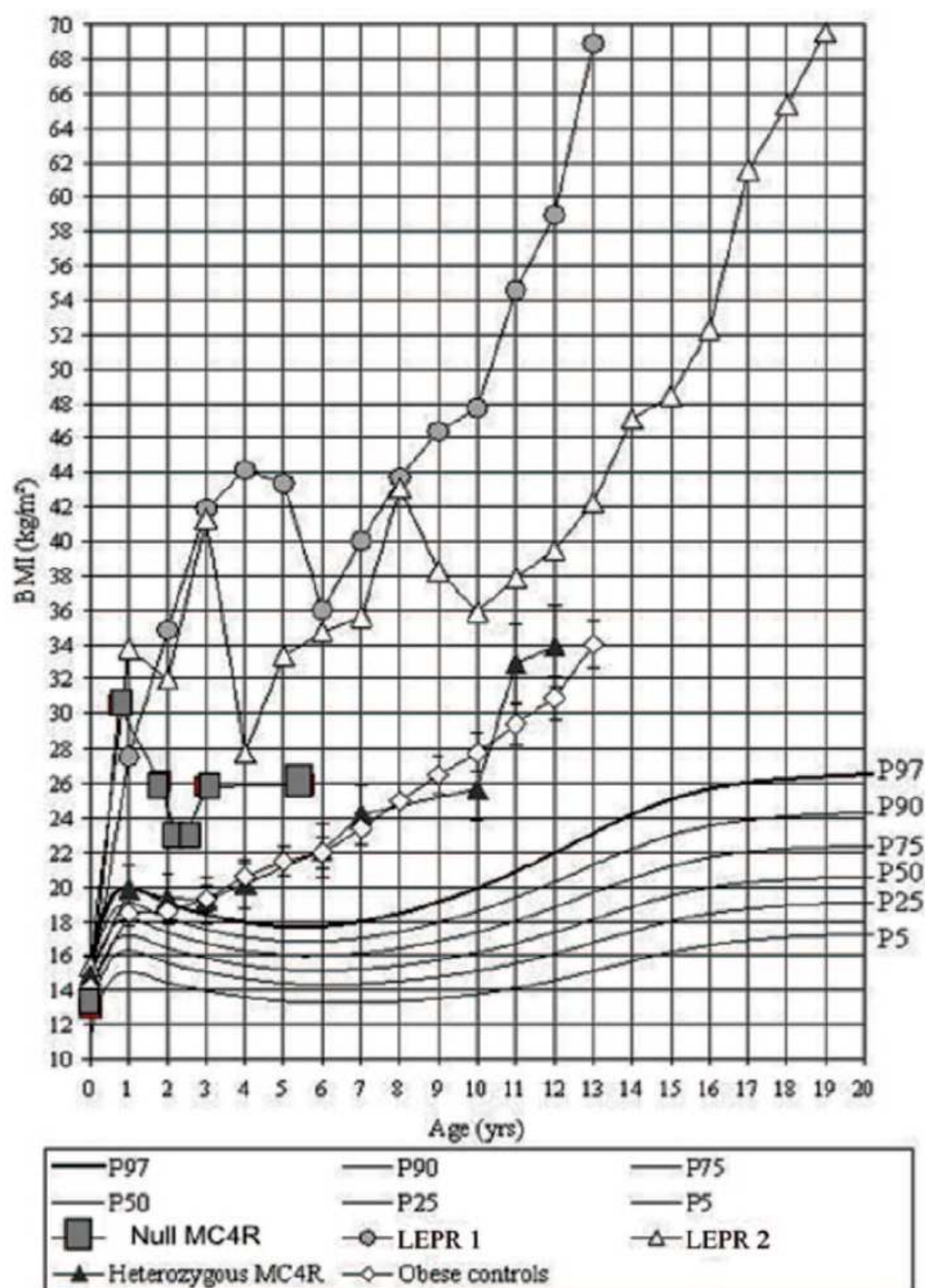


Fig. 2.2 BMI curves of 2 homozygous null *LEPR* mutants (LEPR 1 and 2), 1 homozygous null *MC4R* patient, 6 heterozygous *MC4R* carriers and 40 non mutated obese controls [47]. The reference curves are the standard French/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale percentile curves

of calories in a test meal [11]. The phenotype was explained by extremely low daily calorie intake. Even if one takes into account a substantial underreporting, this observation might suggest that despite LEP deficiency, it was possible to control energy intake and thus to prevent extreme obesity. In that specific case, the parents' role was determinant by providing a favourable environment with vigorous control of the patient's eating behaviour from early infancy onward. A further explanation might be related to the different genetic backgrounds of different subjects with LEP or LEPR deficiency. However, despite this particular case, severe early-onset obesity with major hyperphagia is recognized as a main clinical presentation of LEP or LEPR deficiency.

Associated to the severe early-onset obesity with major hyperphagia, hypogonadotrophic hypogonadism and thyrotrophic insufficiencies complete the phenotype. Insufficient somatotrophic secretion, leading to moderate growth delay, is also described in some patients with a *LEPR* mutation. In LEP deficient subjects, it was described a high rate of infection, particularly recurrent respiratory tract infections, associated with a deficiency in T cell number and function [6, 12, 13]. In individuals with leptin deficiency either due to *LEP* or *LEPR* mutations, no pubertal development was observed while in others there is evidence of spontaneous pubertal development suggesting a recovery of hormonal functions with time. For example, the follow-up of the initially described *LEPR* deficient sisters revealed the normalization of thyroid mild dysfunction at adult age and normal spontaneous pregnancy [14].

Measurement of circulating leptin may help in the diagnosis: it is undetectable in *LEP* mutation carriers and correlated to fat mass or unusually elevated in *LEPR* mutation carriers [3, 6, 7]. Thus, *LEPR* gene screening might be considered in subjects with severe early-onset obesity associated to endocrine dysfunctions with leptin related to corpulence level [7].

Mutations of POMC and PCSK1 Genes

Obese children with a complete POMC deficiency have ACTH deficiency, which can lead to acute adrenal insufficiency from birth. These children display also a mild central hypothyroidism that necessitates hormonal replacement [8]. Alterations in the somatotrophic and gonadotrophic axis are also described [15]. The reason of these endocrine anomalies is unknown even if the role of melanocortin peptides in influencing the hypothalamic pituitary axis has been proposed. Ginger hair due to the absence of α -MSH, which activates the peripheral MC1R involved in pigmentation is classically described. However, it might be inconstant as reported in several observations suggesting that the skin and hair phenotype might vary according to the ethnic origin of *POMC* mutation carriers [15–17]. The modifications in color hair, adrenal function and body weight are consistent with the lack of POMC-derived ligands for the melanocortin receptors MC1R, MC2R and MC4R respectively.

Patients carrying rare mutation in the *PCSK1* (proprotein convertase subtilisin/kexin type 1) gene leading to PC1 deficiency, have also endocrine anomalies in addition to severe obesity. They are mainly postprandial hypoglycemic malaises, fertility disorders due to hypogonadotrophic hypogonadism, central hypothyroidism and adrenal insufficiency secondary to lack of POMC maturation. The delayed postprandial malaises are explained by the accumulation of proinsulin through lack of PC1, which is involved in the synthesis of mature insulin from proinsulin. The absence of POMC maturation causes a dysfunction in the melanocortin pathway that explains the obese phenotype [9]. Severe persistent diarrhea, due to defect in intestinal absorption, is also described, secondary to lack in mature GLP-1 (glucagon-like peptide-1) [18]. Alteration of the processing of prohormones, progastrin and proglucagon, explains, at least in part, the intestinal phenotype and also suggests the role of PC1 in absorptive functions in the intestine. Recently, central diabetes insipidus improved by oral desmopressin was noted in one compound heterozygous proband and in 13 children with a total PC1 deficiency. These observations suggest that *PCSK1* may be involved in the full functioning or central sensing of osmolality in humans [19, 20]. Growth hormone deficiency was also noted in the 13 children with complete PC1 deficiency [20].

Diagnosis Genetic Testing of Monogenic Obesity

In case of clinical situation suggesting a monogenic obesity (severe early-onset obesity associated to endocrine anomalies and potentially consanguineous parents), direct sequencing of the candidate gene (*LEP*, *LEPR*, *POMC*, etc.) is necessary for diagnosis confirmation. It will detect homozygous or compound heterozygous mutation responsible for an interruption of the leptin-melanocortin axis. Family members are needed to be tested for segregation analysis and to evaluate the risk of recurrence.

A few genetics laboratories routinely perform those analyses that usually are part of research programs. For example in Europe, this genetic testing can be found at

- UF nutriginétique (Pitié-Salpêtrière hospital). Contact: B. Dubern or K. Clément. Address: Endocrinology and Nutrition department, Pitié-Salpêtrière hospital, Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris or Pediatric Nutrition department, Trousseau hospital, 75012 Paris. Email: beatrice.dubern@trs.aphp.fr; karine.clement@psl.aphp.fr; Tel: 33 (0) 14234 8936; Fax: 33 (0) 4051 00 57; Web site: <http://www.cgmc-psl.fr/>
- S O'Rahilly's team (University of Cambridge). Contact: S. Farooqi or S. O'Rahilly. Address: Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QR. Email: isf20@cam.ac.uk; Tel: +44 (0) 1223 336792; Fax: +44 (0) 1223 330598; Web site: <http://www.mrl.ims.cam.ac.uk>

Treatment

In case of LEP deficiency, children and adults benefit from subcutaneous injection of leptin, resulting in weight loss, mainly of fat mass, with a major effect on reducing food intake and on other dysfunctions including immunity, as described previously [21]. A detailed microanalysis of eating behavior of three leptin deficient adults, before and after leptin treatment, revealed reduced overall food consumption, a slower rate of eating and diminished duration of eating of every meal in the three subjects after leptin therapy. Leptin treatment also induces features of puberty even in adults [10]. This study supports a role of leptin in influencing the motivation to eat before each meal [22]. Another study shows that leptin treatment had a major effect on food intake. *Ad libitum* energy intake in a test meal was reduced, hunger ratings in the fasted state decreased and satiety following a meal increased. Leptin acts on neural circuits governing food intake to diminish perception of food reward while enhancing the response to satiety signals generated during food consumption [23]. In a separate study, hormonal and metabolic changes were evaluated before and after leptin treatment [10]. Leptin treatment was able to induce aspects of puberty even in adults, as illustrated by the effect of leptin treatment in one 27 year-old adult male with hypogonadism. In two women between 35–40 years, leptin treatment led to regular menstrual periods and hormonal peaks of progesterone evoking a pattern of ovulation. Although cortisol deficiency was not initially found in LEP deficient patients, eight months of leptin treatment modified the pulsatility of cortisol with a greater morning rise of cortisol. Leptin could have a previously unsuspected impact on human hypothalamic-pituitary-adrenal function. Metabolic parameters of leptin deficient patients improved in parallel with weight loss.

In the LEPR deficient subjects, leptin treatment is useless because of a non-functional LEPR. Factors that could possibly bypass normal leptin delivery systems are being developed but are not yet currently available. The ciliary neurotrophic factor (CNTF) was one of the candidate molecules. CNTF activates downstream signaling molecules such as STAT-3 in the hypothalamus area that regulates food intake, even when administered systemically. Treatment with CNTF in humans and animals induced substantial loss of fat mass [24]. The neurotrophic factor, Axokine, an agonist for the CNTF receptor, has been under development by the Regeneron Company, for the potential treatment of obesity and its metabolic associated complications. But the phase III clinical trials were stopped due to development of antibodies against Axokine in nearly 70% of the tested subjects after approximately 3 months of treatment. In addition, Axokine had a small positive effect [25]. It is also possible that side effects of CNTF, a molecule possibly acting in the immune function, might be expected [26].

In children with a complete POMC deficiency, a 3 months trial using MC4R agonist with low affinity was inefficient on weight or food intake [8]. POMC, PC1 or LEPR deficient families might benefit from the development of new MC4R agonists if such drugs become available, in order to restore the melanocortin signal. Likewise, deep brain stimulation trials with an electrode inserted in the anterior

third ventricle contiguous to the ventromedian hypothalamus are actually performed. In monkeys, this chronic 8-week stimulation induces a significant decrease in corpulence with reduction of 8 % of body weight and 18 % of fat mass, without side effects [27].

Today, bariatric surgery is the only long-term efficient treatment for severe obesity [28] using several surgical technics (laparoscopic gastric bypass, gastric banding or sleeve gastrectomy). The question of such treatment and its potential efficiency is crucial in patients with monogenic obesity. But currently, data on bariatric surgery in these patients are limited and controversial. In one LEPR deficient patient, vertical gastropasty was beneficial and sufficient to induce and maintain a 40 kg weight loss (–20 % of the initial weight) over 8 years of regular follow-up, whereas the patient remained obese [29]. In contrast, a relative failure of surgical therapy was illustrated by the rapid weight regain 1 year after bypass in another LEPR deficient morbidly obese woman. But this patient with low socioeconomic status had extreme difficulties after postsurgical counselling. She was noncompliant with the recommendations provided in this type of purely restrictive surgery and her medical follow-up was very irregular. This report illustrated the important role of environment on the benefice of bariatric surgery especially in case of monogenic obesities or underlined the poor efficiency of bariatric surgery in these patients [29].

So, due to the limited number of cases, the long-term efficacy and safety of bariatric surgery need further evaluation. A multidisciplinary team approach should always be adopted in order to establish the correct indication and realistic explanation after surgical treatment of obese patients.

Other Monogenic Obesities

Several additional genes, implicated in the hypothalamus and central nervous system development, have been found to cause monogenic obesity in humans. A deletion of the *SIM1* (single-minded homolog 1) gene, located on the 6q chromosome, secondary to a *de novo* translocation between 1p22.1 and 6q16.2 chromosomes, was identified in one girl with severe early-onset obesity associated to hyperphagia and food impulsivity [30]. She had a rate of early weight gain comparable to the weight curve of LEP and LEPR deficient children. Izumi et al. identified also an interstitial 6q deletion including the *SIM1* gene in a subject with Prader-Willi-like features (neonatal hypotonia, dysmorphism, developmental delay, early-onset obesity, short stature, hypopituitarism) [31]. *SIM1* encodes a transcriptional factor implicated, in mouse, in the development of the hypothalamic paraventricular nucleus. It plays a role in the melanocortin signaling pathway and appears to regulate feeding rather than energy expenditure [32, 33]. The sequencing of the coding region of *SIM1*, in 2100 unrelated patients with severe early-onset obesity and in 1680 unrelated population-based controls, identified 13 different heterozygous variants in 28 severely obese patients. Variants carriers exhibited severe obesity, increased *ad libitum* food intake in a test meal, normal basal metabolic rate and inconstantly

neurobehavioral phenotype (impaired concentration, memory deficit, emotional lability or autistic spectrum behavior). Nine of the 13 variants significantly reduced the ability of *SIM1* to activate a *SIM1*-responsive reporter gene. These mutations co-segregated with obesity in extended family studies with variable penetrance. So, rare variants in *SIM1* should be considered in patients with hyperphagic early-onset obesity associated or not to Prader-Willi-like syndrome features or neurobehavioral abnormalities such as emotional lability or autism-like behavior [34–36].

Likewise, decreased expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was found to regulate eating behavior [37]. BDNF, encoded by *NTRK2* (neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2) gene, and its associated tyrosine kinase receptor (TRKB) are both expressed in the ventromedial hypothalamus. They have been attributed a role downstream of MC4R signaling implicated in feeding regulation [38]. A *de novo* heterozygous mutation in *NTRK2* gene was described in an 8-year-old boy with severe early-onset obesity, mental retardation, developmental delay and anomalies of higher neurological functions, like the impairment of early memory, learning and nociception [39]. Other mutations in *NTRK2* were found in patients with early-onset obesity and developmental delay, but their functional consequences and their implication in obesity are yet to demonstrate. In vitro studies of some mutations have suggested that these mutations could impair hypothalamic-signaling processes [40].

Finally, the contribution of copy number variants (CNVs) to complex disease susceptibility, such as severe obesity, has been the subject of debates in recent years. Variable number tandem repeats (VNTRs) constitute a relatively under-examined class of genomic variants in the context of complex disease. Rare CNVs have been shown to be responsible for severe highly penetrant forms of obesity. For example, investigation of a complex region on chromosome 8p21.2 encompassing the *DOCK5* (dedicator of cytokinesis 5) gene has shown a significant association of the *DOCK5* VNTRs with childhood and adult severe obesity [41]. So, more systematic investigation of the role of VNTRs in obesity had to be performed to study their relatively unexplored contribution to this disease and their potential link with the leptin/melanocortin pathway.

The rapid development of new tools such as whole-exome sequencing will probably help to identify novel genes in severe early-onset obesity or monogenic obesity. The whole-exome sequencing is a diagnostic approach for identification of molecular defects in patients with suspected genetic disorders. It showed its power to identify mutations responsible for rare diseases, in a small number of unrelated affected individuals. Indeed, it contributed greatly to the discovery of disease-causing genes in several rare inherited human diseases. So, this tool could probably help to reveal new molecular abnormalities in patients with monogenic obesity. It was tested and validated in a study for the molecular diagnosis of 43 forms of monogenic diabetes or obesity. Forty patients (19 with a monogenic form of diabetes and 21 with a monogenic form of obesity) carrying a known causal mutation for those subtypes according to diagnostic laboratories were blindly re-analyzed. Except for one variant, all causal mutations in each patient were re-identified, associated with an almost perfect sequencing of the targets (mean of 98.6%). Moreover,

in three individuals, other mutations were detected with a putatively deleterious effect, in addition to those previously reported by the genetic diagnosis laboratories [42]. In another study based on 39 unrelated severely obese Pakistani children, the whole-exome sequencing revealed two novel homozygous *LEPR* mutations in two probands who were phenotypically indistinguishable from age-matched LEP deficient subjects of the same population [43]. Several other genes implicated in severe obesity have been identified using this method: one paternal 2pter deletion, encompassing the *ACPI* (acid phosphatase 1), *TMEM18* (transmembrane protein 18) and *MYT1L* (myelin transcription factor 1-like) genes in five unrelated patients presenting with severe early-onset obesity, hyperphagia, intellectual deficiency and severe behavioral difficulties [44]; multiple rare variants in the *KSR2* (kinase suppressor of Ras 2) gene in 45 unrelated severely obese individuals exhibiting low heart rate, reduced basal metabolic rate and severe insulin resistance [45]; one homozygous frameshift mutation in the *TUB* (tubby-like protein) gene in a proband who presented with obesity, night blindness, decreased visual acuity, and electrophysiological features of rod cone dystrophy [46].

In conclusion, whole-exome sequencing will probably help physicians to identify new molecular abnormalities in patients with severe early-onset obesity in a close future. Moreover, progress in understanding the monogenic obesity mechanisms may help to better understand the pathophysiology of the more common forms of obesity and to improve their management.

References

1. Farooqi IS (2006) Genetic aspects of severe childhood obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 3(Suppl 4):528–536
2. Harrold JA, Williams G (2006) Melanocortin-4 receptors, beta-MSH and leptin: key elements in the satiety pathway. *Peptides* 27:365–371
3. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ et al (1997) Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 387:903–908
4. Strosberg AD, Issad T (1999) The involvement of leptin in humans revealed by mutations in leptin and leptin receptor genes. *Trends Pharmacol Sci* 20:227–230
5. Fatima W, Shahid A, Imran M, Manzoor J, Hasnain S, Rana S et al (2011) Leptin deficiency and leptin gene mutations in obese children from Pakistan. *Int J Pediatr Obes* 6:419–427
6. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D et al (1998) A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 392:398–401
7. Farooqi IS, Wangensteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM et al (2007) Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 356:237–247
8. Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE et al (2003) Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4–10. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4633–4640
9. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT et al (1997) Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 16:303–306

10. Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F et al (2004) Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4531–4536
11. Fischer-Posovszky P, von Schnurbein J, Moepps B, Lahr G, Strauss G, Barth TF et al (2010) A new missense mutation in the leptin gene causes mild obesity and hypogonadism without affecting T cell responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 95:2836–2840
12. Farooqi IS (2005) Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 19:359–374
13. Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, Farooqi IS, Amr K (2011) Homozygosity for a novel missense mutation in the leptin receptor gene (P316T) in two Egyptian cousins with severe early onset obesity. *Mol Genet Metab* 102:461–464
14. Nizard J, Dommergues M, Clément K (2012) Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation. *N Engl J Med* 366:1064–1065
15. Clément K, Dubern B, Mencarelli M, Czernichow P, Ito S, Wakamatsu K et al (2008) Unexpected endocrine features and normal pigmentation in a young adult patient carrying a novel homozygous mutation in the POMC gene. *J Clin Endocrinol Metab* 93:4955–4962
16. Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S et al (2006) Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* 55:2549–2553
17. Carroll L, Voisey J, van Daal A (2005) Gene polymorphisms and their effects in the melanocortin system. *Peptides* 26:1871–1885
18. Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ et al (2003) Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 112:1550–1560
19. Frank GR, Fox J, Candela N, Jovanovic Z, Bochukova E, Levine J et al (2013) Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Mol Genet Metab* 110:191–194
20. Martin MG, Lindberg I, Solorzano-Vargas RS, Wang J, Avitzur Y, Bandsma R et al (2013) Congenital proprotein convertase 1/3 deficiency causes malabsorptive diarrhea and other endocrinopathies in a pediatric cohort. *Gastroenterology* 145:138–148
21. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C et al (2002) Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110:1093–1103
22. Williamson DA, Ravussin E, Wong ML, Wagner A, Dipaoli A, Caglayan S et al (2005) Microanalysis of eating behavior of three leptin deficient adults treated with leptin therapy. *Appetite* 45:75–80
23. Farooqi IS, Bullmore E, Keogh J, Gillard J, O'Rahilly S, Fletcher PC (2007) Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science* 317:1355
24. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (2000) The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74:265–272
25. Preti A (2003) Axokine (Regeneron). *IDrugs* 6:696–701
26. Sariola H (2001) The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* 58:1061–1066
27. Torres N, Chabardes S, Piallat B, Devergnas A, Benabid AL (2012) Body fat and body weight reduction following hypothalamic deep brain stimulation in monkeys: an intraventricular approach. *Int J Obes* 36:1537–1544
28. Sjöström L (2013) Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial—a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 273:219–234
29. Le Beyec J, Cugnet-Anceau C, Pépin D, Alili R, Cotillard A, Lacorte JM et al (2013) Homozygous leptin receptor mutation due to uniparental disomy of chromosome 1: response to bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 98:397–402
30. Holder JL Jr Butte NF Zinn AR (2000) Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 9:101–108

31. Izumi K, Housam R, Kapadia C, Stallings VA, Medne L, Shaikh TH et al (2013) Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving *SIM1* and Prader-Willi syndrome-like features. *Am J Med Genet* 9999:1–7
32. Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E et al (2001) *Sim1* haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 10:1465–1473
33. Kublaoui BM, Holder JL Jr, Gemelli T, Zinn AR (2006) *Sim1* haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol Endocrinol* 20:2483–2492
34. Ramachandrapa S, Raimondo A, Cali AMG, Keogh JM, Henning E, Saeed S et al (2013) Rare variants in single-minded 1 (*SIM1*) are associated with severe obesity. *J Clin Invest* 123:3042–3050
35. Bonnefond A, Raimondo A, Stutzmann F, Ghoussaini M, Ramachandrapa S, Bersten DC et al (2013) Loss-of-function mutations in *SIM1* contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J Clin Invest* 123:3037–3041
36. Zegers D, Beckers S, Hendrickx R, Van Camp JK, de Craemer V, Verrijken A et al (2014) Mutation screen of the *SIM1* gene in pediatric patients with early-onset obesity. *Int J Obes* 38:1000–1004
37. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF (2000) BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 19:1290–1300
38. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR et al (2003) Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 6:736–742
39. Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S et al (2004) A de novo mutation affecting human *TrkB* associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 7:1187–1189
40. Gray J, Yeo G, Hung C, Keogh J, Clayton P, Banerjee K et al (2007) Functional characterization of human *NTRK2* mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *Int J Obes (Lond)* 31:359–364
41. El-Sayed Moustapha JS, Eleftherohorinou H, de Smith AJ, Andersson-Assarsson JC, Couto Alves A, Hadjigeorgiou E et al (2012) Novel association approach for variable number tandem repeats (VNTRs) identifies *DOCK5* as a susceptibility gene for severe obesity. *Hum Mol Genet* 21:3727–3738
42. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Muller J, Saeed S, Arslan M et al (2014) Highly sensitive diagnosis of 43 monogenic forms of diabetes or obesity, through one step PCR-based enrichment in combination with next-generation sequencing. *Diabetes Care* 37:460–467
43. Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Philippe J, Durand E, Arshad M et al (2013) Novel *LEPR* mutations in obese Pakistani children identified by PCR-based enrichment and next generation sequencing. *Obesity* 22(4):1112–1117
44. Doco-Fenzi M, Leroy C, Schneider A, Petit F, Delrue MA, Andrieux J et al (2013) Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the *ACP1*, *TMEM18*, and *MYT1L* genes. *Eur J Hum Genet* 22:1–9
45. Pearce LR, Atanassova N, Banton MC, Bottomley B, van der Klaauw AA, Revelli JP et al (2013) *KSR2* mutations are associated with obesity, insulin resistance, and impaired cellular fuel oxidation. *Cell* 155:765–777
46. Borman AD, Pearce LR, Mackay DS, Nagel-Wolfrum K, Davidson AE, Henderson R et al (2014) A homozygous mutation in the *TUB* gene associated with retinal dystrophy and obesity. *Hum Mutat* 35:289–293
47. Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S et al (2006) Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 91:1811–1818

Revue 3: Obésités rares d'origine génétique.

H Huvenne, B Dubern, K Clément, C Poitou. Feuillet de Biologie 2014; 321: 23-31.

Obésités rares d'origine génétique

H. HUVENNE^{1,2}, B. DUBERN^{2,3}, K. CLÉMENT^{2,4} et C. POITOU^{2,4}

RÉSUMÉ

L'obésité, définie par un excès de masse grasse, est une maladie complexe causée par l'interaction de nombreux facteurs génétiques et environnementaux. À côté de l'obésité polygénique commune, il existe des obésités rares d'origine génétique (5 % des obésités) constituant différentes entités selon leur expression clinique et les gènes impliqués. L'obésité monogénique est une forme rare d'obésité sévère à début précoce, à laquelle sont associées des anomalies endocriniennes ; elle est le plus souvent causée par des mutations autosomiques récessives des gènes de la voie leptine-mélanocortines. L'obésité due aux mutations du gène *MC4R*, en cause dans 2 à 3 % des obésités, est une forme d'obésité de sévérité variable, sans phénotype spécifique associé. Enfin, l'obésité syndromique associe une obésité sévère à début précoce à des atteintes du développement (retard mental, dysmorphie, malformations, atteintes neurosensorielles et/ou endocriniennes).

MOTS-CLÉS : obésité, obésité monogénique, obésité syndromique, leptine, mélanocortines, *MC4R*.

I. - INTRODUCTION

L'obésité, définie par un excès de masse grasse ayant un retentissement sur la santé, est une maladie complexe et multifactorielle qui résulte de l'interaction de nombreux facteurs environnementaux et génétiques. Elle est caractérisée par une large hétérogénéité phénotypique. De nombreuses études d'épidémiologie et d'intervention ont été menées dans différentes populations (études de cohortes, de jumeaux, de familles nucléaires), mettant en évidence le rôle d'une susceptibilité génétique dans la réponse aux changements environnementaux (études de suralimentation par exemple). Il existe donc des différences individuelles dans la progression pondérale et le risque de survenue de comorbidités (1).

Il est maintenant bien accepté que le développement de l'obésité résulte d'une interaction entre de multiples facteurs environnementaux (suralimentation, sédentarité) et des facteurs génétiques. La connaissance des bases moléculaires de l'obésité a énormément progressé ces dernières années grâce au développement d'outils de criblage génétique de plus en plus rapides, précis et efficaces, appliqués à l'étude de cohortes de sujets et de leurs familles. Cette approche moléculaire s'est avérée puissante pour définir de nouveaux syndromes associés aux obésités, ou des obésités monogéniques par altération de la voie leptine-mélanocortines.

Différentes situations cliniques d'obésités rares d'origine génétique peuvent être décrites en fonction des gènes impliqués :

- l'obésité monogénique, le plus souvent causée par des mutations de gènes de la voie leptine-mélanocortines (gènes de la leptine et de son récepteur, de la proopiomélanocortine, de la proconvertase 1), et caractérisée par une obésité précoce et sévère, associée à des anomalies endocriniennes ;
- l'obésité due à des mutations du gène *MC4R* (*melanocortin 4 receptor*), caractérisée par une obésité de sévérité variable et l'absence de phénotype spécifique associé ;
- l'obésité syndromique, qui associe une obésité sévère à début précoce à des atteintes du développement et des malformations (retard mental, dysmorphie, malformations, atteintes neurosensorielles et/ou endocriniennes).

¹ Service de Pédiatrie, Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, boulevard de Belfort, 59000 Lille, France.

² INSERM Nutriomique U872 (Équipe 7), Université Pierre et Marie Curie - Paris 6, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 rue de l'École de Médecine, 75006 Paris, France.

³ Service de Gastroentérologie et Nutrition Pédiatriques, Hôpital Armand Trousseau, 26 avenue du Dr Arnold Netter, 75012 Paris, France.

⁴ Pôle Endocrinologie et Nutrition, Institut Cardiometabolique ICAN, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France.

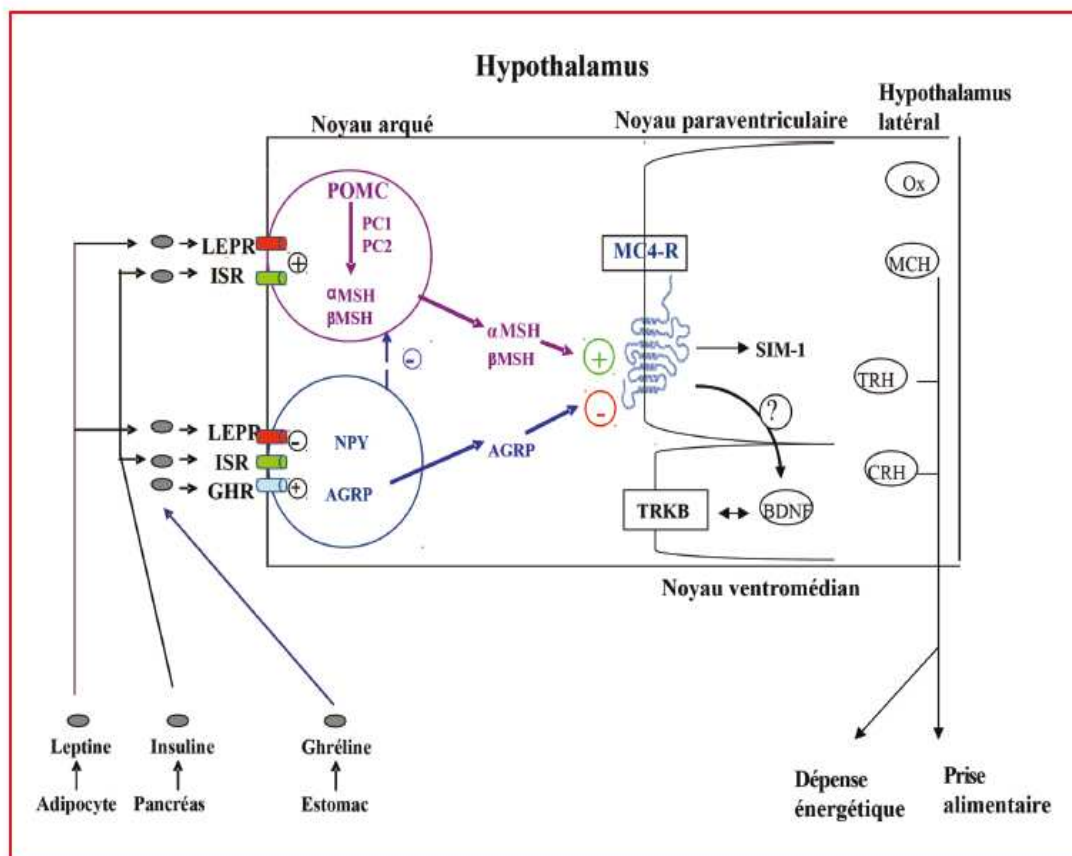


Fig. 1 - La voie leptine/mélanocortines.

Les signaux d'adiposité (leptine et insuline) et la ghréline se lient sur leurs récepteurs spécifiques au niveau des neurones POMC/CART et des neurones NPY/AGRP du noyau arqué. La variation du rapport α MSH/AGRP au niveau de l'hypothalamus module l'activité de MC4R. Ce dernier contrôle l'activité de plusieurs populations neuronales en aval, qui agissent sur les systèmes effecteurs modulant la balance énergétique. Plusieurs mutations des gènes impliqués dans cette voie leptine/mélanocortines sont responsables d'obésité sévère et précoce. AGRP : *Agouti-related peptide*; BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*; CRH : *Corticotrophin-releasing hormone*; GHR : Récepteur de la ghréline; ISR : Récepteur de l'insuline; LEPR : Récepteur de la leptine; MCH : *Melanin-concentrating hormone*; MC4R : Récepteur de type 4 aux mélanocortines; α , β -MSH : α , β -*Melanocyte-stimulating hormone*; NPY : *Neuropeptide Y*; Ox : *Orexines*; PC1 et 2 : *Proconvertases 1 et 2*; POMC : *Proopiomélanocortine*; SIM-1 : *Single-minded 1*; TRKB : *Tropomyosin-related kinase receptor B*; TRH : *Thyrotrophin-releasing hormone*.

Ensemble, ces différentes entités représentent à peine 5 % des cas d'obésité contre 95 % des cas pour l'obésité polygénique, ou obésité commune, dans laquelle chaque gène de susceptibilité pris individuellement n'a que de faibles effets sur le poids, la contribution cumulative de ces gènes ne devenant significative qu'en interaction avec des facteurs environnementaux prédisposant à leur expression phénotypique (suralimentation, sédentarité, stress).

Les formes rares d'obésité génétique, qui seules sont l'objet de cette revue, sont importantes à détecter cliniquement. D'une part, leur étude permet de progresser dans la compréhension de la physiopathologie de l'obésité. D'autre part, elles bénéficient de prises en charge spécifiques relevant d'équipes spécialisées et multidisciplinaires.

II. - OBÉSITÉS MONOGÉNIQUES RARES

Ces formes d'obésités génétiques ont été identifiées grâce à la combinaison d'approches moléculaires et de l'analyse clinique fine d'anomalies biologiques ou hormonales chez des sujets souffrant d'obésité massive et précoce. Les principales anomalies génétiques en cause affectent des facteurs clés de la régulation de la balance énergétique intervenant dans la voie de la leptine, chef d'orchestre contrôlant la régulation du poids et plusieurs voies endocrines, et des mélanocortines, cibles essentielles de la leptine dans l'hypothalamus (Figure 1). Il s'agit de mutations des gènes de la leptine (*LEP*) (2, 3, 4), de son récepteur (*LEPR*) (5, 6), de la proopiomélanocortine (*POMC*), cible centrale de la leptine (7), et de la proconvertase 1 (*PC1*), enzyme de clivage de *POMC* (8).

Ces anomalies entraînent des situations d'obésités sévères parfois associées à des anomalies endocriniennes (Tableau I). Les courbes de poids des patients affectés sont caractéristiques et doivent attirer l'attention. Elles montrent une évolution pondérale rapide avec une obésité sévère qui se développe dès les premiers mois de vie, comme illustré par les courbes des valeurs d'indice de masse corporelle (IMC) de sujets porteurs de mutations de LEPR (Figure 2). L'évaluation de la composition corporelle de ces sujets montre un pourcentage de masse grasse totale très élevé (> 50 %) et une dépense énergétique de repos en lien avec le niveau de corpulence. Le comportement alimentaire est alors caractérisé par une hyperphagie majeure et une faim insatiable (9).

De façon surprenante, une jeune patiente autrichienne porteuse d'un déficit en leptine a récemment été décrite avec une obésité moins sévère (IMC = 31,5 kg/m²) et des prises alimentaires très faibles dans la vie quotidienne, malgré une augmentation de la consommation calorique lors d'un repas-test (10). Même s'il ne s'agit que d'une seule observation, cela peut suggérer que, malgré le déficit en leptine, il est possible de contrôler la prise énergétique et ainsi de prévenir l'obésité extrême, principalement

quand les parents fournissent un environnement favorable en contrôlant vigoureusement le comportement alimentaire du patient dès la petite enfance. Cependant, malgré ce cas spécifique, l'obésité sévère à début précoce, associée à une hyperphagie majeure, reste la présentation clinique principale des déficits en LEP ou en LEPR.

Outre une obésité sévère, les patients porteurs d'une mutation des gènes *LEP* ou *LEPR* présentent un impubérisme ou une puberté retardée par hypogonadisme central et une insuffisance thyroïdienne d'origine centrale. Une insuffisance de sécrétion somatotrope, entraînant un retard de croissance, peut également être observée chez certains patients porteurs d'une mutation de *LEPR*, tout comme une augmentation du risque d'infections, notamment des infections récurrentes respiratoires, avec un déficit du nombre et de la fonction des cellules T (5). Cependant, chez certains sujets ayant un déficit en leptine secondaire à une mutation de *LEP* ou *LEPR*, un développement pubertaire spontané a été observé, suggérant une restauration des fonctions hormonales avec le temps. En effet, le suivi de sœurs présentant un déficit en LEPR a mis en évidence la normalisation d'un déficit thyroïdien modéré à l'âge adulte et une grossesse spontanée normale (11).

Tableau I - Formes rares d'obésité monogénique humaine.

Facteur muté	Type de mutation	Obésité	Phénotype associé
Leptine (LEP)	Homozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisances gonadotrope et thyroïdienne
Récepteur de la leptine (LEPR)	Homozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisances gonadotrope, thyroïdienne et somatotrope
Proopiomélanocortine (POMC)	Homozygote ou hétérozygote composite	Sévère, dès les premiers mois de vie	Insuffisance surrénalienne Hypothyroïdie modérée Cheveux roux (+/-)
Protein convertase subtilisin/kexin type 1 (PCSK1)	Homozygote ou hétérozygote composite	Sévère, apparaissant dans l'enfance	Insuffisance surrénalienne, gonadotrope, somatotrope et thyroïdienne Malaises hypoglycémiques postprandiaux Diabète insipide central
Single-minded 1 (SIM1)	Délétions	Sévère, apparaissant dans l'enfance	Inconstamment, troubles neuro-comportementaux (labilité émotionnelle ou syndrome autistique)
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2)	Mutation <i>de novo</i> hétérozygote	Sévère, dès les premiers mois de vie	Retard de développement Troubles du comportement Réponse atténuée à la douleur
Dedicator of cytokinesis 5 (DOCK5)	VNTR	Obésité sévère de l'enfant et de l'adulte	-

VNTR : variable number tandem repeats.

Un déficit en POMC entraîne une insuffisance surrénalienne aiguë à la naissance, liée au déficit en ACTH (hormone issue du clivage de POMC par une proconvertase). Ces enfants présentent également une hypothyroïdie modérée centrale et parfois des anomalies des axes somatotrope et gonadotrope (7). Ils ont inconstamment des cheveux roux du fait de l'absence d' α MSH (α -melanocyte stimulating hormone), qui est normalement active sur les récepteurs aux mélanocortines périphériques de type 1 (MC1R) impliqués dans la pigmentation (12). Les modifications observées dans la couleur des cheveux, la fonction surrénalienne et le poids sont en rapport, respectivement, avec le manque de ligands (dérivés de POMC) des récepteurs aux mélanocortines MC1R, MC2R et MC4R.

De rares mutations de *PCSK1* (*proprotein convertase subtilisin/kexin type 1*), entraînant un déficit en PC1 (proconvertase 1), enzyme impliquée notamment dans la maturation de l'insuline, sont responsables d'une obésité sévère associée à des malaises hypoglycémiques postprandiaux, des troubles de la fertilité par hypogonadisme hypogonadotrope, d'hypothyroïdie centrale et d'insuffisance surrénalienne (8). Une diarrhée sévère et rebelle par déficit en GLP-1 mature (*glucagon-like peptide-1*) a également été décrite en cas de déficit en PC1 (13), ainsi qu'un syndrome polyuro-polydyspique persistant secondaire à un diabète insipide central (14).

D'autres obésités rares, par mutations de différents gènes impliqués dans le développement de l'hypothalamus et du système nerveux central, ont été décrites chez l'homme, permettant d'identifier de nouvelles pistes physiopathologiques. Des délétions du gène *SIM1* (*single-minded homolog 1*) ont été identifiées chez des sujets présentant une obésité précoce et sévère, associée à une hyperphagie, une impulsivité alimentaire et, inconstamment, à des traits phénotypiques proches de ceux observés dans le syndrome de Prader-Willi (hypotonie néonatale, dysmorphie, retard de développement, retard statural, hypopituitarisme) (15, 16). Le gène *SIM1* code pour un facteur de transcription impliqué, chez la souris, dans le développement des noyaux paraventriculaires de l'hypothalamus, eux-mêmes intervenant dans la régulation de la voie des mélanocortines et dans le contrôle de la balance énergétique (17). Un séquençage de la région codante de *SIM1* a également mis en évidence des variants rares hétérozygotes de *SIM1* chez des sujets présentant une obésité sévère associée à une hyperphagie et, inconstamment, à des anomalies neurocomportementales (troubles de la concentration, déficit mnésique, labilité émotionnelle ou syndrome autistique) (18).

De même, une mutation hétérozygote *de novo* du gène *NTRK2* (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2*) a été mise en évidence chez un jeune garçon atteint d'obésité sévère à début précoce et d'hyperphagie, associées à un retard mental et à des anomalies des fonctions neurologiques (troubles précoces de la mémoire, des apprentissages et de la nociception) (19). Ce gène code pour le BDNF

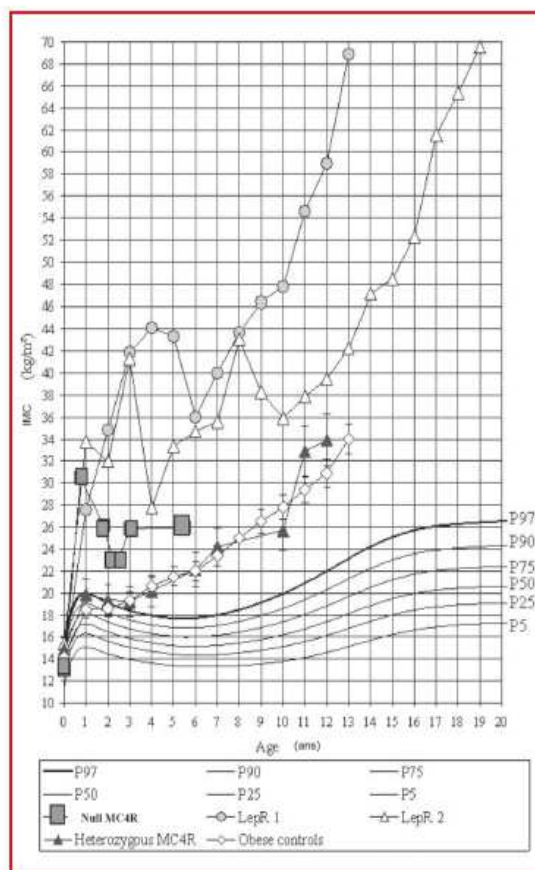


Fig. 2 - Courbes des valeurs d'IMC de deux sujets porteurs de mutations homozygotes du gène *LEPR* (« LepR1 » et « LepR2 »), d'un sujet porteur d'une mutation homozygote de *MC4R* (« null MC4R »), de 6 sujets porteurs de mutations hétérozygotes de *MC4R* (« heterozygous MC4R ») et de 40 sujets obèses non mutés (« obese controls »). Les courbes de référence sont les courbes françaises standard de percentiles de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. D'après (25).

(*brain-derived neurotrophic factor*), dont le récepteur TRKB (*tropomyosin-related kinase receptor B*) est exprimé dans le système nerveux central et est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire en agissant en aval de MC4R (20). D'autres mutations de *NTRK2* ont été retrouvées chez des patients présentant une obésité précoce et un retard de développement, mais leurs conséquences fonctionnelles et leurs implications dans l'obésité restent à démontrer.

Enfin, la contribution des CNV (*copy number variants*) dans la susceptibilité aux pathologies complexes telles que l'obésité sévère, a été le sujet de nombreux débats ces dernières années. Les VNTR (*variable number tandem repeats*) constituent une classe relativement sous-explorée des variants génomiques intervenant dans les pathologies complexes. Des études ont montré que de rares CNV pouvaient être responsables de formes sévères d'obésité, notamment chez 31 sujets porteurs de délétions hétérozygotes d'au moins 593 kb (kilobases) du locus 16p11.2. Ces sujets pré-

se sentaient des malformations congénitales et/ou un retard de développement, en association à l'obésité. Ce phénotype pourrait résulter de l'insuffisance haploïde de multiples gènes ayant un impact sur le développement central de l'obésité (21). L'étude de la région complexe du chromosome 8p21.2 comprenant le gène *DOCK5* (*dedicator of cytokinesis 5*) a également mis en évidence une association significative des VNTR de *DOCK5* avec l'obésité sévère de l'enfant et de l'adulte (22). Des investigations complémentaires sur le rôle des VNTR dans l'obésité devront être réalisées pour étudier leur éventuelle contribution dans cette pathologie et leur lien potentiel avec le système leptine-mélanocortines.

III. - OBÉSITÉS PAR MUTATION DES GÈNES *MC4R* ET *MC3R*

Les obésités liées aux mutations des gènes *MC4R* (*melanocortin 4 receptor*) et *MC3R* (*melanocortin 3 receptor*) sont dites non syndromiques et se situent entre les formes exceptionnelles d'obésité monogénique et les formes polygéniques d'obésité commune. Le diagnostic peut être réalisé par le séquençage du gène dans différents centres français et en Europe.

MC4R, récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé aux protéines G, est un acteur important de la voie des mélanocortines impliquée dans le contrôle de la prise alimentaire. Il est exprimé principalement dans l'hypothalamus. L'importance de *MC4R* dans le contrôle de l'homéostasie pondérale a été démontrée chez l'animal. Des souris *MC4R*^{-/-}, présentant une invalidation génique de *MC4R*, développent une obésité sévère associée à une hyperphagie, une hyperinsulinémie et une accélération de la croissance staturale. Les souris hétérozygotes pour une telle invalidation sont aussi affectées et présentent une obésité intermédiaire. L'utilisation d'agonistes pharmacologiques de *MC4R* chez le rongeur réduit la prise alimentaire et les antagonistes de ce récepteur l'augmentent (23).

Depuis 1998, l'évaluation génétique a révélé que l'obésité liée aux mutations de *MC4R* est la forme d'obésité génétique la plus fréquente chez l'homme identifiée à ce jour. Elle représente 2 à 3 % des obésités de l'enfant et de l'adulte, avec plus de 166 mutations différentes décrites dans diverses populations (Européens, Américains, Asiatiques) (24). Elle se caractérise par une transmission le plus souvent autosomique dominante, par une pénétrance incomplète et par l'absence d'anomalies phénotypiques associées. La sévérité du phénotype (obésité modérée à sévère) est variable, soulignant le rôle de l'environnement et d'autres facteurs génétiques ayant un effet modulateur (25). Les sujets porteurs de mutations de *MC4R* sont généralement hétérozygotes, mais parfois les mutations sont identifiées chez de rares sujets homozygotes ou hétérozygotes composites, chez qui le phénotype est alors plus sévère (26, 27). Le phénotype des sujets porteurs de mutations de *MC4R* est difficile à déterminer de façon précise, en dehors de la survenue d'une obésité à début précoce.

Quelques études ont suggéré l'existence d'une augmentation de la densité minérale osseuse et de la croissance staturale en cas de mutation du gène *MC4R* (26). L'élévation de la densité minérale osseuse pourrait être en rapport avec le rôle proposé de *MC4R* dans le remodelage osseux. Les enfants porteurs de mutations de *MC4R* ont une hyperphagie marquée qui diminue avec l'âge. Cependant, l'association entre des troubles du comportement alimentaire de type « binge eating » et les mutations de *MC4R* (28) n'a pas été confirmée (25, 29).

MC3R a lui aussi été impliqué dans l'obésité. Son invalidation chez la souris entraîne un tableau d'obésité avec augmentation de la masse grasse et diminution de la masse maigre malgré une hypophagie relative (30). Chez l'homme, le rôle des mutations de *MC3R* reste actuellement discuté. Quelques mutations avec changement d'acides aminés dans le récepteur ont été décrites dans un groupe de sujets obèses (31), mais leur fréquence n'est pas significativement différente de celle retrouvée dans les populations témoins (32). Aucun phénotype spécifique de la présence de telles mutations n'a été mis en évidence.

IV. - OBÉSITÉS SYNDROMIQUES

L'obésité syndromique est définie par l'association d'une obésité et d'autres signes cliniques (syndrome). L'obésité est un phénotype clinique associé à de nombreux syndromes génétiques rares. Il y a plus d'une trentaine de syndromes d'origine génétique dans lesquels les patients présentent une obésité de développement précoce associée à un retard mental, une dysmorphie, des anomalies du développement ou neurosensorielles, ou encore des atteintes endocriniennes (33). Une base de données nommée OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>), ainsi que la base des maladies rares ORPHANET (<http://www.orpha.net/consor/cgibin/index.php?lng=FR>), les répertorient et permettent d'accéder à la description clinique de ces maladies. Nous donnons ici quelques exemples de ces syndromes (Tableau II).

A) Association d'une obésité et d'un retard mental

Le syndrome de Prader-Willi (SPW)

Le SPW, dont la fréquence se situe entre 1/15 000 à 1/25 000 naissances, est l'un des syndromes reliés à l'obésité les plus connus. Il est caractérisé par une hypotonie néonatale, une obésité avec des troubles du comportement alimentaire (hyperphagie, impulsivité alimentaire sévère), des anomalies endocriniennes (déficit en hormone de croissance, hypogonadisme), un retard mental, des difficultés d'apprentissage ou des troubles du comportement et des traits dysmorphiques (visage allongé, yeux en amande, nez fin, lèvre supérieure fine, bouche en V inversé) (33).

Ce syndrome est dû à l'absence fonctionnelle ou physique du segment chromosomique 15q11-q13 d'origine paternelle. Trois mécanismes génétiques sont décrits :

Tableau II - Signes cliniques et anomalies génétiques impliquées dans les principaux syndromes génétiques rares avec obésité.

Syndrome	Signes associés à l'obésité	Génétique
Prader-Willi	Hypotonie néonatale, retard mental, hyperphagie, dysmorphie faciale, retard statural, hypogonadisme	Région 15q11-q13 d'origine paternelle (microdélétion, disomie maternelle, défaut d'empreinte ou translocation réciproque)
Bardet-Biedl	Retard mental, dystrophie rétinienne, polydactylie, hypogonadisme, atteinte rénale	Gènes BBS1-BBS15*
Cohen	Dystrophie rétinienne, dysmorphie, microcéphalie, retard mental, neutropénie	Autosomique récessif Gène <i>COH1</i> (chr 8q22-q23)
Alström	Dystrophie rétinienne, surdité de perception, cardiomyopathie dilatée, atteinte rénale, atteinte pulmonaire, atteinte hépatique	Autosomique récessif Gène <i>ALMS1</i> (chr 2p13-p14)
X fragile	Déficit intellectuel modéré à sévère, hyperactivité, dysmorphie faciale, macro-orchidie post-pubertaire	Dominant lié à l'X Gène <i>FMRI</i> (Xq27.3)
Borjeson-Forssman-Lehmann	Retard mental sévère, hypotonie, microcéphalie, dysmorphie faciale, hypogonadisme, épilepsie	Récessif lié à l'X Gène <i>PHF6</i> (Xq26-q27)
Ostéodystrophie d'Albright (pseudo-hypoparathyroïdie de type 1a)	Dysmorphie faciale, brachymétopie et brachymétopie, retard psychomoteur variable, tableau de résistance hormonale (hypocalcémie, hypothyroïdie, retard pubertaire)	Autosomique dominant Mutations de la sous-unité α -activatrice associée à la protéine G

* BBS1 (11q13) ; BBS2 (16q21) ; BBS3 (3p12-p13) ; BBS4 (15q22.3-q23) ; BBS5 (2q31) ; BBS6 (MKKS, 20p12) ; BBS7 (4q27) ; BBS8 (TTC8, 14q32.11) ; BBS9 (PTHB1, 7p14) ; BBS10 (12q) ; BBS11 (TRIM32, 9q33.1) ; BBS12 (4q27) ; BBS13 (MKS1, 17q23) ; BBS14 (CEP290, 12q21.3) ; BBS15 (2p15).

microdélétion *de novo* (70 % des cas), disomie uniparentale maternelle (29 %), défaut d'empreinte ou très rares translocations réciproques (1 %) (34). Au moins 5 gènes, localisés dans cette région chromosomique et exprimés dans l'hypothalamus, ont été identifiés et codent pour différentes protéines dont les fonctions ne sont pas complètement décrites : *MRKN3* (*makorin 3*), *MAGEL2* (*MAGE-like 2*), *NDN* (*neclin*), *NPAP1* (*nuclear pore associated protein 1*), *SNURF-SNRPN* (*SNRPN upstream reading frame - small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) (35, 36). Il est probable que plusieurs gènes soient affectés, ce qui expliquerait le phénotype multiple des sujets atteints de SPW. Les gènes affectés codent, par exemple, pour de petites protéines des ribosomes, des protéines en « doigt de zinc », impliquées dans la transcription des gènes (ZNF127AS, PAR5, PARSN, IPW, et PAR1), et la necline, protéine impliquée dans la croissance axonale.

Des anomalies hormonales ont été observées dans le SPW, comme une synthèse excessive de ghréline, qui augmente l'appétit par activation des neurones hypothalamiques à neuropeptide Y (37). Toutefois, les mécanismes génétiques précis amenant à l'apparition d'une obésité dans le SPW sont encore actuellement à définir. Schaaf *et al.* ont mis en évidence des mutations tronquantes de l'allèle paternel du gène *MAGEL2*, gène compris dans le domaine SPW, chez 4 individus présentant des troubles

autistiques, un retard de développement ou une déficience intellectuelle et des signes cliniques de SPW de degré variable (hypotonie néonatale, obésité sévère à début précoce, hypogonadisme, défaut d'articulation du langage). *MAGEL2* pourrait donc être un nouveau gène causant des désordres complexes d'autisme, et la perte de fonction de *MAGEL2* pourrait contribuer à différents aspects du phénotype du SPW (36).

L'ostéodystrophie héréditaire d'Albright

Également connu sous le nom de pseudohypoparathyroïdie de type 1A, ce syndrome est un exemple de maladie autosomique dominante transmise par la mère. Elle est caractérisée par une obésité précoce, une petite taille, une brachymétopie et une brachymétopie, des malformations du crâne et de la face (faciès lunaire, hypertélorisme) et un retard psychomoteur variable (33). Ce syndrome associe une résistance à diverses hormones, dont une résistance à l'action de la parathormone, une hypothyroïdie et un retard pubertaire. Une mutation située dans le gène *GNAS1* a été identifiée. Ce gène code pour la sous-unité α -activatrice de la protéine Gs, une sous-unité importante des récepteurs membranaires couplés aux protéines G. Certaines de ces protéines sont susceptibles d'être impliquées dans les circuits hypothalamiques qui contrôlent le bilan énergétique.

Le syndrome de Cohen

Dans ce syndrome, l'obésité débute dans l'enfance (vers l'âge de 10 ans), est le plus souvent tronculaire, et s'associe à un retard mental léger à modéré, une dystrophie rétinienne, un retard statural, une hypotonie néonatale et infantile, un comportement sympathique, avenant, des anomalies cranio-faciales caractéristiques (incisives centrales de grande taille, philtrum court, bouche ouverte), des anomalies des extrémités (pieds et mains fins, doigts et orteils longs et fuselés, hyperlaxité articulaire), une neutropénie inconstante et des anomalies endocriniennes (hypogonadisme, retard statural) (33). Ce syndrome est de transmission autosomique récessive, lié à une mutation du gène *COH1* (8q22-q23) codant pour une protéine transmembranaire ubiquitaire ayant un rôle dans le trafic intracellulaire.

Le syndrome de Borjeson-Forssman-Lehman

Ce syndrome associe une obésité généralisée, un retard mental sévère, une hypotonie, une épilepsie, une microcéphalie avec dysmorphie faciale, des grandes oreilles, une petite taille, une cyphose et un cubitus valgus, un hypogonadisme et un retard pubertaire. Chez les hommes, il existe des anomalies des organes génitaux externes (micropénis, atrophie testiculaire) et une gynécomastie. Le mode de transmission est récessif lié au chromosome X, et le gène a été localisé en Xq26-q27. Des mutations du gène *PHF6* ont été retrouvées dans différentes familles (33). Ce gène en doigt de zinc a une fonction inconnue mais pourrait avoir un rôle dans la transcription génique.

Le syndrome MEHMO

Il s'agit d'une maladie liée à l'X caractérisée par un retard mental, une épilepsie, une microcéphalie, une obésité et un hypogonadisme (MEHMO : *Mental retardation, Epileptic seizures, Hypogenitalism, Microcephaly and Obesity*). Le locus a été identifié en Xp21.1-p22.1 (33).

Le syndrome de l'X fragile

Ce syndrome affecte des garçons et se caractérise par une obésité sévère avec hyperphagie associée à un retard mental modéré à sévère, des troubles du comportement avec hyperactivité, une dysmorphie (visage étroit et allongé, des oreilles et un front proéminents), un hypogonadisme ou un retard pubertaire, et un macro-orchidisme après la puberté. Lié à l'X, il est causé par une expansion de la répétition du trinucléotide CGG (> 200) dans la région promotrice du gène *FMRI* (*fragile X mental retardation 1*). La méthylation variable de cette région promotrice conduit au déficit ou à l'absence de la protéine FMRI, protéine de liaison de l'ARN qui contrôle la synthèse protéique et d'autres voies de la signalisation dendritique (38).

Le syndrome de Smith Magenis

L'obésité est ici associée à un retard statural, un syndrome dysmorphique (brachycéphalie, faciès large

et plat, front bombé, fentes palpébrales inclinées vers le haut, bouche en chapeau de gendarme, lèvres épaisses, philtrum court, oreilles mal ourlées), des anomalies du comportement et du sommeil (inversion du rythme) et des anomalies ophtalmologiques (strabisme, myopie). Ce syndrome est lié à une microdélétion dans la région 17p11.2, qui peut être détectée par des techniques de cytogénétique (FISH, *fluorescent in situ hybridization*). Cette région contient plusieurs gènes dont les fonctions sont inconnues.

La disomie uniparentale du chromosome 14

Ce syndrome associe une obésité moins sévère que dans le SPW, un retard psychomoteur modéré et une puberté précoce. L'histoire néonatale est caractérisée par un retard de croissance intra-utérin et une hypotonie avec difficultés alimentaires néonatales (33). Le gène *DLK1* (*delta drosophila homolog-like 1*), impliqué dans la différenciation adipocytaire, serait à l'origine de cette pathologie.

D'autres syndromes dont l'origine génétique est inconnue sont également décrits, comme le **syndrome de Biemond**, qui comporte une obésité généralisée, un retard mental, un colobome irien, des anomalies des extrémités (mains courtes, brachy- et polydactylie, nystagmus et strabisme). Sur le plan sexuel, il existe chez l'homme des anomalies des organes génitaux externes (micropénis, hypospadias, épispadias, verge coudée, atrophie testiculaire et cryptorchidie).

B) Association d'une obésité et d'anomalies ophtalmologiques

Le syndrome de Bardet-Biedl (*Bardet-Biedl syndrome, BBS*)

Le BBS se caractérise par, outre l'obésité sévère à début précoce, une dystrophie rétinienne, une polydactylie, des anomalies rénales, un hypogonadisme et des difficultés d'apprentissage. Son mode de transmission est un objet de controverse. S'il est le plus souvent un syndrome de transmission autosomique récessive, il a été montré que les manifestations cliniques de certaines formes de BBS étaient liées à des mutations récessives sur un des loci impliqués dans le BBS en association avec une ou plusieurs mutations localisées sur d'autres loci (transmission tri- ou tétra-allélique), mais ce mode de transmission ne serait présent que dans quelques familles (39, 40).

Au moins 15 gènes différents sont impliqués dans le BBS, tous liés au fonctionnement des cils primaires (41). Le concept de ciliopathie (maladie des cils primaires) a donc été introduit. Les cellules ciliées sont impliquées dans le développement des mammifères, contribuant notamment à la symétrie droite/gauche, et permettent de transmettre des messages de signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule. On comprend que des dysfonctionnements de ces processus mettant en jeu les cellules ciliées puissent contribuer à des altérations des épithéliums pigmentaires essentiels à la vision et aux anomalies de certains organes comme le rein.

Les mécanismes précis menant à l'obésité dans le BBS sont, cependant, encore mal compris. Il a été montré qu'un cil primaire est présent dans le préadipocyte, que les protéines BBS10 et BBS12 y sont présentes et que l'inhibition de leur expression induit des modifications de l'adipogenèse, suggérant un rôle important du tissu adipeux dans le développement de l'obésité dans ce syndrome (42). Les protéines BBS semblent aussi impliquées dans le signal du récepteur de la leptine dans l'hypothalamus, et une altération de ce signal pourrait être à l'origine du déséquilibre de la balance énergétique dans le BBS (43).

Le syndrome d'Alström

Il s'agit d'une maladie rare autosomique récessive qui est caractérisée par une obésité précoce, une dystrophie rétinienne, une surdité de perception, un diabète de type 2, une insuffisance rénale et cardiaque (cardiomyopathie dilatée). D'autres manifestations cliniques sont parfois observées, incluant un acanthosis nigricans, une alopecie, une petite taille, une cyphoscoliose ou une cataracte (33). Sur le plan hormonal, il existe parfois une hypothyroïdie, un hypogonadisme, un déficit en hormone de croissance, un diabète insipide ou un hyperinsulinisme. Le gène *ALMS1*, localisé sur le chromosome 2p13-p14, code pour

une protéine d'expression ubiquitaire mais de fonction inconnue. Du fait de sa localisation particulière dans le centrosome et le corps ciliaire, il a également été suggéré que le syndrome d'Alstrom, comme le BBS, fasse partie des ciliopathies (44).

V. - CONCLUSION

La recherche d'une origine génétique doit être systématique devant toute obésité chez un enfant ou un adulte présentant ou ayant présenté une obésité précoce et massive et/ou associée à un retard mental, un syndrome dysmorphique ou polymalformatif, des anomalies neurosensorielles (anomalies ophtalmologiques ou surdité) et/ou des anomalies hypothalamo-hypophysaires.

L'interrogatoire et l'examen clinique doivent être approfondis à la recherche d'une dysmorphie, d'anomalies du développement, d'un syndrome malformatif, d'anomalies endocriniennes. Le diagnostic génétique doit être confié à des spécialistes : généticiens cliniciens ou membres du Centre de référence Maladies Rares spécialisé dans les maladies rares avec obésité (<http://www.chu-toulouse.fr/-centre-de-referance-du-syndrome-de-892->).

Conflit d'intérêt : aucun.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Farooqi IS. Genetic aspects of severe childhood obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006 ; 3 (Suppl 4) : 528-36.
- (2) Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997 ; 387 : 903-8.
- (3) Strosberg AD, Issa T. The involvement of leptin in humans revealed by mutations in leptin and leptin receptor genes. *Trends Pharmacol Sci* 1999 ; 20 : 227-30.
- (4) Fatima W, Shahid A, Imran M, Marzoor J, Hasnain S, Rana S, Mahmood S. Leptin deficiency and *leptin* gene mutations in obese children from Pakistan. *Int J Pediatr Obes* 2011 ; 6 : 419-27.
- (5) Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D, Gourmelin M, Dina C, Chambaz J, Lacorte JM, Basdevant A, Bougnères P, Lebouc Y, Froguel P, Guy-Grand B. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998 ; 392 : 398-401.
- (6) Farooqi IS, Wangersteen T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM, Lank E, Bottomley B, Lopez-Fernandez J, Ferraz-Amaro I, Dattani MT, Ercan O, Myhre AG, Retterstol L, Stanhope R, Edge JA, McKenzie S, Lessan N, Ghodsi M, De Rosa V, Perna F, Fontana S, Barroso I, Undlien DE, O'Rahilly S. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007 ; 356 : 237-47.
- (7) Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE, Grüters A. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 ; 88 : 4633-40.
- (8) Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT, Hutton JC, O'Rahilly S. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997 ; 16 : 303-6.
- (9) Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, Whitby R, Liang L, Cohen P, Bhasin S, Krauss RM, Veldhuis JD, Wagner AJ, DePaoli AM, McCann SM, Wong ML. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 ; 101 : 4531-6.
- (10) Fischer-Posovszky P, von Schnurbein J, Moepps B, Lahr G, Strauss G, Barth TF, Kassubek J, Mühleder H, Möller P, Debatin KM, Gierschik P, Wabitsch M. A new missense mutation in the leptin gene causes mild obesity and hypogonadism without affecting T cell responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 2010 ; 95 : 2896-40.
- (11) Nizard J, Dommergues M, Clément K. Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation. *N Engl J Med* 2012 ; 366 : 1064-5.
- (12) Clément K, Dubern B, Mencarelli M, Czernichow P, Ito S, Wakamatsu K, Barsh GS, Vaisse C, Leger J. Unexpected endocrine features and normal pigmentation in a young adult patient carrying a novel homozygous mutation in the POMC gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2008 ; 93 : 4955-62.
- (13) Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray GJ, Holst JJ, Brubaker PL, Corvol P, Polonsky KS, Ostrega D, Becker KL, Bertagna X, Hutton JC, White A, Dattani MT, Hussain K, Middleton SJ, Nicole TM, Milla PJ, Lindley KJ, O'Rahilly S. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 2003 ; 112 : 1550-60.
- (14) Frank GR, Fox J, Candela N, Jovanovic Z, Bochukova E, Levine J, Papenhausen PR, O'Rahilly S, Farooqi IS. Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Mol Genet Metab* 2013 ; 110 : 191-4.

- (15) Holder JL Jr, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 2000 ; 9 : 101-8.
- (16) Izumi K, Housam R, Kapadia C, Stallings VA, Medne L, Shaikh TH, Kutbaoui BM, Zackai EH, Grimberg A. Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving SIM1 and Prader-Willi syndrome-like features. *Am J Med Genet* 2013 ; 161 (12) : 3137-43.
- (17) Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Lévy E, Mitchell GA, Himmels-Hagen J, Fan CM. Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 1465-73.
- (18) Zegers D, Beckers S, Hendrickx R, Van Camp JK, de Craemer V, Verrijken A, Van Hoornebeek K, Verhulst SL, Rooman RP, Desager KN, Massa G, Van Gaal LF, Van Hul W. Mutation screen of the SIM1 gene in pediatric patients with early-onset obesity. *Int J Obes* 2014 ; 38 (7) : 1000-4.
- (19) Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S, O'Rahilly S, Farooqi IS. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 2004 ; 7 : 1187-9.
- (20) Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR, Tecott LH, Reichardt LF. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 2003 ; 6 : 736-42.
- (21) Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, Andersson J, et al. A novel highly-penetrant form of obesity due to microdeletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 2010 ; 463 : 671-5.
- (22) El-Sayed Moustapha JS, Eleftherohorinou H, de Smith AJ, Andersson-Assarsson JC, Couto Alves A, Hadjigeorgiou E, Walters RG, Asher JE, Bottolo L, Buxton JL, Sladek R, Meyre D, Dina C, Visvikis-Siest S, Jacobson P, Sjöström L, Carlsson LM, Walley A, Falchi M, Froguel P, Blakemore AI, Coin LJ. Novel association approach for variable number tandem repeats (VNTRs) identifies *DOCK5* as a susceptibility gene for severe obesity. *Hum Mol Genet* 2012 ; 21 : 3727-38.
- (23) Huszar D, Lynch CA, Fairchild-Huntress V, Dunmore JH, Fang Q, Berkemeier LR, Gu W, Kesterson RA, Boston BA, Cone RD, Smith FJ, Campfield LA, Burn P, Lee F. Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* 1997 ; 88 : 131-41.
- (24) Hinney A, Volckmar AL, Knoll N. Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013 ; 114 : 147-91.
- (25) Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S, Bertrais S, Hercberg S, Basdevant A, Clement K, Vaisse C. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006 ; 91 : 1811-8.
- (26) Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1085-95.
- (27) Dubern B, Bisbis S, Talbaoui H, Le Beyec J, Tounian P, Lacorte JM, Clément K. Homozygous null mutation of the melanocortin-4 receptor and severe early-onset obesity. *J Pediatr* 2007 ; 150 : 613-7.
- (28) Branson R, Potoczna N, Kral JC, Lentjes KU, Hoehe MR, Horber FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 2003 ; 348 : 1096-103.
- (29) Valette M, Poirou C, Kesse-Guyot E, Bellisle F, Carette C, Le Beyec J, Hercberg S, Clément K, Czernichow S. Association between melanocortin-4 receptor mutations and eating behaviors in obese patients: a case-control study. *Int J Obes* 2014 ; 38 (6) : 883-5.
- (30) Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H, Rosenblum CI, Vongs A, Feng Y, Cao L, Metzger JM, Strack AM, Camacho RE, Mellin TN, Nunes CN, Min W, Fisher J, Copal-Truter S, Macintyre DE, Chen HY, Van der Ploeg LH. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 97-102.
- (31) Mencarelli M, Walker GE, Maestrini S, Alberti L, Verti B, Brunani A, Petroni ML, Tagliaferri M, Liuzzi A, Di Blasio AM. Sporadic mutations in melanocortin receptor 3 in morbid obese individuals. *Eur J Hum Genet* 2008 ; 16 : 581-6.
- (32) Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, Kane JP, Malloy MJ, Pullinger CR, Bromberg Y, Pennacchio LA, Dent R, McPherson R, Ahituv N, Vaisse C. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 1140-7.
- (33) Goldstone AP, Beales PL. Genetic obesity syndromes. *Front Horm Res* 2008 ; 36 : 37-60.
- (34) Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet* 2008 ; 146 : 2041-52.
- (35) Horsthemke B, Buiting K. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 2006 ; 113 : 292-9.
- (36) Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Cripp KW, Zhang B, Peters BA, McElwain MA, Drmanac R, Beaudet AL, Caskey CT, Yang Y. Truncating mutations of *MAGE2* cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet* 2013 ; 45 : 1405-9.
- (37) Cummings DE, Clément K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS, Schwartz MW, Basdevant A, Weigle DS. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 2002 ; 8 : 643-4.
- (38) McLennan Y, Polussa J, Tassone F, Hagerman R. Fragile X syndrome. *Curr Genomics* 2011 ; 12 : 216-24.
- (39) Katsanis N, Lupski JR, Beales PL. Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 2001 ; 10 : 2293-9.
- (40) Abu-Safieh L, Al-Anazi S, Al-Abdi L, Hashem M, Alkuraya H, Alam M, Sirelkhatim MO, Al-Hassnan Z, Alkuraya B, Mohamed JY, Al-Salem A, Alrashed M, Fageih E, Softah A, Al-Hashem A, Wali S, Rahbeeni Z, Alsayed M, Khan AO, Al-Gazali L, Tascner PE, Al-Hazzaa S, Alkuraya FS. In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 2012 ; 20 : 420-7.
- (41) Zaghoul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 2009 ; 119 : 428-37.
- (42) Marion V, Stoetzel C, Schlicht D, Messadeq N, Koch M, Flori E, Danse JM, Mandel JL, Dollfus H. Transient ciliogenesis involving Bardet-Biedl syndrome proteins is a fundamental characteristic of adipogenic differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 1820-5.
- (43) Seo S, Guo DF, Bugge K, Morgan DA, Rahmouni K, Sheffield VC. Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : 1323-31.
- (44) Marshall JD, Hinman EG, Collin GB, Beck S, Cerqueira R, Maffei P, Milan G, Zhang W, Wilson DI, Hearn T, Tavares P, Vettor R, Veronesi C, Martin M, So WV, Nishina PM, Naggert JK. Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alström syndrome. *Hum Mutat* 2007 ; 28 : 1114-23.

Revue 4: Obesity.

H Huvenne, P Tounian, K Clément, B Dubern. In: Weiss RE, Refetoff S. Genetic diagnosis of endocrine disorders, Second edition. Elsevier 2015. En cours de publication.

Chapter 5:

Title: Obesity

H Huvenne ^{1,2}, P Tounian ^{2,3}, K Clément ^{2,4}, B Dubern ^{2,3}

Affiliation:

1- Saint-Vincent de Paul Hospital, GHICL, Department of pediatrics, 59000 Lille, France

2- Institute of cardiometabolisme and Nutrition (ICAN), UMRS INSERM/UPMC U1166 Nutriomique, University Pierre et Marie Curie-Paris 6, Pitie-Salpêtrière hospital, 75013 Paris France

3- Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Nutrition and Gastroenterology department, Armand-Trousseau hospital, 75012 Paris, France.

4- Assistance Publique Hôpitaux de Paris, Nutrition department, Pitié-Salpêtrière hospital, boulevard de l'hôpital, 75013 Paris, France

Corresponding author:

Karine Clément

Address: Institute of Cardiometabolisme and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière hospital, boulevard de l'hôpital, 75013 PARIS, FRANCE

Email: karine.clement@psl.aphp.fr

Telephone: 33 (0) 14234 8936

Fax: 33 (0) 4051 00 57

Running title: genetics of obesity

Summary (150 words)

Obesity, defined as an excess fat mass, results from individual genetic and biological susceptibilities in response to the current weight-gain promoting environment. There is thus a synergistic relationship between genes and environment. Depending on the genes involved, different clinical situations are described: **a) Monogenic obesity** defined as rare and severe early-onset obesity associated with endocrine disorders. They are mainly due to autosomic recessive mutations in genes of the leptin-melanocortin axis. In some cases such as leptin deficiency, specific treatments are efficient, **b) Melanocortin 4 receptor-linked obesity** characterized by the variable severity of obesity and the absence of additional phenotypes. They are involved in 2-3% of cases and eventually may benefit from new developed drugs (MC4R agonists); **c) Syndromic obesity** where patients are clinically obese, and additionally distinguished by mental retardation, dysmorphic features, and organ-specific developmental abnormalities. No specific treatments are recommended except for hormonal substitution if necessary (growth hormone or gonadotrope deficiency).

Key words: obesity, genetics, melanocortins, leptin, melanocortin 4 receptor, proopiomelanocortin

I. Introduction

1. Background, incidence, prevalence

According to the World Health Organization (<http://www.who.int>), there are an estimated 1.5 billion adults who are overweight (body mass index (BMI) $> 25 \text{ kg/m}^2$), and 500 millions of these are considered clinically obese (BMI $> 30 \text{ kg/m}^2$). The worldwide prevalence of childhood overweight and obesity also increased from 4.2% in 1990 to 6.7% in 2010, but has stabilized in recent years [1]. Obesity, defined by an excess fat mass having an impact on health, is characterized by a wide phenotype heterogeneity. There are also individual differences in progression of weight (i.e. different trajectories) and risk of associated comorbidities. It is now well accepted that the development of obesity stems from the interaction of multiple environmental factors (such as overeating and/or reduction in physical activity) with genetic factors. Numerous epidemiological and intervention studies carried out in different cohorts (twins brought up together or separately, adopted children, nuclear families, etc.) have recognized the role of individual genetic and biological susceptibilities in response to the current weight-gain promoting environment [2]. The severity of obesity will be thus determined by the impact of environment on the genetic background of each individual.

While obesity was first thought to be a disease that obeys the rules of Mendelian inheritance, new technologies paint a far more complicated picture of this complex disorder. Obesity due to a single, naturally occurring dysfunctional gene (i.e. monogenic obesity) is both severe and rare (from $<1\%$ to 2-3% depending of gene) when compared to the more common forms in which numerous genes make minor contributions in determining phenotypic traits in large populations (i.e. polygenic obesities) [3].

2. Clinical presentation

Several clinical presentations are described in obesity depending on the involved genes:

a) Monogenic obesity described as rare and severe early-onset obesity associated with endocrine disorders. There are mainly due to mutations in genes of the leptin-melanocortin axis involved in food intake regulation (genes of leptin (*LEP*) and its receptor (*LEPR*), proopiomelanocortin (*POMC*), proconvertase 1(*PC1*)...). New mutations were identified in the last years.

b) Melanocortin 4 receptor (*MC4R*) linked obesity characterized by a variable severity of obesity and the absence of very noticeable phenotype. They are responsible for 2-3% of obesity in adults and children.

c) Syndromic obesity corresponding to obesity associated with others genetic syndromes, as reviewed elsewhere [4]. Patients are clinically obese, and additionally distinguished by mental retardation, dysmorphic features, and organ-specific developmental abnormalities.

d) Polygenic obesity, which is the more common clinical situation (>95% of cases). Here each susceptibility gene, taken individually, would only have a slight effect on weight. The cumulative contribution of these genes would become significant only in an “obesogenic lifestyle” (such as overfeeding, sedentariness, stress, and others.). This part will not be developed in this chapter.

II. Genetic pathophysiology

1. Monogenic obesity

At least 200 cases of human obesity have been associated with a single gene mutation. These gene mutations all lie in an increased number of genes, but the monogenic forms of obesity remain rare in the obese population [5]. Unlike syndromic obesity, the reason why excess body fat mass develops in these subjects is quite well understood since the genetic anomalies affect key factors related to the leptin and the melanocortin pathways well known to be

pivotal in energy balance regulation (Figure 1). Most of the severe forms of childhood obesity are due to single gene mutations; new ones are regularly discovered in different families.

The hypothalamic leptin/melanocortin pathway is activated following the systemic release of the adipokine LEP and its subsequent interaction with its receptor LEPR located on the surface of neurons of the arcuate nucleus. The downstream signals that regulate satiety and energy homeostasis are then propagated via POMC, cocaine-and-amphetamine-related transcript (CART), and the melanocortin system [6]. While POMC / CART neurons synthesize the anorectic peptide α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), a separate group of neurons express the orexigenic neuropeptide Y (NPY) and the agouti-related protein (AGRP), which acts as a potent inhibitor of melanocortin 3 (MC3R) and MC4R receptors. The nature of the POMC derived peptides depends on the type of endoproteolytic enzyme present in the specific brain region. In the anterior pituitary the presence of the PC1 enzyme produces ACTH and β - lipotropin peptides, while the combined presence of PC1 and PC2 in the hypothalamus controls the production of α -, β -, γ -MSH and β -endorphins.

Mutations in human genes coding for LEP [7, 8, 9], LEPR [10], POMC [11] and PC1 [12, 13] lead to severe obesity occurring soon after birth, with generally complete penetrance and autosomal-recessive transmission (Table 1). Patients carrying mutations show a rapid and dramatic increase in weight, as illustrated by the weight curve of LEPR deficient subjects (Figure 2). Evaluating body composition in some *LEPR* mutation carriers show a large amount of total body fat mass (>50%) but resting energy expenditure remains related to the level of body corpulence. Feeding behavior is characterized by major hyperphagia and ravenous hunger [14]. Surprisingly, a LEP deficient Austrian girl has been recently described with more moderate obesity (BMI 31.5 kg/m²), despite an increased consumption of calories in a test meal [15]. The phenotype was explained by extremely low daily calorie intake. Even if one takes into account a substantial underreporting, this observation might suggest that

despite leptin deficiency, it was possible to control energy intake and thus to prevent extreme obesity. In that specific case the parents' role was described as determinant. They provided a favorable environment by vigorously controlling the patient's eating behavior from early infancy onward [16]. A further explanation might be related to the different genetic backgrounds of different subjects with LEP or LEPR deficiency. However, despite this particular case, severe early-onset obesity with major hyperphagia is recognized as a main clinical presentation of LEP or LEPR deficiency.

Associated to severe early-onset obesity with major hyperphagia, hypogonadotrophic hypogonadism and thyrotropic insufficiency complete the patient phenotype. Insufficient somatotrophic secretion, leading to moderate growth delay, is also described in some patients with a *LEPR* mutation. In LEP deficient subjects, it was described a high rate of infection, particularly recurrent respiratory tract infections, associated with a deficiency in T cell number and function [17, 18, 19]. In individuals with leptin deficiency either due to *LEP* or *LEPR* mutations, no pubertal development was observed while in others there is evidence of spontaneous pubertal development suggesting a recovery of hormonal functions with time. For example, the follow-up of the initially described LEPR deficient sisters revealed the normalization of thyroid mild dysfunction at adult age and a normal spontaneous pregnancy [20].

Measurement of circulating leptin may help for the diagnosis in some cases: it is undetectable in *LEP* mutation carriers. However leptin levels can be correlated to fat mass or extremely elevated in *LEPR* mutation carriers [8, 10, 18]. Thus, *LEPR* gene screening might be considered in subjects with the association of severe obesity with endocrine dysfunctions such as hypogonadism but with leptin related to corpulence level [18].

Obese children with a complete POMC deficiency have ACTH deficiency, which can lead to acute adrenal insufficiency from birth. These children display a mild central hypothyroidism

that necessitates hormonal replacement [11] and sometimes alterations in the somatotrophic and gonadotrophic axes [21]. The reason of these endocrine anomalies is unknown even if the role of melanocortin peptides in influencing the hypothalamic pituitary axis has been proposed. Children have inconstantly ginger hair due to the absence of α MSH, which activates the peripheral melanocortin receptor type 1 (MC1R) (involved in pigmentation). Several observations, suggest that the skin and hair phenotype might vary according to the ethnic origin of *POMC* mutation carriers [21, 22, 23]. The modifications in color hair, adrenal function and body weight are consistent with the lack of POMC-derived ligands for the melanocortin receptors MC1R, MC2R and MC4R respectively.

Patients carriers of a rare mutation in the proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (PCSK1) gene leading to proconvertase 1 (PC1) deficiency, have, in addition to severe obesity, postprandial hypoglycemic malaises, fertility disorders due to hypogonadotrophic hypogonadism, central hypothyroidism and adrenal insufficiency secondary to lack of POMC maturation. The delayed postprandial malaises are explained by the accumulation of proinsulin through lack of PC1, which is involved in the synthesis of mature insulin from proinsulin. The absence of POMC maturation due to *PCSK1* mutation causes a dysfunction in the melanocortin pathway that explains the obese phenotype [12]. In patients suffering from a congenital PC1 deficiency, severe and rebel diarrhea due to defect in intestinal absorption is described, secondary to lack in mature GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) [13]. The processing of prohormones, progastrin and proglucagon, is altered, explaining, at least in part, the intestinal phenotype and also suggesting a role for PC1 in absorptive functions in the intestine. Recently, in a proband who was compound heterozygous for a maternally inherited frameshift mutation and a paternally inherited 474kb (kilobase) deletion that encompasses *PCSK1* and in 13 children with total PC1 deficiency, persistent polydipsia and polyuria were noted, as the disease progressed, due to the development of central diabetes insipidus

improved by oral desmopressin. These observations suggest that PCSK1 may be involved in the full functioning or central sensing of osmolality in humans [24, 25]. Growth hormone deficiency was also noted in the 13 children with complete PC1 deficiency [25].

These studies have played an important part in confirming the critical role of the leptin and melanocortin pathways in controlling food intake and energy expenditure as well as their strong implication in controlling endocrine pathways. Furthermore, these studies encouraged the pursuit of screens for genes encoding proteins acting both upstream and downstream of the G-protein coupled receptor MC4R factors (Table 1 and Figure 1). Several additional genes, implicated in the development of the hypothalamus and the central nervous system, have been found to cause monogenic obesity in humans. A deletion of the *SIM1* (*single-minded homolog 1*) gene, located on the 6q chromosome, secondary to a *de novo* translocation between 1p22.1 and 6q16.2 chromosomes, was identified in a girl with early-onset obesity (since first months of life) associated to hyperphagia and food impulsivity [26]. She had a rate of early weight gain comparable to the weight curve of *LEP* and *LEPR*-deficient children. Izumi et al. identify an interstitial 6q deletion including the *SIM1* gene in a subject with Prader-Willi-like features (neonatal hypotonia, dysmorphism, developmental delay, early-onset obesity, short stature, hypopituitarism) [27]. *SIM1* encodes a transcriptional factor implicated in the development of the hypothalamic paraventricular nucleus. It plays a role in the melanocortin signaling pathway and appears to regulate feeding rather than energy expenditure [28, 29]. The sequencing of the coding region of *SIM1*, in 2100 unrelated patients with severe, early-onset obesity and in 1680 unrelated population-based controls, identified 13 different heterozygous variants in 28 severely obese patients. Variants carriers exhibited severe obesity, increased ad libitum food intake at a test meal, normal basal metabolic rate and inconstantly neurobehavioral phenotype (impaired concentration, memory deficit, emotional lability or autistic spectrum behavior). Nine of the 13 variants significantly reduced the ability of *SIM1*

to activate a *SIM1*-responsive reporter gene. These mutations cosegregated with obesity in extended family studies with variable penetrance. Rare variants in *SIM1* should be considered in patients with hyperphagic early onset obesity associated or not to Prader-Willi-like syndrome features (including severe obesity, that start between 1 and 2 years of age) and/or in patients with associated neurobehavioral abnormalities (including emotional lability or autism-like behavior) [30, 31, 32].

A decreased expression of the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was found to regulate eating behavior [33]. BDNF, encoded by *NTRK2* gene (*neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2*) and its associated tyrosine kinase receptor (TRKB) are both expressed in the ventromedial hypothalamus. They have been attributed a role downstream of MC4R signaling implicated in feeding regulation [34]. A de novo heterozygous mutation in *NTRK2* gene was described in an 8-year-old boy with severe early onset obesity, mental retardation, developmental delay and anomalies of higher neurological functions like the impairment of early memory, learning and nociception [35]. Other mutations in *NTRK2* were found in patients with early-onset obesity and developmental delay, but their functional consequences and their implication in obesity are yet to demonstrate. *In vitro* studies of some but not all mutations have suggested that these mutations could impair hypothalamic-signaling processes [36].

Finally the contribution of copy number variants (CNVs) to complex disease susceptibility, such as severe obesity, has been the subject of debates in recent years. Variable number tandem repeats (VNTRs) constitute a relatively under-examined class of genomic variants in the context of complex disease. Rare CNVs have been shown to be responsible for severe highly penetrant forms of obesity, initially observed in 31 subjects who were heterozygous for deletions of at least 593 kb at 16p11.2 locus. In addition to obesity, these carriers presented with congenital malformations and/or developmental delay. The phenotype may result from

the haploinsufficiency of multiple genes that impact on pathways central to the development of obesity [37]. An investigation of a complex region on chromosome 8p21.2 encompassing the *DOCK5* (*dedicator of cytokinesis 5*) gene has shown a significant association of the *DOCK5* VNTRs with childhood and adult severe obesity [38]. More systematic investigation of the role of VNTRs in obesity had to be performed to study their relatively unexplored contribution to this disease and their potential link with the leptin/melanocortin pathway.

2. Melanocortin 4 and 3 receptor-linked obesities

The obesities linked to *MC4R* and *MC3R* mutations can be placed between the rare forms of monogenic obesity with complete penetrance and the polygenic forms of common obesity.

Considering the pivotal role of the melanocortin pathway in the control of food intake, the *MC4R* gene is a major candidate gene in human obesity (figure 1). Since 1998, its genetic evaluation revealed that *MC4R*-linked obesity is the most prevalent form of genetic obesity identified to date. It represents approximately 2 to 3% of childhood and adult obesity with currently 166 different mutations described in different populations (European, North American and Asian) [39, 40]. They include frameshift, inframe deletion nonsense and missense mutations located throughout the *MC4R* gene (Figure 3). The frequency of heterozygous for these mutations in (extremely) obese individuals cumulates to approximately 2-5% [40]. In addition, the frequency of such heterozygous carriers in non-obese controls or in the general population is about 10 fold lower than in the cohorts of obese patients [41, 42].

In contrast with rare monogenic obesities, even a meticulous clinical analysis does not easily detect obesity stemming from *MC4R* mutations because of the lack of additional obvious phenotypes. In families with *MC4R*-linked obesity, obesity tends to have an autosomal dominant mode of transmission, but the penetrance of the disease can be incomplete and the clinical expression variable (moderate to severe obesity) underlying the role of the

environment and other potentially modulating genetic factors [41, 42]. Homozygous or compound heterozygous carriers of *MC4R* mutations are very rare. Four carriers of homozygous null mutations in the *MC4R* gene have been detected [43, 44, 45] and as expected from a dominant condition, obesity is developed earlier in life and is more severe than for heterozygous carriers, but it does not display any additional unrelated phenotypes. In heterozygous *MC4R* mutations carriers, the onset and severity of obesity vary and are related to the severity of the functional alteration caused by the mutation.

Many authors agree on that *MC4R* mutations facilitate early onset obesity. *MC4R* mutations carriers display increased linear growth, in particular in the first five years of life [43] but appear to be taller as adults only in rare cases [41, 46, 47]. This trend is often observed in overweight and obese children. Assessment of body composition in these patients demonstrates increase in both fat and lean mass [48]. One study performed in English children with *MC4R* mutations, has suggested that bone mineral density and size increase [43]. This potential increase of bone density may be explained, at least in part, by a decrease in bone resorption, as illustrated by decreases in bone resorption markers in the serum of patients with *MC4R* homozygous and heterozygous mutations [49, 50]. Obese children carrying *MC4R* mutations have a marked hyperphagia that decreases with age, when compared to their siblings [48], while in both children and adults, no evidence has been found for a decreased metabolic rate in these patients. Meanwhile, the association between “binge eating” disorder and *MC4R* gene sequence changes [51] has not been confirmed [41, 52]. Adult *MC4R* mutation carriers do not have an increased prevalence of diabetes or other obesity complications [41]. In UK children, fasting insulinemia was found to be significantly elevated in *MC4R* mutation carriers, particularly before the age of 10 years when compared to age, sex and BMI matched control [43]. This hyperinsulinemia has not consistently been observed in children [44, 45] and in adults [41, 53]. Finally, with respect to endocrine function,

hypothalamo-pituitary axis and reproductive axis [43, 44, 45, 46] as well as thyroid function are normal in *MC4R* mutation carriers.

The role of *MC4R* mutations in cases of human obesity relies on two main arguments based on the frequency of *MC4R* mutations in different populations and their *in vitro* functional consequences. Firstly, *MC4R* mutations are more abundant in obese populations. Functional mutations have also been reported in non-obese subjects but to a significantly lesser frequency (<1%) [42]. Secondly, investigating the molecular mechanisms by which loss of function mutations in *MC4R* cause obesity have suggested a panel of functional anomalies: abnormal *MC4R* membrane expression, defect to the agonist response, and a disruption in the intracellular transport of this protein. Normally, after ligand binding, *MC4R* activation stimulates Gs protein, leading to a subsequent increase in cAMP levels; however, the production of intracellular cAMP in response to α MSH peptides demonstrated a broad heterogeneity in the activation of the different *MC4R* mutants in response to α MSH, ranging from normal or partial activation to a total absence in activation [39, 46]. The intracellular transport defect of the mutated receptor, by intracytoplasmic retention, has been described for the majority of *MC4R* mutations found in childhood obesity [54], but also in adults [41, 42]. This mechanism explains the impaired response to agonists. In addition, *MC4R* has a constitutive activity, meaning a basal activity not necessitating the presence of a ligand, for which agouti related peptide (AGRP) acts as an inverse agonist [55]. In the absence of the ligand, *MC4R* has an inhibitory action on food intake. The systematic study of basal activity of some mutations has shown that an alteration in this activity may be the only functional anomaly found, in particular for mutations located in the N-terminal extra-cytoplasmic part of the receptor [56]. A tonic satiety signal, provided by the constitutive activity of *MC4R* could be required in the long-term regulation of energy balance. It is accepted that *MC4R* mutations cause obesity by a haploinsufficiency mechanism rather than a dominant negative activity.

While the roles of homo and hetero-dimerization in G protein synthesis and maturation are emphasized, some dominant negative effects of *MC4R* mutations might not be excluded.

The *MC3R* has also been involved in obesity. *MC3R* deficient (*MC3R*^{-/-}) mice have increased fat mass, reduced lean mass and higher feed efficiency than wild-type littermates, despite being hypophagic and maintaining normal metabolic rates [57]. In humans, strong evidence of a causative role for *MC3R* mutations is still lacking. Some mutations, leading to amino-acid changes in the receptor, have been described in a group of 290 obese subjects [58] but the total prevalence of rare *MC3R* variants was not significantly different between cohorts of severely obese subjects and lean controls [59]. No specific phenotype of *MC3R* mutations has been identified.

3. Obesity syndromes

There are between 20-30 Mendelian disorders in which patients are clinically obese with additional phenotype as mental retardation, dysmorphic features, and organ-specific developmental abnormalities. These syndromes arise from discrete genetic defects or chromosomal abnormalities and are both autosomal and X-linked disorders. The most common and well-known disorders are Prader-Willi and Bardet-Biedl syndromes, but many others have been reported (table 2) [4]. The Online Mendelian Inheritance in Man database provides access to their clinical descriptions (OMIM; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>).

The Prader-Willi syndrome (PWS) (1 in 20000-25000 births) is characterized by obesity, hyperphagia, neonatal hypotonia, mental retardation, and hypogonadism. It is due to physical or functional absence of the paternal chromosomal segment 15q11-q13. Three genetic mechanisms are described: de novo microdeletion (70% of cases), uniparental maternal disomy (29%), imprinting defect or very rare reciprocal translocation (1%) [60]. At least 5 genes, located in the PWS chromosomal region and expressed in the hypothalamus, have been

identified. They encode for different proteins which functions are incompletely understood: *MRKN3* (*makorin 3*), *MAGEL2* (*MAGE-like 2*), *NDN* (*necdin*), *NPAP1* (*nuclear pore associated protein 1*), *SNURF-SNRPN* (*SNRPN upstream reading frame – small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N*) [61, 62]. The *SNURF-SNRPN* region encodes for several proteins implicated in the imprinting center or in alternative splicing. These genes are expressed in the hypothalamus and may be involved in common obesity. The *necdin* gene is implicated in axonal outgrowth. The *MAGEL2* gene encodes an ubiquitin ligase enhancer, which is required for endosomal protein recycling. Several other genes are probably affected and could explain the variability of PWS phenotype. But the exact genetic mechanisms leading to obesity are still to be defined [63]. The genetic basis of hyperphagia remains also undefined in part due to the fact that none of the currently available PWS mouse models have an obese phenotype [64]. One genetic candidate that may mediate the obese phenotype and disrupt the control of food intake is the gastric hormone ghrelin [65], via its regulation of hunger and stimulating growth factor hormone (GH) secretion [17]. Patients suffering from PWS have high ghrelin levels [65]. Ghrelin's implication in PWS is additionally reinforced by the positive findings that GH supplementation is capable of reversing several dysfunctional processes associated with PWS [66, 67]; however, in the absence of a suitable experimental model, identifying the genetic components of this syndrome is challenging. Even if the specific genes responsible for PWS phenotype are not still identified, understanding the molecular mechanism has improved the management of those children and their families. Schaaf et al. report four individuals with truncating mutations on the paternal allele of *MAGEL2*, a gene within the PWS domain. All four subjects had autism spectrum disorder, developmental delay or intellectual disability and a varying degree of clinical and behavioral features of PWS (neonatal hypotonia, severe early-onset obesity, hypogonadism, speech articulation defects). It suggests that *MAGEL2* may be a novel gene causing complex autism

spectrum disorder and that *MAGEL2* loss of function can contribute to several aspects of the PWS phenotype [62].

Bardet-Biedl syndrome (BBS) is characterized by obesity, retinal dystrophy (pigmentary retinopathy), malformed extremities (syndactily, polydactily), kidney diseases and eventually mental disabilities. It concerns 1 in 100000 births, with an increased prevalence in Arab and Bedouin populations (1 in 13500 births). BBS was first considered as a monogenic disease; however, large scale molecular screening in families revealed that BBS is associated with at least fifteen different chromosomal locations with several mutations identified within some of these locations in more than 80% of the affected families (*BBS1* on 11q13; *BBS2* on 16q21; *BBS3* on 3p12-p13; *BBS4* on 15q22.3-q23; *BBS5* on 2q31; *BBS6* on 20p12; *BBS7* on 4q27; *BBS8* on 14q32.11; *BBS9* on 7p14; *BBS10* on 12q; *BBS11* on 9q33.1; *BBS12* on 4q27; *BBS13* on 17q23; *BBS14* on 12q21.3 and *BBS15* on 2p15) [68, 69, 70, 71, 72]. While BBS was considered to be autosomal recessive, it has been hypothesized that the clinical symptoms of certain forms of BBS are due to recessive mutations on one of the *BBS* loci associated with one or several heterozygous mutation on another locus; this finding prompting for the first time the hypothesis of a tri- or tetra-allelic mode of transmission [68, 73, 74]. However, it seems that the tri- or tetra-allelic transmission is only present in few families. *BBS* genes encode for proteins that are involved in primary cilium function. For the *BBS6* loci, positional cloning identified the *MKKS* (*McKusick-Kaufman syndrome*) gene, which codes for a chaperone protein located in the basal body of primary cilium. Mutations identified in *MKKS* result in a shortened chaperone protein and represent 5-7% of all BBS cases; however, the links between *MKKS*, its eventual target proteins and the BBS clinical traits are largely unknown. Recently mutations in the locus *BBS10* encoding for *C12orf58*, a vertebrate-specific chaperone-like protein, have been described in 20% of subjects from various ethnic backgrounds [69]. Unlike *BBS6* and *BBS10*, the genes implicated in *BBS1*, *BBS2* and *BBS4*

are different from *MKKS* and *C12orf58* genes, but it is conceivable that they are encoding for protein substrates of these chaperones [75]. The E3 ubiquitin ligase *TRIM32* (*tripartite motif-containing protein-32*) was identified as the eleventh loci associated with BBS, suggesting that the list of genetic components for this syndrome may yet be incomplete [71]. For BBS13, mutations in *MKS1* (*Meckel syndrome-1*) gene have been implicated. Fascinating functional studies performed in single cell organisms have shown that certain *BBS* genes are specific to ciliated cells [76]. These cells have a role in mammalian development, where they contribute to right/left symmetry and enable the organs (heart, liver, lungs) to be correctly positioned within the biological system. Such dysfunction in the processes affecting the ciliated cells may contribute to alterations in pigmentary epithelia and to structural anomalies noted with certain organs like the kidney [77]. BBS is now defined as a ciliopathy (primary cilium dysfunction). But the precise mechanisms leading to obesity in BBS are still to understand [72]. However, obesity in BBS mice is associated with hyperleptinemia and leptin resistance. BBS proteins seem also to be required for LEPR signaling in the hypothalamus. *BBS2*^{-/-}, *BBS4*^{-/-} and *BBS6*^{-/-} mice are resistant to the action of leptin regardless of serum leptin levels and obesity. In addition, the activation of the hypothalamic STAT3 by leptin is significantly decreased in these models [78]. Furthermore, BBS1 protein was found to physically interact with the LEPR and loss of BBS proteins perturbs LEPR trafficking suggesting that BBS proteins mediate LEPR trafficking and that impaired LEPR signaling underlies energy imbalance in BBS [78]. Finally, a recent study indicates that leptin resistance is present only when BBS mutant mice are obese and that a defect in the leptin signaling axis may not be the initiating event leading to hyperphagia and obesity in BBS [79].

Recent data highlighted a significant difference in obesity rates in young fragile X males (31%) compared to age matched controls (18%). Fragile X syndrome (FXS) is the most common cause of inherited intellectual disability in males and is also frequently implicated in

autism. Common features of FXS include mild to severe cognitive impairment in males (cognitive impairment is milder in females), attention deficit hyperactivity disorder, elongated face, prominent ears, severe obesity (onset in the first decade of life) with hyperphagia and lack of satiation after meals, hypogonadism or delayed puberty, post-pubertal macroorchidism. This X-linked disorder is caused by an expansion of a trinucleotide CGG repeat (>200) on the promotor region of *FMR1* (*fragile X mental retardation 1 gene*). Variable methylation of this promotor region leads to a deficiency or absence of the FMR1 protein [80]. An Xq27.3-q28 duplication, including the *FMR1* gene, was identified in a male proband with profound intellectual disability, hypogonadotropic hypogonadism, short stature, morbid obesity and gynecomastia [81].

Alström syndrome is a very rare autosomal recessive disease that apart from severe early onset obesity, associates several phenotypes reminiscent of BSS-like retinal cone dystrophy. Patients with Alström disease also develop dilated cardiomyopathy, sensorineural deafness but no polydactyly. The *ALMS1* gene encoding for a protein with ubiquitous expression but unknown function has been implicated. Because of its particular localization in the centrosome and basal bodies, which resembles the pattern of protein expression for some BBS-linked genes, it has been suggested that Alström syndrome could also belong to a class of ciliopathy [77, 82].

Cohen syndrome is characterized by late-onset obesity (after the age of 10 years) associated to moderate mental retardation, typical craniofacial features (downwards slanting and wave shaped palpebral fissures, short philtrum, heavy eyebrows, thick hair and prominent nasal base), and progressive pigmentary retinopathy appearing at mild-childhood, early onset and severe myopia and intermittent neutropenia. It is an autosomal recessive disorder with variable clinical manifestations. Mutations in the gene *COH1* or *VPS13B* (*vacuolar protein*

sorting 13B) located in chromosome 8q22-q23 encoding a transmembrane protein presumably involved in intracellular protein transport are described [83, 84, 85].

The OMIM database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/Query.fcgi?db=OMIM>) provides access to clinical descriptions and genetic anomalies for all these obesity syndromes.

III. Diagnosis Genetic Testing and Interpretation

1. Monogenic obesity

In case of clinical situation suggesting a monogenic obesity (severe early-onset obesity associated to endocrine anomalies and consanguineous parents), direct sequencing of the candidate gene (*LEP*, *LEPR* or *POMC*, etc) is necessary for diagnosis confirmation. It will detect homozygous or compound heterozygous mutation responsible for an interruption of leptin-melanocortin axis. Family members are needed to be tested for segregation analysis and to evaluate the risk of recurrence.

A few genetics laboratories routinely perform those analyses that usually are part of research programs. For example in Europe, this genetic testing can be found at

- UF nutriginétique (Pitié Salpêtrière hospital). Contact: B. Dubern or K Clément. Address: Endocrinology and Nutrition department, Pitié-Salpêtrière hospital, Boulevard de l'hôpital, 75013 Paris or Pediatric Nutrition department, Trousseau hospital, 75012 Paris. Email: beatrice.dubern@trs.aphp.fr; karine.clement@psl.aphp.fr; Tel: 33 (0) 14234 8936; Fax: 33 (0) 4051 00 57; Web site : <http://www.cgmc-psl.fr/>

- S O'Rahilly's team (University of Cambridge). Contact: S Farooqi or S O'Rahilly. Address: Department of Clinical Biochemistry, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital, Hills Road, Cambridge, CB2 2QR. Email: isf20@cam.ac.uk ; Tel: +44 (0) 1223 336792 Fax: +44 (0) 1223 330598; Web site : <http://www.mrl.ims.cam.ac.uk>

2. Melanocortin 4 receptor-linked obesity

Direct sequencing of the *MC4R* gene (1 exon) leads to the detection of *MC4R* mutations. To date, it is questionable to perform in routine systematic detection of *MC4R* mutations in obese subjects with a strong obesity familial history. Although knowing the biological reason (ie: altered melanocortin pathway) leading to an increased susceptibility to obesity might be of interest in some individuals, no specific therapeutic is still available and the severity of phenotype is highly variable within *MC4R* mutation carrier families. It may however become necessary in few years in case of development of specific drugs such as MC4R agonists in order to detect patients that may be eligible for such treatments [86].

3. Obesity syndromes

In PWS, genetic analysis is crucial to assess the absence of the paternal chromosomal segment 15q11.2-q12 and to precise the risk of recurrence even if the vast majority of PWS cases occur sporadically. The investigation of DNA methylation of *SNRPN* is now the gold standard and will be completed to detect the exact mechanism (microdeletion, maternal uniparental disomy, translocations...).

For the other few genes or loci identified in obesity syndromes, direct sequencing of the candidate gene (for example the *COH1* gene in Cohen syndrome) or specific genetic tests (FISH to detect microdeletions...) are indicated in order to diagnose those syndromes.

Whole-exome sequencing showed its power to identify mutations responsible for rare diseases, in a small number of unrelated affected individuals. This tool could probably help to identify new molecular abnormalities in patients with syndromic obesity. It was tested and validated in a study for the molecular diagnosis of 43 forms of monogenic diabetes or obesity. Forty patients (19 with a monogenic form of diabetes and 21 with a monogenic form of obesity) carrying a known causal mutation for those subtypes according to

diagnostic laboratories were blindly re-analyzed. Except for one variant, all causal mutations in each patient were re-identified, associated with an almost perfect sequencing of the targets (mean of 98,6%). Moreover, in three individuals, other mutations were detected with a putatively deleterious effect, in addition to those previously reported by the genetic diagnosis laboratories [87]. In another study based on 39 unrelated severely obese Pakistani children, the whole-exome sequencing revealed two novel homozygous *LEPR* mutations in two probands who were phenotypically indistinguishable from age-matched leptin-deficient subjects from the same population [88]. The whole-exome sequencing could also be a highly efficient and practical method for genetic diagnosis of BBS, it successfully revealed six pathological mutations, including 5 novel mutations, in *BBS* genes in 5 typical BBS patients and family member [89]. For another example, this method of whole-exome sequencing led to identify a paternal 2pter deletion, encompassing the *ACPI* (*acid phosphatase 1*), *TMEM18* (*transmembrane protein 18*) and *MYT1L* (*myelin transcription factor 1-like*) genes, in five unrelated patients presenting with severe early-onset obesity, hyperphagia, intellectual deficiency and severe behavioural difficulties [90]. It had also permit to identify multiple rare variants in the *KSR2* (*kinase supressor of Ras 2*) gene in 45 unrelated severely obese individuals that impair cellular fatty acid oxidation and glucose oxidation. Mutations carriers exhibit, in addition to severe obesity, hyperphagia in childhood, low heart rate, reduced basal metabolic rate and severe insulin resistance [91]. A homozygous frameshift mutation in the *TUB* (*tubby-like protein*) gene was also identified by whole-exome sequencing in a proband who presented with obesity, night blindness, decreased visual acuity, and electrophysiological features of a rod cone dystrophy [92]. So, the wole-exome sequencing seems to be helpfull to identify new molecular abnormalities in patients with syndromic obesity.

IV. Treatment

1. Monogenic obesity

Leptin deficient children and adults benefit from subcutaneous injection of leptin, resulting in weight loss, mainly of fat mass, with a major effect on reducing food intake and on other dysfunctions including immunity as described previously [93]. A detailed microanalysis of eating behavior of three leptin-deficient adults, before and after leptin treatment, revealed reduced overall food consumption, a slower rate of eating and diminished duration of eating of every meal in the three subjects after leptin therapy. Leptin treatment also induces features of puberty even in adults [14]. This study supports a role of leptin in influencing the motivation to eat before each meal [94]. Another study shows that leptin treatment had a major effect on food intake, ad libitum energy intake at a test meal was reduced, hunger ratings in the fasted state decreased and satiety following a meal increased. Leptin acts on neural circuits governing food intake to diminish perception of food reward while enhancing the response to satiety signals generated during food consumption [95]. In a separate study, hormonal and metabolic changes were evaluated before and after leptin treatment [14]. Leptin treatment was able to induce aspects of puberty even in adults, as illustrated by the effect of leptin treatment in one 27 year-old adult male with hypogonadism. In two women between 35-40 years, leptin treatment led to regular menstrual periods and hormonal peaks of progesterone evoking a pattern of ovulation. Although cortisol deficiency was not initially found in leptin-deficient patients, eight months of leptin treatment modified the pulsatility of cortisol with a greater morning rise of cortisol. Leptin could have a previously unsuspected impact on human hypothalamic-pituitary-adrenal function in humans. Metabolic parameters of leptin deficient patients improved in parallel with weight loss.

Because of a non-functional LEPR, leptin treatment is useless in the LEPR deficient subjects. Factors that could possibly bypass normal leptin delivery systems are being developed but are

not yet currently available. The ciliary neurotrophic factor (CNTF) was one of the candidate molecules. CNTF activates downstream signaling molecules such as STAT-3 in the hypothalamus area that regulates food intake, even when administered systemically. Treatment with CNTF in humans and animals, including *db/db* mice induced substantial loss of fat mass [96]. The neurotrophic factor, Axokine, an agonist for CNTF receptor, was under development by the Regeneron Company, for the potential treatment of obesity and its metabolic associated complications. But the phase III clinical trials were stopped due to development of antibodies against Axokine in nearly 70% of the tested subjects after approximately 3 months of treatment. In addition, the effect of Axokine had a small positive effect [97]. It is also possible that side effects of CNTF a molecule possibly acting in the immune function might be expected [98].

In children with a complete POMC deficiency, a 3 months trial using a MC4R agonist with a low affinity was inefficient on weight or food intake [11]. POMC, PC1 or LEPR deficient families might benefit from the development of new MC4R agonists if such drugs become available, in order to restore the melanocortin signal. Likewise, deep brain stimulation trials with an electrode inserted in the anterior third ventricle contiguous to the ventromedian hypothalamus are actually performed. In monkeys, this chronic 8-week stimulation induces a significant decrease in corpulence with reduction of 8% of body weight and 18% of fat mass, without side effects [99].

2. Melanocortin 4 receptor-linked obesity

To date, no specific management has been proposed for *MC4R* mutation obese patients except for well-balanced diet and physical activity. However, interestingly, physical activity may have a specific role for modulating the obese phenotype in case of MC4R anomalies. In *MC4R*^{-/-} mice, regular physical activity is described to be more efficient for limiting the weight gain during life

when compared to wild type [100]. Those findings are also observed in some patients with *MC4R* mutation in clinical practice. It suggests its specific role in the management of patients with *MC4R* mutations and possibly the prevention of weight gain or regain after intervention. In addition, due to its important role in obesity, MC4R is becoming an attractive candidate drug target suggesting that identification and design of ligands or peptides may rescue the phenotype of the particular molecular mechanistic defect. Several synthetic ligands from the classical NDP-MSH peptides to the multiple tetrapeptides and small molecule MC4R agonists have been *in vitro* tested with variable results [101, 102]. But, they have to face normal concerns of targeting GPCRs and specific difficulties of possible side effects due to the widespread expression of MC4R in the brain and the already demonstrated role of MC4R in erectile function [101, 102]. At long term, this type of treatment should be evaluated in heterozygous patients for *MC4R* mutations with impaired α MSH activity, in specific clinical investigation protocols in order to provide effective anti-obesity treatment probably in combination with other approaches such as diet and physical activity. Actually, novel pharmacological MC4R agonists have been tested *in vitro* and can restore a normal activity in mutated receptor [84]. Preclinical trials are now performed [103]. So, treatment with a highly-selective novel MC4R agonist in obese non human primate model resulted in decreased food intake (35%), increased total energy expenditure (14%) and weight loss after 8 weeks of treatment (13.5%). No side effect, in particular in blood pressure or heart rate, was observed in this study [104].

3. Obesity syndromes

No specific therapeutic is described in obesity syndromes except for their global management (diet and physical activity, psychomotricity, hormone substitution, etc.). In PWS, treatment by GH must be discussed. Studies had shown that GH therapy with doses of GH typically used for childhood growth, started before 1 year old, improves growth, body composition, physical

strength and agility, fat utilization and lipid metabolism in children and in adults with PWS [105, 106, 107, 108]. In addition, in case of hypogonadotrophic hypogonadism, hormonal substitution is necessary.

4. Bariatric surgery

Today, bariatric surgery is the only long-term efficient treatment for severe obesity [109] using several operative methods (laparoscopic gastric bypass, gastric banding or sleeve gastrectomy). The question of such treatment and its potential efficiency is crucial in patients with genetic abnormalities previously described in this chapter. Currently, data on bariatric surgery in patients with genetic obesity are limited and controversial.

In 4 patients with heterozygous *MC4R* mutations, weight loss after Roux-en-Y gastric bypass surgery was identical to controls without *MC4R* mutations suggesting that heterozygous *MC4R* mutation status should not influence the decision to perform surgery [110]. Valette and al confirmed these findings in a group of obese adults [111]. In contrast, in a teenager with complete *MC4R* loss of function, laparoscopic adjustable gastric banding resulted in the absence of long-term weight loss (12 months postoperatively) suggesting that the full interruption of melanocortin pathway may not be counteracted by bariatric surgery [112]. Other studies on the effect of bariatric surgery in *MC4R* mutated patients are needed.

In one *LEPR*-deficient patient, vertical gastropasty was beneficial and sufficient to induce and maintain a 40-kg weight loss (-20% of the initial weight) over 8 years of regular follow-up whereas the patient remained obese [113]. In contrast, a relative failure of surgical therapy was illustrated in a report of rapid weight regain 1 year after bypass in another *LEPR* deficient morbidly obese woman. But this patient of low socioeconomic status had extreme difficulties after postsurgical counselling. She was noncompliant with the recommendations provided in this type of purely restrictive surgery and her medical follow-up was very irregular. This

report illustrated the important role of environment on the benefice of bariatric surgery especially in case of monogenic obesities or underlined the poor efficiency of bariatric surgery in these patients [113].

In three patients with genetic diagnosis of PWS, bariatric surgery was beneficial. Two patients underwent laparoscopic sleeve gastrectomy and one patient underwent laparoscopic gastric bypass. After a median follow-up of 33 months, mean weight loss and percentage of excessive weight loss at 2 years were 32.5 kg and 63.2% respectively. No major complication was observed [114]. These observations were in contrast with a retrospective review including 60 cases of PWS patients who underwent bariatric surgery. Various bariatric procedures have been used, with poor results in PWS patients in comparison with normal obese individuals. The average weight loss results at 5 years after gastric bypass were only 2.4% and 3.5% gain above preoperative weight after gastric banding. In addition to poor results on weight, a variety of postoperative issues were reported, including deaths, pulmonary embolus, postoperative wound infection, gastric perforation [115]. So, due to the limited number of cases, the long-term efficacy and safety of bariatric surgery need further evaluation. A multidisciplinary team approach should always be adopted in order to establish the correct indication and realistic explanation after surgical treatment of obese patients.

References

1. de Onis M, Blössner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr* 2010; 92: 1257-64.
2. Sorensen TI. The genetics of obesity. *Metabolism* 1995; 44: 4-6.
3. Farooqi IS. Genetic aspects of severe childhood obesity. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006; 3 Suppl 4: 528-36.

4. Chung WK, Leibel RL. Molecular physiology of syndromic obesities in humans. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 267-72.
5. Farooqi IS, O'Rahilly S. Monogenic obesity in humans. *Annu Rev Med* 2005; 56: 443-58.
6. Harrold JA, Williams G. Melanocortin-4 receptors, beta-MSH and leptin: key elements in the satiety pathway. *Peptides* 2006; 27: 365-71.
7. Strosberg AD, Issad T. The involvement of leptin in humans revealed by mutations in leptin and leptin receptor genes. *Trends Pharmacol Sci* 1999; 20: 227-30.
8. Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ and al. Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature* 1997; 387: 903-8.
9. Fatima W, Shahid A, Imran M, Manzoor J, Hasnain S, Rana S and al. Leptin deficiency and *leptin* gene mutations in obese children from Pakistan. *Int J Pediatr Obes* 2011; 6: 419-27.
10. Clément K, Vaisse C, Lahlou N, Cabrol S, Pelloux V, Cassuto D and al. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction. *Nature* 1998; 392: 398-401.
11. Krude H, Biebermann H, Schnabel D, Tansek MZ, Theunissen P, Mullis PE and al. Obesity due to proopiomelanocortin deficiency: three new cases and treatment trials with thyroid hormone and ACTH4-10. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88: 4633-40.
12. Jackson RS, Creemers JW, Ohagi S, Raffin-Sanson ML, Sanders L, Montague CT and al. Obesity and impaired prohormone processing associated with mutations in the human prohormone convertase 1 gene. *Nat Genet* 1997; 16: 303-6.
13. Jackson RS, Creemers JW, Farooqi IS, Raffin-Sanson ML, Varro A, Dockray G.J and al. Small-intestinal dysfunction accompanies the complex endocrinopathy of human proprotein convertase 1 deficiency. *J Clin Invest* 2003; 112: 1550-60.

14. Licinio J, Caglayan S, Ozata M, Yildiz BO, de Miranda PB, O'Kirwan F, and al. Phenotypic effects of leptin replacement on morbid obesity, diabetes mellitus, hypogonadism, and behavior in leptin-deficient adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4531-6.
15. Fischer-Posovszky P, von Schnurbein J, Moepps B, Lahr G, Strauss G, Barth TF and al. A new missense mutation in the leptin gene causes mild obesity and hypogonadism without affecting T cell responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 2836-40.
16. Birch LL. Development of food acceptance patterns in the first years of life. *Proc Nutr Soc* 1998; 57: 617-24.
17. Farooqi IS. Genetic and hereditary aspects of childhood obesity. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2005; 19: 359-74.
18. Farooqi IS, Wangenstein T, Collins S, Kimber W, Matarese G, Keogh JM and al. Clinical and molecular genetic spectrum of congenital deficiency of the leptin receptor. *N Engl J Med* 2007; 356: 237-47.
19. Mazen I, El-Gammal M, Abdel-Hamid M, Farooqi IS, Amr K. Homozygosity for a novel missense mutation in the leptin receptor gene (P316T) in two Egyptian cousins with severe early onset obesity. *Mol Genet Metab* 2011; 102: 461-4.
20. Nizard J, Dommergues M, Clément K. Pregnancy in a woman with a leptin-receptor mutation. *N Engl J Med* 2012; 366: 1064-5.
21. Clément K, Dubern B, Mencarelli M, Czernichow P, Ito S, Wakamatsu K and al. Unexpected endocrine features and normal pigmentation in a young adult patient carrying a novel homozygous mutation in the POMC gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 4955-62.
22. Farooqi IS, Drop S, Clements A, Keogh JM, Biernacka J, Lowenbein S and al. Heterozygosity for a POMC-null mutation and increased obesity risk in humans. *Diabetes* 2006; 55: 2549-53.

23. Carroll L, Voisey J, van Daal A. Gene polymorphisms and their effects in the melanocortin system. *Peptides* 2005; 26: 1871-85.
24. Frank GR, Fox J, Candela N, Jovanovic Z, Bochukova E, Levine J and al. Severe obesity and diabetes insipidus in a patient with PCSK1 deficiency. *Mol Genet Metab* 2013; 110: 191-4.
25. Martin MG, Lindberg I, Solorzano-Vargas RS, Wang J, Avitzur Y, Bandsma R and al. Congenital proprotein convertase 1/3 deficiency causes malabsorptive diarrhea and other endocrinopathies in a pediatric cohort. *Gastroenterology* 2013; 145: 138-48.
26. Holder JLR, Butte NF, Zinn AR. Profound obesity associated with a balanced translocation that disrupts the SIM1 gene. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 101-8.
27. Izumi K, Housam R, Kapadia C, Stallings VA, Medne L, Shaikh TH and al. Endocrine phenotype of 6q16.1-q21 deletion involving *SIM1* and Prader-Willi syndrome-like features. *Am J Med Genet* 2013; 9999: 1-7.
28. Michaud JL, Boucher F, Melnyk A, Gauthier F, Goshu E, Levy E and al. Sim1 haploinsufficiency causes hyperphagia, obesity and reduction of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1465-73.
29. Kublaoui BM, Holder JLR, Gemelli T, Zinn AR. Sim1 haploinsufficiency impairs melanocortin-mediated anorexia and activation of paraventricular nucleus neurons. *Mol Endocrinol* 2006; 20: 2483-92.
30. Ramachandrapa S, Raimondo A, Cali AMG, Keogh JM, Henning E, Saeed S and al(). Rare variants in single-minded 1 (SIM1) are associated with severe obesity. *J Clin Invest* 2013; 123: 3042-50.
31. Bonnefond A, Raimondo A, Stutzmann F, Ghossaini M, Ramachandrapa S, Bersten DC and al. Loss-of-function mutations in *SIM1* contribute to obesity and Prader-Willi-like features. *J Clin Invest* 2013; 123: 3037-3041.

32. Zegers D, Beckers S, Hendrickx R, Van Camp JK, de Craemer V, Verrijken A and al. Mutation screen of the SIM1 gene in pediatric patients with early-onset obesity. *Int J Obes* 2013; 1-5.
33. Kernie SG, Liebl DJ, Parada LF. BDNF regulates eating behavior and locomotor activity in mice. *Embo J* 2000; 19: 1290-300.
34. Xu B, Goulding EH, Zang K, Cepoi D, Cone RD, Jones KR and al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci* 2003; 6: 736-42.
35. Yeo GS, Connie Hung CC, Rochford J, Keogh J, Gray J, Sivaramakrishnan S and al. A de novo mutation affecting human TrkB associated with severe obesity and developmental delay. *Nat Neurosci* 2004; 7: 1187-9.
36. Gray J, Yeo G, Hung C, Keogh J, Clayton P, Banerjee K and al. Functional characterization of human NTRK2 mutations identified in patients with severe early-onset obesity. *Int J Obes (Lond)* 2007; 31: 359-64.
37. Walters RG, Jacquemont S, Valsesia A, de Smith AJ, Martinet D, Andersson J and al. A novel highly-penetrant form of obesity due to microdeletions on chromosome 16p11.2. *Nature* 2010; 463: 671-5.
38. El-Sayed Moustapha JS, Eleftherohorinou H, de Smith AJ, Andersson-Assarsson JC, Couto Alves A, Hadjigeorgiou E and al. Novel association approach for variable number tandem repeats (VNTRs) identifies *DOCK5* as a susceptibility gene for severe obesity. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 3727-38.
39. Govaerts C, Srinivasan S, Shapiro A, Zhang S, Picard F, Clement K and al. Obesity-associated mutations in the melanocortin 4 receptor provide novel insights into its function. *Peptides* 2005; 26: 1909-19.

40. Hinney A, Volckmar AL, Knoll N. Melanocortin-4 receptor in energy homeostasis and obesity pathogenesis. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2013; 114: 147-91.
41. Lubrano-Berthelier C, Dubern B, Lacorte JM, Picard F, Shapiro A, Zhang S and al. Melanocortin 4 receptor mutations in a large cohort of severely obese adults: prevalence, functional classification, genotype-phenotype relationship, and lack of association with binge eating. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1811-8.
42. Hinney A, Bettecken T, Tarnow P, Brumm H, Reichwald K, Lichtner P and al. Prevalence, spectrum, and functional characterization of melanocortin-4 receptor gene mutations in a representative population-based sample and obese adults from Germany. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 1761-9.
43. Farooqi IS, Keogh JM, Yeo GS, Lank EJ, Cheetham T, O'Rahilly S. Clinical spectrum of obesity and mutations in the melanocortin 4 receptor gene. *N Engl J Med* 2003; 348: 1085-95.
44. Lubrano-Berthelier C, Le Stunff C, Bougnères P, Vaisse C. A homozygous null mutation delineates the role of the melanocortin-4 receptor in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 2028-32.
45. Dubern B, Bisbis S, Talbaoui H, Le Beyec J, Tounian P, Lacorte JM and al. Homozygous null mutation of the melanocortin-4 receptor and severe early-onset obesity. *J Pediatr* 2007; 150: 613-7.
46. Vaisse C, Clément K, Durand E, Hercberg S, Guy-Grand B, Froguel P. Melanocortin-4 receptor mutations are a frequent and heterogeneous cause of morbid obesity. *J Clin Invest* 2000; 106: 253-62.
47. Martinelli CE, Keogh JM, Greenfield JR, Henning E, van der Klaauw AA, Blackwood A and al. Obesity due to melanocortin 4 receptor (MC4R) deficiency is associated with increased linear growth and final height, fasting hyperinsulinemia, and incompletely suppressed growth hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96: 181-8.

48. MacKenzie RG. Obesity-associated mutations in the human melanocortin-4 receptor gene. *Peptides* 2006; 27: 395-403.
49. Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature* 2005; 434: 514-20.
50. Ahn JD, Dubern B, Lubrano-Berthelier C, Clément K, Karsenty G. Cart overexpression is the only identifiable cause of high bone mass in melanocortin 4 receptor deficiency. *Endocrinology* 2006; 147: 3196-202.
51. Branson R, Potoczna N, Kral JG, Lentes KU, Hoehe MR, Horber FF. Binge eating as a major phenotype of melanocortin 4 receptor gene mutations. *N Engl J Med* 2003; 348: 1096-103.
52. Valette M, Poitou C, Kesse-Guyot E, Bellisle F, Carette C, Le Beyec J and al. Association between melanocortin-4 receptor mutations and eating behaviors in obese patients: a case-control study. *Int J Obes* 2013; 1-3.
53. Mergen M, Mergen H, Ozata M, Oner R, Oner C. A novel melanocortin 4 receptor (MC4R) gene mutation associated with morbid obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 3448.
54. Lubrano-Berthelier C, Durand E, Dubern B, Shapiro A, Dazin P, Weill J and al. Intracellular retention is a common characteristic of childhood obesity-associated MC4R mutations. *Hum Mol Genet* 2003; 12: 145-53.
55. Nijenhuis WA, Oosterom J, Adan RA. AgRP(83-132) acts as an inverse agonist on the human-melanocortin-4 receptor. *Mol Endocrinol* 2001; 15: 164-71.
56. Srinivasan S, Lubrano-Berthelier C, Govaerts C, Picard F, Santiago P, Conklin BR and al. Constitutive activity of the melanocortin-4 receptor is maintained by its N-terminal domain and plays a role in energy homeostasis in humans. *J Clin Invest* 2004; 114: 1158-64.

57. Chen AS, Marsh DJ, Trumbauer ME, Frazier EG, Guan XM, Yu H and al. Inactivation of the mouse melanocortin-3 receptor results in increased fat mass and reduced lean body mass. *Nat Genet* 2000; 26: 97-102.
58. Mencarelli M, Walker GE, Maestrini S, Alberti L, Verti B, Brunani A and al. Sporadic mutations in melanocortin receptor 3 in morbid obese individuals. *Eur J Hum Genet* 2008; 16: 581-6.
59. Calton MA, Ersoy BA, Zhang S, Kane JP, Malloy MJ, Pullinger CR and al. Association of functionally significant Melanocortin-4 but not Melanocortin-3 receptor mutations with severe adult obesity in a large North American case-control study. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1140-7.
60. Horsthemke B, Wagstaff J. Mechanisms of imprinting of the Prader-Willi/Angelman region. *Am J Med Genet* 2008; 146: 2041-52.
61. Horsthemke B, Buiting K. Imprinting defects on human chromosome 15. *Cytogenet Genome Res* 2006; 113: 292-9.
62. Schaaf CP, Gonzalez-Garay ML, Xia F, Potocki L, Gripp KW, Zhang B and al. Truncating mutations of *MAGEL2* cause Prader-Willi phenotypes and autism. *Nat Genet* 2013; 45: 1405-1409.
63. Kousta E, Hadjiathanasiou CG, Tolis G, Papathanasiou A. Pleiotropic genetic syndromes with developmental abnormalities associated with obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2009; 22: 581-92.
64. Goldstone AP. Prader-Willi syndrome: advances in genetics, pathophysiology and treatment. *Trends Endocrinol Metab* 2004; 15: 12-20.
65. Cummings DE, Clément K, Purnell JQ, Vaisse C, Foster KE, Frayo RS and al. Elevated plasma ghrelin levels in Prader Willi syndrome. *Nat Med* 2002; 8: 643-4.

66. Franzese A, Romano A, Spagnuolo MI, Ruju F, Valerio G. Growth hormone therapy in children with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 2006; 148: 846; author reply 846-7.
67. Carrel AL, Moerchen V, Myers SE, Bekx MT, Whitman BY, Allen DB. Growth hormone improves mobility and body composition in infants and toddlers with Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 2004; 145: 744-9.
68. Katsanis N, Lupski JR, Beales PL. Exploring the molecular basis of Bardet-Biedl syndrome. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 2293-9.
69. Stoetzel C, Laurier V, Davis EE, Muller J, Rix S, Badano JL and al. BBS10 encodes a vertebrate-specific chaperonin-like protein and is a major BBS locus. *Nat Genet* 2006; 38: 521-4.
70. Nishimura DY, Swiderski RE, Searby CC, Berg EM, Ferguson AL, Hennekam R and al. Comparative genomics and gene expression analysis identifies BBS9, a new Bardet-Biedl syndrome gene. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 1021-33.
71. Chiang AP, Beck JS, Yen HJ, Tayeh MK, Scheetz TE, Swiderski RE and al. Homozygosity mapping with SNP arrays identifies TRIM32, an E3 ubiquitin ligase, as a Bardet-Biedl syndrome gene (BBS11). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 6287-92.
72. Zaghloul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest* 2009; 119: 428-37.
73. Eichers ER, Lewis RA, Katsanis N, Lupski JR. Triallelic inheritance: a bridge between Mendelian and multifactorial traits. *Ann Med* 2004; 36: 262-72.
74. Abu-Safieh L, Al-Anazi S, Al-Abdi L, Hashem M, Alkuraya H, Alamr M and al. In search of triallelism in Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet* 2012; 20: 420-7.
75. Slavotinek AM, Searby C, Al-Gazali L, Hennekam RC, Schrandt-Stumpel C, Orcan-Losa M and al. Mutation analysis of the MKKS gene in McKusick-Kaufman syndrome and selected Bardet-Biedl syndrome patients. *Hum Genet* 2002; 110: 561-7.

76. Fan Y, Esmail MA, Ansley SJ, Blacque OE, Boroevich K, Ross AJ and al. Mutations in a member of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins causes Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet* 2004; 36: 989-93.
77. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2006; 7: 125-48.
78. Seo S, Guo DF, Bugge K, Morgan DA, Rahmouni K, Sheffield VC. Requirement of Bardet-Biedl syndrome proteins for leptin receptor signaling. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 1323-31.
79. Berbari NF, Pasek RC, Malarkey EB, Yazdi SMZ, McNair AD, Lewis WR and al. Leptin resistance is a secondary consequence of the obesity in ciliopathy mutant mice. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110: 7796-801.
80. McLennan Y, Polussa J, Tassone F, Hagerman R. Fragile X syndrome. *Curr Genomics* 2011; 12: 216-224.
81. Hickey SE, Walters-Sen L, Mihalic Mosher T, Pfau RB, Pyatt R, Snyder PJ and al. Duplication of the Xq27.3-q28 region, including the *FMRI* gene, in an X-linked hypogonadism, gynecomastia, intellectual disability, short stature, and obesity syndrome. *Am J Med Genet* 2013; 161: 2294-2299.
82. Marshall JD, Hinman EG, Collin GB, Beck S, Cerqueira R, Maffei P and al. Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alström syndrome. *Hum Mutat* 2007; 28: 1114-23.
83. Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Traskelin A and al. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1359-69.

84. Seifert W, Holder-Espinasse M, Spranger S, Hoeltzenbein M, Rossier E, Dollfus H and al. Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet* 2006; 43: e22.
85. Balikova I, Lehesjoki AE, de Ravel TJL, Thienpont B, Chandler KE, Clayton-Smith J and al. Deletions in the VPS13B (COH1) gene as a cause of Cohen syndrome. *Hum Mutat* 2009; 30: 845-54.
86. Roubert P, Dubern B, Plas P, Lubrano-Berthelier C, Alihi R, Auger F and al. Novel pharmacological MC4R agonists can efficiently activate mutated MC4R from obese patient with impaired endogenous agonist response. *J Endocrinol* 2010; 207: 177-83.
87. Bonnefond A, Philippe J, Durand E, Muller J, Saeed S, Arslan M and al. Highly sensitive diagnosis of 43 monogenic forms of diabetes or obesity, through one step PCR-based enrichment in combination with next-generation sequencing. *Diabetes Care* 2013; 1-26.
88. Saeed S, Bonnefond A, Manzoor J, Philippe J, Durand E, Arshad M and al. Novel LEPR mutations in obese Pakistani children identified by PCR-based enrichment and next generation sequencing. *Obesity* 2013.
89. Xing DJ, Zhang HX, Huang N, Wu KC, Huang XF, Huang F and al. Comprehensive molecular diagnosis of Bardet-Biedl syndrome by high-throughput targeted exome sequencing. *Plos One* 2014; 9: 90599.
90. Doco-Fenzi M, Leroy C, Schneider A, Petit F, Delrue MA, Andrieux J and al. Early-onset obesity and paternal 2pter deletion encompassing the *ACPI*, *TMEM18*, and *MYT1L* genes. *Eur J Hum Genet* 2013; 1-9.
91. Pearce LR, Atanassova N, Banton MC, Bottomley B, van der Klaauw AA, Revelli JP and al. KSR2 mutations are associated with obesity, insulin resistance, and impaired cellular fuel oxidation. *Cell* 2013; 155: 765-77.

92. Borman AD, Pearce LR, Mackay DS, Nagel-Wolfrum K, Davidson AE, Henderson R and al. A homozygous mutation in the *TUB* gene associated with retinal dystrophy and obesity. *Hum Mutat* 2014; 35: 289-93.
93. Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C and al. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110: 1093-103.
94. Williamson DA, Ravussin E, Wong ML, Wagner A, Dipaoli A, Caglayan S and al. Microanalysis of eating behavior of three leptin deficient adults treated with leptin therapy. *Appetite* 2005; 45: 75-80.
95. Farooqi IS, Bullmore E, Keogh J, Gillard J, O'Rahilly S, Fletcher PC. Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science* 2007; 317: 1355.
96. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ. The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 2000; 74: 265-72.
97. Preti A. Axokine (Regeneron). *IDrugs* 2003; 6: 696-701.
98. Sariola H. The neurotrophic factors in non-neuronal tissues. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 1061-6.
99. Torres N, Chabardes S, Piallat B, Devergnas A, Benabid AL. Body fat and body weight reduction following hypothalamic deep brain stimulation in monkeys: an intraventricular approach. *Int J Obes* 2012; 36: 1537-44.
100. Irani BG, Xiang Z, Moore MC, Mandel RJ, Haskell-Luevano C. Voluntary exercise delays monogenetic obesity and overcomes reproductive dysfunction of the melanocortin-4 receptor knockout mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 638-44.
101. Xiang Z, Pogozheva ID, Sorenson NB, Wilczynski AM, Holder JR, Litherland SA and al. Peptide and small molecules rescue the functional activity and agonist potency of

- dysfunctional human melanocortin-4 receptor polymorphisms. *Biochemistry* 2007; 46: 8273-87.
102. Ujjainwalla F, Sebhat IK. Small molecule ligands of the human melanocortin-4 receptor. *Curr Top Med Chem* 2007; 7: 1068-84.
103. Fani L, Bak S, Delhanty P, van Rossum EFC, van den Akker ELT. The melanocortin-4 receptor as target for obesity treatment: a systematic review of emerging pharmacological therapeutic options. *Int J Obes* 2013; 1-7.
104. Kievit P, Halem H, Marks DL, Dong JZ, Glavas MM, Sinnayah P and al. Chronic treatment with a melanocortin-4 receptor agonist causes weight loss, reduces insulin resistance, and improves cardiovascular function in diet-induced obese rhesus macaques. *Diabetes* 2012; 62: 490-7.
105. Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Allen DB. Growth hormone improves body composition, fat utilization, physical strength and agility, and growth in Prader-Willi syndrome: A controlled study. *J Pediatr* 1999; 134: 215-21.
106. Festen DA, de Lind van Wijngaarden R, van Eekelen M, Otten BJ, Wit JM, Duivenvoorden HJ and al. Randomized controlled growth hormone trial: Effects on anthropometry, body composition, and body proportions in a large group of children with Prader-Willi syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008.
107. Carrel AL, Myers SE, Whitman BY, Eickhoff J, Allen DB. Long-term growth hormone therapy changes the natural history of body composition and motor function in children with Prader-Willi syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1131-6.
108. Sanchez-Ortiga R, Klibanski A, Tritos NA. Effects of recombinant human growth hormone therapy in adults with Prader-Willi syndrome: a meta-analysis. *Clin Endocrinol* 2012; 77: 86-93.

109. Sjöström L. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial - a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *J Intern Med* 2013; 273: 219-34.
110. Aslan IR, Campos GM, Calton MA, Evans DS, Merriman RB, Vaisse C. Weight loss after Roux-en-Y gastric bypass in obese patients heterozygous for MC4R mutations. *Obes Surg* 2011; 21: 930-4.
111. Valette M, Poitou C, Le Beyec J, Bouillot JL, Clement K, Czernichow S. Melanocortin-4 receptor mutations and polymorphisms do not affect weight loss after bariatric surgery. *Plos One* 2012; 7: 48221.
112. Aslan IR, Ranadive SA, Ersoy BA, Rogers SJ, Lustig RH, Vaisse C. Bariatric surgery in a patient with complete MC4R deficiency. *Int J Obes* 2011; 35: 457-61.
113. Le beyec J, Cugnet-Anceau C, Pépin D, Alili R, Cotillard A, Lacorte JM and al. Homozygous leptin receptor mutation due to uniparental disomy of chromosome 1: response to bariatric surgery. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98: 397-402.
114. Fong AKW, Wong SKH, Lam CCH, Ng EKW. Ghrelin level and weight loss after laparoscopic sleeve gastrectomy and gastric mini-bypass for Prader-Willi syndrome in Chinese. *Obes Surg* 2012; 22: 1742-5.
115. Scheimann AO, Butler MG, Gourash L, Cuffari C, Kish W. Critical analysis of bariatric procedures in Prader-Willi syndrome. *JPGN* 2008; 46: 80-3.

Table 1: Rare monogenic forms of human obesity

Gene (References)	Mutation type	Obesity	Associated phenotypes
Leptin ^{7, 8, 9, 15, 16}	Homozygous mutation	Severe, from the first days of life	Gonadotropic and thyrotropic insufficiency
Leptin receptor ^{10, 17, 18, 19}	Homozygous Mutation	Severe, from the first days of life	Gonadotropic, thyrotropic and somatotropic insufficiency
Proopiomelanocortin (POMC) ¹¹	Homozygous or compound heterozygous	Severe, from the first months of life	ACTH insufficiency Mild hypothyroidie and ginger hairs if the mutation leads to the absence of POMC production
POMC but in the β MSH coding region ^{21, 22, 23}	Heterozygous non synonymous mutations	Severe obesity occurring in childhood	Rapid size growth
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 (PCSK1) ^{12, 13, 24, 25}	Homozygous or compound heterozygous	Severe obesity occurring in childhood	Adrenal, gonadotropic, somatotropic and thyrotropic insufficiency Postprandial hypoglycemic malaises Central diabetes insipidus

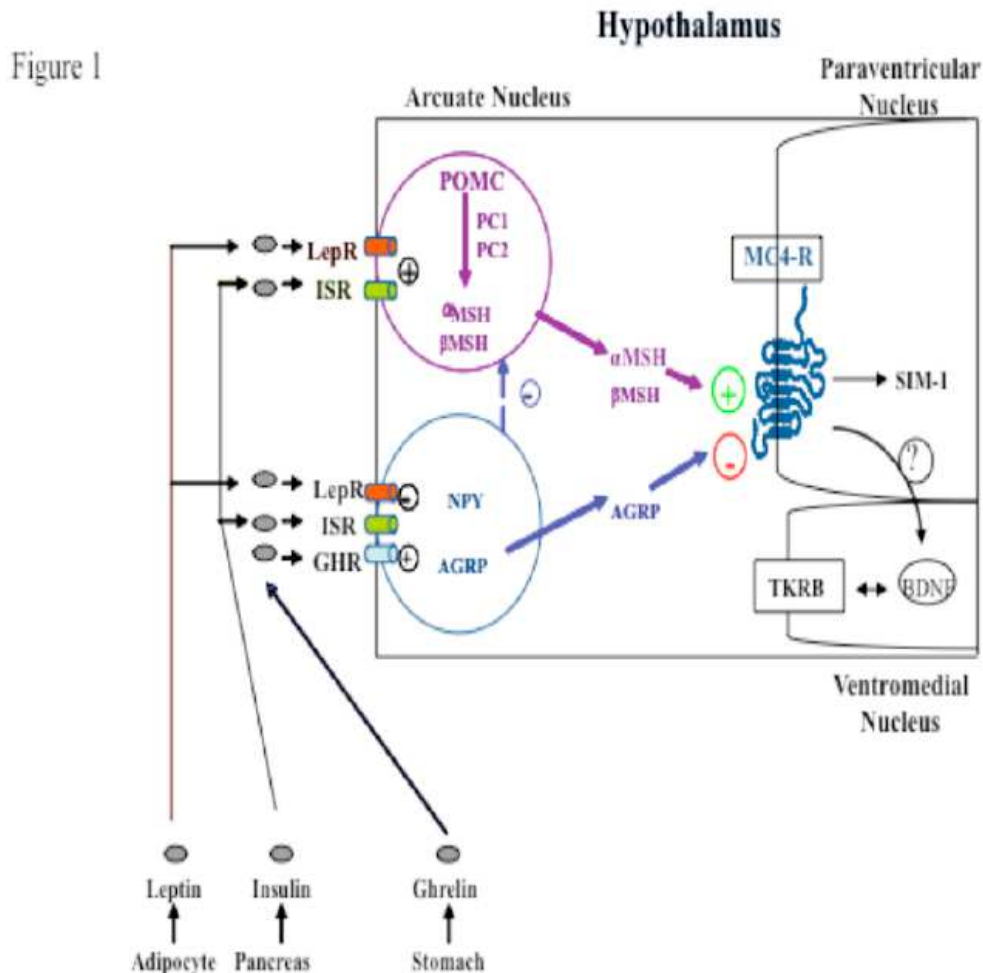
Single-minded (SIM1) ²⁶	1	Translocation between chr 1p22.1 and 6q16.2 in the SIM 1 gene	Severe obesity occurring in childhood	Inconstantly, neurobehavioral abnormalities (including emotional lability or autism- like behavior)
Neurotrophic tyrosine kinase receptor type 2 (NTRK2) ³⁵		De novo heterozygous mutation	Severe obesity from the first months of life	Developmental delay Behavioral disturbance Blunted response to pain
Dedicator cytokinesis (DOCK5) ³⁸	of 5	Variable number tandem repeats (VNTRs)	Childhood and adult severe obesity	-
Kinase suppressor of Ras2 (KSR2) ⁹¹		Heterozygous frameshift, nonsense or missense variants	Severe obesity	Hyperphagia in childhood Low heart rate Reduced basal metabolic rate Severe insulin resistance
Tubby-like (TUB) ⁹²	protein	Homozygous frameshift mutation	Early-onset obesity	Night blindness, decreased visual acuity and electrophysiological features of a rod cone dystrophy

Table 2: Principal obesity syndromes

Syndrome	Clinical features in addition to obesity	Locus	Gene
Autosomal dominant			
Prader-Willi syndrome (PWS)	Neonatal hypotonia, mental retardation, facial dysmorphism, hypogonadotrophic hypogonadism, short stature	Lack of the paternal segment 15q11.2-q12 (microdeletion or maternal disomy)	Unknown SRNPN region
Albright hereditary osteodystrophy	Short stature, skeletal defects, facial dysmorphism, endocrine anomalies	20q13.2	GNAS1
Autosomal recessive			
Bardet-Biedl syndrome (BBS)	Mental retardation, dysmorphic extremities, retinal dystrophy or pigmentary retinopathy, hypogonadism, kidney anomalies (structural abnormalities or functional renal impairment)	1q13 (BBS1), 16q21 (BBS2), 3p13 (BBS3), 15q22 (BBS4), 2q31 (BBS5), 20p12 (BBS6), 4q27 (BBS7), 14q32 (BBS8)....	
Alström syndrome	Retinal dystrophy, neurosensory deafness, diabetes	2p13	ALMS1
Cohen syndrome	Prominent central incisors, dysmorphic extremities, ophthalmopathy, microcephaly, cyclic neutropenia	8q22	COH
X-linked			
Borjeson-Forsman-Lehman	Mental retardation, hypogonadism, facial	Xq26	PHF6

Figure Legends

Figure 1: The leptin/melanocortin pathway



Neuronal populations propagate the signaling of various molecules (leptin, insulin, ghrelin) to control food intake and satiety. POMC-neurons in the arcuate nucleus are activated by leptin and insulin and produce the α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH), which then activates the MC4R receptor in the paraventricular nucleus resulting in a satiety signal. The downstream roles of SIM1, BDNF and TKRB are currently being explored. A separate group of neurons expressing NPY and AGRP produce

molecules that act as potent inhibitors of MC4R signaling. Several mutations of those genes involved in the leptin/melanocortin pathway are responsible for early-onset and severe obesity. POMC, proopiomelanocortin; LepR; leptin receptor; ISR, insulin receptor; GHR, ghrelin receptor; NPY, neuropeptide Y; AGRP, agouti-related protein; SIM1, single-minded 1; BDNF, brain-derived neurotrophic factor; TRKB, tyrosine kinase receptor; PC1 and 2, proconvertase 1 and 2.

Figure 2: BMI curves of 2 homozygous null LEPR mutants (LEPR 1 and 2), 1 homozygous null MC4R patient, 6 heterozygous MC4R carriers and 40 non mutated obese controls [41]. The reference curves are the standard French/Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale percentile curves.

Figure 2

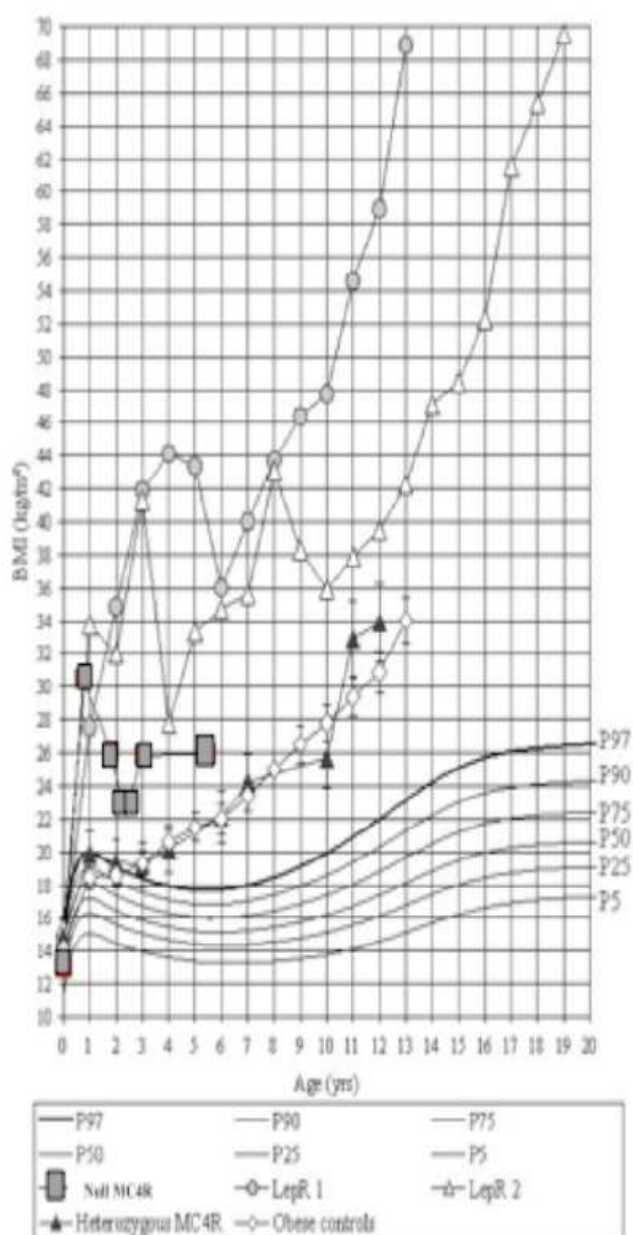
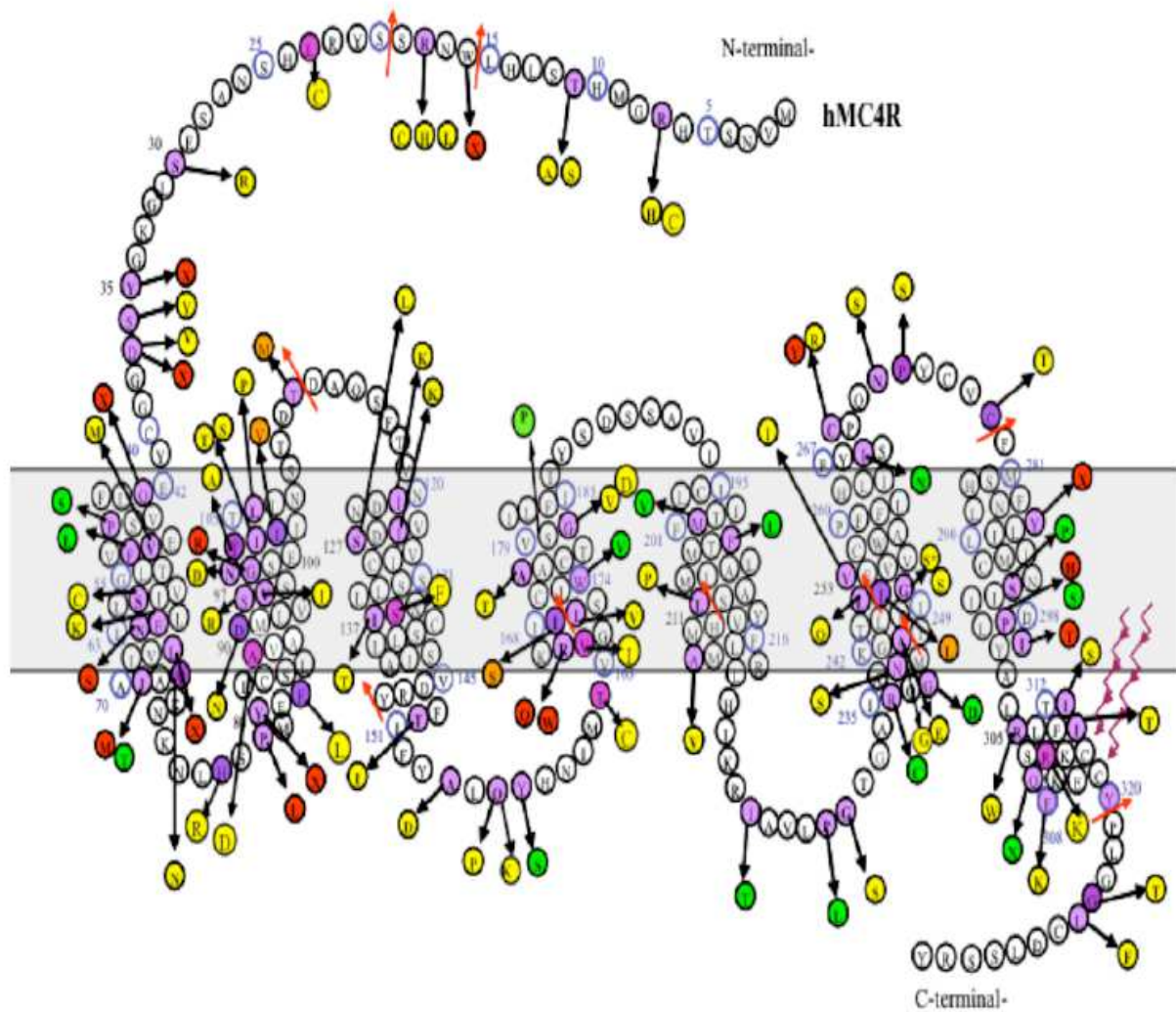


Figure 3: Localisation of human MC4R mutations including polymorphisms described in adults and children.

Figure 3



Red circles: mutations responsible for intracellular retention of the mutated receptor or frameshift. Orange circles: polymorphisms. Yellow circles: mutation with functional consequence (altered α -melanocyte stimulating hormone production, impaired basal activity...). Green circles: any known or described functional effect.