

La protéine Agouti et son rôle dans les syndromes d'obésité

Naïma Moustaid Moussa

Les mutations dominantes du locus *agouti* provoquent chez la souris l'obésité, le diabète et une coloration jaune du pelage ; ce syndrome a été attribué à l'expression ectopique du gène *agouti*. Ce gène code pour une protéine sécrétée qui agit *via* des actions locales paracrines. Les effets de la protéine Agouti dans cette obésité sont relayés à la fois par un mécanisme central et par un mécanisme périphérique. Au niveau central, la protéine Agouti antagonise les récepteurs des mélanocortines, en particulier MC4-R, provoquant ainsi une augmentation de la prise alimentaire. En périphérie, la protéine Agouti augmente les niveaux intracellulaires de calcium impliqués dans la stimulation du stockage des triglycérides par la protéine Agouti. Des mécanismes centraux et périphériques contribuent donc à l'obésité de la souris jaune *via* un antagonisme au niveau des récepteurs des mélanocortines et/ou la régulation des signaux cellulaires liés au calcium.

L'obésité est un phénotype complexe qui implique des facteurs génétiques et environnementaux. Les modèles animaux ont été très utilisés pour étudier les gènes de l'obésité, et pour élucider les causes et les mécanismes de l'obésité humaine. Plusieurs mutations autosomiques dominantes (*yelloxw*, *figure 1*) et récessives (*obese*, *diabetes*, *fatty* et *tubby*) ont été décrites chez la souris et le rat [1]. Bien que ces mutants aient été étudiés depuis de nombreuses années, le clonage de ces gènes n'a été réalisé que récemment, fournissant ainsi une approche élégante pour l'étude des aspects moléculaires de l'obésité. *Agouti* est le premier gène de l'obésité qui a été cloné [2], et cette revue sera

consacrée au rôle du produit de ce gène (la protéine Agouti) dans le syndrome de l'obésité de la souris jaune. Bien qu'aucune mutation dans le gène *agouti* humain n'ait été décrite chez les sujets obèses, la compréhension des mécanismes responsables de l'obésité de la souris jaune peut être utile pour étudier l'obésité humaine (*m/s* n° 5, vol. 13, p. 737). La comparaison des protéines humaine et murine révèle 80 % d'identité totale et 87 % d'identité partielle dans la région carboxy-terminale [3]. Il est intéressant de noter que, chez la souris, la protéine Agouti est exprimée uniquement dans la peau pendant le développement du pelage, alors que la protéine Agouti est normalement exprimée dans le tissu adipeux.

ADRESSE

N. Moustaid Moussa: Ph. D, assistant professor of nutrition. University of Tennessee, Department of Nutrition, 1215 W. Cumberland Avenue, Knoxville, TN 37996-1900, États-Unis.

TIRÉS À PART

N. Moustaid Moussa.



Figure 1. *Souris normale (pelage sombre) et souris jaune obèse (A^{vy}).*

Anomalies métaboliques chez la souris jaune

Le gène de la protéine Agouti est normalement impliqué dans la régulation de la couleur du pelage chez la souris. L'expression d'*agouti* dans le follicule pileux pendant le développement précoce postnatal provoque la synthèse d'un pigment jaune (phaeomélanine), en parallèle avec l'arrêt de la synthèse du pigment noir (eumélanine). En conséquence, une bande jaune apparaît au sommet des poils qui sont par ailleurs de couleur sombre [4].

Les mutations dominantes du locus *agouti* tel que *A^y* (*lethal yellow*) et *A^{vy}* (*viable yellow*) (*figure 1*) provoquent un syndrome pléiotropique comprenant l'obésité, la résistance à l'insuline, l'augmentation de la taille, une susceptibilité accrue au cancer, ainsi que la coloration jaune du pelage [4-5] (*figure 1*). Chez ces mutants, l'expression du gène *agouti* est déré-

glée et provoque son expression ectopique dans presque tous les tissus examinés chez la souris jaune.

Outre la fourrure jaune, les souris *A^{vy}* et *A^y* développent une obésité assez tardive qui atteint son maximum entre 8 et 17 mois [6], et leur graisse corporelle augmente de 35 % à 50 % par rapport à celles des souris normales [7]. Les taux de lipogenèse hépatique sont six fois plus élevés chez les souris adultes *A^{vy}* que chez les souris normales du même âge [8]. Une hypertrophie adipocytaire davantage qu'une hyperplasie [9] et une faible lipolyse basale [4] caractérisent la souris jaune obèse.

Les mutants *ob* et *db* ont un comportement alimentaire incontrôlé et une balance énergétique positive ; ils deviennent très tôt obèses [10]. En revanche, bien que les mutants obèses jaunes aient tendance à consommer plus de nourriture que les souris normales de la même por-

tée [4, 8, 11], leurs mécanismes de la satiété restent intacts [5]. Ni une boulimie modérée, ni une diminution de la thermogenèse [12] ne peuvent expliquer l'obésité de la souris jaune [4]. En fait, il a été proposé que le déterminant majeur d'obésité de la souris jaune soit l'efficacité 3 à 4 fois plus élevée à convertir les calories consommées en graisse [4, 11]. L'hyperinsulinémie est évidente chez les souris *A^{vy}* à partir de 6 semaines, et 20 fois plus élevée que chez les témoins aux environs de 6 mois [4]. Ainsi, l'hyperinsulinémie peut augmenter l'utilisation des nutriments et favoriser l'hypertrophie de l'adipocyte, contribuant ainsi à l'obésité de la souris jaune [4, 5]. De plus, l'hyperplasie des cellules pancréatiques est apparente chez les mâles *A^{vy}* âgés de 21 jours, avant tout gain de poids ou avant toute modification des valeurs d'insuline ou de glucagon [13]. Cependant, les rapports entre l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et l'obésité sont complexes, et il est impossible d'attribuer l'obésité de la souris jaune à l'hyperinsulinémie seule [4].

Des études ont montré que la prédisposition des souris *A^{vy}* à devenir obèses n'est pas dépendante des hormones hypophysaires, surrénaliennes ou thyroïdiennes et que ni l'hypophysectomie [14] ou la surrénalectomie [15], ni le déficit génétique de l'hormone de croissance [7] ne préviennent le développement de l'obésité chez les souris jaunes. En outre, des expériences de parabiose dans lesquelles les circulations des souris normales et obèses *A^{vy}* ont été reliées, ont montré que le phénotype de la souris jaune obèse n'est pas dû à l'hormone *agouti* circulante [16]. Ces expériences suggèrent qu'*agouti* modifie l'adiposité par l'intermédiaire d'actions locales paracrines, en accord avec son mécanisme d'action dans le follicule pileux.

Caractérisation moléculaire d'*agouti* et études sur des modèles transgéniques

Agouti est le premier gène de l'obésité qui a été cloné [2]. Bien que les gènes *agouti* soient analogues chez la souris et l'homme, leur expression

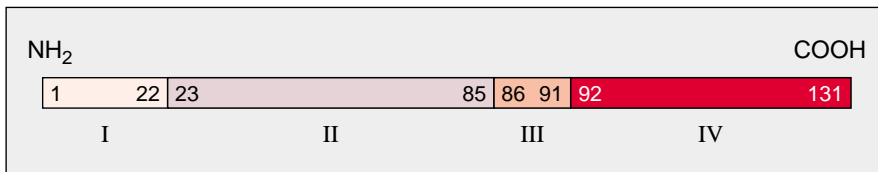


Figure 2. **Structure de la protéine Agouti.** La protéine contient 131 acides aminés qui sont répartis en quatre domaines. La région carboxy-terminale comporte *in vitro* une activité comparable à celle de la protéine totale.

tissulaire est différente. Alors que le gène *agouti* chez la souris est uniquement exprimé dans la peau de manière transitoire (entre le 3^e et le 7^e jour de vie) correspondant à son rôle dans la pigmentation, le gène humain est exprimé chez l'adulte, à un niveau assez bas, dans plusieurs tissus y compris le tissu adipeux.

Le gène *agouti* code pour une protéine sécrétée qui contient 131 acides aminés [17]. La comparaison de séquences entre la protéine Agouti et d'autres protéines connues (et dont les séquences sont publiées) n'a montré aucune homologie significative. La protéine est composée de quatre domaines (figure 2): un peptide signal dans la région amino-terminale (dont le rôle est de relayer la sécrétion extracellulaire de la protéine), une région centrale riche en résidus d'acides aminés basiques (16 Lys ou Arg sur une longueur totale de 29 acides aminés; ce fragment contient aussi un site de N-glycosylation ainsi que des sérines et thréonines qui peuvent être des sites de phosphorylation de la protéine Agouti), un fragment poly-proline adjacent à la région basique et qui est normalement responsable de la structure en hélice de certaines protéines comme le collagène, et un domaine carboxy-terminal riche en résidus cystéines. La fonction exacte des fragments centraux (basique et prolinique) n'est pas déterminée. Le dernier domaine (carboxy-terminal) est aussi biologiquement actif que la protéine entière *in vitro* [18, 19]. Une autre caractéristique de la région carboxy-terminale est que les 10 résidus cystéines sont espacés d'une manière semblable à celle des cystéines conservées dans un grand groupe de neurotoxines présentes dans certains venins [20]. Toutes les 10 cystéines – dans la protéine Agouti – sont reliées par des ponts disulfures, sur un modèle [19] identique à celui

observé dans les agatoxines [20]. Cependant, nous n'avons observé aucun effet de ces toxines ni sur la lipogenèse, ni sur les signaux calcium réglés par la protéine Agouti.

L'analyse moléculaire des mutants *A^y* a confirmé la délétion d'un large fragment (170 kb) en amont du gène *agouti*. Cette délétion supprime la presque totalité du gène *Raly* (*ribonucleoprotein associated with lethal yellow*) sauf son premier exon et son promoteur qui contrôle alors la transcription du gène *agouti* [21]. Le gène *Raly* étant exprimé de façon ubiquiste, la conséquence du contrôle transcriptionnel du gène *agouti* par le promoteur *Raly* (au lieu de son propre promoteur) est que la protéine Agouti ubiquiste.

Les souris transgéniques, dont l'ADNc d'*agouti* est placé sous le contrôle transcriptionnel de promoteurs ubiquistes (l'actine), non seulement expriment l'ARNm *agouti* dans tous les tissus, mais aussi développent l'obésité, l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie et un pelage de couleur jaune [22]. *Agouti* est exprimé chez ces souris dans tous les tissus à des niveaux supérieurs ou égaux à ceux observés chez les souris *A^y*. Les mâles et les femelles transgéniques deviennent respectivement 30-40 % et 60-70 % plus lourds que les témoins non-transgéniques [22]. En outre, la température centrale est considérablement déprimée chez les souris transgéniques [23]. Cela indique que la diminution de la thermogénèse peut contribuer à une balance énergétique positive chez les souris jaunes obèses. Qu'elles soient mâles ou femelles, les souris transgéniques deviennent hyperinsulinémiques à l'âge de 12 semaines, alors que seuls les mâles développent l'hyperglycémie [22]: le rapport insuline/glucose chez ces souris transgéniques est le double de celui des non-transgéniques. Ces résultats indiquent que

l'expression ectopique du gène *agouti* restitue le syndrome de la souris obèse jaune et démontre que cette expression ectopique du gène *agouti* est responsable du syndrome et des désordres associés à la mutation dominante *agouti* [22]. Ces résultats suggèrent que l'expression du gène *agouti* dans un ou plusieurs tissus déclenche le développement de l'obésité. Il est intéressant de noter que les souris transgéniques qui surexpriment spécifiquement *agouti* dans la peau [24] ou le tissu adipeux [25] ne développent pas d'obésité. Cependant, l'injection d'insuline aux souris surexprimant *agouti* dans le tissu adipeux provoque un gain de poids [25]. Toutes les souris transgéniques exprimant *agouti* dans le tissu adipeux ou de façon ubiquiste développent aussi des niveaux très élevés de leptine [27, 28], en accord avec l'observation de niveaux élevés de leptine chez les souris *A^y* (et autres modèles d'obésité) comparées aux témoins [26]. Les hauts niveaux de leptine ont été attribués à la résistance de ces animaux aux effets de la leptine [26]. Cependant, il est possible que cette augmentation aide à limiter l'obésité provoquée par *agouti*.

L'analyse mutationnelle d'*agouti* a révélé que les mêmes propriétés structurales d'*agouti* sont généralement importantes aussi bien pour la production du pigment jaune que pour le développement de l'obésité [29]. Les souris transgéniques qui expriment une mutation dans le peptide signal ne deviennent ni jaunes ni obèses, alors que la délétion de la moitié de la région centrale basique d'*agouti* n'a pas d'effet significatif sur ces phénotypes. Cependant, la substitution de chaque cystéine par une sérine dans la région carboxy-terminale d'*agouti* bloque leur développement [29]. Les mutations dans la région carboxy-terminale diminuent aussi bien l'obésité que l'effet inhibiteur d'*agouti* sur la liaison du ligand du récepteur de la mélanocortine [18, 29].

Mécanismes d'action d'Agouti

Il a été proposé que la protéine Agouti agit en général *via* un antagonisme avec les récepteurs des mélanocortines. Ces récepteurs sont par-

Tableau I			
PROPRIÉTÉS DES RÉCEPTEURS DES MÉLANOCORTINES			
Récepteur	Ligands naturels	Expression tissulaire	Fonctions majeures
MC1-R	MSH-ACTH	Mélanocytes, macrophages, tissu adipeux	Pigmentation, immunité, métabolisme lipidique?
MC2-R	ACTH	Surrénales, tissu adipeux	stéroïdogénèse, lipolyse
MC3-R	MSH-ACTH	Cerveau, placenta, pancréas, région gastro-intestinale	Comportement alimentaire. À déterminer: thermogénèse, régulation de la leptine, NPY et développement foetal
MC4-R	MSH-ACTH	Cerveau, muscle	Comportement alimentaire. À déterminer: thermogénèse, régulation de la leptine et NPY
MC5-R	MSH-ACTH	Ubiquitaire	Largement inconnue, métabolisme lipidique?

MSH comprend les agonistes suivants: α MSH, β MSH, γ MSH et NDP-MSH (puissant agoniste des mélanocortines au niveau des récepteurs MC1-R, MC3-R, MC4-R et MC5-R).

que les deux phénotypes sont indépendants l'un de l'autre, et que la protéine Agouti n'agit pas au niveau de MC1-R pour induire l'obésité. A l'inverse, nous avons démontré que l'administration périphérique d'un puissant agoniste des mélanocortines (NDP-MSH) ne supprime pas les anomalies métaboliques provoquées par l'obésité de la souris jaune (*voir plus loin*).

Des études récentes ont démontré [31] que la protéine Agouti est un antagoniste d'un autre récepteur de la famille des mélanocortines, MC4-R. Ce récepteur est largement exprimé dans le cerveau, en particulier dans plusieurs régions de l'hypothalamus [33] connues pour leur rôle dans la régulation directe du poids corporel [5]. L'élimination des récepteurs MC4-R par recombinaison homologue a entraîné le syndrome d'obésité de la souris jaune [34]. Cependant, l'ampleur de l'hyperinsulinémie, de l'hyperglycémie et de l'excès d'appétit est considérablement plus importante que chez les souris A^{vy} ou chez les souris transgéniques exprimant *agouti*. Contrairement aux récepteurs MC1-R, les récepteurs MC4-R semblent donc jouer un rôle majeur dans l'obésité de la souris jaune ou l'obésité induite par l'expression ectopique d'*agouti*. Cette observation est corroborée par des études montrant que l'expression d'*agouti* dans la peau provoque le développement du pelage jaune sans aucune modification du poids corporel ni de l'hyper-

tie de la famille de récepteurs à sept domaines transmembranaires associés aux protéines G. Le *Tableau I* décrit les différents récepteurs des mélanocortines, leur spécificité, leur distribution tissulaire et leur fonction (pour revue, *voir* [30]).

Bien que le mécanisme d'action de la protéine Agouti dans l'obésité n'ait pas été déterminé, son action dans les cellules folliculaires sur la production du pigment jaune chez la souris est fondée sur l'antagonisme compétitif de la MSH (*melanocyte stimulating hormone*) [31], conduisant à la suppression de la production de l'AMP cyclique et à la synthèse d'un pigment jaune (phaeomélanine), en parallèle avec l'arrêt de la synthèse du pigment noir (eumélanine) (*figure 3*). En conséquence, ce mécanisme peut servir de modèle pour déterminer comment *agouti* conduit à l'obésité. Le gène *agouti* s'oppose à la liaison de la MSH au récepteur mélanocortine 1 (MC1-R) et bloque l'augmentation de l'AMP cyclique et la synthèse de l'eumélanine. Cette action antagoniste d'*agouti*, a été démontrée dans la lignée rénale embryonnaire humaine (HEK 293) transfectée et

exprimant MC1-R [31]. Bien que le pelage jaune chez la souris coïncide généralement avec son obésité, la synthèse du pigment jaune n'est pas nécessaire au développement de l'obésité. En effet, les souris A^{vy} qui portent une mutation noire dominante ont un pelage noir mais deviennent obèses [32], indiquant

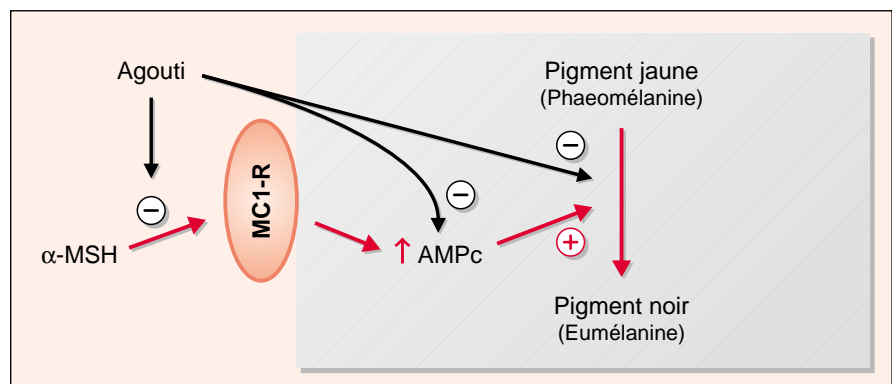


Figure 3. **Mécanisme d'action de la protéine Agouti au niveau du mélanocyte.** Agouti agit au niveau de la peau pour régler la pigmentation du pelage par son antagonisme avec l'hormone alpha MSH (alpha melanocyte stimulating hormone), au niveau du récepteur de la mélanocortine 1 (MC1-R). Cela provoque une diminution de la concentration intracellulaire de l'AMPc et par conséquent une augmentation de la synthèse du pigment jaune (phaeomélanine) au lieu du pigment noir (eumélanine).

glycémie [24]. Des études *in vitro* ont montré qu'Agouti n'est pas antagoniste de MC5-R, un récepteur de la famille mélanocortine exprimé de manière ubiquiste dans plusieurs tissus [35]; il est donc vraisemblable que ce récepteur ne joue aucun rôle dans l'obésité de la souris jaune [18, 30]. MC3-R et MC2-R restent des cibles potentielles pour *agouti* dans les tissus périphériques. MC3-R [33] est exprimé dans le système limbique, l'hypothalamus, le placenta, et l'appareil digestif et la protéine Agouti est un puissant antagoniste du récepteur MC3-R humain (mais pas chez le rat) [18, 31]. Il reste à déterminer si *agouti* s'oppose à MC2-R (récepteurs ACTH), étant donné que ces récepteurs sont exprimés et régle la lipolyse dans les adipocytes [36]. L'homologue humain de la protéine Agouti nommé *agouti signaling protein* (ASIP) est aussi un antagoniste compétitif de la MSH sur le récepteur MC1-R [37]. ASIP est un antagoniste puissant des récepteurs humains MC1-R, MC2-R et MC4-R et il pourrait jouer un rôle dans les transmissions des signaux intercellulaires chez l'homme [37], comme la protéine Agouti murine.

Les effecteurs centraux impliqués dans le mécanisme d'action de la protéine Agouti

Les effets de la protéine Agouti dans les syndromes d'obésité sont vraisemblablement relayés à la fois par un mécanisme central et par un mécanisme périphérique (*voir plus loin*). Ces mécanismes peuvent être affectés différemment par leur antagonisme avec les récepteurs des mélanocortines (MC-R). Des études récentes ont impliqué l'hypothalamus dans l'obésité de la souris jaune. Les souris transgéniques déficientes en MC4-R deviennent boulimiques et présentent plusieurs caractéristiques du syndrome d'obésité des souris jaunes, ce qui semble impliquer clairement le récepteur hypothalamique MC4-R dans l'obésité de la souris jaune [38]. Des études confirmant ces résultats montrent que l'injection intracérébroventriculaire d'un puissant agoniste du récepteur MC4-R a inhibé le comportement alimentaire chez les

modèles d'obésité avec boulimie tels que les souris obèses *ob/ob* et *A^y* et les souris maintenues à jeun ou chez lesquelles a été injecté le neuropeptide Y (NPY) [38]. Le même groupe de chercheurs a identifié le noyau hypothalamique dorsal intermédiaire comme la région du cerveau altérée par le dysfonctionnement des signaux mélanocortinergiques *via* l'augmentation du neuropeptide Y [39]. Les taux de NPY sont élevés aussi bien chez les souris dépourvues de MC4-R que chez les souris *A^y* qui sont toutes obèses [39]. Ces données démontrent que *agouti* peut induire l'obésité par son antagonisme avec les récepteurs centraux MC4-R et que cette action fait probablement intervenir NPY pour régler la prise alimentaire (*figure 4*). Bien que les études décrites ci-dessus indiquent un rôle important de l'hypothalamus dans l'obésité de la souris jaune, aucune étude n'a montré un effet direct d'une injection intracérébrale de la protéine Agouti (ou de l'expression spécifique de cette protéine dans le système nerveux central) sur l'obésité ou sur le métabolisme énergétique.

Récemment, une nouvelle protéine a été décrite, produit d'un transcrite similaire au gène *agouti* (*agouti-related transcript*, ART, appelée *agouti related protein*, AGRP) (*m/s n° 6-7, vol. 13, p. 905*) [40, 41]. L'ART code pour une protéine de 132 acides aminés qui est à 25% identique à l'Agouti humaine et dont le plus haut degré d'identité réside dans la partie carboxy-terminale où 9 cystéines sur 11 sont conservées [40]. L'ART murine

est identique à 81% – au niveau de la séquence peptidique – à l'ART humaine et présente la même distribution tissulaire. Le gène *ART* est situé, chez l'homme, sur le chromosome 16 et, chez la souris, sur le chromosome 8 [40]. Comme la protéine Agouti, ART agit aussi *in vitro* comme un puissant antagoniste des récepteurs humains MC3-R et MC4-R mais est un faible antagoniste du récepteur humain MC5-R [40]. L'action d'ART dans la régulation des récepteurs de la mélanocortine dans l'hypothalamus a été récemment impliquée dans le contrôle central de la prise alimentaire [40]. L'expression ubiquiste de l'ADNc de l'AGRP humaine chez des souris transgéniques a induit l'obésité sans affecter la pigmentation des souris. Les niveaux de cette protéine sont 8 à 10 fois plus élevés chez les souris obèses *ob/ob* et *db/db* comparativement aux souris témoins, indiquant que AGRP est probablement un neuropeptide impliqué dans le contrôle normal du poids en aval de l'action de la leptine (*m/s n° 4, vol. 14, p. 496*) [41].

Les effecteurs périphériques impliqués dans l'action d'agouti

Nos données récentes soulignent le rôle des tissus périphériques, en particulier le tissu adipeux, dans le syndrome de l'obésité de la souris jaune. Les récepteurs de la mélanocortine MC2-R et MC5-R sont exprimés dans le tissu adipeux et dans les cellules de la lignée adipocytaire 3T3-L1 [36].

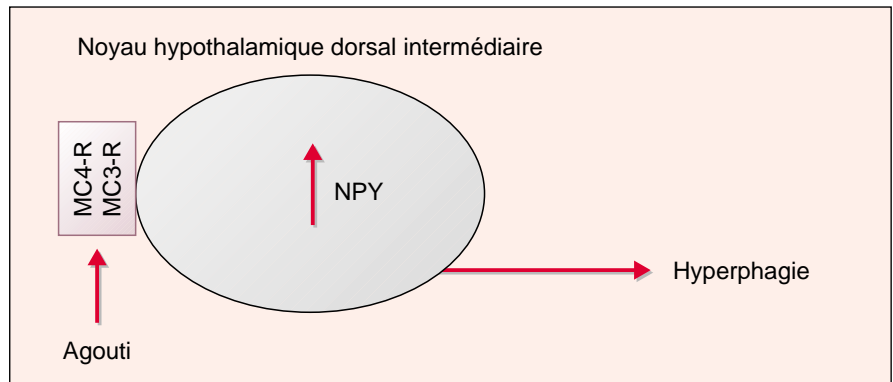


Figure 4. **Rôle de l'hypothalamus dans l'obésité de la souris jaune.** La protéine Agouti agit dans le système nerveux central, en particulier sur l'hypothalamus au niveau des récepteurs mélanocortine (surtout MC4-R), provoquant une augmentation du neuropeptide NPY et par conséquent la boulimie.

Afin de déterminer le rôle des récepteurs périphériques de la mélanocortine dans l'obésité de la souris jaune, nous avons injecté par voie intrapéritonéale un puissant agoniste des mélanocortines (NDP-MSH). Cet agoniste se lie fortement à tous les récepteurs des mélanocortines sauf MC2-R. NDP-MSH a été incapable d'inverser l'obésité ou les anomalies métaboliques observées chez la souris jaune obèse aussi bien celles surexprimant *agouti* à cause de la mutation dominante (*A^y*) que celles qui expriment *agouti* de façon ubiquiste (souris transgéniques). Cependant, cet agoniste a montré comme prévu, d'autres effets physiologiques, sur la couleur du pelage (noire) et la température centrale (diminution) [28]. En accord avec les effets que nous avons observés, d'autres études ont par ailleurs montré que l'injection intracérébrale de NDP-MSH bloque l'effet des interleukines sur la température centrale et l'inflammation [42]. Ces études suggèrent que les effets métaboliques de la protéine Agouti peuvent être relayés par les récepteurs de la mélanocortine mais pas *via* un antagonisme compétitif et que *agouti* agit peut-être par l'intermédiaire d'un récepteur différent des récepteurs de la mélanocortine. Cela contraste avec les effets centraux d'*agouti* discutés ci-dessus qui impliquent un antagonisme des récepteurs des mélanocortines (MC3-R et MC4-R) dans les effets d'*agouti* sur l'obésité.

Puisque la protéine Agouti n'est pas une hormone circulante mais qu'elle agit de façon paracrine, les tissus lipogéniques sont des cibles possibles pour le produit du gène *agouti*. Des études ont en effet montré des taux élevés de lipogénèse hépatique et une augmentation de la taille adipocytaire chez la souris jaune obèse comparée aux souris normales [4]. Ces études suggèrent que l'augmentation du stockage et de la synthèse des lipides dans le foie et le tissu adipeux contribuent au phénotype obèse de la souris jaune. En effet, nous avons démontré récemment qu'Agouti induit l'activité d'un gène important dans la synthèse *de novo* des acides gras (*fatty acid synthase*, FAS) et augmente le taux de triglycérides dans les adipocytes 3T3-L1 [43]. Ces résultats sont en accord

avec la surexpression de FAS dans le tissu adipeux des souris obèses *A^y* et des souris transgéniques (exprimant *agouti* de façon ubiquiste) [23, 43]. Toutefois, la relation de cause à effet entre obésité et hyperinsulinémie reste à élucider (*m/s n° 2, vol. 14, p. 227*), puisque l'hyperinsulinémie ainsi que l'hyperglycémie sont des effecteurs principaux de l'expression des enzymes de la lipogénèse et peuvent ainsi contribuer à l'obésité de la souris jaune.

Les niveaux intracellulaires de calcium [Ca^{2+}]_i sont plus élevés chez les souris jaunes obèses que chez les souris normales [44]. De plus, la protéine recombinante Agouti augmente le [Ca^{2+}]_i dans plusieurs types cellulaires y compris l'adipocyte [31, 28]. Nous avons en outre démontré qu'*agouti* augmente l'expression du gène FAS et l'accumulation des triglycérides dans les adipocytes 3T3-L1 et conduit à l'obésité au moins en partie *via* un mécanisme impliquant les signaux liés au Ca^{2+} [23, 28]. Les

effets de la protéine Agouti sur la protéine FAS et l'obésité aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* sont inhibés par des agents pharmacologiques bloquant l'entrée cellulaire du Ca^{2+} tels que la nitrendipine ou la nifédipine [23, 43]. Ces études suggèrent que des perturbations dans les signaux cellulaires liés au calcium induits par la protéine Agouti peuvent contribuer à la résistance à l'insuline et à l'obésité de la souris jaune. Les souris transgéniques qui expriment *agouti* uniquement dans le tissu adipeux, sous le contrôle transcriptionnel du promoteur du gène *aP2* (*aP2* code pour une protéine spécifique de l'adipocyte qui se lie aux acides gras), expriment de très hauts niveaux d'*agouti* dans les tissus adipeux brun et blanc [25]. Cependant, ces souris ne deviennent pas obèses et ne prennent du poids qu'après des injections quotidiennes d'insuline. Cela indique que la seule expression d'*agouti* dans l'adipocyte n'est pas suffisante pour induire

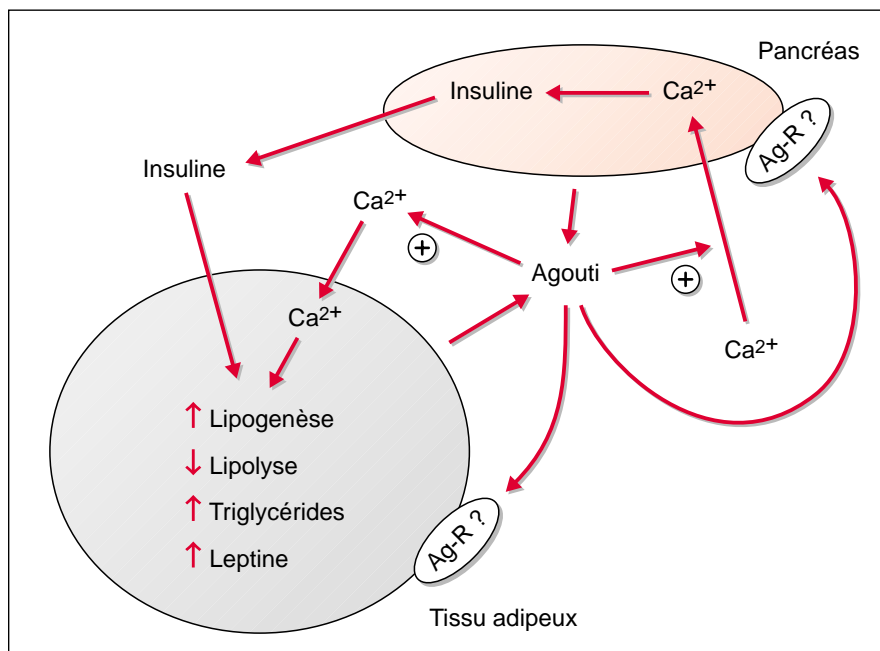


Figure 5. Rôle du tissu adipeux et du pancréas dans l'obésité de la souris jaune. La protéine Agouti est exprimée et sécrétée par des tissus périphériques, en particulier le tissu adipeux et le pancréas et induit l'accumulation de triglycérides dans les adipocytes. Cet effet est encore augmenté par la stimulation de la sécrétion de l'insuline par Agouti. L'insuline et Agouti agissent de manière additive pour stimuler l'hypertrophie adipocytaire et la synthèse-sécrétion de la leptine, qui peut-être sert à limiter l'obésité provoquée par Agouti. De manière générale, ces effets périphériques de la protéine Agouti font intervenir les signaux calcium. Agouti peut agir, soit au niveau de ses propres récepteurs (AgR), soit au niveau des récepteurs de la mélanocortine (mais non *via* un antagonisme compétitif).

l'obésité [25] et suggère qu'Agouti agit en présence de niveaux élevés d'insuline pour augmenter le poids des souris, peut-être grâce aux effets lipogéniques et antilipolytiques [3, 4] de l'insuline et d'Agouti. Nous avons confirmé ces hypothèses *in vitro* en démontrant que la protéine Agouti augmente la lipogénèse [43] et inhibe la lipolyse [44] dans les adipocytes. En accord avec les études réalisées *in vivo*, Agouti et l'insuline agissent d'une manière additive pour augmenter la transcription du gène de la FAS des acides gras [45]. Il est intéressant de noter que nous avons aussi montré récemment qu'*agouti* est exprimé dans les cellules pancréatiques dans lesquelles il augmente les niveaux intracellulaires de calcium ainsi que la sécrétion de l'insuline [46]. Dans l'ensemble, ces données indiquent qu'une combinaison d'hyperinsulinémie et de l'expression (normale) d'*agouti* dans le tissu adipeux humain peut contribuer à l'hypertrophie adipocytaire (figure 5).

Conclusion et perspectives sur le rôle et les mécanismes d'action de la protéine Agouti dans l'obésité

Les données disponibles indiquent que la protéine Agouti règle la masse grasse par des mécanismes centraux et périphériques (figure 6) qui peuvent être affectés différemment par l'antagonisme des récepteurs des mélanocortines (*m/s n° 4*, vol. 14, p. 496). Au niveau central, Agouti agit comme antagoniste des récepteurs des mélanocortines MC4R pour régler le comportement alimentaire. Des études futures viseront probablement à élucider les mécanismes de la protéine Agouti et des récepteurs des mélanocortines centraux dans l'obésité et les rapports entre *agouti* et leptine, de même que leurs actions dans la régulation de la prise alimentaire. Dans les tissus périphériques, la protéine Agouti agit comme une hormone lipogénique et antilipolytique, stimulant la sécrétion de l'insuline et favorisant le stockage des triglycérides, en partie selon des mécanismes modulant les niveaux intracellulaires de calcium. Il reste à déterminer si des récepteurs des mélanocortines ou des

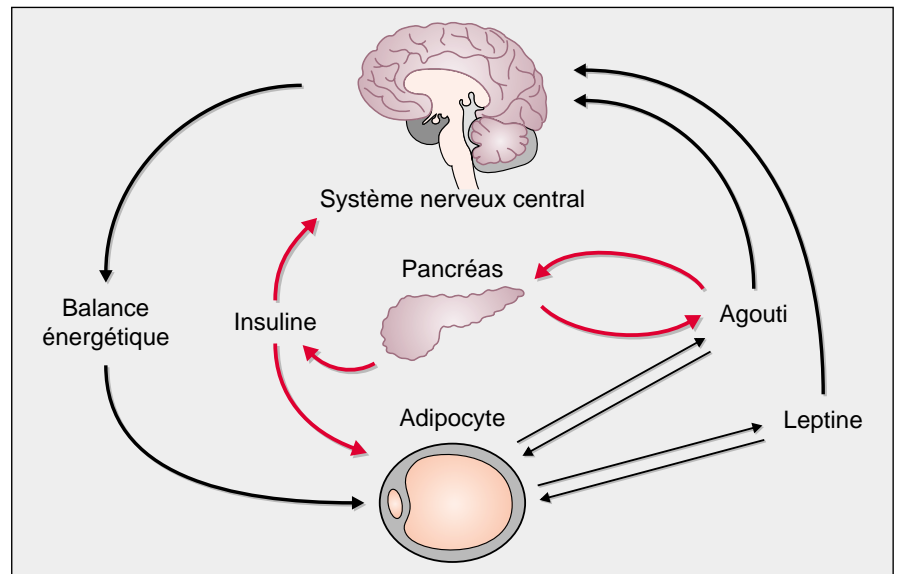


Figure 6. **Rôle de la protéine Agouti dans la régulation centrale et périphérique de la masse adipeuse.** Les mécanismes d'action de la protéine Agouti sur la balance énergétique font intervenir des effecteurs centraux (hypothalamus) et périphériques (adipocytes et pancréas) qui agissent de manière coordonnée pour contrôler la masse adipeuse.

récepteurs spécifiques de la protéine Agouti sont impliqués dans la régulation périphérique de la masse adipeuse. Cependant, il semble que les actions périphériques d'*agouti* n'impliquent pas l'antagonisme compétitif des récepteurs des mélanocortines ■

Remerciements

L'auteur remercie le Dr C. Hountondji pour son aide lors de la rédaction de cet article.

RÉFÉRENCES

1. Naggert J, Harris T, North M. The genetics of obesity. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7: 398-404.
2. Bultman SJ, Michaud ED, Woychick RP. Molecular characterization of the mouse *agouti* locus. *Cell* 1992; 71: 1-20.
3. Kwon HY, Bultman SJ, Loffler C, Chen W, Furdon PJ, Powell JG, Usala AL, Wilkinson WO, Hansmann I, Woychick RP. Molecular structure and chromosomal mapping of the human homolog of the *agouti* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9760-4.
4. Yen TT, Gill AM, Frigeri LG, Barsh GS, Wolff GL. Obesity, diabetes and neoplasia in yellow *A^y*/mice: ectopic expression of the *agouti* gene. *FASEB J* 1994; 8: 479-88.
5. Bray GA. Mechanisms for development of genetic, hypothalamic and dietary obesity. In: Bray GA, Ryan DH, eds. Pennington Center Nutrition Series, 1st ed, vol 5. *Molecular and genetic aspects of obesity*. Baton Rouge, LA: Louisiana State University Press, 1996: 3-66.

6. Dicki MM, Woodley GW. The age factor in weight of yellow mouse. *J Hered* 1946; 37: 365-8.
7. Zomely C, Mayer J. Fat metabolism in experimental obesities. *Am J Physiol* 1959; 196: 611-3.
8. Yen TT, Allan JA, Yu PL, Acton MA, Pearson DV. Triacylglycerol contents and *in vivo* lipogenesis of *ob/ob*, *db/db*, and *A^{y/a}* mice. *Biochim Biophys Acta* 1976; 441: 213-20.
9. Johnson PR, Hirsch J. Cellularity of adipose depots in six strains of genetically obese mice. *J Lipid Res* 1972; 13: 2-11.
10. Spiegelman BM, Flier JS. Adipogenesis and obesity: rounding up the big picture. *Cell* 1996; 87: 377-89.
11. Frigeri LG, Wolf GL, Teguh C. Differential responses of yellow mouse *A^y/A* and *agouti A/a* (BALB/c X VY) F1 hybrid to the same diets: glucose tolerance, weight gain, and adipocyte cellularity. *Int J Obes* 1988; 12: 305-20.
12. Yen TT, McKee MM, Stamm NB. Thermogenesis and weight control. *Int J Obes* 1984; 1 (suppl 8): 65-78.
13. Warbritton A, Gill AM, Yen TT, Bucci T, Wolff GL. Pancreatic islet cells in preobese yellow *A^{y/-}* mice: relation to adult hyperinsulinemia and obesity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 206: 145-51.
14. Plocher TA, Powley TL. Effect of hypophysectomy on weight gain and body composition in the genetically obese yellow (*A^{y/a}*) mouse. *Metabolism* 1976; 25: 593-602.
15. Jackson E, Stolz D, Martin R. Effect of adrenalectomy on weight gain and body composition of yellow obese mice (*A^{y/a}*). *Horm Metab Res* 1976; 8: 452-5.

RÉFÉRENCES

16. Wolff GL. Growth of inbred yellow (A^y/a) and non-yellow (a/a) mice in parabiosis. *Genetics* 1963; 48: 1041-58.
17. Miller MW, Duhl DM, Vrieling H, Cordes SP, Ollmann MM, Winkes BM, Barsh GS. Cloning of the mouse agouti gene predicts secreted protein ubiquitously expressed in mice carrying the lethal yellow mutation. *Genes Dev* 1993; 7: 454-67.
18. Kiefer LL, Ittoop OR, Bunce K, Truiesdale AT, Willard DH, Nichols JS, Blanchard SG, Mountjoy K, Chen WJ, Wilkison WO. Mutations in the carboxyl terminus of the agouti protein decrease inhibition of ligand binding to the melanocortin receptors. *Biochemistry* 1997; 36: 2084-90.
19. Willard DH, Bodnar W, Harris C, Kiefer L, Nichols JS, Blanchard S, et al. Agouti structure and function: characterization of a potent alpha-melanocyte stimulating hormone receptor antagonist. *Biochemistry* 1995; 34: 12341-6.
20. Olivera BM, Miljanich GP, Ramachandran J, Adams ME. Calcium channel diversity and neurotransmitter release. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 823-67.
21. Michaud EJ, Bultman SJ, Stubbs LJ, Woychik RP. The embryonic lethality of homozygous lethal yellow mice (A^y/A^y) is associated with the disruption of a novel RNA binding protein. *Genes Dev* 1993; 7: 1203-13.
22. Klebig ML, Wilkinson JE, Geisler JG, Woychik RP. Ectopic expression of the agouti gene in transgenic mice causes obesity, features of type II diabetes, and yellow fur. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 4728-32.
23. Kim JH, Mynatt RL, Moore JW, Woychik RP, Moustaid N, Zemel MB. The effects of calcium channel blockade on agouti-induced obesity. *FASEB J* 1996; 14: 1646-52.
24. Kucera GT, Bortner DM, Rosenberg MP. Overexpression of an agouti cDNA in the skin of transgenic mice recapitulates dominant coat color phenotypes of spontaneous mutants. *Dev Biol* 1996; 173: 162-73.
25. Mynatt RL, Miltenberger RJ, Klebig ML, Zemel MB, Wilkinson JE, Wilkison WO, Woychik RP. Combined effects of insulin treatment and adipose tissue specific agouti expression on the development of obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 919-22.
26. Halaas JL, Boozer C, Blair-West J, Fidathusein N, Denton DA, Friedman JM. Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 8878-83.
27. Claycombe KJ, Xue B, Mynatt RL, Wilkison WO, Zemel MB, Moustaid N. Regulation of leptin by agouti and insulin. *FASEB J* 1998; 12: A505.
28. Zemel MB, Moore JW, Moustaid N, Kim JH, Nichols JS, Blanchard SG, et al. Effects of a potent melanocortin agonist on the diabetic/obese phenotype in yellow mouse. *Int J Obes* 1998 (sous presse).
29. Perry WL, Nakamura T, Swing DA, Secret L, Eagleson B, Hustadm CM, Copeland, NG, Jenkins NA. Coupled site-directed mutagenesis/transgenesis identifies important functional domains of the mouse agouti protein. *Genetics* 1996; 144: 255-64.
30. Mountjoy KG, Wong J. Obesity, diabetes and functions for proopiomelanocortin-derived peptides. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 128: 171-7.
31. Lu DD, Willard IR, Patel S, Radwell L, Overton T, Kost M, Luther W, Chen RP, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 1994; 371: 799-802.
32. Wolf GL, Galbraith DB, Domon OE, Row JM. Phaeomelanin synthesis and obesity in mice. Interaction of the viable yellow *Avy* and *sombre* (*Eso*) mutations. *J Hered* 1978; 69: 295-8.
33. Magenis RE, Smith L, Nadeau JH, Johnson KR, Mountjoy KG, Cone R. Mapping of the ACTH, MSH and neural MC3 and MC4 melanocortin receptors in the mouse and human. *Mamm Genome* 1994; 5: 503-8.
34. 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.
35. Gantz I, Shimoto Y, Konda Y, Miwa H, Dickinson CJ, Yamada T. Molecular cloning, expression and characterization of a fifth melanocortin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 200: 1212-20.
36. Boston BA, Cone RD. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in 3T3-L1 cell line. *Endocrinology* 1996; 137: 2043-50.
37. Yang YK, Ollmann MM, Wilson BD, Dickinson C, Yamada T, Barsh GS, Gantz I. Effects of recombinant agouti-signaling protein on melanocortin action. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 274-80.
38. Fan W, Boston BA, Kesterson RA, Hruby VJ, Cone RD. Role of melanocortinergic neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* 1997; 385: 165-8.
39. Kesterson RA, Huszar D, Lynch CA, Sierly RB, Cone RD. Induction of neuro-peptide Y gene expression in the dorsal medial hypothalamus nucleus in two models of the agouti obesity syndrome. *Mol Endocrinol* 1997; 11: 630-7.
40. Shutter JR, Graham M, Kinsey S, Luthy R, Stark KL. Hypothalamic expression of ART, a novel gene related to agouti, is upregulated in obese and diabetic mutant mice. *Genes Dev* 1997; 11: 593-602.
41. Ollemann MM, Wilson BD, Yang YK, Kerns JA, Chen Y, Gantz I, Barsh GS. Antagonism of central melanocortin receptors *in vitro* and *in vivo* by agouti-related protein. *Science* 1997; 278: 135-8.
42. Robertson B, Dostal K, Daynes RA. Neuropeptide regulation of inflammatory and immunologic responses. *J Immunol* 1988; 140: 4300-7.
43. Jones BH, Kim JH, Zemel MB, Michaud E, Woychik RP, Wilkison WO, Moustaid N. Agouti protein upregulates components of lipid metabolism: possible paracrine actions of agouti in yellow mouse obesity. *Am J Physiol* 1996; 270: E192-6.
44. Xue B, Moustaid N, Wilkison WO, Zemel B. The agouti gene product inhibits lipolysis in human adipocytes *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism. *FASEB J* 1998 (sous presse).
45. Claycombe KJ, Jones BH, Standridge MK, Wilkison WO, Zemel MB, Guo Y, Moustaid N. Transcriptional regulation of the adipocyte fatty acid synthase gene by the agouti gene product: interaction with insulin. *FASEB J* 1997; 11: A352.
46. Xue B, Wilkison WO, Mynatt RL, Moustaid N, Zemel MB. The agouti gene product stimulates pancreatic β cell Ca^{2+} signaling and insulin release. *FASEB J* 1997; 11: A230.



Prochaines réunions
Atelier préparatif sur HLA-G
Deuxième semestre 1999
Paris, France

Organisateurs :

Edgardo D. Carosella
 Hôpital Saint-Louis – Centre Hayem – CEA
 1, avenue Claude-Vellefaux
 75475 Paris Cedex 10, France
 Tél. : + 33 (1) 53 72 21 99 – Fax : + 33 (1) 48 03 19 60

Renée Fauchet
 Laboratoire d'Héματο-Immunologie – CHRU Rennes
 rue Henri-Le-Guillou
 35033 Rennes, France
 Tél. : + 33 (2) 99 28 42 72 – Fax : + 33 (2) 99 28 41 52

Summary

The role of the Agouti protein in the yellow mouse obesity syndrome

Several dominant mutations at the *agouti* locus in the mouse cause a syndrome of marked obesity, hyperinsulinemia, insulin resistance, hyperglycemia, increased lean body mass as well as yellow coat color. Dominant obese yellow mutants, such as viable yellow (A^{vy}) and lethal yellow (A^y) exhibit mutations in the promoter region of the *agouti* gene, resulting in ectopic overexpression of *agouti* transcripts which contain the entire protein-coding portion in numerous tissues. Transgenic mice in which the wild-type *agouti* cDNA is placed under the transcriptional control of ubiquitous promoters develop the yellow mouse obesity syndrome, demonstrating that ectopic expression of *agouti per se* is responsible for this syndrome. While expression of *agouti* in adipose tissue does not lead to obesity, the combination of hyperinsulinemia and *agouti* expression in adipose tissue leads to weight gain. The mechanism of *agouti* regulation of mouse coat color is based upon competitive antagonism of α -melanocyte stimulating hormone (α -MSH) binding at the melanocortin receptor 1 (MC1-R), resulting in suppression of cAMP production and a shift from eumelanin (black pigment) to pheomelanin (yellow pigment) production. Similar to its action on the skin, *agouti* acts centrally as an antagonist to α -MSH at the melanocortin receptor (MC4R). *Agouti* recombinant protein increases intracellular Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) signaling in several cell types including adipocytes and stimulates fatty acid and triglyceride synthesis in adipocytes at least in part *via* a Ca^{2+} -dependent mechanism. *Agouti* and insulin act in an additive manner to increase fatty acid synthesis in adipocytes. Interestingly, *agouti* is expressed in human adipose tissue and pancreatic islets where it increases intracellular calcium and insulin secretion.

