UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL — UNIVERSITÉ D'AUVERGNE

Année 2015 — N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Nutrition

Soutenue le 10 Septembre 2015

par

Sinda MAHBOULI

Etude de l'impact de la leptine sur le statut oxydatif et inflammatoire du tissu mammaire : approche expérimentale *in vitro* et *in vivo.* Mise en œuvre de la technique de détection par fluorescence native.

Membres du jury :

Mme Joëlle Dupont, Directrice de Recherche, INRA CNRS UMR 6175, Tours — Rapporteur

Mme Mathilde Touvier, Chargée de Recherche, INSERM U1153, Paris — Rapporteur

M. Christian Villiers, Chargé de Recherche, INSERM U823, Institut A. Bonniot, La Tronche — Rapporteur

M. Jacques Nunès, Directeur de Recherche, INSERM U1068, CNRS UMR 7258, Marseille

Directrice de Thèse :
Mme Marie-Paule VASSON, Professeur d'Université PU-PH, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Encadrant de Thèse :
M. Adrien ROSSARY, Maître de Conférences, UNH, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Laboratoire d'accueil :
Équipe Micro-environnement cellulaire et Immunonutrition, Unité de Nutrition Humaine (UNH),
UMR1019 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Université d'Auvergne

UNIVERSITÉ BLAISE PASCAL — UNIVERSITÉ D'AUVERGNE

Année 2015 — N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE
DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

N° d'ordre :

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne

Pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité : Nutrition

Soutenue le 10 Septembre 2015

par

Sinda MAHBOULI

Etude de l'impact de la leptine sur le statut oxydatif et inflammatoire du tissu mammaire : approche expérimentale *in vitro* et *in vivo.* Mise en œuvre de la technique de détection par fluorescence native.

Membres du jury :

Mme Joëlle Dupont, Directrice de Recherche, INRA CNRS UMR 6175, Tours — Rapporteur

Mme Mathilde Touvier, Chargée de Recherche, INSERM U1153, Paris — Rapporteur

M. Christian Villiers, Chargé de Recherche, INSERM U823, Institut A. Bonniot, La Tronche — Rapporteur

M. Jacques Nunès, Directeur de Recherche, INSERM U1068, CNRS UMR 7258, Marseille

Directrice de Thèse :
Mme Marie-Paule VASSON, Professeur d'Université PU-PH, UNH, UMR1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Encadrant de Thèse :
M. Adrien ROSSARY, Maître de Conférences, UNH, UMR 1019 INRA-Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand

Laboratoire d'accueil :
Équipe Micro-environnement cellulaire et Immunonutrition, Unité de Nutrition Humaine (UNH),
UMR1019 Institut National de la Recherche Agronomique (INRA)-Université d'Auvergne

Remerciements

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à l'ensemble des membres du jury. Merci à Madame Joëlle Dupont et Madame Mathilde Touvier pour avoir aimablement accepté et pris le temps de juger ce travail. Merci également à Monsieur Christian Villiers, et Monsieur Jacques Nunès pour avoir accepté de juger ce travail après avoir activement participé au Comité de thèse. Vos questions pertinentes et vos conseils sont précieux. C'est un immense honneur que vous me faites d'avoir accepté d'être membres du jury et rapporteurs de ce travail.

Je souhaite remercier ma directrice de thèse, Mme le Pr Marie-Paule Vasson, sans qui, cet accouchement douloureux n'aurait jamais eu lieu. Merci de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et permis de travailler dans les meilleures conditions. Je vous remercie également de m'avoir fait bénéficier de votre rigueur scientifique qui m'ont permis d'aboutir à ce travail de thèse et de votre acharnement à mener à bien tous les projets. Merci de m'avoir toujours soutenue dans les bons et les moins bons moments…

Mes remerciements vont également à Adrien Rossary, pour son encadrement, pour la gentillesse qu'il a manifestée à mon égard durant cette thèse, pour ses connaissances et pour tous les conseils et pour la confiance qu'il m'a accordés.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici en particulier à Marie-Chantal Farges. Mes plus sincères et chaleureux remerciements pour ses conseils, sa gentillesse et son hospitalité.

Je tiens évidement à remercier Stéphanie pour son aide lors des expérimentations mais, surtout pour sa bonne humeur, sa joie de vivre, son humanisme et l'ambiance qu'elle amène au laboratoire. Saches que tu es une personne très chère à mon cœur.

Merci aussi à Jérémie pour sa sympathie, sa bonne humeur et ses conseils scientifiques et méthodologiques pertinents et tous les bons moments de travail et d'amitié partagés et surtout merci d'avoir toujours le sourire.

Merci également à Aicha, Nicolas, Manon, Aurore pour vos encouragements continus. Merci pour les bons moments partagés ensemble au labo.

Je tiens à remercier spécialement Carmen pour sa bonne humeur, pour les bons moments qu'on a passés ensemble au labo, merci pour les rigolades à longueur de journée, le temps passe tellement vite avec toi ! Je ne saurais jamais comment te remercier pour ton soutien continu. Merci pour tout. Bonne continuation pour ta thèse et bon vent pour la suite.

Merci également à toutes les nombreuses personnes que j'ai côtoyées au laboratoire ces quelques années, qui se sont toujours montrées disponibles et chaleureuses : Carla, Bruno, Camille, Rachida, Kristell Combe, Kristell, Lauriane, Hermine et Lamia et bien d'autres…

Je n'oublie pas non plus de remercier Sandrine pour la joie de vivre qu'elle apporte au laboratoire et pour sa générosité.

Je remercie également tous les stagiaires que j'ai croisés pendant ma thèse.

Un grand Merci également à tous mes amis, pour leur sincère amitié et confiance, qui m'ont soutenue tout au long de cette épreuve, qui ont su trouver les bons mots pour me motiver et qui ont toujours été présents et à qui j'exprime ma reconnaissance et mon attachement. Ahlem, Khaoula, Balkis, Khaled, Malek, Salem, Mohammed, Chaïma, Sara, Radhia, Refka, Zina. Merci pour votre amitié !

Enfin, les mots les plus simples étant les plus forts, j'adresse toute mon affection à ma famille, et en particulier à mes parents et mes sœurs de m'avoir soutenue au cours de mes longues études et merci pour vos sacrifices. Malgré mon éloignement depuis quelques années, leur confiance, leur tendresse, leur amour me portent et me guident tous les jours. Merci pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

Enfin merci à toute les personnes que j'ai involontairement oubliées…

Sommaire

Résumé de thèse ..... ***i***

Abstract ..... ***ii***

Production scientifique ..... ***iii***

Liste des abréviations ..... ***v***

Liste des illustrations ..... ***vii***

Avant-propos ***1***

PARTIE I : Synthèse bibliographique ***3***

I. La leptine ***3***

1. Structure et synthèse de la leptine **3**

1.1. Structure du gène *ob* 3

1.2. Structure de la protéine 4

1.3. Synthèse, sécrétion et régulation de la leptine 4

2. Transduction du signal et voies de signalisation **6**

2.1. Récepteur de la leptine 6

2.2. Voies de signalisation 7

3. Rôles physiologiques **12**

3.1. Régulation de la prise alimentaire au niveau central 12

3.2. Régulation de la sécrétion d'insuline 14

3.3. Régulation de la digestion 14

3.4. Modulation des défenses immunitaires 15

4. Leptine et activité physique **17**

4.1. Données expérimentales 17

4.2. Données cliniques 20

5. Implication de la leptine en pathologie **21**

5.1. Leptine et obésité 21

5.2. Leptine et maladies hépatiques 23

5.3. Leptine et inflammation 25

5.4. Leptine et cancer mammaire 26

II. Le stress oxydatif ***31***

1. Systèmes pro-oxydants **31**

1.1. Espèces oxydantes 32

1.2. Source des espèces réactives 33

2. Défenses anti-oxydantes **37**

2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques 38

2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques 40

3. Homéostasie redox et régulation des voies de signalisation et de transcription **41**

4. Stress oxydant et dommages oxydatifs **42**

4.1. Dégâts cellulaires 42

4.2. Implication du stress oxydant en pathologie 46

III. Impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif 48

1. Effets de la leptine dans la modulation du statut oxydatif *in vitro* 49

2. Effets de la leptine dans la modulation du statut oxydatif *in vivo* 50

3. Etudes cliniques évaluant les effets de la leptine sur le statut oxydatif 51

PARTIE II : Application de la fluorescence native à la quantification des produits de peroxydation lipidique 53

I. Etat de l'art 53

1. Méthodes actuellement disponibles 53

2. Place de la fluorescence native 60

II. Objectif de l'étude : 62

III. Travaux réalisés en fluorescence native induite par laser à 224 nm 63

IV. Discussion – Conclusion 65

OBJECTIFS DE LA THESE 66

PARTIE III : Approche expérimentale in vitro 67

Publication n°1 67

Publication n°2 81

PARTIE IV : Approche expérimentale in vivo 97

Publication n°3 97

Publication n°4 113

PARTIE V : Discussion, conclusion et perspectives 123

Discussion 123

Conclusion et perspectives 131

Références bibliographiques 134

Annexe 166

Résumé

La leptine est une hormone peptidique ayant une action au niveau de nombreux tissus. Une dérégulation de la sécrétion de cette hormone est observée au cours de l'obésité. L'obésité est fréquemment associée à des troubles de santé dont les principaux sont le diabète de type II, l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaires. L'obésité est également un facteur de risque du cancer du sein, particulièrement en post-ménopause favorisant la récidive et augmentant la mortalité. Ces perturbations, associées à un état de stress oxydant défini par un excès de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par rapport aux systèmes de défense antioxydants, pourraient avoir un impact majeur dans le risque de carcinogenèse chez le sujet obèse. Il est clairement établi aujourd'hui que le statut oxydatif des cellules est directement corrélé aux capacités de prolifération mais aussi de survie des cellules dans leur environnement. A ce jour, très peu de données existent concernant le rôle de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires saines et tumorales.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'étudier, dans un premier temps, les mécanismes d'action et les effets de la leptine sur le statut oxydatif et inflammatoire des cellules épithéliales mammaires saines et néoplasiques présentant des caractéristiques différentes en termes de récepteurs hormonaux et de capacité d'invasion, puis dans un deuxième temps, une étude expérimentale a été conduite afin de caractériser in vivo l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur la croissance tumorale et le statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs. Le projet avait également pour finalité de mettre en œuvre une nouvelle technique d'analyse basée sur ladétection de fluorescence native induite par excitation laser à 224 nm afin d'évaluer la production de composés bio-actifs de la famille des éicosanoïdes, dont les isoprostanes, impliqués dans le processus inflammatoire.

Nous avons exploré in vitro l'impact de la leptine sur le statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires. Cette étude nous a permis d'établir que la réponse au signal leptinique varie en fonction du statut néoplasique de la lignée considérée, en fonction du temps de contact et non de la dose testée.

Ensuite, nous avons étudié l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur la croissance tumorale ainsi que le statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs à l'aide d'un modèle de souris âgées C57BL/6 de tumeur mammaire syngénique, nourries avec un régime hyper-lipidique (HL) vs un régime contrôle. Les animaux ovariectomisés ont été placés, soit dans un environnement enrichi (EE) pour favoriser l'activité physique et les interactions sociales, soit dans un environnement standard.

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative du poids dans les groupes recevant le régime HL tout en ayant une prise alimentaire journalière identique. La composition corporelle à 8 semaines montre une prise de masse grasse significative sous régime HL, majorée par l'ovariectomie et partiellement limitée par l'activité physique. Après implantation des tumeurs, le régime HL favorise la croissance tumorale et la perte de l'activité locomotrice. Par contre, l'EE prévient la perte d'activité physique des animaux.

La méthode de dosage par fluorescence native des isoprostanes, s'avère ne pas être assez sensible. Par conséquent, la fluorescence native de ces composés est trop faible pour permettre leur détection dans les milieux biologiques utilisés. En revanche, la fluorescence native semble être un outil d'exploration cellulaire potentiel.

L'ensemble de ces travaux, montre que la leptine contribue à l'apparition d'un stress oxydant en lien avec le statut tumoral des cellules épithéliales mammaires. Ceci peut expliquer en partie l'augmentation du risque de cancer mammaire associée à l'obésité en post-ménopause. Ces résultats permettront d'objectiver le bénéfice d'une intervention nutritionnelle ciblée afin de moduler la réponse des cellules aux stimulations des adipokines. A terme, cette étude doit contribuer à mieux comprendre l'intégration des signaux issus de l'environnement cellulaire.

Mots clés : obésité, leptine, statut oxydatif, cellules épithéliales mammaires, cancérogenèse, tumeurs mammaires, activité physique, souris C57BL/6, fluorescence native.

Abstract

Obesity is now considered, as a risk factor for developing breast cancer in postmenopausal women and for mortality in response to this pathology. Obesity, which is frequently associated with hyperleptinemia, induces cellular signalling pathways, some of which involving reactive oxygen species (ROS) as intracellular messengers. High levels of ROS contribute to oxidative stress, cellular damages and pathogenesis. Therefore, ROS production associated to obesity could be a major risk factor for mammary carcinogenesis. Furthermore, increased oxidative stress and inflammation characterised by infiltration of immune cells into adipocytes are described. This is associated with a lipid peroxidation and the production of bio-active compounds including isoprostanes.

The aim of this study was to determine the impact of leptin in modulating the oxidative and inflammatory status of epithelial mammary cells and in tumor mammary tissue. Moreover, the purpose of this work was to develop a new analysis technique based on native fluorescence detection induced by laser excitation at 224 nm to evaluate the production of bio-active compounds from the family of eicosanoids, involved in the inflammatory process, including isoprostanes.

Initially we identified *in vitro* the leptin effects on ROS production in 3 human epithelial mammary cell models which present different neoplastic status (healthy primary (HMEC) cells, MCF-7 and MDA-MB-231) in presence of two leptin concentrations (10 ng/ml close to physiological values, 100 ng/ml as obesity level). To better understand the potential involvement of adipocyte tumor microenvironment in mammary carcinogenesis, we secondly explored *in vivo* the impact of high fat diet (HFD) and of enriched environment (EE) on mammary tumor development. Female C57BL/6 mice were fed with a HFD *versus* a normo-caloric diet (NC) for 14 weeks, after 8 weeks mammary tumor syngeneic cells EO771 were implanted into the fourth mammary fat pads. Before injection, mice were housed in EE or in standard environment (ES) for 8 weeks.

In vitro, leptin stimulated ROS production in dose-independent manner and this increase was dependent of cytosolic O_2•- production. This ROS production contributed to a different antioxidative response depending of the neoplastic cell status. Leptin induced the antioxidative enzymes expression and activities such as heme-oxygenase or glutathione peroxidase only in HMEC cells. In neoplastic cells, these enzyme activities did not change whatever the leptin concentration used.

Thus, high fat diet promoted mammary tumor development associated with a decrease in body fat and an increase in volume and weight of tumors that was not limited by physical activity. This diet induced a decrease of adiponectin and an increase of leptin plasma level compared to NC diet however, leptinemia was not influenced by EE.

The native fluorescence isoprostanes determination method, turned out not to be quite sensitive. Therefore, the native fluorescence of these compounds is too low to allow their detection in biological media used. In contrast, the native fluorescence appears to be a potential cellular exploration tool.

Through this work, we have shown that leptin contributes to the onset of oxidative stress linked to the status of mammary epithelial tumor cells. This may partly explained the increase of risk of breast cancer recurrence observed in situations of obesity. The results obtained *in vivo* eventually will support the benefit of a nutrition intervention to modulate cell response to adipokines stimulation. Ultimately, this study contributes to better understand the integration of signals from the cell environment.

Keywords: obesity, leptin, oxidative status, mammary epithelial cells, carcinogenesis, breast tumors, physical activity, C57BL/6 mice, native fluorescence.

Production scientifique

Publications

Publications originales

Sinda Mahbouli, Jérémie Talvas, Audrey der Vartanian, Sophie Ortega, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary. **Induction of NADPH oxidase 5-reactive oxygen species production and SOCS-3 Expression by leptin depends on the neoplastic state of epithelial mammary cells** (*Article soumis dans le journal Plos One*).

Sinda Mahbouli, Jérémie Talvas, Sophie Ortega, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary. **Activation of antioxidant defences of human epithelial mammary cell under leptin depend on the neoplastic state.** (*Article soumis dans le journal Cellular Biochemistry*).

Sinda Mahbouli, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Christophe Montaurier, Imen Miladi, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary**. Impact of high-fat diet on energy balance in C57BL/6 mouse syngeneic model of mammary cancer** (*Article en préparation pour soumission*).

Sinda Mahbouli, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary. **Effects of enriched environment in tumor mammary development in aged ovariectomized mice** (*Article en cours de rédaction*).

Revue générale

Marie-Chantal Farges, Bruno Lamas, **Sinda Mahbouli**, Ahmad Khalil, Marie-Paule Vasson. **La leptine : un modulateur de l'activité des cellules Natural Killer?** Revue publiée dans Nutrition Clinique et Métabolisme, 2015.

Communications

Communications orales

Congrès International :

Sinda Mahbouli, Adrien Rossary, Rachida Nachat Kappes, Kristell Combe, Samar Basu, Marie-Paule Vasson. *Leptin induces in vitro and in vivo a lipid peroxidation and an inflammatory response, in neoplasic mammary epithelial cells.* **The 11th Biennial ISSFAL Congress 2014 Stockholm June 28 - July 2, Suède 2014.**

Séminaire Scientifique :

Sinda Mahbouli, Adrien Rossary, Marie-Paule Vasson. *Caractérisation de l'impact des sécrétions adipocytaires sur le métabolisme des éicosanoïdes des cellules épithéliales mammaires : mise en œuvre de la technique de détection par fluorescence native*. **Journée scientifique des doctorants de l'Unité de Nutrition Humaine (UNH), 6 septembre 2012; INRA de Clermont-Ferrand/Theix.**

Sinda Mahbouli, Sophie Ortega-Fernandez, Adrien Rossary, Marie Paule-Vasson. *La leptine module in vitro le statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires.* **Journée scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), 22 Novembre 2012 ; Clermont Ferrand, Auvergne.**

Sinda Mahbouli, Stéphanie Rougé, Marie-Chantal Farges, Imen Miladi, Christophe Montaurier, Adrien Rossary, Marie Paule-Vasson. *Impact de l'obésité et de l'activité physique sur la cancérogenèse mammaire : Approche expérimentale chez la souris C57/bl6.***Journée scientifique du Centre de Recherche en Nutrition Humaine (CRNH), 20 Novembre 2014 ; Clermont-Ferrand, Auvergne.**

Communications affichées

Congrès International :

Adrien Rossary, ***Sinda Mahbouli***, Stéphanie Rougé, Jérémie Talvas, Marie-Paule Vasson. *Modulation of oxidative status in human mammary epithelial cells by leptin is dependent of neoplasic status.* **The 11th Biennial ISSFAL Congress 2014 Stockholm June 28 - July 2, 2014.**

Marie-Paule Vasson, ***Sinda Mahbouli*,** Stéphanie Rougé, Jérémie Talvas, Adrien Rossary. *Leptin induces a oxidative response in human mammary epithelial cells dependent of neoplasic status: approach in vitro.* **Oxygen Club of California 2014 World Congress University of California, Davis 7-10 may 2014.**

Sinda Mahbouli, Sophie Ortega-Fernandez, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary. *Impact of leptin on ROS production in human mammary epithelial cells is dependant of neoplastic status.* **Second International Congress of Translational Research; In Human Nutrition, Clermont-Ferrand, 8 et 9 Mars 2013.**

Adrien Rossary, ***Sinda Mahbouli***, Marie-Paule Vasson. *Impact of leptin on pro/anti-oxidant balance in human mammary epithelial cells is dependent of neoplastic stauts.* **56èmes Journées Internationales d'endocrinologie Clinique, Paris, 6 et 7 Juin 2013.**

Sinda Mahbouli, Sophie Ortega-Fernandez, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary. *La leptine module in vitro le statut des cellules épithéliales mammaires (HMEC)*. **Journées Francophones de Nutrition 2012, Lyon 12-14 Décembre 2012.**

Sinda Mahbouli, Adrien Rossary, Stéphanie Rougé, Marie-Paule Vasson. *La modulation in vitro du statut oxydatif par la leptine est dépendante du statut néoplasique des cellules épithéliales mammaires*. **Journées Francophones de Nutrition 2013, Bordeaux 11-13 Décembre 2013.**

Séminaire Scientifique :

Sinda Mahbouli, Stéphanie Rougé, Marie-Chantal Farges, Imen Miladi, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary. *Impact de l'obésité et de l'activité physique sur la cancérogenèse mammaire chez la souris C57BL/6J.* ***Journées de l'Ecole Doctorale 2014, Clermont-Ferrand 12-13 Juin 2014.***

Article de vulgarisation

Sinda Mahbouli. Modulation par la leptine du statut oxydatif de cellules épithéliales mammaires : approche *in vitro.* **Article en ligne dans le magazine « Auvergne science » 11 Juillet 2013**.

Sinda Mahbouli. La leptine induit *in vitro* et *in vivo* une peroxydation lipidique et une inflammation, au niveau des cellules épithéliales mammaires. **Article en ligne dans le magazine « Auvergne science » 23 Septembre 2014**.

Liste des abréviations

4-HNE : 4-hydroxy-2-nonénal
5HMU : 5-hydroxyméthyluracil
8-isoPGF2α : 8-isoprostaglandine F2α
8-OHdG : 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine
AA : Acides Aminés
Ac : Anticorps
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt : ADN mitochondrial
Ag : Antigène
Ag-Ac : Complexe Antigène-Anticorps
AGPI : Acides Gras polyinsaturés
AgRP : Agouti-Related Peptide
AP-1 : Activator Protein 1
ARN : Acide Rbonucléique
ATP : Adénosine TriPhosphate
BAEC : Bovine Aortic Endothelial Cells
BCL2 : B-Cell Lymphoma 2
C/EBPα : CCAAT/Enhancer Binding Brotein α
CaM : Calmoduline
CART : Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript
CAT : Catalase
CCl4 : Tétrachlorure de Carbone
Cdk2 : Cyclin-Dependant Kinase 2
CHC : Carcinome Hépatocellulaire
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CNTF : Ciliary NeuroTrophic Factor
COX : Cyclo-oxygénase
COX-2 : Cyclo-oxygénase 2
CRE : Camp Responsive Element
CRH : Corticotropin Releasing Hormone
CRP : Protéine-C-Réactive
CYP450 : Cytochromes P450
Cyst : Cystéine
DAG : Diacylglycerol
DAN : Diaminonaphtalène
DE : Dépense Energétique
DHA : Acide Docosahexaénoïque
DHETs : Acide Dihydroxyeicosatriénoïque
DIO : Diet Induced Obesity
DMH : Hypothalamus Dorsomédian
DMH : Hypothalamus Dorsomédian
DMH : Hypothalamus Dorsomédian
DSS : Dextran Sodium Sulfate
DUOX 1 / 2 : DUal-Oxydases-1 et 2
EE : Environnement Enrichi
EETs : Acide époxy-eicosatriénoïque
Egr-1 : Early growth response protein 1
EIA : Enzymatic Immuno Assay
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
eNOS : Endothelial Nitric Oxide Synthase
eNOS : NOS endothéliale
EPA : Acide Eicosapentaénoïque
ER+ : Récepteurs aux oestrogènes positifs
ERK : Extracellular Signal Regulated Kinase
ERN : Espèces Réactives de l'Azote
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
ES : Environnement Standard
FAD : Adénine Dinucléotide
FAS : Appoptosis Stimulating Fagment
FITC : Fluorescéine Isothiocyanate
FTs : Facteurs de Transcriptions
GFP : Green Fluorescent Protein
GH : Growth Hormone
GLP-1 : Glucagon-Like Peptide-1
GPx : Glutathion Peroxydase
Grb-2: Growth Factor receptor Binding-2;
GSH : Glutathion Réduit
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3 ;
GSSG : Disulfure de Glutathion
GST : Glutathion S Transférase
H_2O_2 : Peroxyde d'Hydrogène
HETEs : Acide Hydroxy-Eicosatétraénoïque
HNE : 4-Hydroxynonénal
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance
HPLIP : Hydroperoxydes Lipidiques
HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IFN-α, IFN : Interférons α et γ -γ
IL-1 : Interleukine-1
IL-2 à IL-15 : Interleukines 2 à 15
IMC : Indice de Masse Corporelle
iNOS : NOS inductible
IR : Ischémie-Reperfusion
IRMA : Immuno-Radio-Metric Assay
IRS : Insulin Receptor Substrate
JAK1 : Janus Kinase 1
JAK2 : Janus Kinase 2
JNK : c-Jun NH2-Terminal kinase
LHA : Hypothalamus Latéral
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
LNIF : Fluorescence Native Induite par Laser
LOX : Lipoxygénases
LPS : Lipopolysaccharide

LPS : Lipopolysaccharide
m/z : rapport masse/charge
MALDI : Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MC4-R : Récepteur 4 de la Mélanocortine
MCF-7 : Michigan Cancer Foundation 7
MCH : Melanin-Concentrating Hormone
MCP-1 : Chimioattractante Monocytaire-1
MDA : MalondialDéhyde
MDA-MB-231 : M.D. Anderson - Metastatic Breast-231
M-NO : métaux-nitrosyl
mtNOS : NOS mitochondriale
mTOR : Mammalian Target Of Rapamycine
N_2O : Protoxyde d'Azote
NAC : N-acétylcystéine
NASH : hépatite stéatosique non alcoolique
NF-κB : nuclear factor-kappa B
NK : Natural Killer
nNOS : NOS neuronale
NO : monoxyde d'azote
NO^- : Anion Nitroxyle
NO^+ : Ion Nitrosonium
NOS : NO-Synthases
NOX : NADPH oxydase
NPY : NeuroPeptide Y
Nrf-2 : NF-E2-related factor-2
$O_2^{\bullet-}$: anion superoxide
$^{\bullet}OH$: radical hydroxyle
$^1O_2$: oxygène singulet
$ONOO^-$: anion peroxynitrite
p53 : tumor protein 53
PAF-A : platelet activating factor-acetylhydrolase
PCs : protéines carbonylées
PDE3B : Phosphodiestérase 3B
PDK-1 : Phosphoinositide Dependent Kinase-1
PG : prostaglandines
PGI : prostacyclines
PH-GPx : GPx phospholipidique
PI3 : Phosphatidyl-Inositol 3 ;
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PIP3 : phosphatidylinositol triphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol triphosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLC : PhosphoLipase C ;
PNNs : les polynucléaires neutrophiles
POMC : Pro-OpioMelanocortin
PON1 : paraxonase-1
PPAR-γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-γ
PTP1B : Protein tyrosine phosphatase 1B
PVH : noyau paraventriculaire
PVH : noyau paraventriculaire
RIA : radio-immunodosage
$ROO^{\bullet}$: radicaux lipidiques peroxyles
-SH : Les groupements thiols
SH2 : Src Homology 2
SOCS-3 : Suppressor of Cytokine Signalling-3
SOD : Superoxyde Dismutase
SOS : Son of Sevenless
Souris db/db : déficientes en récepteur fonctionnel Ob-Rb
Souris ob/ob : déficientes en leptine fonctionnelle
SP-1 : Specificity Protein-1
TAA : Thioacétamide
TC-PTP : T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase
TNFα : Tumor Necrosis Factor
TRX : La Thiorédoxines Peroxydases
TX : Thromboxanes
TYK2 : Tyrosine Kinase 2
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VMH : Hypothalamus Ventromédian
α-MSH : α-Melanocyte-Stimulating-Hormone
γ-GCL : γ-Glutamylcystéine Ligase

Liste des illustrations

Liste des figures **Pages**

Figure 1 : Structure du gène *ob* murin et humain **3**

Figure 2 : Structure tertiaire de la leptine E100 **4**

Figure 3 : Les différentes isoformes du récepteur Ob-R **6**

Figure 4 : Internalisation du récepteur de la leptine **7**

Figure 5 : Modèle d'activation du récepteur Ob-R **7**

Figure 6 : Les voies de signalisation activée par la leptine **8**

Figure 7 : La voie de signalisation JAK/STAT couplée à Ob-Rb **8**

Figure 8 : La voie de signalisation MAPK/ERK **9**

Figure 9 : La voie de signalisation PI3K couplée à Ob-R **9**

Figure 10 : La voie de signalisation IRS couplée à Ob-Rb **10**

Figure 11 : Régulation du signal leptine par les protéines SOCS3 **10**

Figure 12 : Régulation du signal leptinique par les protéines phosphatases PTP1B et TC-PTP **11**

Figure 13 : Schéma récapitulatif sur les principales fonctions pléïotropiques de la leptine **12**

Figure 14 : Action centrale de la leptine **12**

Figure 15 : Effets paracrines de la leptine gastrique au niveau intestinal **14**

Figure 16 : Effet de la leptine sur la réponse immune innée et adaptative **15**

Figure 17 : Effet de la leptine sur l'activité métabolique des cellules NK-92 **16**

Figure 18 : Effet de la leptine sur l'activité cytotoxique des cellules NK-92 vis-à-vis de différentes cibles **16**

Figure 19 : Environnement standard et enrichi **19**

Figure 20 : Environnement enrichi et fonctions métaboliques des adipocytes **19**

Figure 21 : Concentrations de leptine avant et après trois courses d'endurance **21**

Figure 22 : Modèle schématique des effets de l'entraînement sur l'expression de leptine au niveau du tissu adipeux blanc **21**

Figure 23 : Prévalence de l'obésité dans le monde chez les adultes de plus de 20 ans **22**

Figure 24 : Concentrations plasmatiques de leptine chez l'Homme **22**

Figure 25 : La leptinorésistance chez l'obèse. **23**

Figure 26 : La voie leptine-mélanocortine **23**

Figure 27 : Composants cellulaires et molécules synthétisées par le tissu adipeux **24**

Figure 28 : Effets du placement en environnement enrichi (EE) sur le développement de la glande mammaire et de la croissance tumorale chez la souris C57BL/6 **28**

Figure29 : Expression de la leptine et de son récepteur au niveau de cellules mammaires cancéreuses ou normales avoisinant la tumeur à partir de prélèvements tumoraux humains **29**

Figure 30 : Les voies de signalisation de leptine dans le cancer du sein **29**

Figure 31 : Voies des œstrogènes impliqués dans le développement du cancer du sein **30**

Figure 32 : Les acteurs de la réponse pro-oxydante **32**

Figure 33 : Systèmes endogènes de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote **32**

Figure34 : La chaîne respiratoire mitochondriale et ses différents complexes **33**

Figure 35 : Organisation des NOX/DUOX et de leurs sous unités régulatrices **34**

Figure 36 : Représentation schématique d'un monomère de NO synthase **36**

Figure 37 : Production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène **37**

Figure 38 : Les acteurs de la réponse anti-oxydante **37**

Figure 39 : Voies de signalisation des ERO **41**

Figure 40 : Phases de la peroxydation lipidique **42**

Figure 41 : Attaque radicalaire des acides gras polyinsaturés **42**

Figure 42 : Voies de synthèse des éicosanoïdes **44**

Figure 43 : Principes des méthodes d'immunodosage **54**

Figure 44 : Réaction simplifiée du couple luciférine/Luciférase **56**

Figure 45 : Principe générale de la spectrométrie de masse **58**

Figure 46 : Spectre de masse **58**

Figure 47 : Schéma simplifié des transitions énergétiques en luminescence **60**

Figure 48 : Schéma de principe de la cellule de détection de fluorescence native **61**

Figure 49 : Structure chimique des principales familles d'eicosanoïdes **62**

Figure 50 : Principe général de la réaction de peroxydation **63**

Figure 51 : Spectres de fluorescence native des huiles alimentaires **64**

Figure 52 : Quantification des produits de peroxydation lipidique dans les huiles alimentaires **64**

Figure 53 : Spectre de fluorescence native du tissu **65**

Figure 54 : Quantification des produits de peroxydation lipidique dans le tissu **65**

Figure 55 : Schéma récapitulatif de la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires par la leptine **125**

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets de l'environnement enrichi *in vivo* **18**

Tableau 2 : Effets de l'exercice sur les concentrations de leptine chez l'homme **20**

Tableau 3 : Impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des modèles expérimentaux utilisés *in vitro* **49**

Tableau 4 : Impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des modèles expérimentaux utilisés *in vivo* **50**

Tableau 5 : Etudes cliniques évaluant les effets de la leptine sur le statut oxydatif **52**

Tableau 6 : Composition lipidique des huiles alimentaires **63**

Tableau 7 : Caractéristiques de fluorescence native des huiles alimentaires **63**

Tableau 8 : Caractéristiques de fluorescence native du tissu cérébral et de ses différentes fractions d'extraction **65**

Avant-Propos

Avant-propos

L'obésité est fréquemment et étroitement associée à de nombreuses pathologies chroniques dont le diabète de type II, l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaires. Elle est un facteur de risque de cancer favorisant la récidive et augmentant la mortalité comme dans le cancer du sein en post-ménopause. Au cours de l'obésité, les modifications de sécrétion des adipokines (leptine et adiponectine), l'apparition d'une inflammation chronique à bas bruit associée à un stress oxydant, sont des facteurs de risque reconnus de carcinogenèse chez le sujet obèse.

Des travaux antérieurs de l'équipe ont confirmé d'une part la présence de récepteurs à la leptine et à l'adiponectine sur des biopsies de tumeurs mammaires et d'autre part, les activités pro- et antiprolifératives de ces adipokines à des doses pharmacologiques sur des modèles cellulaires. Par ailleurs, il est clairement établi aujourd'hui que le statut oxydatif des cellules est directement corrélé aux capacités de prolifération mais aussi de survie des cellules dans leur environnement. Un déséquilibre entre les systèmes pro-oxydants par rapport aux systèmes de défense anti-oxydants est associé à un état de stress oxydant. Connaissant le lien étroit entre cancer du sein, stress oxydant et leptine, nous avons émis l'hypothèse que la leptine pouvait avoir un lien direct dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires humaines.

Dans ce contexte nous avons cherché à mieux comprendre l'implication de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales et dans la cancérogenèse mammaire. Pour cela, nous avons mené ce projet de recherche selon deux approches complémentaires. La première a consisté à déterminer *in vitro* les effets de la leptine sur le statut oxydatif des cellules mammaires humaines à différents stade néoplasiques. Nous nous sommes focalisés sur la capacité de la leptine à modifier les systèmes pro-oxydants en parallèle de la défense anti-oxydante. La seconde approche a été d'évaluer *in vivo* l'impact d'un régime hyperlipidique et de l'activité physique sur la croissance tumorale. une première étude *in vivo* a permis d'identifier les altérations biologiques liées au régime hyperlipidique contribuant à la croissance tumoral chez la souris C57BL/6. Dans une deuxième étude chez la souris ovariectomisée, mimant une situation de ménopause, l'impact de l'activité physique sur les perturbations liées au régime obésogène et sur le développement tumoral, a été évalué.

Ces travaux ont été présentés sous forme de communications orales ou affichées lors de congrès internationaux et nationaux et de journées scientifiques locales et ont fait l'objet de quatre articles, un article soumis, deux rédigés et un quatrième en cours de rédaction.

Ces travaux de recherche ont été réalisés dans le cadre d'une bourse d'Innovation financé par le Conseil Régional d'Auvergne et le FEDER (Fond Européen de Développement Régional, en collaboration avec la société Flowgene (Saint Beauzire, France). Ainsi un autre but du projet était d'évaluer une nouvelle technique d'analyse basée sur la détection de fluorescence native induite par excitation de laser (LINF). La contribution de l'entreprise était de mettre à disposition un appareillage d'analyse de fluorescence native. Il s'agit d'un moyen de détection universel qui repose sur l'émission de fluorescence spontanée des molécules, sans marquage préalable, provoquée par une excitation lumineuse à 224 nm. Les potentialités de cette technique ont été démontrées pour la détection et la quantification de composés

endogènes (protéines, composés aromatiques, hormones…) à l'état de traces dans les matrices biologiques et environnementales. Notre approche est d'évaluer la capacité de cette technique pour détecter et quantifier les composés issus de la peroxydation lipidique potentiellement fluorescents dans les milieux biologiques, mais aussi au niveau tissulaire. En effet, de par leurs temps de demi-vie très courts dans les liquides biologiques et de par la diversité de structures chimiques rencontrées, le dosage de ces composés est particulièrement délicat en routine.

Ce manuscrit fait la synthèse en quatre parties de l'ensemble des travaux réalisés au cours ce projet de recherche.

La première partie consiste en une synthèse bibliographique divisée en 3 chapitres. Le premier aborde les caractéristiques de la leptine et traite de son rôle physiologique et de son implication en pathologie. Le deuxième chapitre est axé sur le stress oxydant. Il est présenté une étude détaillée des systèmes producteurs des espèces pro-oxydantes, des systèmes de la défense anti-oxydante. Puis les voies de signalisations impliquées dans l'homéostasie redox et les dommages oxydatifs liés au stress oxydant sont présentés. Enfin le troisième chapitre expose une synthèse des connaissances actuelles concernant l'implication de la leptine dans la modulation du statut oxydatif.

La deuxième partie du manuscrit est consacrée à la technique de fluorescence native. Après des rappels bibliographiques sur les méthodes actuellement disponibles pour l'analyse et le dosage des produits de peroxydation lipidique, les propriétés physico-chimiques de la fluorescence native et ses applications actuelles sont présentées. Par la suite la présentation du détecteur et les travaux réalisés en fluorescence native sont présentés et discutés.

La troisième partie du manuscrit est consacrée à la présentation puis à la discussion des résultats des travaux sur la leptine et le statut oxydatif, essentiellement sous forme de publications. A noter que l'analyse d'une partie des résultats issus des modèles *in vivo* utilisés au cours du présent travail est toujours en cours. Ainsi la présentation et la discussion de ces résultats a donc été intégrée dans cette partie en lieu et place d'un quatrième article.

Enfin, la dernière partie consiste en une discussion générale de l'ensemble des résultats recueillis au cours de cette thèse. Cette discussion souvrira sur les futures perspectives de nos travaux ainsi que l'ensemble des nouvelles interrogations que ce travail de thèse a soulevé.

Ces travaux de recherche s'inscrivent pleinement dans les thématiques scientifiques de l'équipe ECREIN focalisées sur la modulation nutritionnelle de la réponse immunitaire et inflammatoire associée aux pathologies chroniques liées au vieillissement comme le cancer, et sur l'étude des interactions entre les cellules et leur micro-environnement.

Partie I :

Synthèse bibliographique

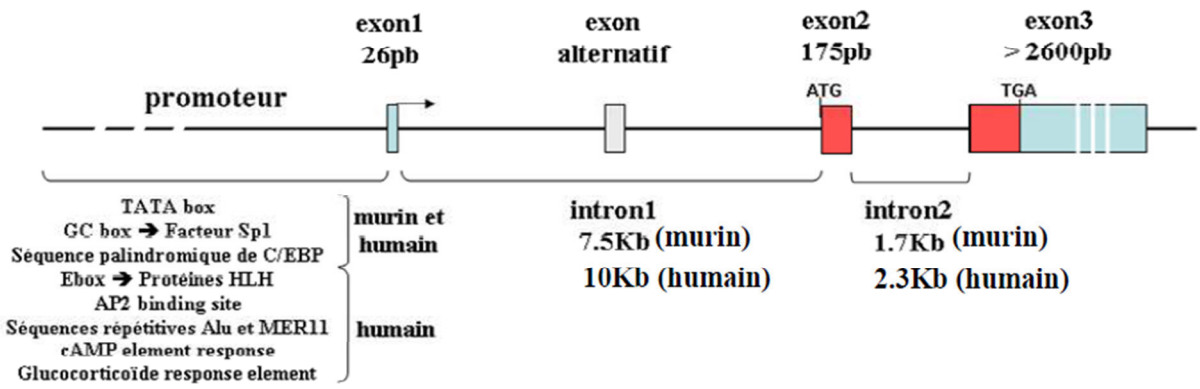


Figure 1 : Structure du gène *ob* murin et humain.
(D'après Zhang *et al.,* 1997). Séquence du gène codant pour la leptine humaine, localisé sur le chromosome 7q31 : 20 kb, comprenant 3 exons et 2 introns et possède 84 % d'homologie avec la séquence murine.

I. La leptine

La leptine, une des principales adipokines produite par le tissu adipeux, intervient dans des nombreuses fonctions biologiques. Découverte en 1994 par l'équipe de Friedman Jeffrey (Zhang et al., 1994) suite à la recherche de déficiences génétiques dans un modèle murin, elle a été identifié par clonage positionnel du gène *ob*. La mutation de ce gène à l'état homozygote est responsable de l'obésité des souris *ob/ob* qui présentent un syndrome proche d'une forme monogénique de l'obésité morbide humaine (Friedman, 2014; Zhang et al., 1994). Cette découverte a permis de comprendre les études de parabiose menées entre deux modèles murins d'obésité génétique, les souris *ob/ob*, et les souris *db/db* dont le gène codant pour le récepteur à cette protéine est muté. Un an plus tard, fut cloné le récepteur de la leptine, Ob-R (Tartaglia et al., 1995) dont la distribution ubiquitaire à laisser présumer que la leptine pouvait avoir de nombreuses cibles et intervenir dans de multiples phénomènes physiologiques.

La leptine a été pendant quelques années considérée comme une hormone exprimée exclusivement par le tissu adipeux, son rôle étant d'informer le cerveau sur l'état des réserves et des besoins énergétiques de l'organisme par l'intermédiaire de récepteurs hypothalamiques. Elle diminue la prise alimentaire en modulant la production des neurotransmetteurs orexigènes (NPY et AGRP) et anorexigènes (α MCH et CART) dans l'hypothalamus, augmente la dépense énergétique et contrôle certaines sécrétions hormonales telles que la sécrétion d'insuline et de ghréline (Coll et al., 2007).

1. Structure et synthèse de la leptine

1.1. Structure du gène *ob*

La séquence du gène codant pour la leptine a été identifiée pour la première fois en 1994 chez la souris (Friedman, 2014; Zhang et al., 1994). Elle est principalement exprimée dans le tissu adipeux blanc, et plus faiblement dans le tissu adipeux brun (Zhang et al., 1994). L'expression du gène *ob* est induite pendant la différenciation et la maturation des adipocytes. Si l'ARNm *ob* n'est pas exprimé dans les pré-adipocytes (Leroy et al., 1996), les études *in vitro* ont montré que son expression augmente durant la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes matures (MacDougald et al., 1995; Miller et al., 1996).

Aussi appelé gène de l'obésité, le gène *ob* est localisé sur le chromosome 6 chez la souris et sur le bras long du chromosome 7 chez l'homme (Geffroy et al., 1995). Il mesure 650 kilobases (kb) réparties en trois exons séparés par deux introns, la région codante pour la leptine se situe dans les exons 2 et 3 (Ahima and Flier, 2000). Ces exons 2 et 3 sont transcrits en un ARNm de 4,5 kb chez la souris et de 3,5 kb chez l'homme (Cohen et al., 1996; Friedman, 2014; Zhang et al., 1994). Le premier exon contient une seule séquence de 26 paires de bases non codantes (Zhang et al., 1997) **(Figure 1)**.

L'étude des régions promotrices du gène a permis de mettre en évidence de nombreuses séquences de régulation contrôlant de façon opposée l'expression du gène *ob* telles que : des sites de fixation pour les facteurs de transcription **C/EBPα** (CCAAT/Enhancer Binding Protein α) ; des sites à motifs **SP-1** (Specificity Protein-1) qui augmentent l'efficacité de la transcription, en coopérant avec l'ARN polymérase (Isse et al., 1995) ; des séquences

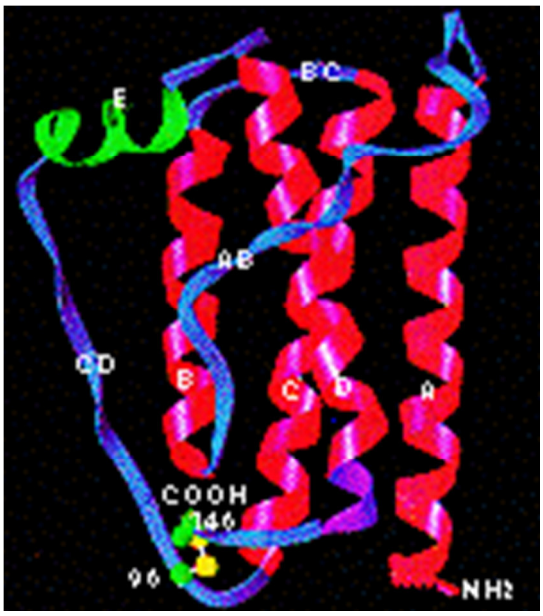


Figure 2 : Structure tertiaire de la leptine E100.
(D'après Zhang *et al.,* 1997). Structure tridimensionnelle de la leptine, avec une représentation des 4 hélices alpha parallèles (en rouge), reliées par trois boucles (en bleu), deux boucles longues (AB et CD), une courte (BC) et une petite hélice supplémentaire (en vert) dans la boucle CD. La présence d'un pont disulfure au niveau de l'extrémité carboxy-terminale est essentielle pour l'intégrité de la protéine et la reconnaissance de son récepteur.

consensus **CRE** (cAMP Responsive Element) (Ahima and Flier, 2000; Houseknecht et al., 1998).

Le promoteur du gène *ob* présente aussi des éléments de réponse aux **PPARγ** (Peroxisome Proliferator-Ativated Receptor), membres de la superfamille des récepteurs nucléaires hormonaux. Les thialozidinediones ou glitazones, ligands synthétiques des PPARγ, réduisent l'expression du gène *ob in vivo* et *in vitro* (De Vos et al., 1996; Zhang et al., 1996). De plus, les PPARγ sont capables d'antagoniser l'activation du promoteur *ob* par la protéine C/EBPα (Hollenberg et al., 1997), ce qui pourrait expliquer la faible expression du gène *ob* en présence de thialozidinediones (Ahima and Flier, 2000; Houseknecht et al., 1998).

1.2. Structure de la protéine

Après traduction, la protéine de 18 kDa formée (167 acides aminés (AA) chez la souris, 166 AA chez l'homme), perd un peptide signal de 2 kDa (21 AA) ce qui libère dans la circulation une forme non glycosylée de 16 kDa contenant 146 AA, n'ayant subi aucune modification post-traductionnelle (Prolo et al., 1998). Plus de 67 % de la séquence peptidique est conservée entre les différentes espèces : la leptine humaine possède un taux d'homologie de 84 % et 83 % avec les séquences primaires de la leptine de souris et de rat, respectivement (Ahima and Flier 2000; Münzberg and Morrison 2015).

La structure tridimensionnelle de cette adipokine est constituée de quatre hélices α antiparallèles connectées par deux boucles longues (AB et CD) et une plus courte (BC) **(Figure 2)** (Madej et al., 1995; Zhang et al., 1997) Elle possède également deux résidus cystéine formant un pont disulfure entre les résidus 96 et 146, localisés au niveau de l'extrémité C-terminale et au commencement de la boucle CD, essentielle pour l'intégrité de la protéine et la reconnaissance de son récepteur spécifique (Frühbeck, 2006a). La mutation d'une de ces cystéines se traduit par une protéine biologiquement inactive (Grasso et al., 1997; Madej et al., 1995; Zhang et al., 1997).

La leptine présente des homologies structurales avec différentes cytokines à longue chaîne hélicoïdale, telles que les interleukines 2 à 15 (IL-2 à IL-15), des interférons α et γ (IFN-α, IFN-γ) (Prolo et al., 1998), certains facteurs de croissance, tels que l'érythropoïétine, le LIF (Leukemia Inhibitory Factor) ou le CNTF (Ciliary Neuro Trophic Factor) et les récepteurs de deux hormones hypophysaires, l'hormone de croissance et la prolactine (Cava and Matarese, 2004; Otero et al., 2005).

1.3. Synthèse, sécrétion et régulation de la leptine

La leptine est synthétisée de façon importante, mais non exclusive, au niveau du tissu adipeux (Ahima and Flier 2000; Münzberg and Morrison 2015) mais également dans l'hypophyse, l'estomac, l'intestin, les muscles squelettiques, l'ovaire et le placenta (Cinti et al., 2000; Harris, 2000; Morton et al., 1998; Rayner and Trayhurn, 2001).

Cette hormone est déversée dans la circulation générale, selon un rythme circadien (pic de sécrétion entre 20 h et 4 h du matin chez l'homme), où elle atteint des concentrations comprises entre 1 et 30 ng/ml chez l'adulte sain de poids normal (Prolo et al., 1998). Elle circule sous forme de monomère au niveau plasmatique soit sous forme libre avec un turn-

over rapide (Frühbeck 2006) soit sous forme liée à d'autres protéines plasmatiques (Landt, 2000; Ronti et al., 2006; Sinha et al., 1996). La leptine humaine possède un temps de demi-vie biologique de 30 min (Ahima and Flier, 2000; Banks et al., 1996), ce temps assez court pouvant s'expliquer en partie, par une clairance rénale (Cumin et al., 1997; Prolo et al., 1998).

Le taux sérique de leptine est corrélé positivement avec l'indice de masse corporelle et la masse grasse chez l'homme et les rongeurs (Considine and Caro, 1996; Galic et al., 2010; Senthil Kumar et al., 2014). Le sujet obèse présente aussi une leptinémie plus élevée que le sujet de poids normal pouvant varier de 2 à 100 ng/ml (Chapman et al., 1997; Hancke et al., 2010; Llanos et al., 2014; Silha et al., 2003).

La quantité de leptine sécrétée est deux fois plus importante au niveau du tissu adipeux sous-cutané qu'au niveau du tissu adipeux viscéral (Fain et al., 2004; Kershaw and Flier, 2004) et deux à trois fois plus importante chez la femme que chez l'homme (Ahima and Flier, 2000; Rosenbaum and Leibel, 1999). Contrairement à ce qui est observé chez la souris *ob/ob*, l'obésité chez l'homme est souvent accompagnée d'une hyperleptinémie, ce qui laisse supposer le développement d'une leptino-résistance (Galic et al., 2010; Koch et al., 2014). Cette hyperleptinémie peut avoir des effets délétères et favoriser le développement de pathologies telles que le diabète de type II, l'inflammation chronique et augmenter le risque de maladies cardiovasculaires ou de cancer (S. S. Martin, Qasim, and Reilly 2008).

Lors d'une restriction calorique, il est observé dans les études humaines et animales une diminution du taux sérique de leptine (Monteleone *et al.* 2000; Weigle *et al.* 2005; Cardillo, Seshadri, and Iqbal 2006; de Luis *et al.* 2007; Koide *et al.* 2007; Münzberg and Morrison 2015) sans qu'il n'y ait de lien entre l'intensité de la perte de poids et le taux basal ou la variation en leptine (Dubuc et al., 1998; Wadden et al., 1998). Les taux plasmatiques de glucose et d'acides gras sont corrélés avec les variations des taux de leptine, induites par la restriction calorique chez l'homme (Choi et al., 2014; Senthil Kumar et al., 2014). En particulier, plus les taux d'acides gras sont augmentés et plus la concentration de leptine est diminuée. Toutefois, certaines études montrent que la variation de la masse grasse n'est pas toujours le seul déterminant de la diminution du taux de leptine sérique, le taux de leptine circulant étant diminué même après ajustement pour les variations de masse grasse (Doucet et al., 2000; Havel et al., 1996; Wadden et al., 1998).

La diminution de la prise alimentaire est associée à une diminution du taux plasmatique de leptine (Coll et al., 2007). Par ailleurs, au cours des repas la sécrétion d'insuline stimule la sécrétion de leptine et une diminution d'insulinémie précède la réduction de leptinémie durant le jeûne. Il existe au contraire une relation antagoniste entre leptine et glucocorticoïdes (cortisol). La sécrétion de leptine est par ailleurs freinée par la testostérone alors qu'elle est stimulée par les hormones sexuelles féminines. De plus, la synthèse de leptine augmente en réponse aux infections aiguës et à la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, le TNFα et le LIF (Otero et al., 2005).

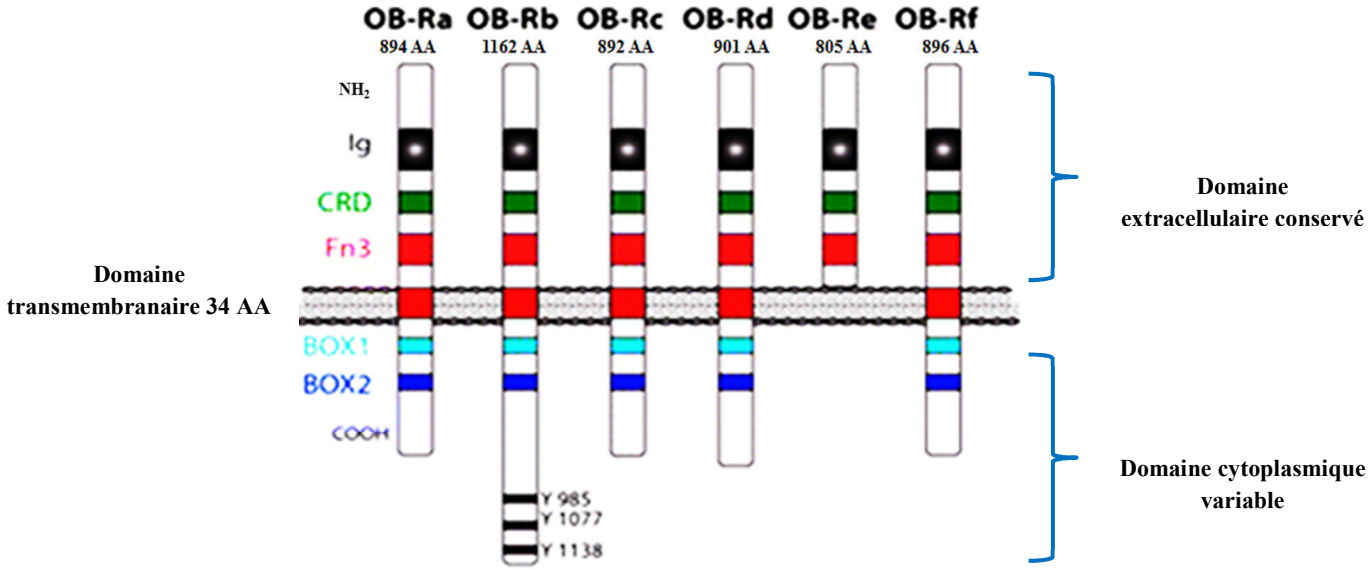


Figure 3 : Les différentes isoformes du récepteur Ob-R.
(D'après Ahima and Flier, 2000). Ob-R a été classé dans la famille des récepteurs aux cytokines à un seul domaine transmembranaire. Les isoformes Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf sont dites courtes, l'isoforme Ob-Rb correspond à la forme longue et enfin l'isoforme Ob-Re est soluble. Ils possèdent un domaine extracellulaire commun d'environ 800 acides aminés contenant le site de liaison à la leptine ainsi qu'un domaine transmembranaire de 34 acides aminés à l'exception d'Ob-Re. Les domaines cytoplasmiques sont quant à eux variables : l'isoforme longue Ob-Rb comporte une partie intracellulaire de 302 acides aminés, contenant des motifs peptidiques nécessaires à l'activation de signaux de transduction, ces derniers étant partiellement délétés dans les quatre isoformes courtes.

2. Transduction du signal et voies de signalisation

2.1. Récepteur de la leptine

La leptine interagit avec les cellules *via* son récepteur membranaire Ob-R isolé pour la première fois en 1995 (Tartaglia et al., 1995). Ob-R est principalement exprimé au niveau de l'hypothalamus mais aussi dans d'autres tissus-cible périphériques. C'est un récepteur transmembranaire présentant des similarités structurales avec les récepteurs de la superfamille des cytokines de classe I (même famille que les récepteurs des IL, des IFN) (Ahima and Flier, 2000; Tartaglia et al., 1995). Comme d'autres récepteurs aux cytokines de classe I, Ob-R ne possède pas d'activité d'auto-phosphorylation et requiert donc le recrutement de tyrosine kinases de la famille Janus Kinase 2 (JAK2) pour activer différents voies de signalisation (Frühbeck, 2006a).

Le gène *db* du récepteur de la leptine est positionné sur le chromosome 4 chez la souris, 5 chez le rat et 1 chez l'homme (Tartaglia et al., 1995). Il code pour six isoformes obtenues par épissage alternatif : Ob-Ra, Ob-Rb, Ob-Rc, Ob-Rd, Ob-Re et Ob-Rf (Cirillo et al., 2008). Ces isoformes possèdent un domaine extracellulaire commun de liaison à la leptine et des domaines cytoplasmiques de longueur différente **(Figure 3)**. Ob-Ra et Ob-Rb sont les plus exprimées, Ob-Ra correspondant à la forme courte et Ob-Rb à la forme longue, principalement exprimée dans l'hypothalamus et la plus active (Löllmann et al., 1997).

Les isoformes du récepteur à la leptine sont classées en 3 groupes (Cava and Matarese, 2004; Faggioni et al., 2001; Gorska et al., 2010; Otero et al., 2005) :

- **Ob-Rb** est l'isoforme longue. Il comporte une partie intracellulaire de 302 AA, contenant les motifs d'activation et de transduction du signal requis pour activer de nombreuses voies de signalisation (Myers et al., 2008). Il est exprimé en concentration élevée dans l'hypothalamus, traduisant ainsi les effets de la leptine dans la régulation du poids corporel. Il est de plus exprimé dans de nombreux tissus périphériques tels que les cellules β pancréatiques, les cellules endothéliales, les plaquettes, les précurseurs hématopoïétiques CD34+, les lymphocytes T et B, les macrophages (Caldefie-Chezet et al., 2001; Farges et al.). Ce récepteur a longtemps été considéré comme le seul récepteur fonctionnel de la leptine.
- **Ob-Ra**, **Ob-Rc**, **Ob-Rd** et **Ob-Rf** sont les isoformes courtes (Ob-Rs) ont un domaine intracellulaire tronqué, d'environ 30 à 40 AA, caractérisés par un domaine cytoplasmique de 34 AA. Exprimés par différents tissus non immuns, ils semblent médier le transport et la dégradation de la leptine. **Ob-Ra**, l'isoforme courte la plus étudiée, est exprimé par de nombreux tissus tels que les poumons, les reins, le foie (Fei et al., 1997). Il est de plus fortement exprimé au niveau du plexus choroïde et participe ainsi au transport actif de la leptine du sang vers le cerveau à travers la barrière hémato-encéphalique (Hileman et al., 2002). Ce récepteur est susceptible d'activer certaines voies de signalisation en réponse à la leptine malgré un domaine intracellulaire tronqué. L'expression d'**Ob-Rc** est rapportée au niveau du cortex, de l'hypothalamus, des micro-vaisseaux et du plexus choroïde. L'expression d'**Ob-Rf** est mise en évidence chez le rat au niveau du multiples tissus, tels que le cerveau, le foie,

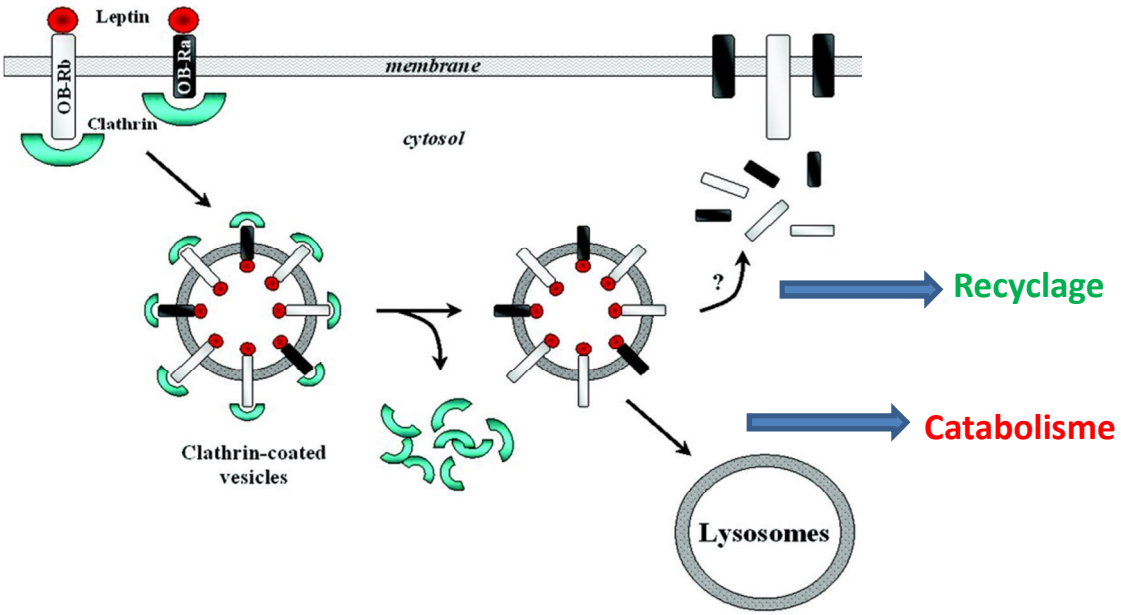


Figure 4 : Internalisation du récepteur de la leptine.
(D'après Frühbeck, 2006). La fonction biologique de la leptine est fortement dépendante de l'internalisation de son récepteur Ob-R au niveau de ses cellules cibles. Ob-R est internalisé d'une manière dépendante du ligand *via* la voie d'endocytose des vésicules de clathrine. Le récepteur internalisé est ensuite recyclé vers la membrane plasmique ou dégradé.

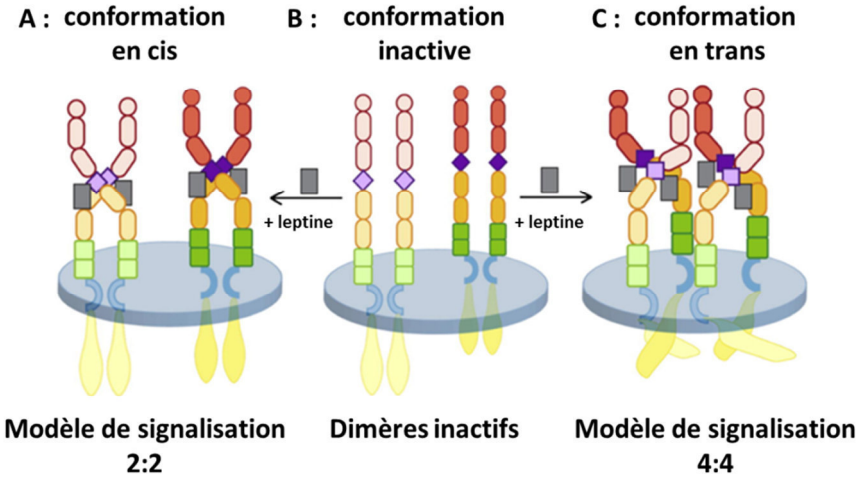


Figure 5 : Modèle d'activation du récepteur Ob-R.
(D'après Moharana *et al.,* 2014). Le récepteur de la leptine situé sur la membrane cellulaire est sous forme de dimères inactifs (**B**). L'activation du récepteur par la leptine se fait soit *via* une cis-activation, soit une trans activation. Dans le modèle de cis-activation, la leptine interagit avec le récepteur afin de former des dimères actifs selon un modèle stœchiométrique 2:2 (**A**). Le modèle de trans-activation résulte d'une dimérisation en configuration trans des dimères actifs induite par la leptine, formant ainsi un complexe de signalisation selon un modèle stœchiométrique 4:4 (**C**). Ce modèle représente une meilleure réponse au signal leptinique.

l'estomac, les reins et le cœur (Wang et al., 1996). La distribution tissulaire de l'isoforme **Ob-Rd** reste indéterminée (Fei et al., 1997).

- Il existe enfin une isoforme sécrétée, **Ob-Re**. Cette forme du récepteur, est essentiellement retrouvé dans le plasma chez l'homme (Chua et al., 1997) et ne comprend pas de domaine transmembranaire et cytoplasmique. Ainsi, dans le sérum, Ob-Re est la protéine de transport majoritaire de la leptine (Lammert et al., 2001). La fonction de cette isoforme serait de réduire la proportion de leptine libre dans le plasma et ainsi de réguler son activité biologique. La forme soluble Ob-Re est exprimée par la plupart des tissus, notamment par le tissu adipeux, les gonades, le foie et la rate. Chez la ratte gestante, il est exprimé par les cellules du placenta, plus particulièrement pendant les derniers jours de la gestation où il faciliterait comme Ob-Ra le transport de la leptine au fœtus (Campfield et al., 1995).

Ob-R est susceptible de s'internaliser après phosphorylation *via* la voie d'endocytose dépendante de la clathrine pour être ensuite soit catabolisé dans les endosomes soit recyclé à la surface de la membrane cellulaire (Barr, Lane, and Taylor 1999; Frühbeck 2006) **(Figure 4)**. Selon certains auteurs la forme longue du récepteur est préférentiellement dégradée après internalisation contrairement à la forme courte qui est plus souvent recyclée. Ceci pourrait expliquer le phénomène de résistance à la leptine qui s'installe chez les sujets hyperleptinémiques.

Seulement un quart des isoformes du récepteur de la leptine est localisé au niveau membranaire, la majorité étant retrouvée dans le pool intracellulaire. En l'absence de ligand, les récepteurs de la leptine sont présents à la surface de la membrane sous la forme de monomère et/ou d'homodimère. La leptine semble interagir avec Ob-R selon un modèle stœchiométrique 4:4 (Moharana et al., 2014) en formant des complexes tétramériques récepteur-ligand, indispensables à l'activation du récepteur (Devos et al., 1997; Moharana et al., 2014). Selon ce modèle, la liaison de la leptine à son récepteur induit une dimérisation en trans des récepteurs sous forme de dimères actifs, permettant ainsi une meilleure transduction du signal leptinique **(Figure 5)**. L'interaction de la leptine avec son récepteur est capable d'induire de nombreuses voies de signalisation (Frühbeck 2006, 2014; Münzberg and Morrison 2015).

2.2. Voies de signalisation

Comme le récepteur Ob-R est un membre de la famille des récepteurs aux cytokines, des voies de signalisation communes ont été recherchées et identifiées. Le récepteur **Ob-Rb** (forme longue) est considéré classiquement comme l'isoforme essentielle dans la transmission du signal leptinique. En revanche, les isoformes courtes **Ob-Rs** sont également impliquées dans la signalisation de la leptine par des voies différentes.

Comme pour les autres récepteurs de cette famille, la voie JAK/STAT est activée mais d'autres voies de signalisation sont également impliquées, notamment l'activation de la voie Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) et la voie PhosphoInositide 3-Kinase (PI3K) (Cirillo *et al.* 2008; Frühbeck 2006; Münzberg and Morrison 2015) **(Figure 6)**.

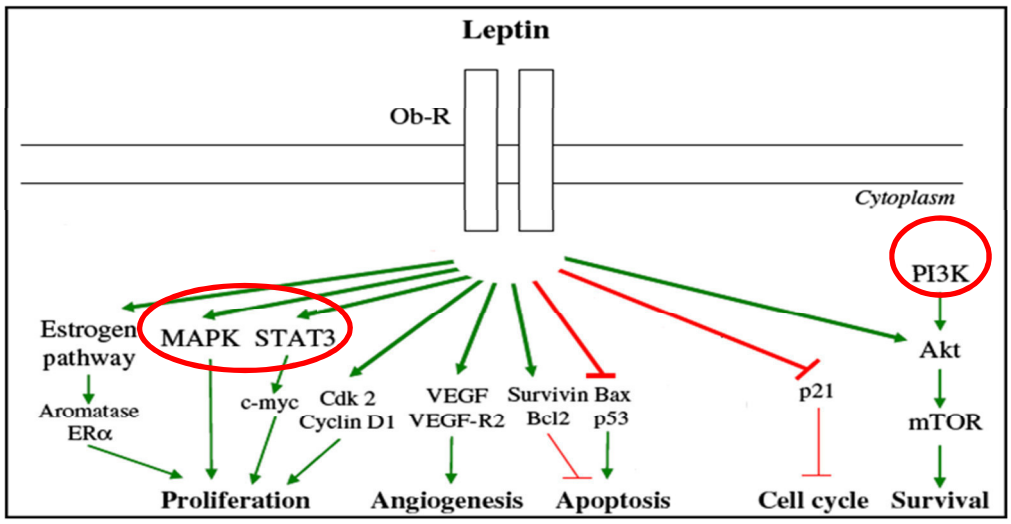


Figure 6 : Les voies de signalisation activée par la leptine.
(D'après Frühbeck, 2006).

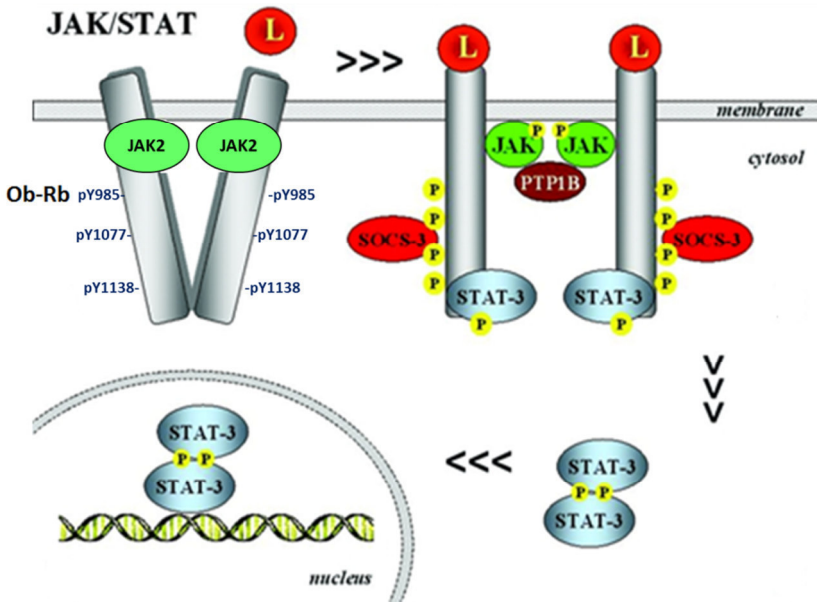


Figure 7 : La voie de signalisation JAK/STAT couplée à Ob-Rb.
(D'après Frühbeck, 2006). La liaison de la leptine à son récepteur permet le positionnement correct des protéines JAK qui peuvent alors s'auto-phosphorylé et phosphoryler le domaine intracellulaire de Ob Rb. Le résidu tyr 1138 phosphorylé permet la liaison des protéines STAT-3 et leur activation. Ces protéines phosphorylées se dimérisent et migrent vers le noyau où elles interagissent avec l'ADN et modulent la transcription des gènes cibles.

2.2.1. La voie JAK/STAT

Il existe quatre isoformes de protéines à activité tyrosine kinase telles que JAK1, 2, 3 et TYK2 (Tyrosine Kinase). Il a été montré que JAK1 et JAK2 interagissent avec Ob-R par l'intermédiaire de séquences conservées appelées Box 1 et Box 2 (Cirillo et al., 2008).

En conditions physiologiques, seule JAK2 semble être activée par la fixation de la leptine sur Ob-Rb et Ob-Rs bien que JAK1 semble également avoir un rôle *in vitro* dans l'activation des voies de signalisation de la leptine (Bjørbaek *et al*., 1997). Box 1 est une séquence très conservée présente dans Ob-Rb et Ob-Rs, riche en proline, indispensable à l'activation de JAK2. Box 2, plus variable et présente uniquement sur Ob-Rb, permettrait une activation maximale des JAKs (Cirillo et al., 2008; Frühbeck, 2006a). Une fois activée, JAK2 phosphoryle le domaine intracellulaire du récepteur au niveau de plusieurs résidus tyrosine, Y^{985}, Y^{1077} et Y^{1138}, présents uniquement sur Ob-Rb **(Figure 7)**. La protéine JAK2 activée peut également recruter directement certaines protéines adaptatrices. Elle joue donc un rôle central dans la signalisation leptinique, en activant les différentes voies de transduction du signal soit de manière directe soit *via* la phosphorylation du récepteur (Frühbeck, 2006a).

La famille de protéines STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) comprend sept membres. Ce sont des facteurs de transcription activés par l'ensemble des cytokines (Levy and Darnell, 2002). Bien que Ob-Rs et Ob-Rb puissent activer JAK2, seule la forme longue, comprenant les sites de liaison pour les facteurs STAT, peut activer entièrement la voie JAK/STAT. Les protéines STAT sont recrutées au niveau des tyrosines phosphorylées Y^{1077} et Y^{1138} présentes sur Ob-Rb *via* leur domaine SH2 et sont activées par auto-phosphorylation. Une fois activées, les STAT s'assemblent en dimères et sont transloquées dans le noyau. Elles stimulent alors la transcription de nombreux gènes cibles impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaires (Frühbeck 2006). La co-expression de chaque protéine STAT avec Ob-Rb a révélé que seules STAT3, STAT5 et STAT6 sont activées par la leptine. Tandis que STAT5 est recrutée par Y^{1077} et Y^{1138}, STAT3 n'est recrutée que par Y^{1138} (Frühbeck 2006). Les souris Y1138S, exprimant un récepteur Ob-Rb muté pour la tyrosine 1138 et de ce fait, incapable de recruter STAT3, sont obèses et insulino-résistantes (Bates et al., 2003; Cirillo et al., 2008). Ces données montrent d'une part que STAT3 régule la transcription des gènes impliqués dans la régulation de la prise alimentaire et du poids corporel et d'autre part, qu'elle participe aux mécanismes de protection contre le développement de l'obésité. Contrairement aux souris *db/db*, les souris Y1138S ne présentent pas de troubles de la reproduction ce qui rend compte de l'importance des voies de signalisation autres que la voie JAK/STAT (Bates et al., 2003).

2.2.2. La voie MAPK

La voie MAPK joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie énergétique de la cellule. Elle stimule la production d'énergie en agissant sur le transport de glucose et l'oxydation des acides gras et limite la consommation énergétique en inhibant la lipogenèse, la synthèse protéique et la gluconéogenèse. Les protéines de la voie MAPK forment une véritable cascade de signalisation activée entre autres par les cytokines. Cette voie est activée par la leptine *via* Ob-Rb et avec une intensité moindre *via* Ob-Rs (Bjørbaek et al., 1997).

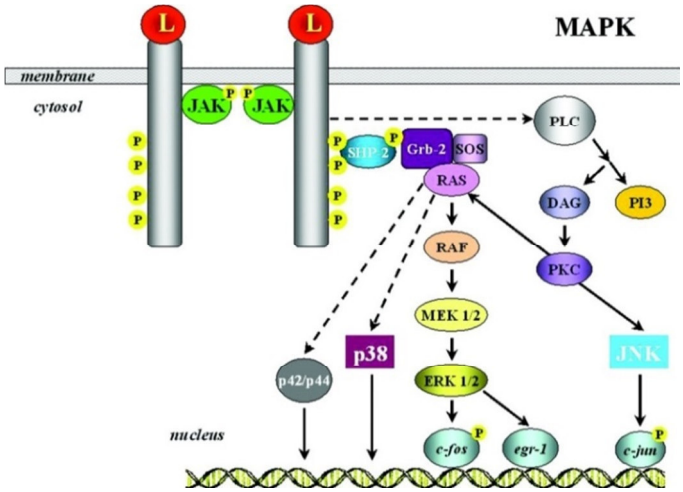


Figure 8 : La voie de signalisation MAPK/ERK.
(Frühbeck 2006). Le résidu Tyr 985 phosphorylé permet la liaison de la protéine SHP-2. SHP-2 interagit avec la protéine adaptatrice Grb2 et avec SOS ce qui conduit à l'activation de la protéine G membranaire Ras. Ras activée déclenche une cascade de phosphorylation qui aboutit à l'activation des protéines ERK. ERK phosphoryle alors des facteurs de transcription comme c-fos. Ces facteurs peuvent se lier à des séquences spécifiques de l'ADN et agir sur la transcription. La protéine Ras activée catalyse également l'activation de la PLC, ce qui conduit à l'activation de la PKC. La PKC peut alors phosphoryler de nombreux facteurs cellulaires sur des résidus serine/thréonine, notamment la protéine JNK qui active le facteur c-jun. DAG : diacylglycerol ; Grb-2 : Growth factor receptor binding-2; PI3: Phosphatidyl-Inositol 3 ; PLC : PhosphoLipase C ; SOS : Son Of Sevenless ; ERK : Extracellular-signal-Regulated Kinase.

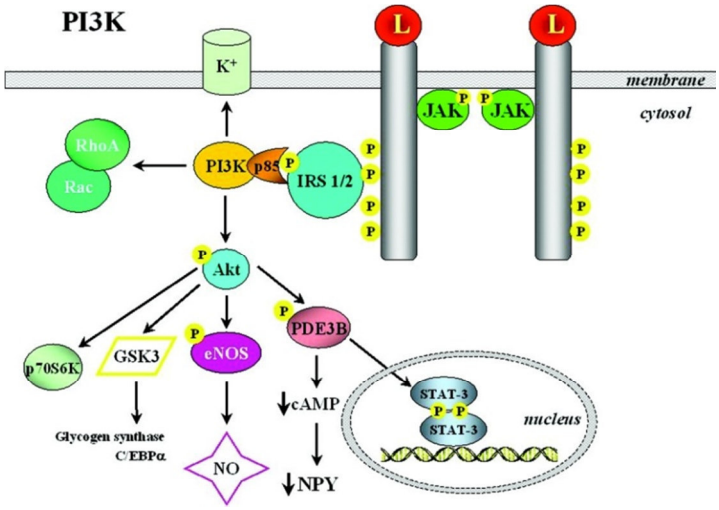


Figure 9 : La voie de signalisation PI3K couplée à Ob-R
(Frühbeck, 2006). La PI3K activée permet l'activation de la PKB. PKB peut alors activer la PDE3B ce qui induit une diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc. PKB agit aussi sur les enzymes du métabolisme glucidique : elle active la GSK3 et la PFK2. Elle stimule la translocation de GLUT 4 vers la membrane et active le PDE3B qui induit la diminution de la concentration intracellulaire d'AMPc. L'activation de PI3K induit aussi l'ouverture de canaux membranaires K+ATP dépendants. C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein ; eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase ; GSK3 : Glycogen Synthase Kinase 3 ; NO : monoxyde d'azote ; NPY : Neuropeptide Y ; IRS : Insulin Receptor Substrate.

La stimulation d'Ob-Rb par la leptine entraîne le recrutement de JAK2 puis la phosphorylation du récepteur au niveau de la tyrosine Y^{985}, permettant l'activation de la protéine tyrosine phosphatase SHP-2. Ne possédant aucun site de phosphorylation, les isoformes courtes Ob-Rs activent la protéine SHP-2 directement *via* JAK2 (Frühbeck 2006). Ensuite, quelle que soit l'isoforme du récepteur, SHP-2 recrute la protéine adaptatrice Grb-2 (Growth factor Receptor Binding protein) qui active ensuite la protéine SOS (Son Of Sevenless), activant à son tour la protéine Ras, déclencheur de la cascade des MAPK **(Figure 8)**.

L'activation consécutive de Ras, Raf, MEK1/2 (MAPK kinase) puis de ERK1/2 (Extracellular signal Regulated Kinase) conduit à la translocation nucléaire afin de réguler l'expression de gènes cibles tels que c-fos et egr-1 impliqués dans les phénomènes de prolifération et différenciation cellulaires **(Figure 8)** (Horgan and Stork, 2003). A l'instar des cytokines, la leptine est capable d'activer les protéines p38MAPK et JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (Bouloumie et al., 1999a), impliquées dans des phénomènes de stress cellulaire (Shin et al., 2005).

Contrairement à la voie JAK/STAT, la voie ERK peut aussi être activée par la forme courte du récepteur, Ob-Ra (Frühbeck, 2006a). Dans ce cas la protéine SHP-2 est phosphorylée directement par JAK. Cependant le signal conduit par Ob-Ra est moins efficace que celui conduit par Ob-Rb (Frühbeck, 2006a).

2.2.3. La voie IRS/PI3K

PhosphoInositide 3-kinase (PI3K) est une voie clé activée par un grand nombre de ligands, tels que l'insuline. La leptine est également capable de réguler certains acteurs de cette voie, comme les substrats des récepteurs à insuline (IRS) initiateurs de cette voie. Ceci suggère une interaction entre les voies de signalisation leptinique et insulinique (Devos *et al.*, 1997). L'activation de la voie PI3K est impliquée dans des processus comme la survie, le métabolisme cellulaire, la prolifération et l'apoptose.

La fixation de la leptine sur son récepteur active les protéines IRS1 et IRS2 (Insulin Receptor Substrate) par interaction avec JAK2, permettant ainsi une activation aussi bien par Ob-Rb que Ob-Rs (Bjørbaek *et al.* 1997; Frühbeck 2006). Une fois activées, les protéines IRS-1/2 stimulent l'activité de la PI3K qui va phosphoryler les phosphatidylinositols de la membrane plasmique pour générer le phosphatidylinositol triphosphate (PIP3). Le PIP3 sert alors de substrat à la PDK-1 (Phosphoinositide Dependent Kinase-1) qui active à son tour les protéines kinases B (PKB ou AKT) et C (PKC) **(Figure 9)** (Frühbeck 2006). AKT, protéine majeure de la voie de signalisation IRS/PI3K, est impliquée principalement dans des phénomènes de prolifération, de croissance et de survie cellulaires *via* l'activation de protéines telles que mTOR (Mammalian Target Of Rapamycine), NFκB et BCL2 *(Andrews et al.* 2008; Mattioli *et al.* 2009). AKT exerce également des effets métaboliques en inhibant la sécrétion d'insuline des cellules β pancréatiques *via* l'activation de la phosphodiestérase 3B (PDE3B) et le stockage de glycogène *via* la phosphorylation de glycogène synthase kinase (GSK3) ce qui provoque une stimulation de la glycolyse et de la glycogénogenèse.

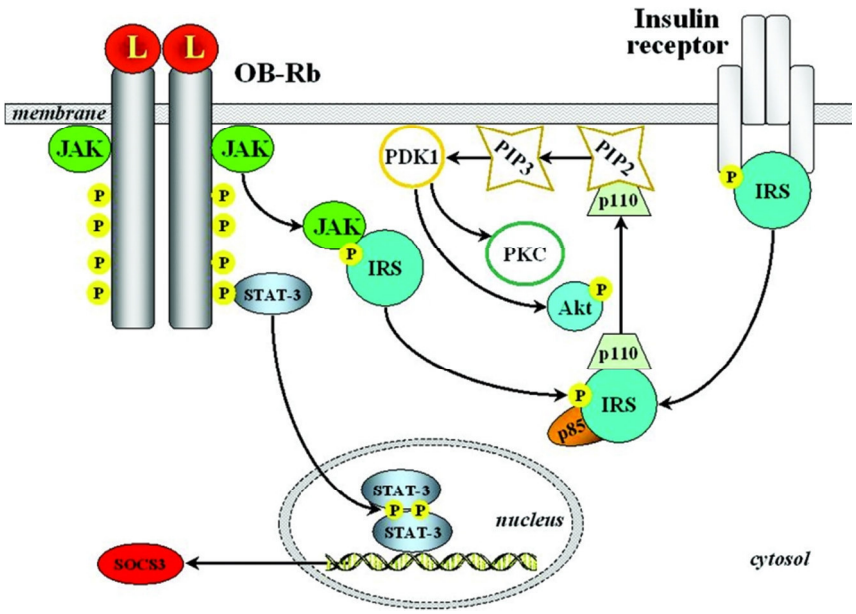


Figure 10 : La voie de signalisation IRS couplée à Ob-Rb.
(Frühbeck, 2006). L'activation du récepteur Ob-Rb fait appel à certains acteurs de la cascade de signalisation de l'insuline, tels que IRS (Insulin Receptor Substrate), PIP2 (Phosphatidyl-Inositol-Diphosphate), PIP3 (Phosphatidyl-Inositol-triphosphate), et Ptdlns (3, 4, 5) P_3 (phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate).

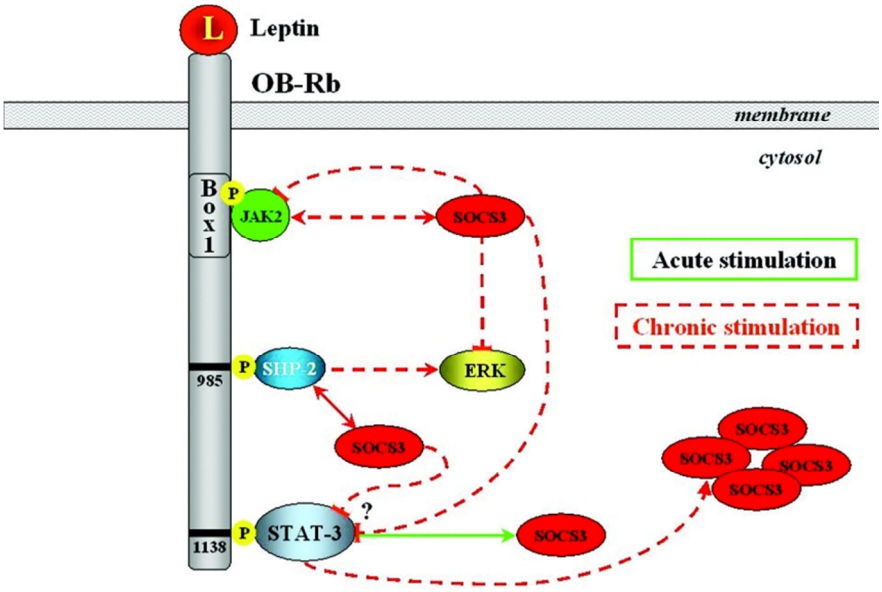


Figure 11 : Régulation du signal leptine par les protéines SOCS3.
(Frühbeck, 2006). L'activation de STAT3 induit l'expression de SOCS3. SOCS3 inhibe la phosphorylation de STAT3 (**stimulation aigue du récepteur**). L'accumulation de SOCS3 dans la cellule peut se traduire par une fixation à JAK2 ce qui inhibe la phosphorylation et l'activation de la totalité du récepteur (**stimulation chronique du récepteur**).

Dans l'hypothalamus de rat, l'utilisation d'un inhibiteur de la PDE3B réverse l'action de la leptine sur la prise alimentaire et la prise de poids. Cet inhibiteur empêche l'activation et l'action de STAT3. Ceci montre le rôle prépondérant de ces deux voies dans les effets hypothalamiques de la leptine. De plus, AKT stimule la NO synthase endothéliale (eNOS) augmentant ainsi la production de monoxyde d'azote (NO) et induisant les effets vasorelaxants de la leptine **(Figure 9)** (Frühbeck 2006). Les effets de l'activation de la PI3K sur la PKC, consécutivement à la fixation de la leptine sur son récepteur sont moins établis. Différentes études ont montré que la leptine possède, selon les conditions, un effet stimulant ou inhibiteur sur l'activation des différentes isoformes de la PKC (Frühbeck 2006). Enfin, une étude réalisée sur des cellules musculaires murines a montré un lien entre les voies IRS/PI3K et MAPK *via* la PKC **(Figure 10)** (Frühbeck 2006). Par ailleurs, la phosphorylation de PI3K entraîne l'activation de canaux potassiques membranaires ATP dépendants, ce qui induit une hyperpolarisation de la membrane cytoplasmique. Cette voie a été mise en évidence dans les cellules isolées à partir des insulinomes ou des îlots de Langerhans et dans les neurones hypothalamiques glucose-sensitifs. En permettant la phosphorylation de IP_3 en IP_4, l'activation de la PI3K conduit à une diminution de la concentration intracellulaire de IP_3 et donc de celle de Ca^{2+} et induit une diminution de l'activité de la PKC. Ainsi il est intéressant de constater que la leptine peut avoir un effet activateur ou inhibiteur sur la PKC selon la voie de signalisation activée. Lorsque les 2 voies sont possibles dans la cellule cible elles participent à la mise en place d'une régulation négative du signal hormonal (Frühbeck 2006).

Ainsi, la voie IRS/PI3K joue un rôle prépondérant dans la régulation de la prise alimentaire à la fois au niveau central et périphérique. De plus, il semblerait qu'elle intervienne également dans les effets délétères de la leptine sur le système reproducteur. En effet, des souris IRS2-/-, déficientes en protéine IRS2, présentent une obésité et une hyperleptinémie, associées à des troubles de la reproduction (Burks *et al.* 2000).

2.2.4. Régulation négative des voies de signalisation

2.2.4.1. Suppressor of Cytokine Signalling-3 (SOCS-3)

Les protéines SOCS (Suppressor of Cytokine Signalling) sont les acteurs d'une boucle de rétrocontrôle négatif induite par de nombreuses cytokines (Starr *et al.* 1997; Münzberg and Morrison 2015). Les membres de cette famille, qui possèdent un domaine SH2, sont induits par une variété de cytokines afin de réguler négativement leurs voies de signalisation. Ainsi, la leptine stimule l'expression cellulaire de SOCS-3 (Bjørbaek *et al.* 1999; Münzberg and Morrison 2015). La transcription des gènes codant pour SOCS-3 est activée *via* STAT3 en réponse à la stimulation d'Ob-Rb par la leptine (Frühbeck 2006). La protéine SOCS-3 inhibe en retour les protéines STAT et JAK, et par conséquent les voies MAPK et IRS/PI3K **(Figure 11)**. La protéine SOCS-3, qui se fixe sur de multiples sites du domaine intra-cellulaire d'Ob-Rb, diminue *in vitro* l'activation de STAT3 et de ERK (Dunn *et al.* 2005). La protéine SOCS-3 est synthétisée. Dans une lignée cellulaire hépatique, il est décrit que la surexpression de SOCS-3 réduit la phosphorylation de ERK1/2 et de AKT, inhibant ainsi l'activation des voies de signalisation correspondantes (Saxena *et al.* 2004). Ainsi, la leptine induit la synthèse de SOCS-3 *via* la voie JAK/STAT afin de prévenir l'activation excessive de son récepteur.

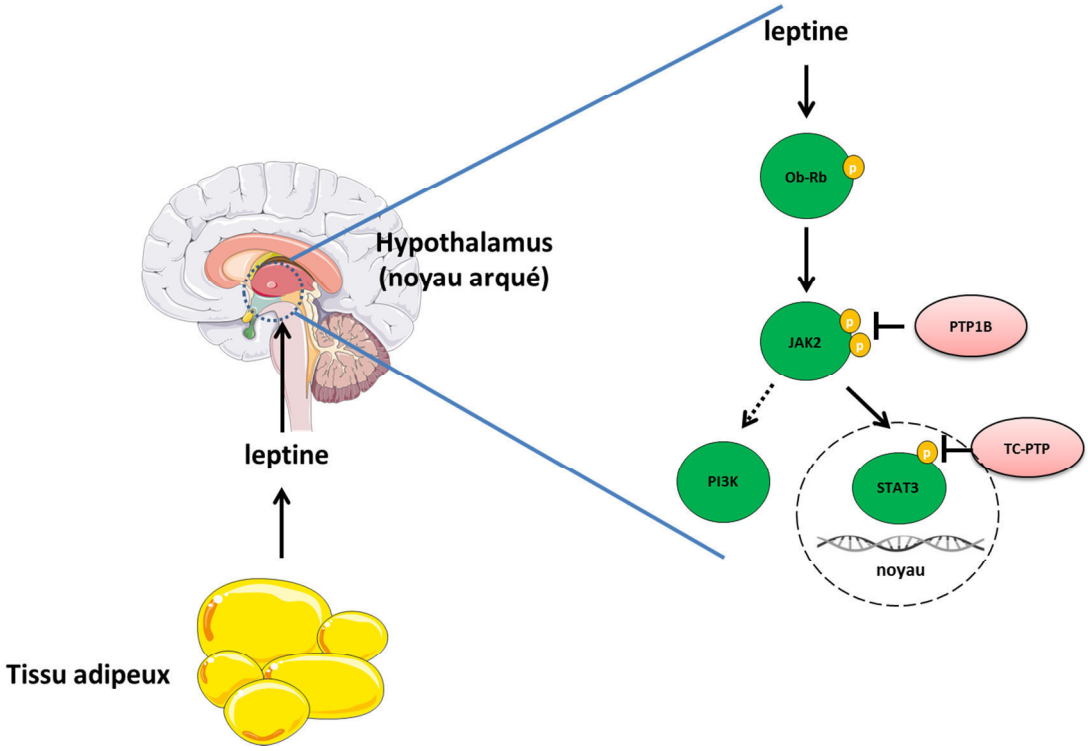


Figure 12 : Régulation du signal leptinique par les protéines phosphatases PTP1B et TC-PTP. (d'après Bakke and Haj, 2014; Loh *et al.,* 2011). Le signal leptine est régulé négativement par l'induction de PTP1B qui inhibe la phosphorylation de JAK2 et de TC-PTP qui déphosphoryle les protéines STAT3 au niveau nucléaire.

L'inhibition de l'expression de la protéine SOCS-3 est alors associée à une prolifération et une survie cellulaire augmentées (Niwa *et al.* 2005; Weber *et al.* 2005).

In vivo, l'injection de leptine au niveau du noyau arqué entraine l'expression hypothalamique de SOCS-3 (Baskin, Breininger, and Schwartz 2000) qui est associée au phénomène de résistance à la leptine caractéristique de l'obésité. En effet, si la stimulation des récepteurs est permanente, l'accumulation de SOCS-3 dans la cellule se traduit par une inhibition totale de la phosphorylation des récepteurs et donc de la transduction du signal leptinique. Ce mécanisme permettrait d'expliquer le phénomène de leptino-résistance observé chez les sujets obèses, qui présentent une hyperleptinémie permanente (Bjørbaek *et al.* 1999). Chez, le rat, une déficience en SOCS-3 conduit à une plus grande sensibilité à la leptine et à une résistance à l'obésité par excès d'apport alimentaire (Jane K. Howard *et al.* 2004).

2.2.4.2. Protéine Tyrosine Phospatase 1B (PTP1B)

La phosphatase (Protein Tyrosine Phosphatase 1B) PTP1B comme SOCS-3 représente une voie de régulation négative *in vitro* et *in vivo* de la signalisation induite par la leptine, aussi bien au niveau central que périphérique (Bence *et al.* 2006; Briancon *et al.* 2010; Handy *et al.* 2011). Sa cible principale est JAK2 dont elle inhibe l'activation. PTP1B catalyse la déphosphorylation des résidus tyrosines de JAK2 et inhibe donc la transduction du signal (Loh *et al.* 2011; Bakke and Haj 2014) **(Figure 12)**. Les souris déficientes en PTP1B sont caractérisées par une sensibilité accrue à l'insuline et à la leptine, ainsi que par une résistance à l'obésité induite par un régime hypercalorique (Bence *et al.* 2006).

2.2.4.3. Protéine Tyrosine Phosphatase des cellules T (TC-PTP)

L'équipe de Tiganis a découvert en 2011 une troisième protéine impliquée dans la boucle de rétrocontrôle négatif de leptine, nommée T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase (TC-PTP). L'étude *in vivo* de Loh *et al.* (Loh *et al.* 2011) a permis de monter que la concentration hypothalamique de cette protéine est élevée en situation d'obésité afin de restreindre l'action de leptine au niveau central. Les souris déficientes en TC-PTP ont une meilleure sensibilité à la leptine et deviennent résistantes à une prise de poids induite par une alimentation hyper lipidique. En outre, l'administration d'un inhibiteur de TC-PTP au niveau intra-cérébroventriculaire améliore la signalisation de la leptine. De plus, l'inhibition simultanée des deux phosphatases TC-PTP et PTP1B au niveau des cellules neuronales a des effets additifs dans la prévention de l'obésité induite par l'alimentation. Loh *et al.* (Loh *et al.* 2011) ont constaté que l'activité de la phosphatase TC-PTP *in vitro* est de réduire les facteurs JAK/STAT3 induits par la leptine par l'intermédiaire d'une déphosphorylation intra-nucléaire (Hoeve *et al*., 2002), sans modification de la voie AKT ou ERK1/2. De plus, ils ont observé chez les souris déficientes en TC-PTP une meilleure adaptation au signal de leptine au niveau central qui se traduit par une activation de la voie STAT3.

Dans des études antérieures, il a été montré qu'au niveau cellulaire les phosphatases PTP1B et TC-PTP peuvent agir en parallèle pour réguler la phosphorylation des facteurs JAK et STAT respectivement dans le cytoplasme et le noyau (Simoncic *et al.* 2006; X. Lu *et al.* 2007). Par conséquent, Loh *et al.* (Loh *et al.* 2011) suggèrent que ces deux protéines régulatrices fonctionnent de manière coordonnée afin de réguler *in vivo* la signalisation

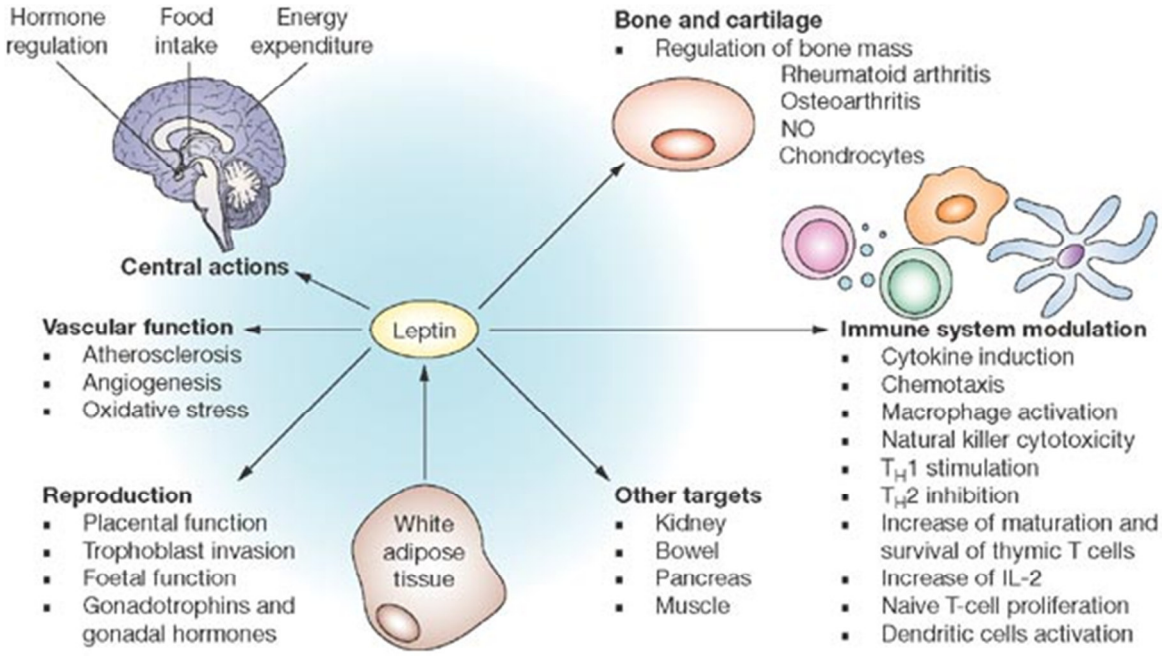


Figure 13 : Schéma récapitulatif sur les principales fonctions pléïotropiques de la leptine.
(Lago *et al.*, 2007)

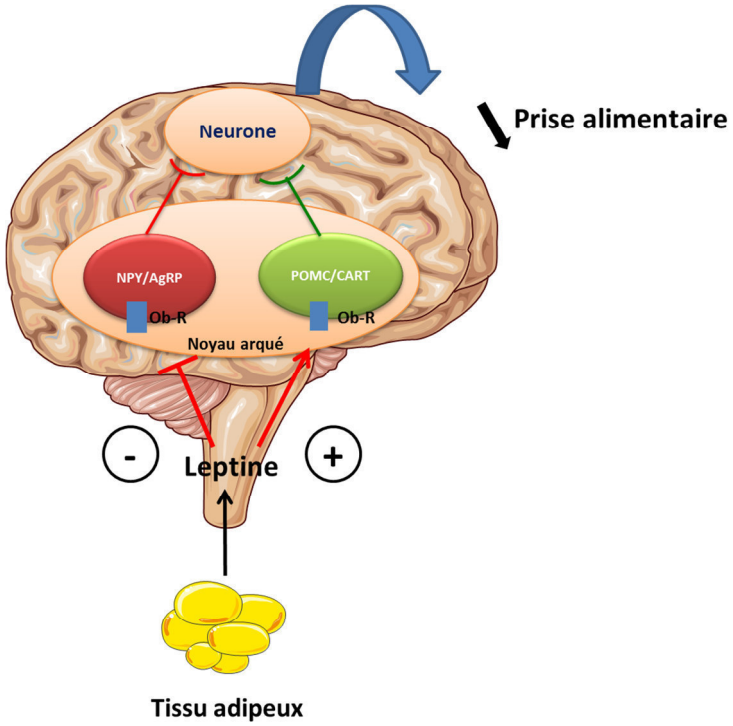


Figure 14 : Action centrale de la leptine
Le tissu adipeux sécrète la leptine qui va agir sur différentes cibles *via* ses récepteurs Ob-R. La leptine agit sur les neurones du noyau arqué en stimulant les neurones anorexigènes (POMC/CART) et en inhibant les neurones orexigènes (NPT/AgRP). Ceci entraîne la diminution de la prise alimentaire. POMC : pro-opiomélanocortine ; CART : Cocaine- and Amphetamine-Regulated Transcript ; NPY : NeuropeptideY ; AgRP : Agouti-Related Peptide.

leptinique : PTP1B en atténuant la phosphorylation de JAK2 et STAT3 éventuellement au niveau cytoplasmique et TC-PTP en favorisant la déphosphorylation nucléaire de STAT3 **(Figure 12)**.

Enfin, la régulation du signal leptine dépend également de la diminution du nombre de récepteurs membranaires (Frühbeck 2006). Ce mode de régulation est commun à de nombreuses cytokines.

3. Rôles physiologiques

Le rôle de la leptine ne semble pas être limité à celui de simple marqueur de la masse adipeuse. La leptine a été initialement décrite comme une cytokine d'origine adipocytaire, limitant la prise alimentaire et augmentant la dépense énergétique (Auwerx and Staels 1998; Ahima and Flier 2000; Coll, Farooqi, and O'Rahilly 2007). L'expression tissulaire ubiquitaire de la leptine et de son récepteur Ob-R, explique son implication dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que le métabolisme énergétique, la reproduction, ou encore la vascularisation. Elle serait également un important régulateur de la réponse immunitaire. Les phénotypes des souris *ob/ob* et *db/db* ont permis de préciser les actions biologiques médiés par la leptine. Ces souris sont hyperphagiques, présentent des perturbations endocriniennes et métaboliques, notamment une hyperinsulinémie et une hyperglycémie (Coleman 1978; Houseknecht and Portocarrero 1998; J. M. Friedman and Mantzoros 2015), conduisant à une obésité massive liée à une prise alimentaire excessive et un défaut de dépense énergétique (Halaas *et al.* 1995; G. Fantuzzi and Faggioni 2000). En outre, elles sont stériles en raison d'une insuffisance hormonale hypothalamo-hypophysaire et présentent une atrophie des organes reproducteurs. De telles altérations sont décrites lors des déficits congénitaux en leptine chez l'homme (Ozata, Ozdemir, and Licinio 1999). La leptine est ainsi une molécule pléïtropique (Lago *et al.* 2007) **(Figure 13)**, jouant un rôle important dans la régulation des fonctions endocrines et des fonctions métaboliques (Faggioni, Feingold, and Grunfeld 2001; Otero *et al.* 2005).

3.1. Régulation de la prise alimentaire au niveau central

La leptine a un rôle essentiel chez l'homme et chez les rongeurs dans la composition corporelle et dans le métabolisme énergétique (S. S. Martin, Qasim, and Reilly 2008; Athyros *et al.* 2010; J. Friedman 2014). La fonction essentielle de cette protéine consiste en effet en la régulation de la prise alimentaire, principalement par ses effets sur le système nerveux central (Coll, Farooqi, and O'Rahilly 2007; Pénicaud, Meillon, and Brondel 2012) **(Figure 14)**. D'ailleurs l'hypothalamus exprime fortement le récepteur à la leptine Ob-R (Ahima and Flier 2000). La prise alimentaire augmente les taux sériques de leptine et à l'inverse ces taux chutent durant le jeûne sous l'influence de neuropeptides hypothalamiques.

Après avoir franchi la barrière hématoencéphalique, la leptine interagit avec un réseau neuronal complexe intégrant les signaux nutritionnels, hormonaux et nerveux (Schwartz *et al.* 2000) et induit un effet satiétogène puissant. Chez le modèle murin *ob/ob* l'injection intracérébroventriculaire de leptine entraîne une inhibition de la prise alimentaire, une augmentation de leur dépense énergétique et une amélioration de la tolérance au glucose (Y. Zhang *et al.* 1994), associées à une diminution du poids corporel (Elmquist, Elias, and Saper

1999; Ahima and Flier 2000). En outre, l'administration centrale d'un anticorps anti-leptine stimule l'augmentation de la prise alimentaire (Brunner *et al.* 1997). Aussi, la thérapie génique des souris *ob/ob* avec un adénovirus recombinant exprimant l'ADNc de la leptine se traduit par une forte réduction de la prise de nourriture, de la masse corporelle et également par la normalisation de la glycémie et de l'insulinémie (Murphy *et al.* 1997; Muzzin *et al.* 1997). A côté de son effet hypo-insulinémiant, la leptine exerce aussi un effet régulateur sur la sécrétion de somatostatine qui est activée au niveau pancréatique par une déficience en insuline. Chez le rat, l'administration centrale de leptine entraîne une diminution de la sécrétion hypothalamique de somatostatine (Carro *et al.* 1999). De même*, in vitro*, le traitement de neurones hypothalamiques de rat avec la leptine diminue l'expression et la libération de somatostatine induite par une hypoglycémie (Quintela *et al.* 1997). De même chez l'homme, l'administration de leptine recombinante chez un enfant obèse présentant une déficience congénitale en leptine, a réduit fortement son poids corporel en diminuant sa prise alimentaire mais sans impact sur ses dépenses énergétiques (Farooqi and O'Rahilly 2009).

Au niveau cérébral, la leptine agit sur deux populations distinctes de neurones localisés dans le noyau arqué pour moduler l'expression de neuropeptides (Spanswick *et al.* 1997; Pinto *et al.* 2004; Pénicaud, Meillon, and Brondel 2012). Elle inhibe l'activité des neurones orexigènes de type NPY (NeuroPeptide Y) (K. A. Takahashi and Cone 2005) et AgRP (Agouti-Related Peptide) (Stephens *et al.* 1995; Morrison *et al.* 2005) et stimule l'activité des neurones anorexigènes de type POMC (Pro-OpioMelanoCortin) (Cowley *et al.* 2001) et CART (Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript) (Gong *et al.* 2008; G. Yang *et al.* 2009) *via* l'activation des voies de signalisation JAK2 (Gong *et al.* 2008; G. Yang *et al.* 2009) et dans une moindre mesure IRS/PI3K (M.-J. Yang *et al.* 2010). Les neurones du noyau arqué envoient, par ailleurs, de nombreuses projections au centre supérieur impliqué dans l'intégration des signaux comme l'hypothalamus dorsomédian (DMH) et le noyau paraventriculaire (PVH) qui modulent au final le comportement alimentaire. Les différents noyaux impliqués sont interconnectés par un réseau de projections neuronales complexe.

L'expression du gène du NPY est majorée chez les souris *ob*/*ob* et *db*/*db* et l'injection chronique, centrale ou périphérique, de leptine normalise l'expression des ARNm du NPY au niveau de son site de synthèse, dans le noyau arqué et dans les noyaux paraventriculaire et dorsomédian (Stephens *et al.* 1995; Schwartz *et al.* 1996) Cependant, les souris invalidées pour le gène du NPY ne sont pas obèses. Le fait que l'administration de leptine chez ces souris maintient un effet anorexigène a conduit à rechercher d'autres modulateurs de la prise alimentaire autre que le neuropeptide NPY (Erickson *et al*., 1996 ; Pénicaud *et al*., 2012), comme la corticolibérine ou CRH (Corticotropin Releasing Hormone). Celle-ci inhibe la prise alimentaire, stimule l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et augmente la thermogenèse dans le tissu adipeux brun. L'administration centrale de leptine augmente l'expression du gène de la CRH au niveau du noyau paraventriculaire (Schwartz *et al.* 1996). Une interaction de la leptine et du GLP-1 (glucagon-like peptide-1) a également été rapportée.

Chez le rat, la réduction de la prise alimentaire par le GLP-1 est potentialisée par l'administration de leptine. Cette potentialisation résulterait de l'interaction de la leptine avec son récepteur Ob-Rb localisé sur les neurones à GLP-1 au niveau du noyau du tractus solitaire

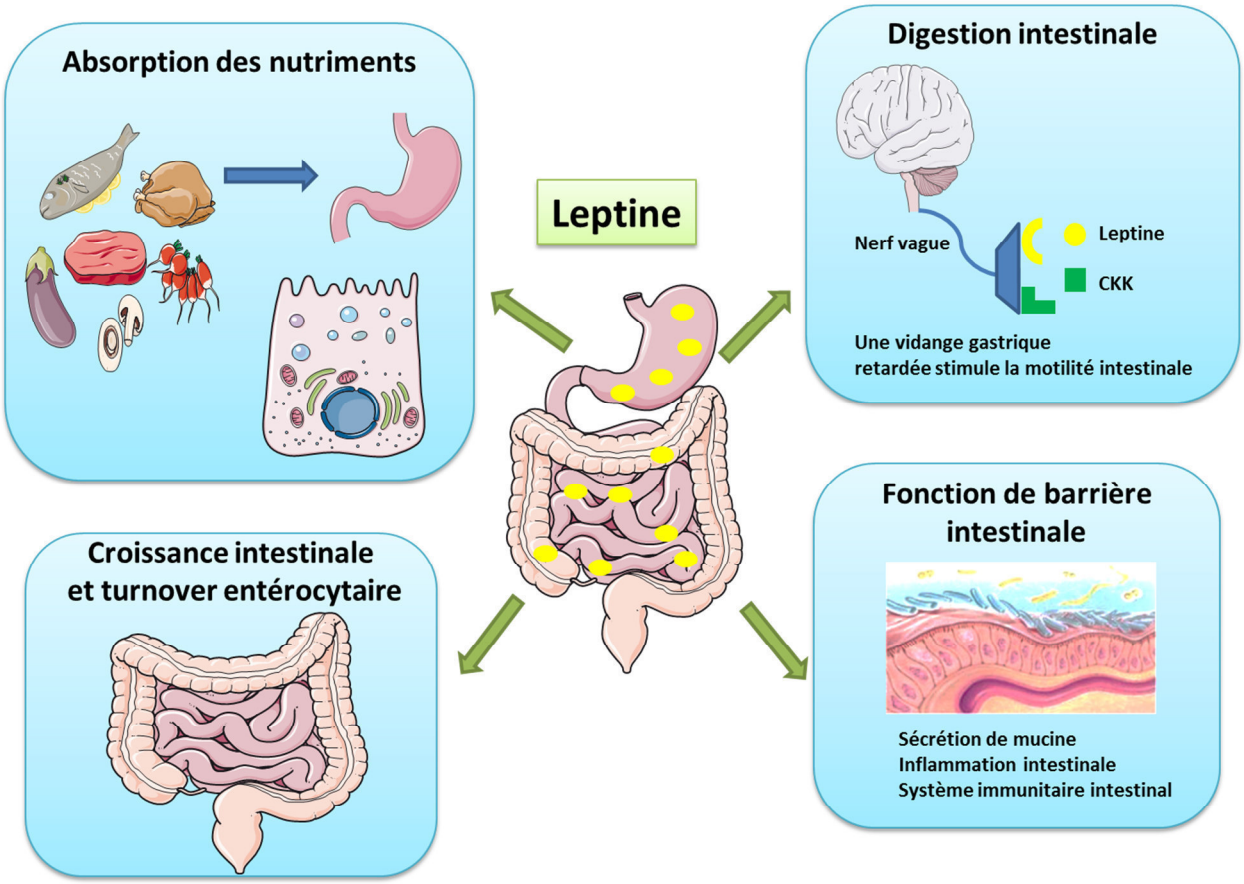


Figure 15 : Effets paracrines de la leptine gastrique au niveau intestinal.
(D'après Sáinz *et al,.* 2015)

(Goldstone *et al.* 1997). La leptine semble diminuer l'expression du MCH (Melanin-Concentrating Hormone), autre peptide neuro-hypophysaire orexigène chez les rongeurs.

Dans le noyau arqué de l'hypothalamus, certains neurones à POMC, précurseur de l'hormone anorexigène α-MSH (α-Melanocyte-Stimulating-Hormone), expriment les récepteurs Ob-Rb. L'administration de leptine engendre une surproduction d'α-MSH qui se lie sur les récepteurs hypothalamiques MC4-R (récepteur 4 de la mélanocortine) impliqués dans le processus d'inhibition de la prise alimentaire (Flier and Maratos-Flier 1998). Ainsi, la voie mélanocortinergique impliquant les récepteurs MC4-R serait un médiateur de l'effet de la leptine sur la prise alimentaire (Auwerx and Staels 1998; Flier, Harris, and Hollenberg 2000).

3.2. Régulation de la sécrétion d'insuline

In vivo, la leptine normalise l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie des souris *ob*/*ob* à des doses n'entraînant pas de perte de poids (Pelleymounter *et al.* 1995). Chez les rongeurs, l'administration périphérique de leptine engendre une diminution de l'insulinémie, excepté chez les souris *db*/*db* et les rats *fa*/*fa* qui n'expriment pas le récepteur de la leptine, présentant une déficience dans la transduction du signal de la leptine (Emilsson *et al.* 1997*;* Kulkarni *et al.* 1997). Dans un modèle de pancréas perfusé, ainsi que dans les îlots pancréatiques isolés d'homme ou de rongeur, la leptine recombinante inhibe l'expression et la sécrétion d'insuline basale mais également l'hyperinsulinémie induite par le glucose (Fehmann *et al.* 1997). Les récepteurs Ob-R sont présents dans les îlots de langerhans, les cellules β productrices d'insuline et les cellules α productrices de glucagon (Kieffer, Heller, and Habener 1996).Ces travaux indiquent que la leptine exerce un effet hypo-insulinémiant *via* son récepteur Ob-Rb. Ainsi le rôle physiologique de la leptine serait de contrôler l'hypersécrétion d'insuline postprandiale (Morris and Rui 2009).

3.3. Régulation de la digestion

L'estomac joue un rôle essentiel dans la digestion et l'absorption des nutriments. Des travaux ont mis en évidence dans celui-ci une synthèse de leptine et l'expression de son récepteur Ob-Rb, ce qui laisse supposer qu'elle intervient au moment de la digestion des aliments (Bado *et al.* 1998; Sobhani *et al.* 2000) **(Figure 15)**. La muqueuse fundique est formée d'une monocouche de cellules présentant de nombreuses invaginations. Les cellules produisant la leptine correspondent aux cellules principales sécrétant également le pepsinogène (Sáinz *et al.* 2015). Cette sécrétion leptinique est contrôlée par des facteurs nerveux (Marion Buyse, Sobhani, and Bado 2002) et hormonaux activés par le repas (Bado *et al.* 1998; Sobhani *et al.* 2000). Le pool gastrique de leptine, n'est pas totalement dégradé dans le suc gastrique. Il est véhiculé vers le duodénum sous forme libre et liée à des macromolécules (Guilmeau *et al.* 2003) et atteint le côlon sous une forme toujours biologiquement fonctionnelle. La leptine stomacale se distingue de la leptine adipocytaire par une action rapide au cours du repas (Attoub *et al.* 1999) et une sécrétion principalement exocrine (Bado *et al.* 1998). La différence de cinétique de sécrétion post-prandiale des deux *pools* de leptine suppose des systèmes de régulation et des fonctions différentes. La sécrétion rapide, à partir du *pool* gastrique, servirait à optimiser l'absorption intestinale des nutriments et la sécrétion tardive, à partir du *pool* adipocytaire, à moduler le stockage et l'utilisation des

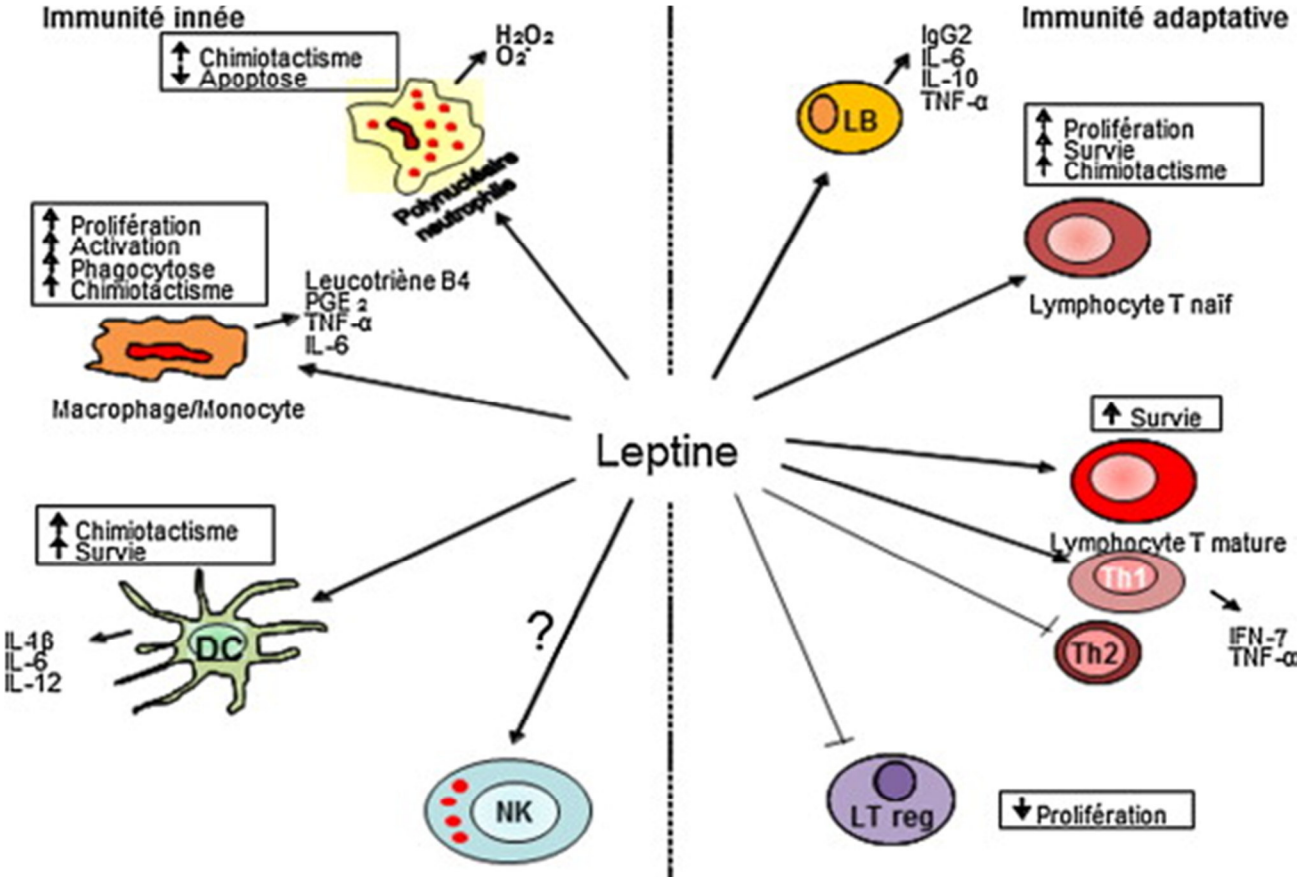


Figure 16 : Effet de la leptine sur la réponse immune innée et adaptative.
(D'après Farges *et al*. 2015). La leptine agit sur le système immun inné et adaptatif. Au niveau du système inné, la leptine module l'activité des neutrophiles par l'augmentation de chimiotaxie et par la sécrétion des espèces réactive de l'oxygène. Chez l'homme, il semble que cette action de la leptine soit médiée par le TNF-α produit par les monocytes. La leptine induit la sécrétion des médiateurs pro-inflammatoires et l'expression des molécules d'adhésion. La leptine augmente aussi la capacité toxique des cellules NK et la sécrétion de la perforine et de l'IL-2 par ces cellules. Au niveau du système adaptatif, la leptine module la génération, la maturation et la survie des cellules T du thymus, en diminuant leur ratio d'apoptose. Au niveau des cellules T 'naïves', la leptine augmente leur prolifération et la sécrétion d'IL-2. Chez les cellules T 'mémoire', la leptine privilégie la stimulation des cellules TH1 par l'induction de la production de IFN-γ et du TNFα. Ce processus est maintenu par une voie autocrine où la leptine est produite par les TH1 et agit sur les TH1. Enfin, la leptine a des effets antiapoptotiques sur les cellules T matures et sur les précurseurs hématopoïétiques. DC : dendritic cell, cellule dendritique ; IFN : interféron ; Ig : immunoglobuline ; IL : interleukine ; LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; LT reg : lymphocyte T regulateur ; M1 : macrophage de phénotype 1 ; M2 : macrophage de phénotype 2 ; MDSC : Myeloïd Derived Supressor Cell, cellule suppresseur dérivée des myéloïdes ; NK : cellule Natural Killer ; PGE2 : prostanglandine E2 ; TNF : Tumor Necrosis Factor, facteur nécrosant les tumeurs.

réserves énergétiques. La présence de récepteurs à la leptine tout au long de l'intestin (M. Buyse *et al.* 2001; Barrenetxe *et al.* 2002) témoigne de l'importance de la leptine circulant dans la lumière intestinale. Quelques données démontrent son rôle dans la réduction de l'absorption intestinale des lipides (Morton *et al.* 1998; Stan *et al.* 2001) et des sucres (Lostao *et al.* 1998).

Chez le rat, l'administration de leptine dans la lumière jéjunale augmente l'absorption des di- et des tri-peptides *via* PepT-1, transporteur dépendant des protons (M. Buyse *et al.* 2001). Ces données ont été confirmées *in vitro* à partir des cellules intestinales Caco2 qui se différencient spontanément en entérocytes en exprimant les différentes formes du récepteur de leptine. Cette action leptinique à court terme résulte essentiellement de la mobilisation du *pool* intracellulaire de PepT-1 à la membrane plasmique. Dans les conditions physiologiques, cette action de leptine gastrique semble contribuer au contrôle des réserves énergétique en favorisant notamment l'absorption intestinale des protéines au détriment de celle des lipides. L'injection intrapéritonéale de leptine chez la souris réduit la prise alimentaire sans influencer la vidange gastrique (Barrachina *et al.* 1997), alors qu'une injection intracérébroventriculaire chez le rat inhibe la vidange gastrique, probablement *via* des récepteurs Ob-R localisés sur les neurones cholinergiques du noyau moteur dorsal du nerf vague (Smedh *et al.* 1998).

3.4. Modulation des défenses immunitaires

Les propriétés immunomodulatrices de la leptine ont été mises en évidence à partir de deux constatations **(Figure 16)** : d'une part, la structure de la leptine et celle de son récepteur peuvent s'assimiler à celle d'une cytokine (Baumann *et al.* 1996; Yiying Zhang *et al.* 1997; Cava and Matarese 2004) et d'autre part, le récepteur à la leptine est exprimé par les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et B (Lord *et al.* 1998; Loffreda *et al.* 1998; Busso *et al.* 2002), les cellules NK (Natural Killer) (Y. Zhao *et al.* 2003; Wrann *et al.* 2012; Farges et al. 2015), les monocytes/macrophages (Tsiotra *et al.* 2000) les polynucléaires neutrophiles (PNNs) (Caldefie-Chezet *et al.* 2001) et les cellules souches hématopoïétiques murines (Cioffi *et al.* 1996; Gainsford *et al.* 1996; Nakao *et al.* 1998). Les adipocytes de la moelle osseuse sont capables de sécréter la leptine à proximité des cellules souches hématopoïétiques (Laharrague *et al.* 1998) et ainsi, probablement de réguler leur capacité de prolifération, de différenciation, et de survie.

En effet, des études de transfection du récepteur Ob-Rb ont montré que la leptine stimule la prolifération de la lignée hématopoïétique Ba/F3 et la différenciation des cellules myéloïdes leucémiques M1 en macrophages par l'activation de JAK2 (Gainsford *et al.* 1996; Ghilardi and Skoda 1997). Toutes ces données étayent le rôle essentiel de la leptine dans le développement du système immunitaire.

La leptine augmente le nombre de macrophages et la formation de colonies granulocytaires (Mikhail *et al.* 1997). Après la stimulation des monocytes et des macrophages par le LPS (lipopolysaccharide), la leptine augmente leur capacité de phagocytose et potentialise l'effet du LPS par la production de cytokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6, IL-12) *via* l'activation de son récepteur Ob-Rb (Loffreda *et al.* 1998; Zarkesh-Esfahani *et al.* 2001; Cava and Matarese 2004) aussi bien chez l'animal que chez l'homme (Loffreda *et al.* 1998; Santos-Alvarez, Goberna, and Sánchez-Margalet 1999). Par contre, Faggioni *et al*.

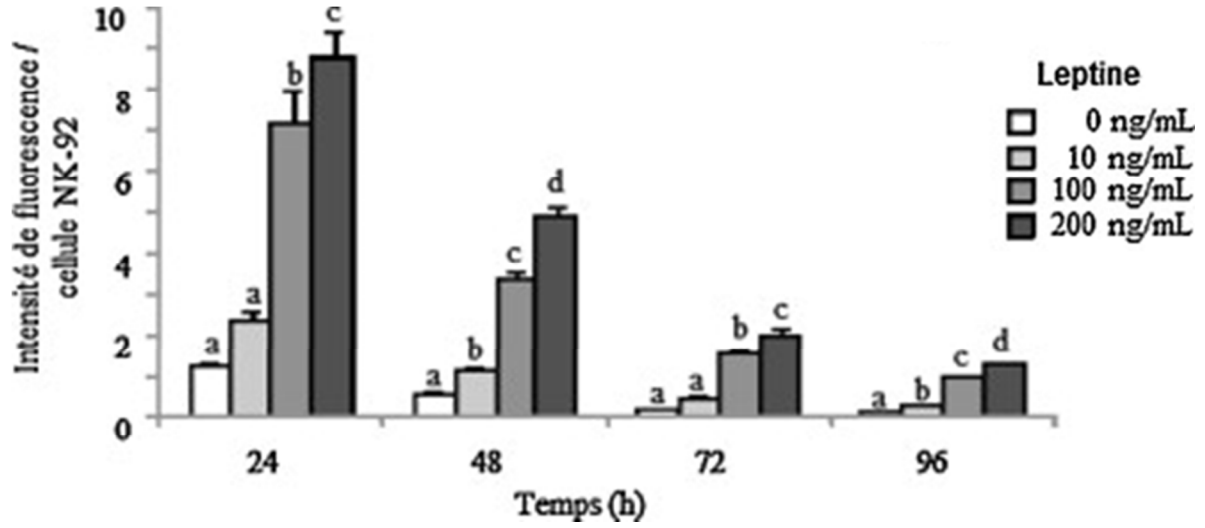


Figure 17: Effet de la leptine sur l'activité métabolique des cellules NK-92.
(Farges *et al*. 2015)

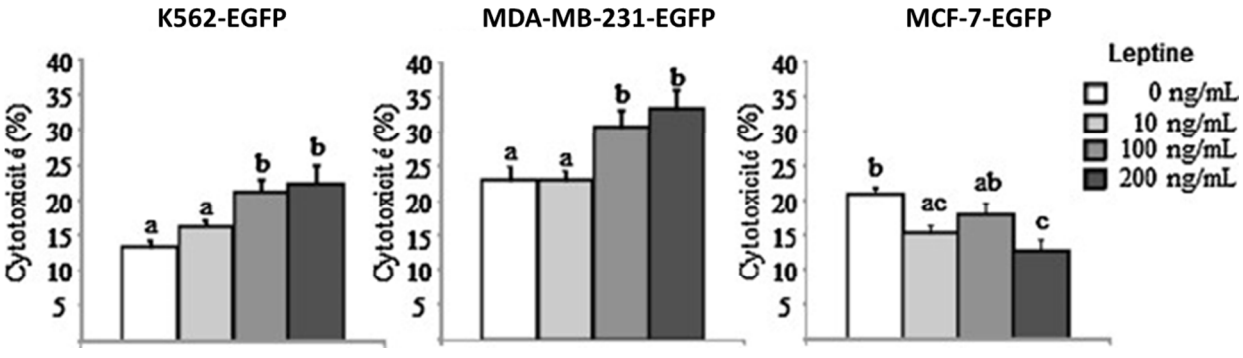


Figure 18 : Effet de la leptine sur l'activité cytotoxique des cellules NK-92 vis-à-vis de différentes cibles.
(Farges *et al*. 2015)

(Faggioni *et al.* 1999) montrent que la leptine augmente la sécrétion aussi bien *in vivo* qu' *in vitro* de cytokines anti-inflammatoires (IL-10 et IL-1Ra) au niveau d'une lignée murine de macrophages. Par ailleurs, au niveau de cellules endothéliales de la veine ombilicale (HUVEC), la leptine induit la production de la protéine chimioattractante monocytaire-1 (MCP-1) (Bouloumie *et al.* 1999). L'administration *in vivo* de leptine chez la souris diminue l'état immunodéficient associé à une période de restriction nutritionnelle (Tadokoro *et al.* 2015; J. K. Howard *et al.* 1999).

La leptine augmente l'expression à la surface des macrophages d'une part, de marqueurs d'activation, tels CD38, CD25 (récepteur à l'IL-2) ou CD71 (récepteur de la transferrine) et d'autre part, de molécules d'adhérence (CD11b/CD18, CD11c/CD18) et de molécules de CMH (HLA-DR) (Santos-Alvarez, Goberna, and Sánchez-Margalet 1999). Elle régule de plus les fonctions des macrophages telle que la phagocytose : les macrophages de souris *ob*/*ob* ou *db*/*db* présentent en effet une fonction phagocytaire altérée, restaurée par l'administration de leptine recombinante (Loffreda *et al.* 1998).

Les cellules NK sont des médiateurs essentiels de l'immunité anti-tumorale. Une plus forte densité d'Ob-R à la surface des NK est observée chez les individus en surpoids et obèses comparativement aux individus normo-pondéraux (Huebner *et al.* 2013; Farges et *al.* 2015). Il est établi que la leptine altère les capacités fonctionnelles des cellules NK (Farges *et al.* 2015). Chez le rat, le récepteur Ob-R est exprimé à la surface des cellules NK quel que soit le statut nutritionnel avec, toutefois, un taux d'ARNm codant pour le gène *ob* plus élevé en situation d'obésité (Nave *et al.* 2008). Les lignées humaines de cellules NK YT (Y. Zhao *et al.* 2003) et NK-92 (Lamas *et al.* 2013) expriment la forme courte et longue du récepteur Ob-R dont l'expression n'est pas modifiée en présence de leptine (Lamas *et al.* 2013). Récemment Lamas *et al*. ont établi que la leptine *in vitro* stimule l'activité métabolique et la cytotoxicité des cellules NK **(Figure 17)** indépendamment d'un effet sur l'expression d'Ob-R en mettant en jeu positivement la voie des TRAIL et de l'IFN-γ et négativement la voie de la perforine (Lamas *et al.* 2013; Farges *et al.* 2015). Ces effets de la leptine sont dose-dépendants et varient selon le type de cellules ciblées par les NK (MDA-MB-231, MCF-7) **(Figure 18)**. Ces effets de la leptine sur la fonctionnalité des cellules NK pourraient également passer par une stimulation de la production mitochondriale d'ATP. Les effets de la leptine sur les cellules NK mettent en jeu la voie intracellulaire Janus Tyrosine Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) (Farges *et al.* 2015). *In vitro*, l'action stimulante de la leptine sur la cytotoxicité et la prolifération des cellules NK YT passe en partie par l'activation de STAT3 (Y. Zhao *et al.* 2003; Nave *et al.* 2008).

De nombreux effets prolifératifs de la leptine ont été décrits. Ainsi, la leptine potentialise les effets des lectines telles que la phytohémaglutinine et la concanavaline A sur la prolifération des lymphocytes T et accroît l'expression de marqueurs de surface tels que le CD69 (antigène d'activation précoce), le CD25 (récepteur à l'IL-2) et le CD71 au niveau des lymphocytes T CD4/CD8+ (Santos-Alvarez, Goberna, and Sánchez-Margalet 1999). De même, la leptine, augmente l'expression de facteurs d'activation au niveau monocytaire tels que les CD25, CD71, CD38 (récepteur au NADP et ADP) et CD69 (Santos-Alvarez, Goberna, and Sánchez-Margalet 1999). Outre sa capacité lymphoprolifération, la leptine stimule *in vitro*

la prolifération des cellules β pancréatiques murines et les cellules embryonnaires murines C3H10T1/2 (Tanabe *et al.* 1997; Y. Takahashi *et al.* 1997).

Des essais expérimentaux *in vivo* et *in vitro* ont établi que la leptine est un facteur angiogénique par interaction avec les récepteurs Ob-Rb présents sur les cellules endothéliales HUVEC (Bouloumié *et al.* 1999; Sierra-Honigmann *et al.* 1998). Elle induit une néovascularisation au niveau de cornées chez des souris mais non chez des rats déficients pour Ob-R. Ces données indiquent que l'endothélium vasculaire peut être régulé par la leptine (L. Huang and Li 2000). La leptine induit la prolifération des kératinocytes *in vitro* et permet la réparation des plaies *in vivo*. Ainsi, les souris déficientes en leptine présentent un retard important de cicatrisation des plaies (Tadokoro *et al.* 2015). En raison de ses propriétés mitogènes et angiogéniques, la leptine joue un rôle important dans la régénération tissulaire au cours de la réponse inflammatoire (Aleffi *et al.* 2005*;* Tanaka *et al.* 2010*;* Aguilar-Valles *et al.* 2015).

Par ailleurs, la leptine exerce des effets anti-apoptotiques au niveau des thymocytes murins cultivés en présence de dexaméthasone et des lymphocytes de souris après traitement par les glucocorticoïdes (Fujita *et al.* 2002). Cet effet est probablement médié par le maintien de l'expression de Bcl-2 (Shimabukuro *et al.* 1998). Tout comme l'IL-6, l'effet de la leptine sur la prolifération cellulaire et ses effets anti-apoptotiques passent par l'activation de STAT3 (Takeda *et al.* 1998). Enfin, il a été montré que la leptine exerce un effet sur la survie des monocytes, en prévenant leur apoptose, *via* l'activation des MAPK (Sánchez-Margalet *et al.* 2003).

4. Leptine et activité physique

De nombreux travaux ont permis d'établir le rôle de la leptine dans la régulation de l'homéostasie énergétique et le contrôle de la prise alimentaire au niveau central. C'est ainsi qu'en 1997, Tuominen *et al*. (Tuominen *et al.* 1997) ont démontré que la leptine est impliquée dans la régulation de la dépense énergétique chez l'homme. Elle agit comme agent de satiété en informant le système nerveux central sur l'état des stocks énergétiques et intervient sur la régulation du métabolisme lipidique. L'exercice physique, par les modifications métaboliques, hormonales et de dépense énergétique qu'il implique, peut contribuer à la régulation de la leptinémie et de son action (Tiryaki-Sonmez *et al.* 2013). Le suivi des modifications de taux de leptine au cours l'exercice physique peut être un bon indicateur de l'état nutritionnel (Queipo-Ortuño *et al*. 2013).

4.1. Données expérimentales

Afin d'étudier l'effet de l'exercice physique dans la régulation de la leptinémie et la perte de poids, des modèles animaux mimant l'activité physique humaine ont été développés. Ces modèles animaux ont été réalisés principalement chez le rongeur que ce soit pour déterminer l'impact de l'activité physique spontanée ou forcée sur la force musculaire ou pour explorer les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse de l'organisme à l'exercice musculaire.

Une étude de Zheng *et al*. (D. Zheng *et al.* 1996) d'un modèle d'exercice physique forcé, a permis de montrer que chez le rat, une course sur tapis roulant de 1 à 3 heures induit

Tableau 1 : Effets de l'environnement enrichi *in vivo*.

Références	Modèle animal	Conditions de l'EE	Conditions de l'ES	Régime alimentaire	Effets observés
Marashi *et al*. 2003	Souris male, ABG	EE : les mêmes cages de l'ES qui ont été enrichie avec une cabane en plastique et un sentier en bois ESE: une grande cage spacieuse de dimensions 100 x 40 x 34,5 cm avec une échelle en plastique, une corde de chanvre, un tronc d'arbre et un sentier en bois	ES : cages standard non structurées (37,5 x 22 x 5 cm)	Standard	↑ : Taux corticostérone dans EE et ESE ↑ : Adrenal tyrosine hydroxylase EE et ESE Paramètres immunologiques : ↓ : Taux d'IgG1 dans ESE vs ES ↓ : IFN-γ/IL-10 dans EE et ESE ↓ : IL-2/IL-10 dans EE et ESE ↑ : IgG2a/IgG1 dans ES ↓ : % cellules LT CD8 dans EE vs ES
Benaroya-Milshtein *et al,* 2004	Souris mâle, C3H	EE: une grande cage (47 x 30 x 22.5 cm) avec une roue d'activité, des tunnels et des échelles (5 souris /cage)	ES : cage standard (31 x 22 x 15 cm) 10 souris/ cage	Standard	↑ : Activité des cellules NK dans EE Paramètres comportementaux : ↓ : Anxiété dans EE ↑ : Activité physique dans EE ↑ : Taux corticostérone dans EE
Hermes *et al.* 2009	Rates sprague-Dawley	Animaux groupés (5/cage) dans une grande cage (46 x 61 x 36 cm).	Animaux isolés dans des cages individuels (26 x 23x 22 cm)	Standard	↑ : Taux corticostérone isolés ↑ : Développement d'une tumeur mammaire chez rates isolées
Cao *et al,* 2010	Souris mâle, C57BL/6 groupe EE groupe ES groupe ES avec roue d'activité	EE : grandes cages de 1,5 x 1,5 x 1,0 m avec des roues d'activité, des tunnels, des cabanes, des jouets en bois, un labyrinthe	ES : cage standard (5souris /cage) (50 x 20 x 20 cm) ES : cage standard avec une roue d'activité	Standard Régime obésogène (hyper-lipidique) 45% lipides	↓ : Leptinémie dans EE ↓ : Développement tumoral dans EE vs ES ↑ : Adiponectinémie dans EE vs ES ↑ : Immunocompétence dans EE vs ES ↑ : Taux corticostérone dans EE vs ES ↑ : IGF-1 ↓ : Poids des rates EE vs ES ↓ : MG dans EE vs ES
Mainardi *et al*. 2010	Souris mâles C57BL/6 Souris, $Apc^{Min/+}$ groupe dès la naissance dans EE groupe élevé dans EE transféré après dans ES groupe ES groupe ES avec une roue d'activité	EE : grandes cages de 1,5 x 1,5 x 1,0 m avec des roues de course, des tunnels, des cabanes, des jouets en bois, un labyrinthe	ES : Cage standard (5souris /cage) ES : Cage standard avec une roue d'activité	Standard	↓ : MG : dans EE vs ES ↓ : Leptinémie dans EE et ES avec roue ↑ : La sensibilité à l'insuline ↑ : Sensibilité à la leptine ↓ : Glycémie dans EE vs ES ↑ : Expression hypothalamique de BDNF ↑ : Prise alimentaire dans ES avec roue vs EE et ES
Lei Cao *et al.* 2011	Souris mâles C57/BL6 ES standard ES avec roue d'activité EE sans roue d'activité EE avec roué d'activité	 EE sans roue d'activité EE avec roué d'activité	 ES standard ES avec roue d'activité	Standard Régime hyper-lipidique (45% lipides)	↑ : expression de UCP1 dans TAB EE ↓ : poids corporelle EE ++ ↑ : prise alimentaire EE vs ES ↑ : VO_2 EE vs ES ↓ : leptinémie EE vs ES ↓ : Insuline EE vs ES MG : ↓ avec EE vs ES

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; ES : environnement standard ; EE environnement enrichi ; BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor

une diminution de 30 % du taux de leptine, mais seulement 3 heures après la fin de la séance (D. Zheng *et al*. 1996). Après 4 semaines d'entraînement, le taux de leptine est significativement plus bas chez le groupe entraîné que chez le groupe témoin (D. Zheng *et al.* 1996). L'exercice physique module la sensibilité à la leptine chez ces rats.

Pour la mesure de l'activité physique spontanée, deux modèles ont été décrit : le premier modèle est la roue d'activité, il s'agit d'une méthode simple pour mesurer spontanément l'activité locomotrice et l'effort physique de rongeurs dans une cage de vie. Le deuxième modèle est l'environnement enrichi (EE).

L'EE est un environnement se différenciant d'une cage standard de laboratoire d'environ 50 x 20 x 20 centimètres par une cage bien plus grande de 1,5 x 1,5 x 1 mètre et par la présence d'éléments stimulants les animaux (un labyrinthe, des roues, des tunnels et des endroits où se cacher) **(Figure 19)**, que ce soit par l'activité physique, les activités sensorielles ou encore la vie sociale. Les souris courent, grimpent, se cachent, explorent et font des nids. L'EE constitue un modèle d'activité physique riche et varié pour l'animal en favorisant l'interaction social, c'est le modèle le mieux adapté dans le but de se rapprocher le plus possible de l'exercice physique spontané chez l'humain. Afin de développer des nouvelles stratégies préventives et curatives contre l'obésité et la prise de poids, de nombreuses études d'activité physique ont mis en évidence l'impact de l'environnement enrichi dans la perte du poids et au niveau des mécanismes métaboliques **(Tableau 1)**. Cette partie s'est focalisée sur le modèle de l'environnement enrichi et ses effets sur la variation de la leptinémie dans le cas d'obésité et dans le développement tumoral.

L'EE a d'importantes répercussions sur la leptinémie et l'adiponectinémie. Son effet sur le cancer a été étudié par Cao *et al*. (Cao *et al.* 2010). En effet, un groupe de souris C57BL/6 a été placé dans un environnement standard (ES), un autre groupe de souris a été placé dans l'EE. Les souris C57BL/6 hébergées en EE développent des mélanomes (lignée syngénique B16F10 injectée en sous-cutané) 80 % moins volumineux que les souris hébergées dans l'environnement standard (ES), de plus certaines souris du lot EE semblent même résistantes puisqu'aucune tumeur n'est observée pour 5 à 17 % d'entre elles (Cao *et al.* 2010). La concentration plasmatique de leptine observée chez les souris EE est significativement diminuée par rapport au souris ES. Alors que, l'adiponectinémie est augmentée chez les souris EE par rapport aux souris ES. Les auteurs attribuent notamment cette inhibition de la croissance tumorale à ces changements de concentrations plasmatiques en faveur d'un rapport adiponectine/leptine plus élevé chez les souris hébergées dans l'EE que chez les souris de l'ES (Cao *et al.* 2010). Cependant une étude d'isolement social des animaux, montre que des rattes isolées dans des cages individuelles développent plus de tumeur mammaire par apport aux animaux hébergés dans des grandes cage (5 animaux par cage) accompagnée d'une augmentation de la concentration plasmatique des glucocorticoïdes et de la noradrénaline (Hermes *et al.* 2009).

Dans une autre étude de Cao *et al*. plus récente (Cao *et al.* 2011), l'environnement enrichi a été démontré comme pouvant diminuer l'adiposité de 70 % chez des souris mâle C57BL/6 contrairement à l'ES et augmentent leur dépense d'énergie. Il influence le passage d'un phénotype «blanc» à un phénotype «brun» au niveau des adipocytes, *via* l'activation

Figure 19 : Environnement standard et enrichi.
(A) l'environnement standard (ES), cages classiques de laboratoire (25 × 20 ×15 cm), (B) de l'environnement enrichi (EE), cage de taille plus importante (60 X 38 X 20 cm) comprenant de la nourriture à disposition et de multiples jeux, un labyrinthe, des roues des tunnels et des endroits où se cacher, favorisant l'activité sociale et physique.

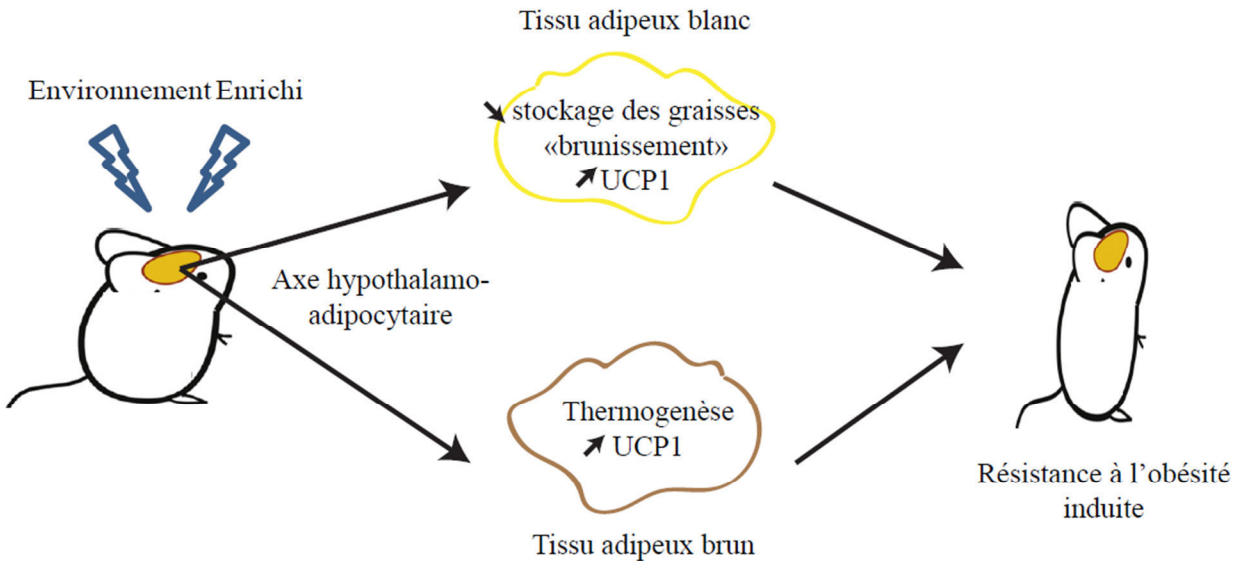


Figure 20 : Environnement enrichi et fonctions métaboliques des adipocytes.
(D'après Cao *et al*. 2011). L'environnement enrichi favorise le développement de l'axe neuronal hypothalamo-adipocytaire. Ceci permet le «brunissement» du tissu adipeux blanc caractérisé par l'augmentation de l'expression de la protéine découplante UCP1, une protéine spécifique des adipocytes bruns, impliquée dans la thermogenèse. L'augmentation de la production de chaleur favorise l'amincissement. UCP1 : Uncoupling protein 1.

d'une voie neuronale hypothalamus-adipocyte (Cao *et al.* 2011). L'EE entraîne une résistance à l'obésité lorsque les souris sont soumises à un régime riche en graisse pendant 4 semaines. Elles restent minces et leur température est augmentée comparées aux souris de l'ES. L'expression de la protéine découplante d'UCP1 (Uncoupling Protein 1) qui permet la production de chaleur au détriment de la production d'ATP est augmentée dans les adipocytes bruns mais également dans les adipocytes blancs des souris EE **(Figure 20)**. On parle alors de «brunissement» du tissu adipeux (Cao *et al.* 2011; Griffioen and Mattson 2011).

Les cages de l'EE ont un impact sur le métabolisme des rongeurs. Des souris contrôles hébergées dans l'ES présentent un poids 6 % plus élevé par rapport aux souris issues de l'EE alors que les deux groupes sont soumis au même régime. D'ailleurs ces mêmes animaux sur-expriment dans l'hypothalamus le facteur de croissance neurotrophique BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) responsable de la baisse de la leptinémie au travers la stimulation du système nerveux sympathique et l'activation des récepteurs β-adrénergiques exprimées par les adipocytes. Alors que, une délétion de BDNF par l'utilisation des ARN d'interférents a éliminé les effets de l'EE. Les auteurs concluent que l'EE augmente l'expression hypothalamique du BDNF et diminue la sécrétion de leptine (Cao *et al*., 2010).

Mainardi *et al*. (Mainardi *et al.* 2010) ont utilisés des souris C57BL/6 non obèses élevées dans des environnements différents pour étudier les effets du changement de mode de vie sur la production et la sensibilité de la leptine et d'autres paramètres métaboliques. Ils ont constaté que des souris adultes hébergés dans un environnement enrichi (44× 62 × 28 cm), ont une diminution de la leptinémie, de la glycémie et de la masse adipeuse par rapport aux souris placées dans un environnement standard (26 × 42 × 18 cm). Ils ont également placés des souris jeunes dans un EE ou un ES avec une roue d'activité dès la naissance, chez ces deux groupes ont observé une diminution de la leptinémie. Par contre les souris dans l'EE ont une réponse plus efficace suite à l'administration de la leptine, un meilleur signal leptinique au niveau du noyau arqué avec l'activation de la voie STAT3 (Mainardi *et al.* 2010).

Ces résultats montrent aussi que l'EE a un effet sur la tolérance au glucose, le comportement alimentaire, et la sensibilité à la leptine ; ce troisième aspect est observé seulement si l'EE a été appliqué depuis la naissance. Chez les souris jeunes, ces effets sont associés à une expression accrue du récepteur de la leptine dans l'hypothalamus et une activation de la voie de signalisation STAT3 (Mainardi *et al.* 2010).

Quant à la corticostérone une hormone de stress, son taux est plus élevé chez les souris de l'environnement stimulant. Ces résultats sont retrouvés dans d'autre modèles de l'environnement enrichi (Benaroya-Milshtein *et al.* 2004; Marashi *et al.* 2003). La grande cage de l'EE est une source de stress pour ces animaux. Ils sont en effet confrontés à de nombreux stimuli cognitifs, moteurs et sociaux, une complexité couplée à une nouveauté, qui entraînent une forme de stress. Les autres parlent d'un stress positif ou *eustress* et non pas agressif ou *distress*, comme par exemple la confrontation à un prédateur (Cao *et al.* 2010; Kappeler and Meaney 2010).

Tableau 2 : Effets de l'exercice sur les concentrations de leptine chez l'homme. (D'après Takuya *et al*., 2013).

Références	n, sexe	Population étudiée	Programme d'activité physique	Restriction alimentaire	Durée d'intervention	Leptine avant l'exercice (ng/ml)	Leptine après exercice (ng/ml)	P	Modification de la composition corporelle
Pasman *et al*., 1999	15 m	Obèses (âge 37,3 ± 5,2)	Un programme d'entrainement en endurance	Régime hypo-calorique enrichie en protéines	16 mois	-	-	-	↓ : Poids, IMC
Houmard *et al*. 2000	7m, 9f 6 m, 8f	Jeune maigre Sujets âgés avec un tissu adipeux plus développé	Un Ergomètre à 70-75 % VO_2 max pendant 60min	non	7 jours	7.1±1.3 14.2±2.7	7.6±1.3 11.0±1.3	NS NS	Poids: NS Poids NS
Ryan *et al*., 2000	8 f 7 f	Femme en post-ménopause non obèses avec EP Femme en post-ménopause obèses + EP + perte de poids	3 séances d'exercice de résistance/semaine	non Conseils diététiques + restriction énergétique	4 mois	14.6±3.3 22.9±3.9	14.8±3.0 14.6±2.6	NS P<0.01	Poids, IMC, MG, et % MG: NS ↓: Poids, IMC, MG, et % MG
Miyatake *et al*. 2004	36m	Surpoids	Exercice en aérobie 90 min	non	12 mois	6.7±4.0	5.1±3.1	P<0.01	↓: Poids, IMC, et % MG
Fatouros *et al*. 2005	10 m 14 m	Personnes âgées en surpoids Personnes âgées en surpoids + EP	Sans exercice physique (EP) EP pendant 60 min 3 fois /semaine	non	6 mois	9.5±0.8 9.1±0.7	9.4±0.7 8.8±0.7	NS P<0.05	Poids et IMC: NS ↓ : IMC, Poids: NS
Polak *et al.* 2006	25 f	Obèse en pré-ménopause	Exercice en aérobie 45 min 5 fois/semaine à 50 % VO_2max	non	3 mois	24.3±8.7	18.1±8.3	P < 0.001	↓ : Poids, IMC et % MG
Palacios-González *et al*. 2015	40 m, 45 f	Poids normal Surpoids Obèse	25 minutes d'exercice d'intensité moyenne < 70% VO_2 max, 5 jours /semaine pendant 8 mois	non	8 mois	0.6 ± 0.1 1.7 ± 0.4 2.9 ± 3.6	-	P ≤ 0.001	IMC: NS ↓: IMC ↓: IMC

↑, augmentation ; ↓, diminution ; - : pas de donnée ; EP: exercice physique ; IMC: indice de masse corporelle ; MG : masse grasse ; m : homme ; f : femme ; NS : non significatif.

4.2. Données cliniques

Chez l'homme l'effet de l'activité physique sur le taux plasmatique de leptine suscite la controverse. Certains auteurs montrent une diminution de la leptinémie suite à l'exercice et d'autres constatent une stabilité de la sécrétion de leptine (Kraemer, Chu, and Castracane 2002). La divergence entre ces résultats peut résulter de plusieurs facteurs tels que la dépense calorique engendrée lors d'effort physique, le statut nutritionnel des sujets, la durée et l'intensité de l'exercice physique (**Tableau 2**).

De nombreuses études se sont attachées à établir au cours de l'exercice physique des corrélations entre les taux de leptine et différents paramètres métaboliques et endocriniens impliqués dans la régulation de l'expression et/ou de la sécrétion de leptine. Chez des sujets modérément entraînés, Essig *et al*. (Essig *et al.* 2000) ont montré que des sessions d'exercices sur tapis roulant et à deux niveaux de dépense calorique (800 et 1500 kcal) réduisent la leptinémie. Cette diminution apparaît, non pas immédiatement à la fin de l'exercice, mais 48 h après l'effort : Essig *et al*. (Essig *et al.* 2000) ont ainsi conclu que la baisse de la leptine post-exercice permet de stimuler l'appétit afin de restaurer les stocks de glycogène et de triglycérides musculaires. Cette hypothèse est en accord avec l'étude de Karamouzis *et al*. (Karamouzis *et al.* 2002) montrant que la diminution de la leptinémie à la suite d'un marathon est associée à une augmentation du neuropeptide NPY. Ainsi, un exercice intense stimule l'axe NPY-leptine qui augmente l'appétit afin de reconstituer les réserves énergétiques.

En 1999, Duclos *et al*. (Duclos *et al.* 1999) ont confirmé le rôle possible de la lipolyse sur la sécrétion de leptine car une corrélation négative est observée entre la leptinémie abaissée de 30 %, 2 h après un effort et le taux sanguin d'acides gras libres est augmenté. D'un point de vue endocrinien, des relations ont été décrites entre leptine, insulinémie et cortisol. Les taux de leptine, bas chez des sujets contrôle entraînés, sont augmentés significativement après un clamp hyper insulinémique de 4 heures (Tuominen, Peltonen, and Koivisto 1997). Le même type de clamp effectué 44 heures après un exercice diminuant les taux de glycogène musculaire de 32 % et la leptine de 34 %, augmente à nouveau la leptinémie de 56 %. Ces auteurs retrouvent en situation contrôle, une corrélation positive entre les taux de leptine, d'insuline, de cortisol et de triglycérides et une corrélation négative avec le taux d'hormone de croissance.

En réalité seules les épreuves de terrain à forte dépense calorique induisent une diminution de la leptinémie (Desgorces *et al.* 2004; Rämson *et al.* 2008). Il a également été montré une diminution très significative de la leptine après 25 km de natation (Karamouzis *et al.* 2002*)*. L'abaissement des taux de leptine dépend du niveau de la dépense énergétique et du type d'exercice (Zaccaria *et al.* 2002) : les taux de leptine diminuent de 70 % après un ultramarathon (7000 kcal) et de 40 % après une course de ski d'alpinisme (5000 kcal), alors qui ne varient pas après un semi-marathon de 1400 kcal (**Figure 21**). Les études décrivent les effets de l'entraînement physique soit sur des sujets sédentaires, soit sur des entraînés. Les résultats peuvent alors différer selon le type, la durée et l'intensité de l'entraînement (**Figure 22**). Les études réalisées chez l'homme sur de courtes périodes d'entraînement ont mis en évidence que le taux de leptine n'est pas modifié ni par l'entraînement ni par la balance

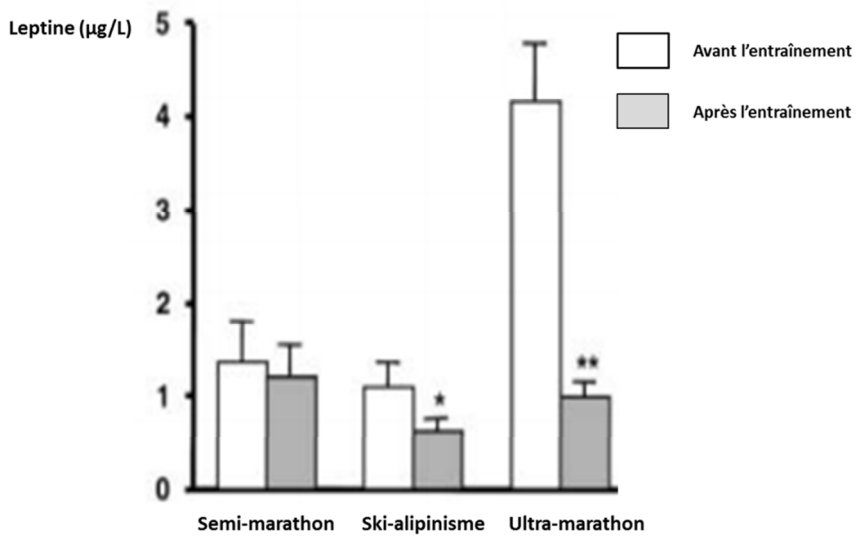


Figure 21 : Concentrations de leptine avant et après trois courses d'endurance
(D'après Zaccaria *et al*. 2002) **p*<0,01 ; ***p*<0,001

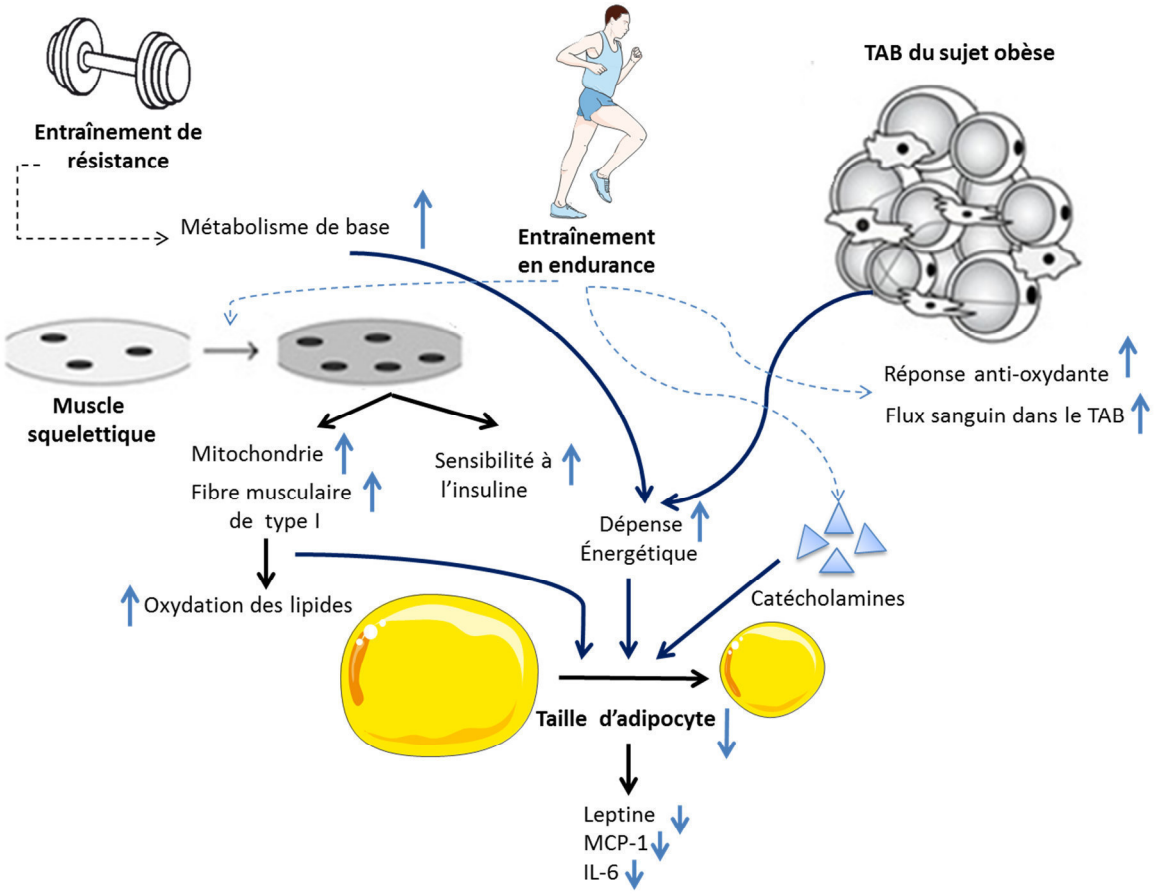


Figure 22 : Modèle schématique des effets de l'entraînement sur l'expression de leptine au niveau du tissu adipeux blanc.
(D'après Takuya S *et al*. 2013). TAB : tissus adipeux blanc.

énergétique (Dirlewanger *et al.* 1999) tant que qu'il n'y a pas de diminution de la masse adipeuse.

En 2001, Noland *et al*. (Noland *et al.* 2001) ont suivi des nageurs (femmes et hommes) pendant une saison d'entraînement. Ils ont montré que le taux basal de leptine n'est pas modifié au cours de la saison, quel que soit le sexe, alors qu'il y a une réduction de la masse adipeuse chez les femmes. Ils en concluent que la leptinémie n'est pas un bon indicateur, ni de l'intensité ni du volume de l'entraînement chez l'athlète.

Chez des sujets obèses (IMC à environ 31 kg/m^2), 12 semaines d'entraînement physique diminuent la leptinémie uniquement lorsque ils perdent du poids (Pasman, Westerterp-Plantenga, and Saris 1998) ; lorsque les sujets compensent leur dépense calorique liée à l'entraînement (environ 700 kcal/j) par un surplus alimentaire, il n'y a pas d'effet. Les auteurs concluent que l'exercice physique diminue le taux de leptine à condition qu'il y ait perte de poids corporel associée ou masse grasse (Pasman, Westerterp-Plantenga, and Saris 1998). Dans une étude réalisée chez des femmes obèses en pré-ménopause Polak *et al*.(Polak *et al.* 2006) ont constatés une diminution de la leptinémie accompagnée d'une modification de la masse corporelle, une diminution de la masse adipeuse et de l'IMC après un entraînement pendant 3 mois (45 min /j à 50 % VO_2 max) (Polak *et al.* 2006).

Palacios-González *et al*. (Palacios-González *et al.* 2015) ont conçu un programme d'activité physique pendant 8 mois (5 jours par semaine) d'intensité moyenne (25 minutes d'exercice < à 70 % VO2 max) pour des enfants de 6 à 11 ans. Pendant l'étude les parents ont été invités à maintenir les habitudes alimentaires habituelles de leurs enfants. Palacios-González *et al*. (Palacios-González *et al.* 2015) ont constatés une corrélation positive entre le taux plasmatique de l'irisine, une hormone secrété par le tissu adipeux durant l'exercice prolongé (Moreno-Navarrete *et al.* 2013; Timmons *et al.* 2012) et l'IMC, avec les plus hauts niveaux chez les enfants obèses. Après l'entraînement, chez les enfants obèses la concentration plasmatique de l'irisine à une tendance à diminuer, cette diminution est associée à une perte du poids. Dans cette étude, une corrélation positive entre la leptinémie et l'irisinémie a été observée avant et après l'exercice physique (Palacios-González *et al.* 2015). Les modifications de l'IMC observées suggèrent que le programme d'activité physique a été efficace; et la plus grande amélioration d'IMC a été observée chez les enfants obèses et en surpoids.

5. Implication de la leptine en pathologie

Parallèlement à son rôle physiologique, la leptine est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que l'obésité, la fibrose hépatique, où elle intervient au cours du processus inflammatoire. Elle est également associée à un risque accru de certains cancres, en particulier le cancer mammaire, favorisant la récidive et augmentant la mortalité.

5.1. Leptine et obésité

L'obésité est devenue un problème de santé publique à l'échelle mondiale **(Figure 23)**. De 1980 à 2013, la prévalence de la surcharge pondérale et de l'obésité a globalement augmenté dans les pays développés ou en voie de développement, avec un taux d'obèses plus important chez les hommes dans les pays développés et chez les femmes dans les pays en voie

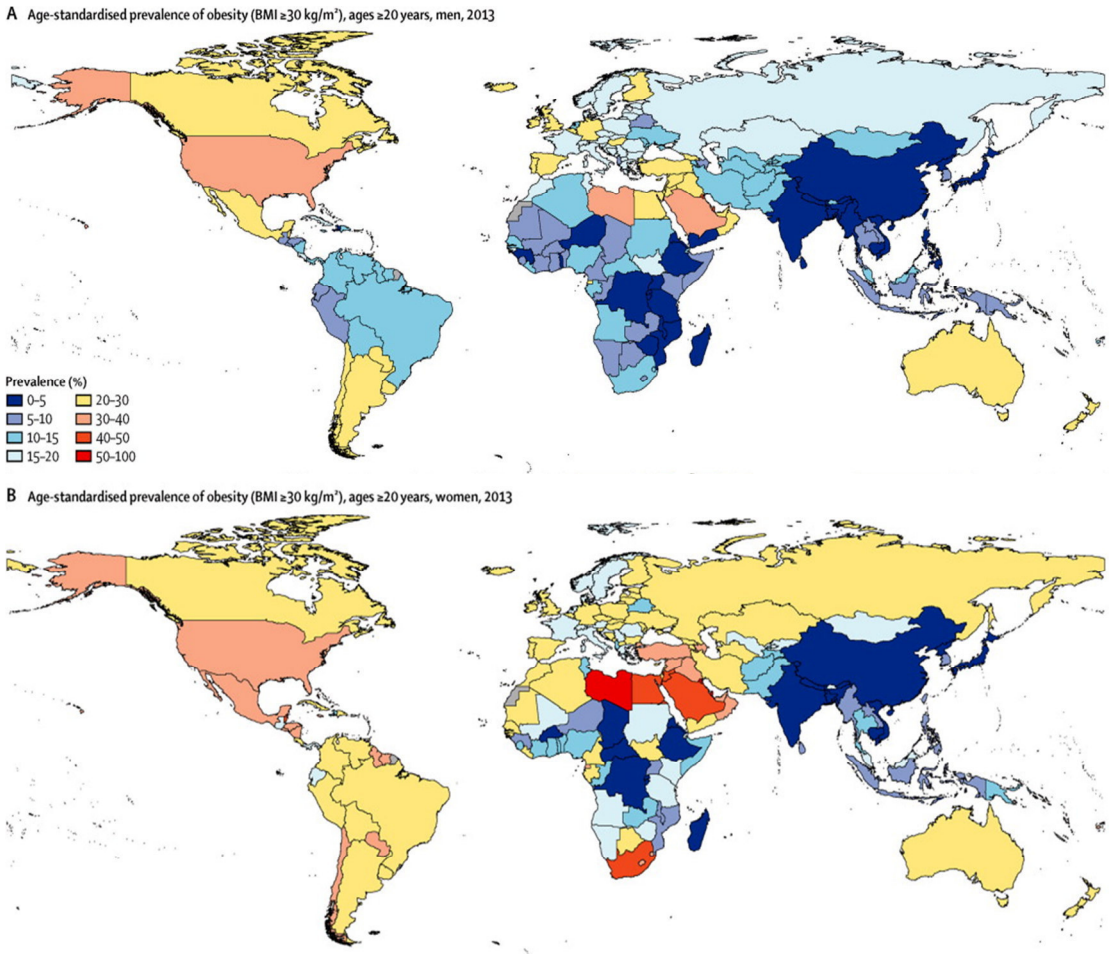


Figure 23 : Prévalence de l'obésité dans le monde chez les adultes de plus de 20 ans.
(D'après Ng *et al*. 2014)

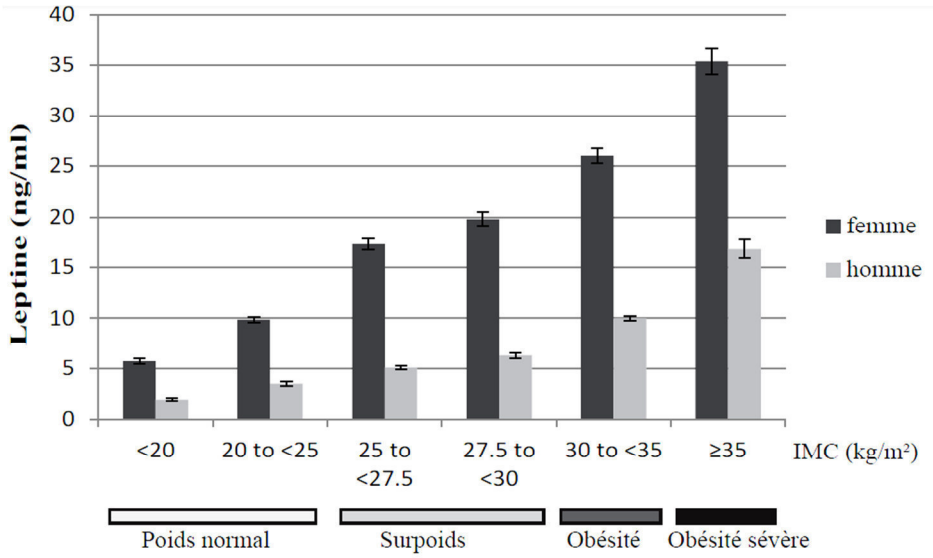


Figure 24 : Concentrations plasmatiques de leptine chez l'Homme.
(D'après Basu *et al*. 2013). Concentration plasmatique de leptine en fonction de l'IMC chez l'homme et chez la femme. Plus l'indice de masse corporelle est élevé, plus la leptinémie augmente.

de développement (Ng *et al*., 2014). La prévalence de la surcharge pondérale dans le monde est actuellement de 37 % et 38 % chez les hommes et les femmes, respectivement. Dans les pays développés, plus de 50 % des hommes et plus de 40 % des femmes ont un indice de masse corporelle (IMC) supérieur à 25, et près de 20 % sont obèses. En France, 56 % et 19 % des hommes ont des IMC supérieurs à 25 ou 30 kg/m^2, chez les femmes 43 % et 20 % sont en surpoids ou obèses (Ng *et al*., 2014).

L'obésité se caractérise par une augmentation de la masse adipeuse par hypertrophie ou hyperplasie adipocytaire accompagnée d'une augmentation du niveau plasmatique de leptine correlé à l'IMC **(Figure 24)** (Ruhl and Everhart 2001; Basu *et al.* 2013). L'obésité est une maladie complexe causée par l'interaction de nombreux facteurs génétiques et environnementaux (alimentation inadaptée dense en calories, sédentarité, facteurs psychologiques). Le tissu adipeux blanc est le réservoir d'énergie de l'organisme composé de cellules stroma-vasculaires, d'adipocytes, cellules de stockage et de relargage de l'énergie. Les cellules stroma-vasculaires comprennent les pré-adipocytes et des cellules immunitaires telles que les macrophages dont le nombre dans le tissu adipeux dépend du degré d'adiposité et de la taille des adipocytes (Penicaud *et al*., 2000 ; Fantuzzi *et al*., 2005). Dans l'obésité, l'hypertrophie adipocytaire et le recrutement de macrophages altèrent la fonction sécrétoire du tissu adipeux et induisent un état inflammatoire, caractérisé par une production anormale de cytokines, une augmentation de la CRP (Protéine-C-réactive) circulante, et par l'activation des voies pro-inflammatoires dans les adipocytes (Wellen *et al*., 2005).

La leptine, de par ses actions au niveau du tissu adipeux, mais aussi au niveau du système nerveux, et du système immunitaire, contribue d'une manière cruciale au processus d'inflammation. L'augmentation de la leptinémie chez la personne obèse sans la régulation de la prise alimentaire, qui est le principal rôle physiologique de la leptine, a conduit à la notion de leptinorésistance chez l'obèse (Zhou and Rui, 2013) **(Figure 25)**. Ce concept est illustré expérimentalement dans les modèles animaux d'obésité génétique ou nutritionnelle qui développent une hyperleptinémie et une diminution de sensibilité à l'administration de leptine exogène (Van Heek *et al.* 1997). Dans toutes les formes étudiées d'obésité chez les rongeurs, les animaux obèses (autres que les souris *ob/ob*) ont de plus forts taux de leptine que les animaux contrôles. Ces données suggèrent que ces formes d'obésité sont associées à la résistance à la leptine (Frederich *et al.* 1995). Chez les patients obèses, la leptine est augmentée proportionnellement à l'augmentation de leur masse adipeuse (Aguirre *et al.* 2014).

Chez l'homme, des mutations sur les gènes *ob* et *db* ont été décrites chez quelques individus, produisant des phénotypes d'obésité massive et précoce semblables à ceux observés dans les modèles animaux correspondants (Montague *et al.* 1997; Strobel *et al.* 1998; Clément *et al.* 1998). Ces études ont démontré le rôle crucial de la leptine dans la régulation du poids chez l'homme. Cela a permis d'établir que la régulation de la prise alimentaire met en jeu les mêmes facteurs chez les rongeurs et chez l'homme et quelle est essentielle dans la genèse de l'obésité.

La pertinence de la voie leptine-mélanocortine **(Figure 26)** (Farooqi and O'Rahilly 2009) en tant que cible pour une intervention pharmacologique chez les patients obèses

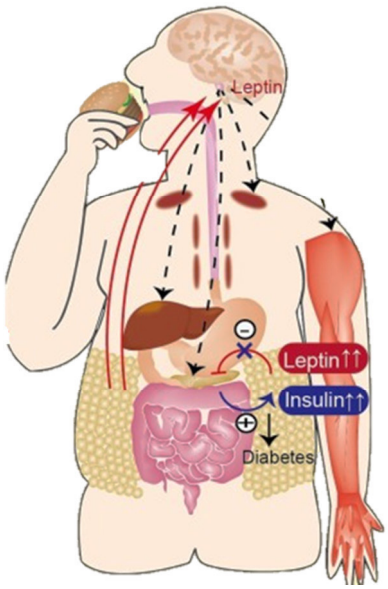


Figure 25: La leptinorésistance chez l'obèse.
(D'après Amitani *et al*. 2013). L'hyperleptinémie chez l'obèse induit un défaut de signalisation de la leptine au niveau central, ceci entraîne une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, qui conduisent au développement du diabète.

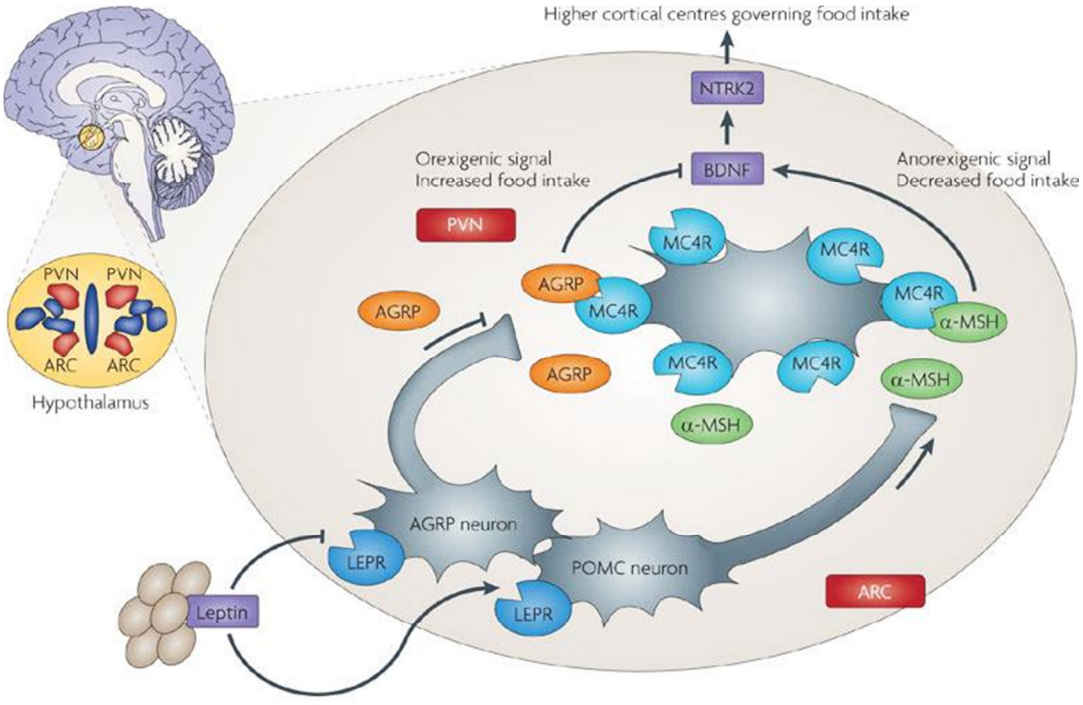


Figure 26 : La voie leptine-mélanocortine.
(D'après Walley *et al*. 2009). La leptine se lie sur son récepteur spécifique au niveau des neurones POMC/CART et des neurones NPY/AGRP du noyau arqué. La variation du rapport αMSH/AGRP au niveau de l'hypothalamus module l'activité de MC4R. Ce dernier contrôle 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 peptid ; BDNF : Brain-derived ; neurotropic factor ; LEPR : Récepteur de la leptine ; MC4R : Récepteur de type 4 aux mélanocortines ; α-MSH : α-Melanocyte-stimulating hormone ; NPY : Neuropeptide Y ; POMC : Proopiomélanocortine ; NTRK2 : Tyrosine kinase neutrophique type 2.

sévères s'est avérée efficace (Walley, Asher, and Froguel 2009). La meilleure illustration est sans doute le cas d'un enfant présentant un déficit congénital en leptine qui a pu être traité par des injections sous-cutanées de leptine humaine recombinante, conduisant à la correction de toutes les anomalies phénotypiques de ce patient (Farooqi and O'Rahilly 2009).

Des analyses d'expression génique à large échelle ont révélé que sur environ 1000 gènes modifiés dans le tissu adipeux de sujets obèses en réponse à un régime hypocalorique, 10 % correspondent à des facteurs de l'inflammation, exprimés majoritairement dans la fraction non adipocytaire (Viguerie *et al.* 2005). Parallèlement, des analyses immunohistochimiques sur coupe de tissu adipeux montrent que la diminution de masse grasse s'accompagne d'une réduction significative du nombre de macrophages (Cancello *et al.* 2005).

Ces observations sont en faveur de l'origine macrophagique des facteurs de l'inflammation et indiquent que leur régulation par la restriction calorique repose en partie, sur la réduction du nombre des macrophages adipocytaires après perte de poids. Ceci n'exclut pas la possibilité d'un changement phénotypique des macrophages, suggéré par le basculement vers l'expression de facteurs anti-inflammatoires (IL-10) en réponse à la perte de poids (Formoso *et al.* 2012). Des travaux réalisés chez la souris rendue obèse par un régime hyperlipidique suggèrent que les macrophages présents dans le tissu adipeux des souris présentent un phénotype mixte de type M1/M2, caractérisé à la fois par l'expression de facteurs anti-inflammatoires, tels que l'IL-10 et l'IL-1RA et de facteurs pro-inflammatoires, tels que TNFα et IL-1 (Shaul *et al.* 2010). En revanche, en réponse à un régime obésogène, les macrophages recrutés dans le tissu adipeux présentent, un phénotype pro-inflammatoire de type M1, caractérisé par la production de TNFα, d'IL-6 et d'IL-1 (de Boer *et al*. 2014). Une fois les macrophages présents dans le tissu adipeux, ils perpétuent, avec la participation des adipocytes, leur recrutement et la production des facteurs pro-inflammatoires (Giamila Fantuzzi 2005; Tilg and Moschen 2006) **(Figure 27)**. Cette inflammation à bas bruit est également observée dans l'insulino-résistance liée à l'obésité (Hotamisligil 1999; Wellen and Hotamisligil 2005). La leptine semble jouer un rôle majeur dans le mécanisme d'insulino-résistance, puisqu'elle est liée aux voies métaboliques de l'insuline (Antuna-Puente et al. 2008), de plus la leptine circulante serait impliquée dans le dysfonctionnement et le remodelage vasculaire, dans le contexte d'inflammation, d'obésité et de l'insulino-resistance et ceci par l'instalation d'une leptinorésistance en situation d'obésité (Chudek and Wiecek 2006; Singer and Granger 2007).

5.2. Leptine et maladies hépatiques

Plusieurs études menées dans des modèles expérimentaux et chez l'homme ont montré que la leptine est un médiateur essentiel de la fibrose hépatique (Tsochatzis *et al.* 2009), bien que les mécanismes précis sont encore mal connus (Anty and Lemoine 2011). La leptine est la première adipokine directement associé à la fibrose hépatique (Bertolani and Marra 2010; Duan *et al.* 2013) (Bertolani and Marra, 2010 ; Duan *et al*., 2013).

La leptine dont la concentration sérique est augmentée semble participer au développement de l'hépatite stéatosique non alcoolique (NASH) (Chitturi *et al.* 2002; D. Wang and Dubois 2010). Elle contribue à l'insulino-résistance hépatique et, par conséquent, à

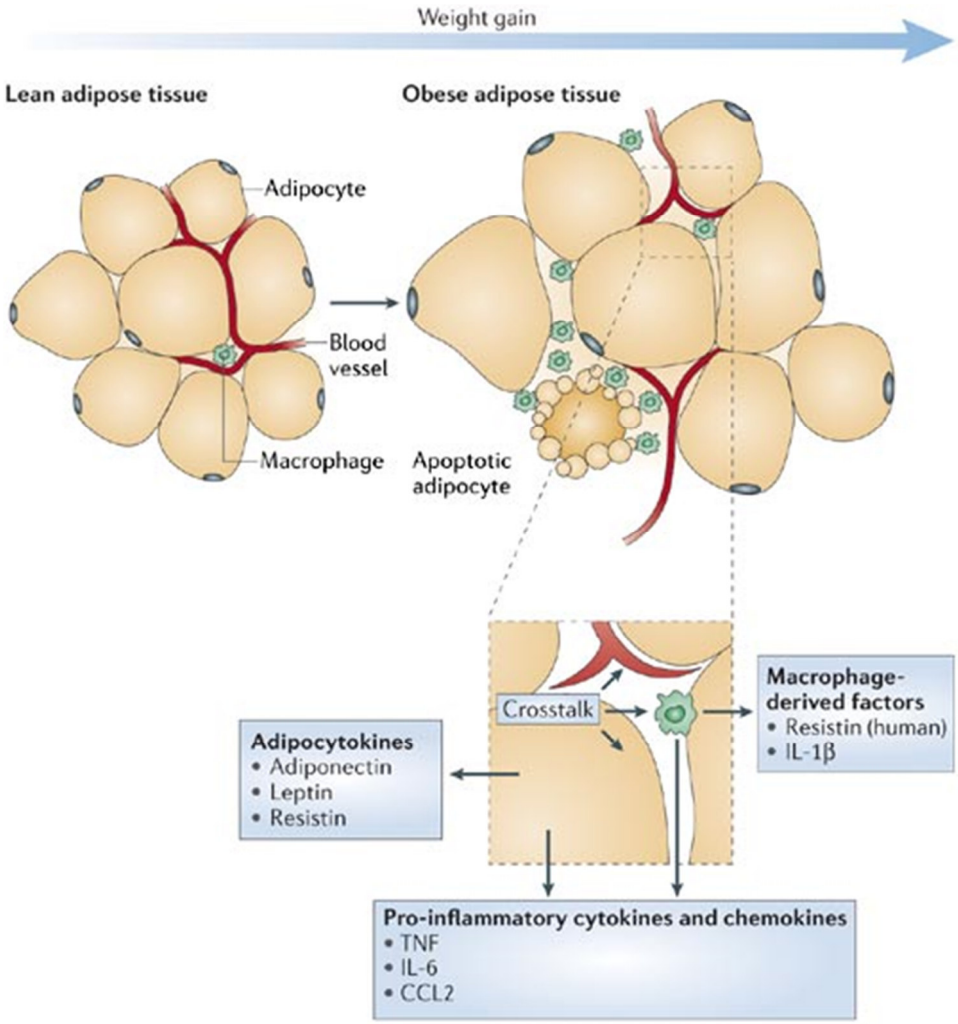


Figure 27 : Composants cellulaires et molécules synthétisées par le tissu adipeux.
(D'après Tilg *et al*. 2006). L'hypertrophie du tissu adipeux liée à la prise de poids entraîne l'infiltration macrophagique en réponse à divers signaux, comme des chimiokines synthétisées par les adipocytes (CCL2 chimiokine ligand 2). Les macrophages se localisent principalement autour des adipocytes apoptotiques : différents médiateurs synthétisés par les adipocytes et les macrophages (adipocytokine-cytokine) peuvent contribuer à l'inflammation locale et systémique. IL : interleukine ; TNF: facteur de nécrose tumorale.

l'établissement de la stéatose hépatique en favorisant le stockage des triglycérides dans l'hépatocyte (Tsochatzis *et al.* 2009). Le rôle de la leptine dans la NASH a été étudié dans plusieurs études humaines, dont les résultats sont contradictoires. Uygun *et al.* ont montré un niveau élevé de leptine chez le patient atteint de NASH par rapport à un témoin sain (Uygun *et al*., 2000). Dans trois autres études n'ont pas observé de différence de la concentration de leptine chez les patients atteints d'une stéatose hépatique et les sujets contrôles (Chalasani *et al.* 2003; Angulo *et al.* 2004; Lemoine *et al*. 2009). Dans ces études, aucune corrélation n'a été observée entre la leptinémie et le degré de gravité de la fibrose hépatique. Le rôle de la leptine dans le développement de la fibrose, peut être significatif dans la progression de l'hépatite virale C chronique : en effet, la leptinémie est corrélée au taux de stéatose chez les patients avec une infection virale C (R. P. Myers *et al.* 2007).

Il a été montré dans des modèles animaux, que la leptine peut promouvoir l'angiogenèse et la progression de la NASH vers le carcinome hépatocellulaire (CHC) (Wang *et al*., 2006) (S.-N. Wang *et al.* 2006). De plus, la fibrose hépatique est réduite chez les souris déficientes en leptine ou portant des mutations de son récepteur, étayant l'hypothèse du rôle pro-fibrogénique de cette adipokine (Ikejima *et al.* 2002; Saxena *et al.* 2004).

La souris *ob/ob* traitée avec du thioacétamide (TAA), un agent chimique hépatotoxique, développe moins de fibrose hépatique que la souris sauvage (Honda *et al.* 2002). Dans un autre modèle de souris *ob/ob* traité avec du tétrachlorure de carbone (CCl4), (un stimulus de fibrose), la fibrose hépatique ne se développe pas chez ces souris contrairement au groupe contrôle (Leclercq, Field, and Farrell 2003; Handy *et al.* 2011). De même, le rat zucker *(fa/fa)* déficient en récepteur fonctionnel à la leptine, ne développe pas de fibrose hépatique induite par le TAA par rapport au rat sauvage (Ikejima *et al.* 2002). En outre, l'administration de leptine recombinante dans des modèles murins traitées avec le CCl4 amplifie d'une part les réponses inflammatoires (Ikejima *et al.* 2002) et d'autre part stimule l'apparition de la fibrose hépatique chez le rat *fa/fa* induite par le traitement TAA (Ikejima *et al.* 2002; Saxena and Anania 2015).

La leptine, également produite par les cellules fibrogéniques est un facteur prédictif indépendant de la fibrose dans les cirrhoses d'origine alcoolique (Piche *et al*. 2004). McCullough *et al.* ont noté une faible augmentation de la leptinémie chez des malades atteints de cirrhose (McCullough *et al.* 1998). Toutefois, cette augmentation est significative lorsque la réduction de la masse adipeuse corporelle des malades cirrhotiques est prise en compte (McCullough *et al.* 1998). L'hyperleptinémie observée dans les stéatoses hépatiques et les cirrhoses serrait liée à la capacité de sécrétion de leptine par des cellules stellaires du foie.

Ainsi, la leptine est un facteur profibrosant majeur (Anty and Lemoine 2011) qui agit par activation du TGF-β1, principale cytokine stimulant la cellule stellaire hépatique (Y.-Y. Yang, Tsai, *et al.* 2012; Y.-Y. Yang, Huang, *et al.* 2012). La leptine stimule la prolifération et la migration des myofibroblastes, et renforce l'action des cytokines profibrogeniques, tel que TGF-β1 à la fois *in vivo* et *in vitro* (Saxena and Anania 2015).

5.3. Leptine et inflammation

Plusieurs études ont montré que le taux circulant de leptine est augmenté au cours de processus inflammatoires (Barbier *et al.* 1998; Ortega and Fernández-Real 2013; Aguilar-Valles *et al.* 2015; Julia *et al.* 2014). L'expression du gène *ob* dans le tissu adipeux et la concentration plasmatique de leptine augmentent après l'administration de stimuli pro-inflammatoire tel que le lipopolysaccharide (LPS) (Grunfeld *et al.* 1996; Finck *et al.* 1998). Le LPS peut stimuler *in vitro* la production de leptine par les cellules mononuclées du sang périphérique isolées chez des sujets sains (Landman *et al.* 2003). Le LPS ainsi que ses médiateurs, TNFα et l'IL-1, augmentent l'expression du transcrit codant pour la leptine dans le tissu adipeux chez les rongeurs (Grunfeld *et al.* 1996). Dans des états septiques chez les patients adultes, la leptinémie est augmenté en comparaison avec celle des sujets sains (Torpy, Bornstein, and Chrousos 1998; Maruna *et al.* 2001). Cependant, il est important de noter que les souris déficientes en leptine ou en son récepteur présentent des taux circulants élevés de corticostérone (Coleman and Burkart 1977; Takeshita, Yoshino, and Mutoh 2000). Etant donné que les glucocorticoïdes tel que la corticostérone, peuvent moduler la réponse inflammatoire, il est difficile de distinguer les effets propres de la leptine des effets indirects dus à un excès de glucocorticoïdes (Stenberg *et al.* 1990; Goujon *et al.* 1996). Par conséquent, les taux élevés de corticostérone pourraient en partie expliquer les modifications de la réponse inflammatoire chez les souris déficientes en leptine. Dans un modèle expérimental d'inflammation, Siegmund *et al.* constatent que les souris *ob/ob* développent une protection contre l'inflammation intestinale induite par un traitement au DSS (dextran sodium sulfate) (Siegmund, Lehr, and Fantuzzi 2002), suggérant que la leptine intervient comme médiateur de l'inflammation. Une transplantation de tissu adipeux sous cutané issu de souris sauvages chez des souris *ob/ob* traitées au DSS maintient un niveau d'inflammation colique identique à celle des souris sauvages également traitées au DSS (Sennello *et al*. 2006).

Chez des patients présentant une colite ulcérative modérée à sévère ou chez les patients atteints de maladie de Crohn, des taux élevés de leptine ont été observés au niveau du colon. La leptine pourrait être libérée par les cellules en nécrose ou en apoptose au cours des maladies inflammatoires intestinales, mais également la leptine circulante pouvant traverser les épithéliums. Si la leptine n'est pas détectée au niveau des cellules épithéliales coliques normales, en situation d'inflammation ces cellules inflammatoires expriment la leptine en forte quantité au niveau du pôle apicale. Ainsi les cellules épithéliales coliques inflammatoires semblent constituer l'une des principales sources de leptine luminale chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. La leptine luminale induit l'activation du facteur de transcription NF-kB, participent à la pathogenèse des maladies inflammatoires intestinales. *In vivo*, la leptine induit des dommages de la paroi épithéliale colique : elle est considérée de ce fait comme une cytokine pro-inflammatoire au niveau du colon (Saxena *et al.* 2004).

La leptine semble également jouer un rôle majeur dans la pathogenèse de la polyarthrite rhumatoïde. En effet, les souris *ob/ob* et *db/db* développent une arthrite moins sévère par rapport aux animaux sauvages et présentent des taux faibles d'IL-1β et de TNFα dans le liquide synovial. Les souris *ob/ob* présentent également une diminution de la prolifération des cellules T, une diminution de la sécrétion d'INF-γ et une augmentation de celle d'IL-10. L'augmentation de la production de leptine au cours de la polyarthrite

rhumatoïde est un argument en faveur de son implication dans la physiopathologie de cette maladie. Chez les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, le jeûne conduit à l'amélioration des différents marqueurs cliniques ou biologiques d'activité de la maladie, ceci étant associé à une diminution de la leptinémie et une polarisation Th2 de la réponse immunitaire. La leptine peut donc influencer les mécanismes inflammatoires de l'arthrite *via* l'induction de la réponse Th1. La leptine exerce un effet synergique avec l'IFN-γ et l'IL-1 sur l'induction de la NO synthase de type II, aboutissant à la production d'oxyde nitrique, médiateur impliqué dans la plupart des altérations inflammatoires du cartilage, comme l'apoptose des chondrocytes et l'activation des métalloprotéases (Otero *et al.* 2005).

5.4. Leptine et cancer mammaire

Selon la dernière étude du centre international de recherche sur le cancer (CIRC), le surpoids et l'obésité sont devenus des facteurs de risque majeurs, responsables de 3,6 % (environ 500.000 cas) de l'ensemble des nouveaux cas de cancers des adultes en 2012 (Arnold *et al.* 2015). Toutefois, les données épidémiologiques et expérimentales suggèrent que les anomalies hormonales associées à l'obésité pourraient être en cause de certains cancers notamment le cancer du sein. Le cancer du sein qui se classe au premier rang des néoplasies chez la femme dans les pays développés (1,7 millions de nouveaux cas diagnostiqués en 2012 au niveau mondial) (Arnold *et al.* 2015) particulièrement en post-ménopause et ceci vraisemblablement suite à la diminution de l'utilisation du traitement hormonal substitutif (Verkooijen *et al.* 2009; Carroll *et al.* 2011). En France, bien que le taux de mortalité tend à diminuer grâce à la mise en place d'un diagnostic précoce et d'une prise en charge thérapeutique plus efficace, le cancer mammaire reste la cause la plus fréquente de décès par cancer chez la femme (Ferlay *et al.* 2010; Curado 2011; Arnold *et al.* 2015). En effet, selon l'étude européenne EPIC un IMC élevé est associé d'une part à une forte prévalence du cancer du sein (C. A. Gonzalez and Riboli 2010) et d'autre part à une moindre survie après prise en charge thérapeutique, ceci indépendamment de l'âge (Chlebowski *et al.* 2002).

Le rôle de l'obésité dans le cancer du sein est complexe, il apparaît que, chez les femmes ménopausées, l'obésité augmenterait le risque de cancer du sein (Key *et al.* 2003), alors que chez les femmes non ménopausée l'obésité diminuerait ce risque (Brandt *et al.* 2000). De plus les patientes obèses ont des tumeurs plus agressives, avec plus souvent un envahissement ganglionnaires (Porter *et al*. 2006). En effet, le sein est un organe spécifique dans lequel les cellules épithéliales baignent dans un micro-environnement adipeux, d'autant plus développé en situation d'obésité.

Le lien entre obésité et cancer mammaire peut résulter de l'action d'adipokines produites par les adipocytes. En effet, d'une part l'imprégnation plasmatique en adipokines, modulée en situation d'obésité, pourrait avoir des effets à distance sur la cancérogénèse mammaire et d'autre part les cellules mammaires sont au contact direct du micro-environnement adipocytaire. Parmi ces adipokines, la leptine semble être un facteur majeur de la cancérogénèse mammaire susceptible de contribuer à la réaction inflammatoire locale et à l'angiogenèse, notamment chez les patientes obèses pour lesquelles une augmentation du potentiel métastatique et du risque de mortalité est décrite (Curado 2011). En effet, l'obésité

chez la femme en post-ménopause multiplie par deux le risque de développer un cancer mammaire.

De nombreuses études cliniques ont suspecté un rôle direct de la leptine dans la promotion du cancer du sein (Renehan, Roberts, and Dive 2008; Pan and DesMeules 2009). En outre, des modèles cellulaires *in vitro*, de nombreux modèles animaux ont permis aussi d'étudier et de confirmer le rôle de la leptine dans le développement et la progression tumorale mammaire.

5.4.1. Rôle de la leptine dans la tumorigenèse mammaire

5.4.1.1. Approche *in vitro*

Il a été décrit que la leptine augmente la prolifération de culture primaire de cellules épithéliales humaines mammaires, isolées de tissus cancéreux ou sains, les cellules cancéreuses sont plus sensibles à la l'action de la leptine que les cellules normales (P. Xu *et al.* 2010). Iyengar *et al*., ont montré que des milieux conditionnés issus de culture d'adipocytes sont capables de stimuler la croissance des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 et également d'induire des programmes transcriptionnels anti-apoptotiques (Iyengar and Scherer 2003). De plus, il a été rapporté que le milieu conditionné d'adipocytes stimule la migration et la capacité invasive des cellules tumorales mammaires MDAMB-231 *via* la production de la chimiokine CCL20 (H. S. Kim 2009). Des modèles de co-culture dans des matrices de collagène entre des adipocytes et des cellules de cancer mammaire (MCF-7, ZR75-1, et T47-D) (Manabe *et al.* 2003), ont montré que les cellules adipocytaires sont impliquées dans le processus de prolifération de ces cellules tumorales.

5.4.1.2. Approche *in vivo*

L'inactivation du gène de la leptine et de son récepteur dans des modèles animaux a permis d'élucider le rôle de la leptine dans le développement tumoral mammaire. Les souris déficientes en leptine (souris *ob/ob*) (Margot P. Cleary *et al.* 2003) et déficientes en récepteur Ob-R (souris *db/db*) sont moins susceptibles de développer des tumeurs mammaires induites par les oncogènes (M. P. Cleary, Grande, and Maihle 2004). De plus, chez des souris *ob/ob* implantées avec des cellules cancéreuses mammaires provenant de souris transgéniques MMTV-Wnt1 développant spontanément des tumeurs mammaires, la taille tumorale est réduite comparativement à celle des souris contrôles (Q. Zheng *et al.* 2011). En revanche, chez des souris *db/db* ayant subi la même implantation, le volume de la tumeur est plus important que celui des souris témoins (Q. Zheng *et al.* 2011). Les souris *ob/ob* obèses, sur-exprimant le facteur de croissance TGF-α spécifiquement au niveau du tissu mammaire, ne développent pas de tumeur mammaire contrairement aux souris non obèses chez lesquelles la prolifération tumorale est observée dans 69 % des cas (M. P. Cleary, Grande, and Maihle 2004). Ces effets prolifératifs de la leptine sont retrouvés dans un modèle de souris *nude* implantées avec des cellules MCF-7, chez lesquelles l'injection de leptine entraîne une augmentation du volume tumoral et une surexpression des voies de signalisation STAT et MAPK induites par cette adipokine (Mauro *et al.* 2007). L'injection d'un agoniste du récepteur à la leptine chez des souris implantées avec des cellules cancéreuses mammaires ralentit la croissance tumorale (C. A. Gonzalez and Riboli 2010) avec une diminution de

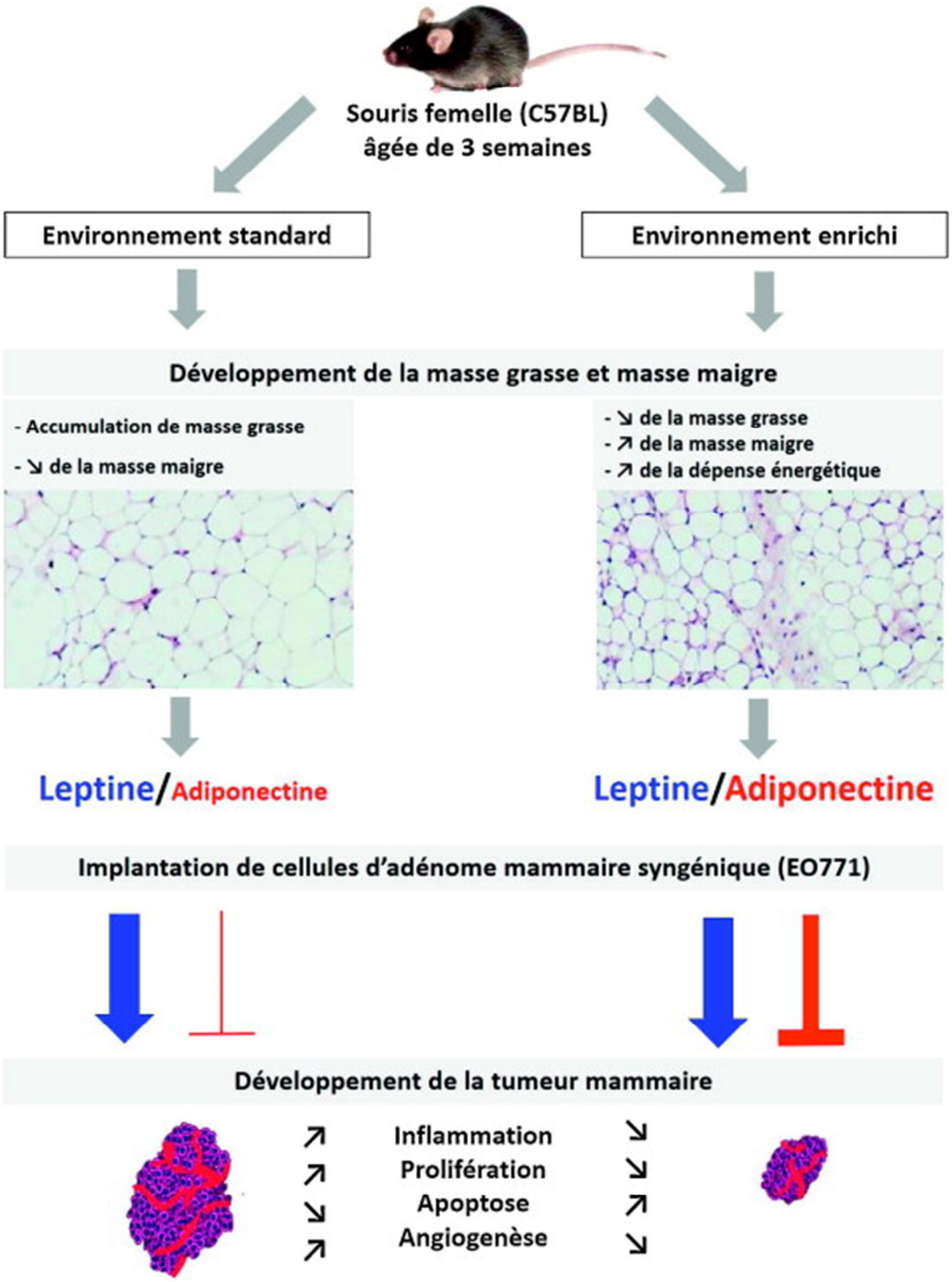


Figure 28: Effets du placement en environnement enrichi (EE) sur le développement de la glande mammaire et de la croissance tumorale chez la souris C57BL.
(D'après Nachat Kappes *et al*. 2012). L'environnement enrichi (EE) induit une réduction significative de la croissance des tumeurs mammaires, associée à une diminution de la prolifération cellulaire, de l'inflammation et de l'angiogenèse ainsi qu'à une augmentation de l'apoptose. Le ratio adiponectinémie sur leptinémie, plus élevé chez les souris hébergées en EE comparées à celles en environnement standard, peut contribuer à l'inhibition de la croissance tumorale.

l'expression des facteurs pro-angiogéniques (VEGF/VEGF-R2) et prolifératifs (cycline D1) (C. A. Gonzalez and Riboli 2010). Récemment au sein de notre équipe Nachat-Kappes et *al.* ont mis en place un modèle de souris C57BL/6 implantées avec des cellules syngéniques d'adénocarcinome mammaire EO771, élevées dans un environnement enrichi (EE) favorisant l'activité physique spontanée et le contact social, Nachat-Kappes et *al.* ont constaté que l'environnement enrichi influence le développement de la glande mammaire (diminution de l'expression de la cyclooxygénase COX-2, développement accru des structures alvéolaires mammaires), limite la croissance tumorale (moindre activité de la COX-2 intratumorale, augmentation du rapport plasmatique adiponectine/leptine) (Nachat-Kappes *et al.* 2012) **(Figure 28)**. Ces observations concordent avec les hypothèses de l'implication de la leptine dans la cancérogénèse mammaire et du rôle protecteur de l'activité physique et des interactions sociales.

5.4.1.3. Approche épidémiologique

La plupart des études épidémiologiques montrent que la leptinémie des femmes porteuses de tumeur mammaire est plus élevée que celle des femmes saines (Ozet *et al.* 2001; D.-C. Chen *et al.* 2006; Hancke *et al.* 2010; Antonio Macciò *et al.* 2010). En prenant en considération l'IMC, il a été établi que le taux sanguin de leptine est plus élevé chez les patientes en situation d'obésité que chez celles de poids normal (Carroll *et al.* 2011). Une corrélation positive est retrouvée entre la leptinémie et la taille de la tumeur (D.-C. Chen *et al.* 2006) mais non avec le statut ménopausique (D.-C. Chen *et al.* 2006) ou le grade tumoral (Münzberg *et al*., 2005 ; Chen *et al*., 2006) (H. Münzberg *et al.* 2005; D.-C. Chen *et al.* 2006).

En revanche, selon d'autres études le statut tumoral est significativement corrélé au statut des récepteurs hormonaux (ER récepteur à l'œstrogène et PR récepteur à la progestérone) mais non à la concentration sérique de leptine (Chen *et al*., 2006). Toutefois, l'hyperleptinémie semble être un facteur de pronostic négatif associé à la présence de métastases et à un taux bas de survie (Macciò *et al*., 2009).

Toutefois, la moitié des études n'ont pas observé de lien direct entre la leptinémie et le risque de développer un cancer mammaire, que ce soit chez femmes en pré-ménopause (Sauter *et al.* 2004; Woods and Jackson 2006), en post ménopause (Petridou *et al.* 2000; Stattin *et al.* 2004) ou dont le statut ménopausique n'est pas déterminé (Coskun *et al*., 2003). En revanche dans l'étude de Han *et al.,* qui comporte le plus grand nombre de patientes sur l'ensemble des études (240 cas de cancer du sein et 500 témoins), ont observé une augmentation de 42,5 % de la concentration plasmatique de leptine au cours du cancer du sein (Han *et al.* 2008).

5.4.2. Modulation des voies de signalisation par la leptine dans la tumorigenèse mammaire

5.4.2.1. L'expression de la leptine et de son récepteur

L'expression de l'ARNm d'Ob-Rb et d'Ob-Ra a été mise en évidence dans différentes lignées cancéreuses mammaires (T Jardé *et al.* 2009). L'expression protéique de ces deux récepteurs a été confirmé dans la plupart des lignées dont MCF-7 et MDA-MB-231 (T Jardé

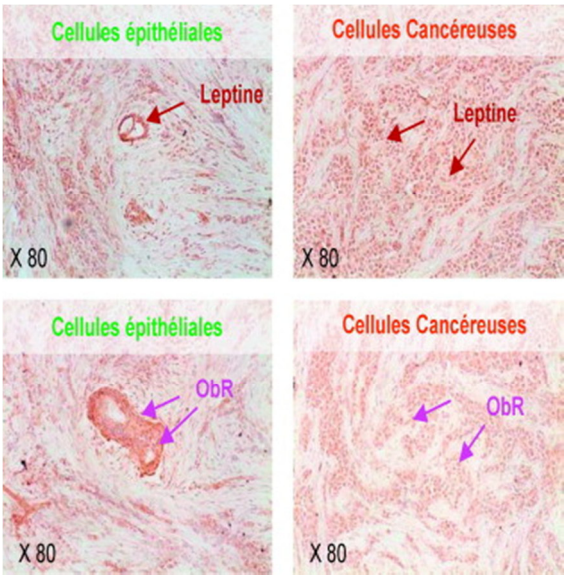


Figure 29 : Expression de la leptine et de son récepteur au niveau de cellules mammaires cancéreuses ou normales avoisinant la tumeur à partir de prélèvements tumoraux humains.
(Caldefie-Chezet *et al*. 2013). Une expression de leptine est retrouvée dans 80% des cas de tumeur au niveau du tissu cancéreux. La leptine est fortement exprimée par le tissu sain épithélial (80% des cas). L'expression d'Ob-R est augmentée dans le tissu cancéreux (85% des cas) et dans le tissu sain adjacent (75% des cas).

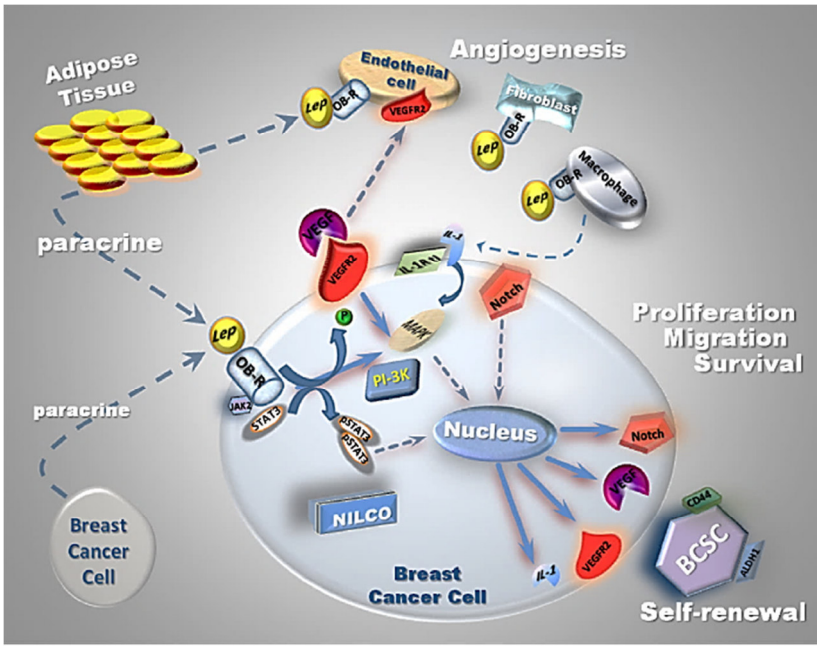


Figure 30 : Les voies de signalisation de leptine dans le cancer du sein
(Guo *et al*. 2012). La leptine, principalement sécrétée par le tissu adipeux, mais aussi par les cellules cancéreuses exerce un effet pro-angiogénique, pro-inflammatoire et mitotique qui favorisent le développement tumoral. Les cellules mammaires et les cellules endothéliales ainsi que les fibroblastes et les macrophages associées aux tumeurs expriment le récepteur Ob-R. La leptine induit l'expression de Notch au sein des cellules mammaires et endothéliales qui joue un rôle essentiel dans l'angiogenèse tumorale.

et al. 2009; Thierry Jardé *et al.* 2011). La leptine et son récepteur Ob-Rb sont sur-exprimés par les cellules mammaires cancéreuses exprimant le récepteur des œstrogènes ERα+ (MCF-7, T47D) par rapport aux cellules ERα- négatives. L'expression de l'ARNm de la leptine a également été retrouvée dans la lignée de cellules mammaires non tumorales MCF-10A. La leptine et son récepteur sont également retrouvés dans des biopsies de tumeurs mammaires et dans le tissu sain environnant la tumeur, l'expression de la leptine dans le tissu cancéreux est corrélée à celle de son récepteur (Thierry Jardé *et al.* 2008a). Ces données suggèrent que la leptine peut agir localement selon un mode d'action autocrine et/ou paracrine en régulant sa propre voie de synthèse (Thierry Jardé *et al*. 2008a; T Jardé *et al.* 2009a). Notre équipe de recherche a montré que la leptine est exprimée au niveau des cancers canalaires *in situ* et invasifs (50 % et 70 %, respectivement) avec une expression dépendante du types de tumeur et du grade **(Figure 29)** (Caldefie-Chézet *et al.* 2005; Thierry Jardé et *al.* 2008a). Revillion *et al.* ont établi que l'expression des récepteurs à la leptine de forme courte est associée à un meilleur pronostic vital. Miyoshi *et al.,* ont décrit une corrélation positive entre la concentration sérique de leptine et le niveau d'expression de son ARNm au niveau tumoral (Miyoshi *et al.* 2006). Selon Miyoshi *et al.,* l'expression des différentes isoformes de récepteurs à leptine, courte ou longue, peut varier quantitativement selon les patients (Miyoshi *et al.* 2006). Outre leurs effets sur la prolifération tumorale, il est également important de noter que la présence de la leptine et de son récepteur est essentielle au développement normal du tissu mammaire (M. P. Cleary, Grande, and Maihle 2004).

5.4.2.2. Voies de signalisation induite par la leptine

Après fixation sur son récepteur, la leptine induit une activité proliférative *via* plusieurs voies de signalisations (Frühbeck 2006; Housa *et al.* 2006). Dans des lignées tumorales mammaires telles que MCF-7 et T47D, la leptine stimule la phosphorylation de ERK1/2 qui sont des acteurs de la voie de signalisation MAPK (Yin *et al.* 2004; D.-C. Chen *et al.* 2006) (**Figure 30**). Des inhibiteurs dirigés contre cette voie inhibent totalement l'activité proliférative de la leptine (Yin *et al.* 2004; D.-C. Chen *et al.* 2006). La leptine peut également stimuler les voies de signalisation JAK/STAT et PI3K comme précédemment décrit (chapitre 1) et permet aux cellules T47D de se multiplier même sans ancrage (Frühbeck 2006; Cirillo *et al.* 2008) (Frühbeck, 2006 ; Cirillo *et al*., 2008). Dans l'étude de Yin *et al.,* (Yin *et al*. 2004), la leptine augmente également l'expression des ARNm de l'oncogène c-myc, gène cible régulé par STAT3. Une fois la membrane nucléaire traversée, les homodimères de STAT stimulent la transcription de gènes tels que cycline D1 et Bcl2 essentiels à la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération. La leptine participe également à la régulation du cycle cellulaire en induisant une augmentation des concentrations de cdk2 (cyclin-dependant kinase 2) facteur essentiel au contrôle des phases S et M, et de la cycline D1, impliquée dans le passage de la phase G0 à la phase G1. Dans les cellules tumorales mammaires MCF-7, la leptine induit l'expression des ARNm et l'expression protéique de la cycline D1 (Yin *et al.* 2004; D.-C. Chen *et al.* 2006; Saxena *et al.* 2007).

La stimulation de la prolifération cellulaire induite par la leptine au niveau des cellules cancéreuses mammaires HTB-26 et ZR-75-1 est abolie par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/Akt (D.-C. Chen *et al.* 2006). De plus, la leptine accroît

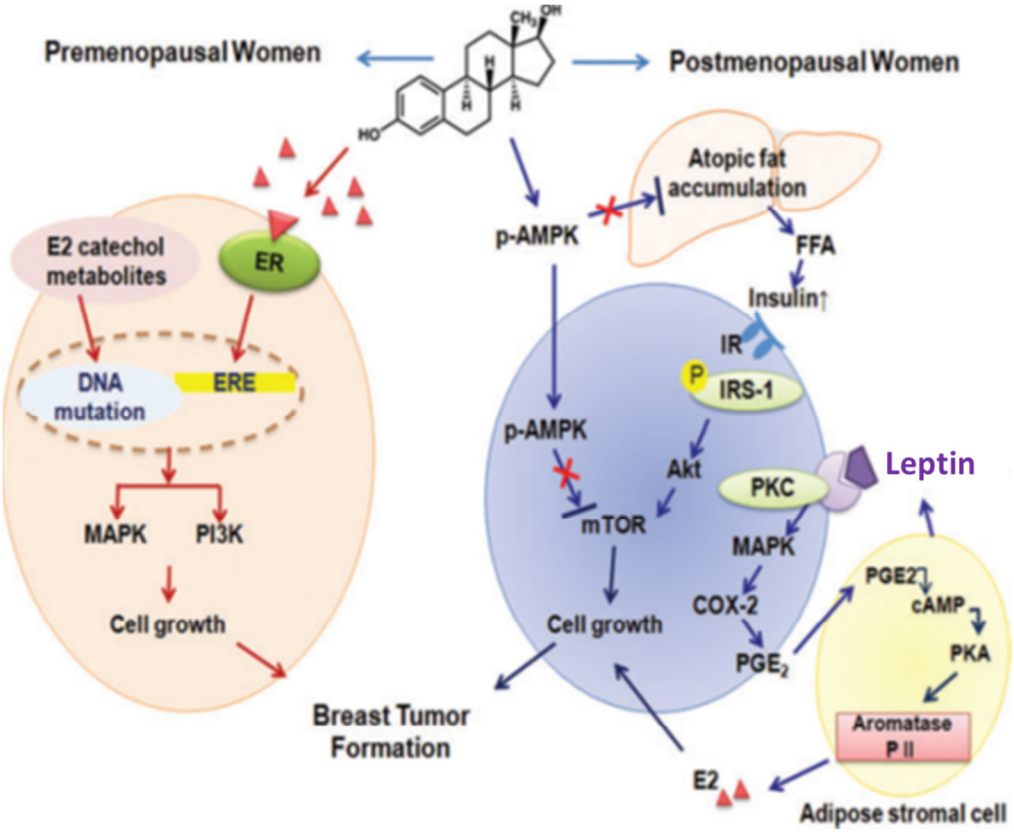


Figure 31 : Voies des œstrogènes impliquées dans le développement du cancer du sein.
(D'après Sung *et al*. 2011). E2 : œstradiol ; ER : récepteurs d'œstrogènes ; ERE : élément de réponse aux œstrogènes ; MAPK : mitogen activated proteine kinase ; PI3K : phophoinositide 3-kinase ; p-AMPK : protéine kinase phosphorylée activée par l'AMP ; mTOR : mammalian target of rapamycin ; FFA : acide gras libre ; IR : récepteur de l'insuline ; IRS-1 : récepteur de l'insuline substrat-1 ; la PKC : protéine kinase C ; COX-2 : cyclo-oxygénase-2 ; la PGE2 : prostaglandine E2 ; l'AMPc : l'adénosine monophosphate cyclique ; PKA : protéine kinase A.

l'expression protéique de la PKC-α dans les cellules MCF-7 (Okumura *et al.* 2002). Il est important de noter que la leptine participe également au développement tumoral en inhibant l'expression de gènes suppresseur de tumeurs tels que p53 et p21 (D.-C. Chen *et al.* 2006), en induisant l'expression protéique de VEGF-R2 au niveau des cellules cancéreuses murines les 4T1 et en favorisant la sécrétion du facteur de croissance endothéliale vasculaire VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor) (R. R. Gonzalez et al. 2006). Ainsi la leptine est capable de moduler l'expression de plusieurs seconds messagers intracellulaires impliqués dans la survie et la prolifération des cellules mammaires cancéreuses.

5.4.2.3. Voie des œstrogènes et leptine

Une méta-analyse de six études prospectives a indiqué que les femmes qui développaient un cancer du sein, en période post-ménopausique avaient une augmentation significative des taux d'œstrogènes en comparaison à celles qui ne développaient pas la maladie. Une autre méta-analyse regroupant neuf études prospectives a montré que le risque de cancer mammaire était doublé lorsque de forts taux d'estrogènes étaient retrouvés (Margot P. Cleary *et al.* 2009). Certaines études ont montré que la leptine est impliquée dans la régulation de la voie des œstrogènes notamment l'expression de l'aromatase, la synthèse et l'activation du récepteur aux œstrogènes (ER) (Yin *et al.* 2004; A. Macciò, Madeddu, and Mantovani 2009).

Il semble exister dans les cellules cancéreuses un lien entre la voie des œstrogènes **(Figure 31)** et celle de la leptine et le degré d'agressivité de la tumeur mammaire *(Cirillo et al.* 2008). Plusieurs équipes, ont montré que la leptine peut diminuer les effets d'un traitement anti-œstrogène (le fulvestrant) appliqué sur les cellules tumorales MCF-7 (Cirillo *et al.* 2008). Ceci suggère que la leptine rend les cellules tumorales mammaires résistantes aux thérapies anti-œstrogènes. La leptine stimule *in vitro* l'expression de ERα au niveau des cellules MCF-7 (Fusco *et al*., 2010). En outre, la leptine et l'œstradiol stimulent la prolifération des cellules tumorales mammaires ZR-75-1. Cet effet est amplifié en cas de traitement simultané. L'effet d'une co-stimulation de leptine et œstradiol sur la prolifération des cellules MCF-7 est supérieur à celui de la leptine seule ou de l'œstradiol seul (D.-C. Chen *et al.* 2006). Cependant cet effet cumulatif n'a pas été retrouvé dans l'étude de Dieudonne *et al.,* (Dieudonne *et al.* 2002). L'œstradiol stimule l'expression des ARNm de la leptine et d'Ob-Rb dans les cellules MCF-7 (Garofalo *et al.* 2006).

L'étude des voies de signalisation a montré que les effets de la leptine sur l'aromatase sont régulés par les voies JAK/STAT et MAPK (Catalano *et al.* 2004). En effet, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces voies de signalisation réduit l'activation du promoteur du gène de l'aromatase, l'expression protéique et l'activité de cette enzyme (Catalano *et al.* 2003). Cependant, Ray *et al.,* (Ray, Nkhata, and Cleary 2007) n'ont pas observé d'effet de la leptine sur l'expression protéique de l'aromatase dans les lignées MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-361, SK-BR-3 et T47D. Le ratio REα/REβ est plus important dans les tumeurs mammaires, en comparaison au ratio dans un tissu normal, ce qui appuie l'hypothèse que l'obésité contribue au développement tumoral par une synthèse accrue des œstrogènes (Margot P. Cleary *et al.* 2009a). De plus, il a été montré que les tumeurs ERα positives étaient associées à un mauvais pronostic en cas d'obésité (Goodwin *et al.* 2005; Garofalo *et al.* 2006;

Miyoshi *et al.* 2006). Dans le cadre du cancer mammaire, il a été suggéré que l'aromatase, serait impliquée dans le processus carcinogénique. Le tissu adipeux peut influencer la synthèse et la biodisponibilité des hormones stéroïdiennes endogènes et particulièrement, les œstrogènes grâce au complexe enzymatique l'aromatase qui convertit les androgènes sécrété par les glandes surrénales en œstrogènes. La leptine stimule l'action de cette enzyme au niveau du tissu adipeux et convertit d'avantage les androgènes tel que l'androstènedione en œstrogène et donc la progression du cancer mammaire hormono- dépendant (Catalano *et al.* 2003). Ce qui pourrait en partie expliquer les effets négatif de l'obésité en post-ménopause. Il est intéressant de relever que chez des patientes atteintes d'un cancer du sein, l'utilisation thérapeutique d'un anti-œstrogène (tamoxifène, torémifène) augmente les concentrations sériques de leptine (Marttunen *et al.* 2000). Chez des sujets ayant un IMC supérieur à 30 kg/m^2 les concentrations des œstrogènes sont statistiquement plus importantes en comparaison aux femmes avec un IMC inférieur à 22,5 kg/m^2 (ceci allant de 60 % à 219 %, respectivement) (Key *et al.* 2003). De plus, les femmes obèses post ménopausées avaient une diminution de l'efficacité d'un traitement inhibiteur de l'aromatase, (le létrozole), en comparaison à des femmes de poids normal, ceci suggère que de plus fortes doses de cet inhibiteur sont nécessaires pour contrecarrer l'augmentation du taux œstrogène (Chlebowski *et al. 2*002).

II. Le stress oxydatif

Par leur métabolisme aérobie les cellules eucaryotes sont continuellement soumises à l'action de composés chimiques oxydants (ou réducteurs). Cette balance entre pro-oxydant/anti-oxydant à l'état basal est appelée statut oxydatif.

Le stress oxydant est décrit comme un déséquilibre entre la génération d'espèces réactives de l'oxygène (**ERO**) et de l'azote (**ERA**) et les défenses anti-oxydantes de l'organisme, en faveur des ERO entraînant des dommages oxydatifs au niveau de l'ADN, des protéines et des lipides ou une altération de la signalisation redox. De nombreuses études ont montré l'implication du stress oxydant, et spécialement la production d'ERO, dans les mécanismes physiopathologiques de maladies chroniques liées au vieillissement comme les cancers (Helmersson *et al.* 2004; Klaunig, Kamendulis, and Hocevar 2010), les pathologies neurodégénératives (Ghosh, Ghosh, and Mandal 2011) ou métaboliques tels que l'obésité, le diabète de type 2 et l'athérosclérose (Stentz *et al.* 2004).

Cependant, le stress oxydant ne peut être limité au simple déséquilibre entre la production et l'élimination d'ERO par les systèmes de défense anti-oxydante. Par leur activité de messagers intercellulaires et de modulateurs des voies de signalisation, les ERO et les systèmes protecteurs tels que le glutathion (GSH) sont des acteurs clés de l'homéostasie cellulaire (Sauer, Wartenberg, and Hescheler 2001). Du concept de stress oxydant, il est préféré aujourd'hui celui de statut oxydatif qui prend en compte l'ensemble de ces phénomènes.

1. Systèmes pro-oxydants

Parmi les molécules réactives se distinguent les espèces réactives de l'oxygène (ERO) et les espèces réactives de l'azote (ERA). Les ERO et les ERA produites par les cellules ont

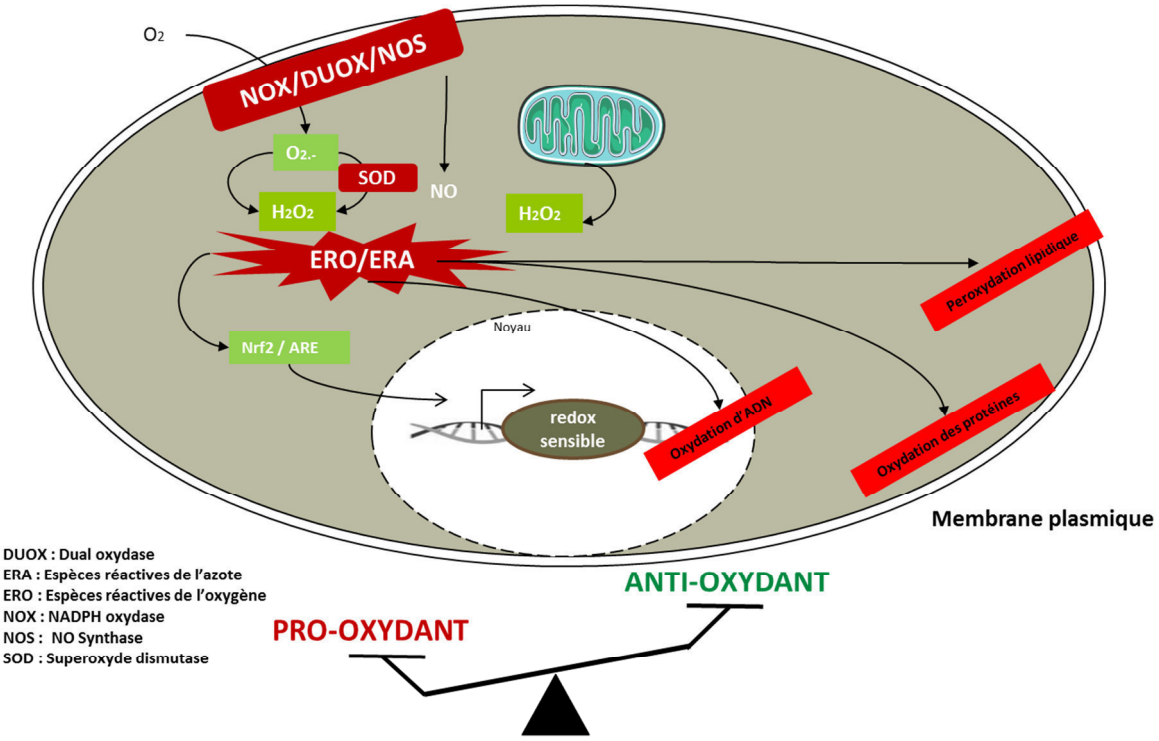


Figure 32 : Les acteurs de la réponse pro-oxydante.
Un déséquilibre de l'homéostasie redox induit un stress oxydant par la production des ERO et ERA. La majorité de ces espèces est produite par le métabolisme de l'oxygène au niveau de la mitochondrie et en parallèle par des systèmes enzymatiques impliquant les NADPH oxydases (NOX), les NO synthases (NOS) et les Dual oxydases (DUOX). L'accumulation des ERO va aboutir à des dommages cellulaires tels que l'oxydation d'ADN, oxydation des protéines et la peroxydation des lipides, ces ERO modulent la transcription des gènes redox sensibles.

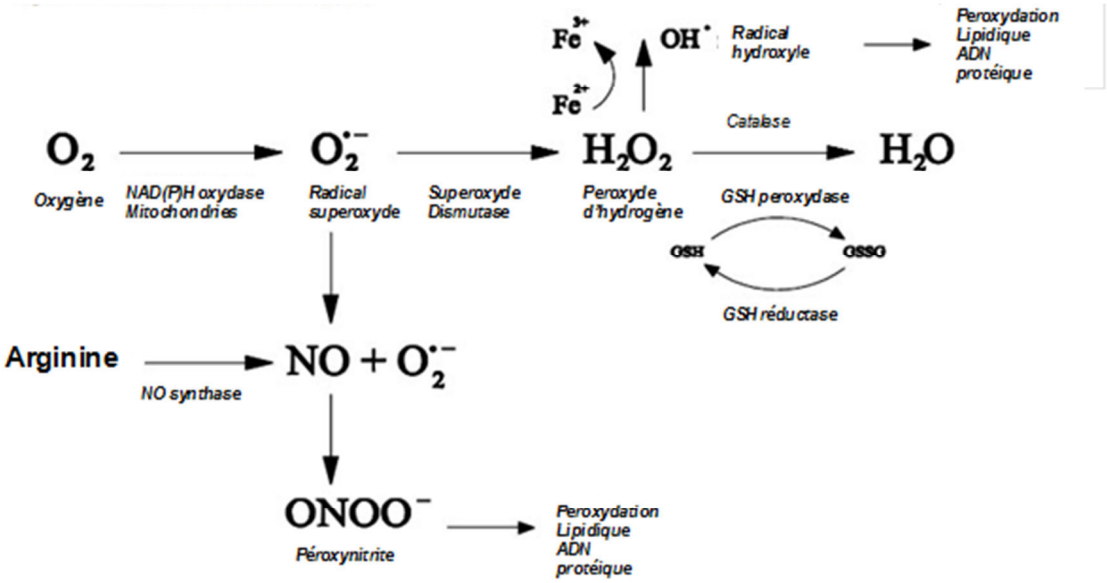


Figure 33 : Systèmes endogènes de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote.

été longtemps considérées uniquement comme des produits toxiques du métabolisme pouvant altérer les constituants lipidiques, protéiques ou l'ADN de la cellule **(Figure 32)**. Toutefois, en participant à la modulation de l'expression de gènes, les ERO/ERA sont avant tout des acteurs importants de la signalisation cellulaire et de la régulation métabolique.

La régulation des taux intracellulaires d'ERO/ERA, se fait à deux niveaux : par les systèmes antioxydants constitutifs de la cellule et par l'induction de gènes dont le produit possède une activité anti-oxydante ou la répression de gènes dont le produit exprime une activité pro-oxydante lors d'un stress oxydant. Plusieurs facteurs de transcription sont les cibles des ERO/ERA parmi lesquels NF-κB (Nuclear Factor κB) et l'AP-1 (Activator Protein 1) (Irani *et al.* 1997).

1.1. Espèces oxydantes

1.1.1. Espèces réactives de l'oxygène

Les ERO peuvent être divisés en deux catégories: les radicaux libres et les espèces non radicalaires **(Figure 33)**. Les radicaux libres de l'oxygène sont définis comme des espèces chimiques contenant des électrons non appariés sur leur couche périphérique ce qui les rend instables et donc très réactifs (M. L. Harris *et al.* 1992; Gamaley and Klyubin 1999; B. Halliwell, Zhao, and Whiteman 1999). Ils incluent le radical hydroxyle (**$^{\bullet}$OH**), l'anion superoxyde (**$O_2^{\bullet-}$**) et l'oxygène singulet (**$^1O_2$**). Leurs effets directs sont limités par leur courte demi-vie et leur temps de diffusion limité. Les EROs non radicalaires incluent les molécules comme le peroxyde d'hydrogène (**H_2O_2**) généré lors de la réaction de dismutation peut être directement converti en radical hydroxyle suivant la réaction de Fenton ou diffuser au sein de la cellule pour être converti dans un autre compartiment cellulaire.

Réaction de Fenton

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + {}^{\bullet}OH$$

Le H_2O_2 est également transformé en H_2O par la catalase au sein des peroxysomes ou dans le cytosol. Le radical hydroxyle (**$^{\bullet}$OH**) et l'anion superoxyde (**$O_2^{\bullet-}$**) réagissent également avec d'autres molécules au sein de la cellule et entraîner la formation d'autre radicaux par réaction en chaine. C'est le cas par exemple des radicaux lipidiques peroxyles (**ROO$^{\bullet}$**), formés suite à l'attaque des acides gras polyinsaturés par un radical hydroxyle (**$^{\bullet}$OH**). Chacun de ces EROs est capable d'endommager de composants cellulaires incluant l'ADN, par une action directe ou à travers des réactions avec d'autres constituants cellulaires.

1.1.2. Espèces réactives de l'azote

Les espèces réactives de l'azote existent sous trois formes : le monoxyde d'azote (**$^{\bullet}$NO**) produit par la NO-synthase (Martinez-Chacin, Keniry, and Dearth 2014; U. E. Martinez-Outschoorn *et al*. 2010), l'anion peroxynitrite (**$ONOO^-$**) qui est le produit de la réaction entre le monoxyde d'azote et l'anion superoxyde (**$O_2^{\bullet-}$**), et le protoxyde d'azote (**N_2O**) clivé par une nitrique oxyde réductase (Minneci *et al.* 2008).

Le monoxyde d'azote radicalaire **$^{\bullet}$NO** est une molécule de signalisation cellulaire importante, il sert de messager cellulaire et participe à de nombreux processus physiologiques

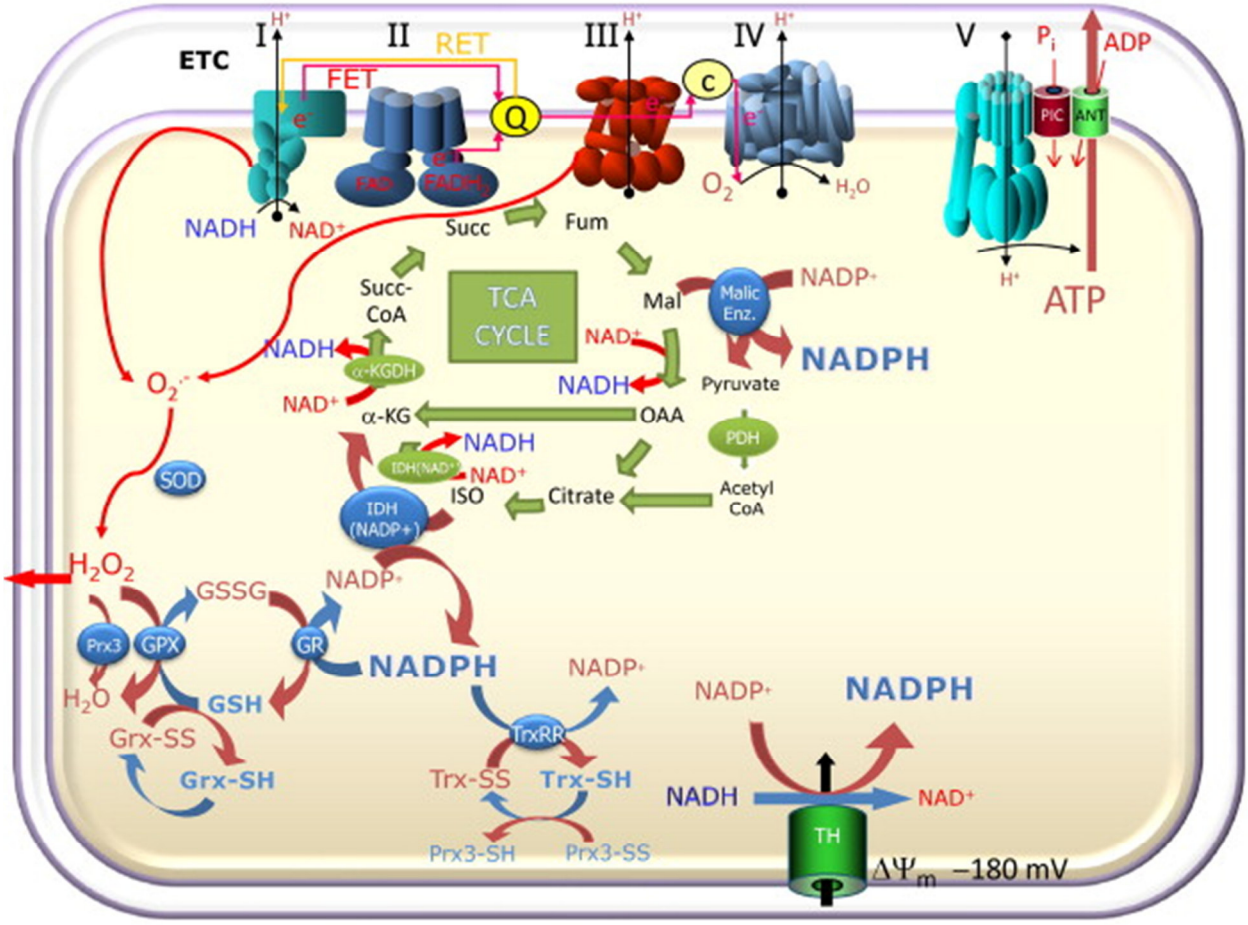


Figure 34 : La chaîne respiratoire mitochondriale et ses différents complexes.
(Aon *et al.* 2010). La chaîne respiratoire mitochondriale, constituée de quatre complexes, oxyde les coenzymes réduits en créant un gradient de protons (ΔμH+) utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser de l'ATP. Le complexe I a une action NADH coenzyme Q réductase. Le complexe a une action Succinate coenzyme Q réductase. Le complexe III a une action coenzyme Q cytochrome C réductase. Le complexe IV a une action Cytochrome C oxydase. Le coenzyme Q ou ubiquinone permet les transitions entre les complexes I, II et III alors que le cytochrome C permet la transition entre le complexe III et IV. La phosphorylation oxydative est réalisée par l'ATP-synthase.

et pathologiques (Kolios, Valatas, and Ward 2004; Pacher, Beckman, and Liaudet 2007). Le **$^{\bullet}$NO** possède un rôle important au niveau de la sphère cardiovasculaire puisqu'il permet de réguler en partie le tonus vasomoteur, il inhibe l'agrégation plaquettaire, permet l'adhésion des cellules de l'endothélium ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires.

Le **$^{\bullet}$NO** est caractérisé par une grande diffusibilité et une réactivité limitée liée aux caractéristiques complexe de son électron non apparié. *In vivo*, sa demi-vie est de quelques secondes. A température ambiante, il s'agit d'un gaz incolore dont la solubilité en solution aqueuse est proche de celle de l'oxygène. Le **$^{\bullet}$NO** est oxydable en ion nitrosonium (**NO^+**) et peut être réduit en anion nitroxyle (**NO^-**) (Lala and Chakraborty 2001). Il est susceptible de réagir avec la plupart des espèces oxygénées, avec les fonction thiols et le fer héminique (Loscalzo *et al.* 2000).

Le **$^{\bullet}$NO** est produit par oxydation d'un atome d'azote du radical guanidium de L-arginine par une molécule d'oxygène lors de la transformation de L-arginine en citrulline (Darblade *et al.* 2000). Beaucoup des effets du **$^{\bullet}$NO** sont liés à la modulation de l'activité de diverses protéines suite à sa liaison au fer héminique de ses protéines. Le **$^{\bullet}$NO** a également la capacité de réagir avec l'anion superoxyde, pour former de l'anion peroxynitrite (**$ONOO^-$**) (Barry Halliwell 2006; Pacher, Beckman, and Liaudet 2007; Bolisetty and Jaimes 2013) selon la réaction suivante :

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \longrightarrow ONOO^-$$

L'anion peroxynitrite a la capacité d'entraîner des oxydations de l'ADN appelée nitrosylation, des protéines et des lipides (B. Halliwell 1999). Il peut se décomposer en radical hydroxyle **$^{\bullet}$OH** et en radical dioxyde d'azote (**$NO_2^{\bullet}$**). Le **$NO_2^{\bullet}$** peut entraîner des nitrations de macromolécules telles que des protéines de l'ADN. Le NO peut également réagir avec les métaux de transition pour former des complexes métaux-nitrosyl (**M-NO**), notamment avec le fer (Schopfer, Wang, and Karlin 2010).

1.2. Source des espèces réactives

Les sources d'ERO au sein de la cellule sont produits au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale lors de la phosphorylation oxydative **(Figure 34)** (Aon, Cortassa, and O'Rourke 2010; Bolisetty and Jaimes 2013). Au cours de la respiration, environ 1 à 5 % de l'oxygène subit une réduction mono-électronique en anion superoxyde (O_2•-) par fuite d'électrons principalement au niveau des complexes I (NADPH-ubiquinone oxydo-réductase) et III (ubiquinol cytochrome coxydoréductase) et plus faiblement niveau du complexe II (Lenaz and Genova 2010). La production d'ERO peut être générée par des systèmes enzymatiques impliquant les xanthines oxydases, les réductases et les nicotinamides adenine dinucliotide phosphate oxydases (NOX) (Natarajan and Becker 2012).

1.2.1. Systèmes enzymatiques producteurs d'espèces réactives

Comme nous avons vu précédemment, la production d'espèces réactives dépend de l'activité de nombreux systèmes enzymatiques dont certains sont finement régulés.

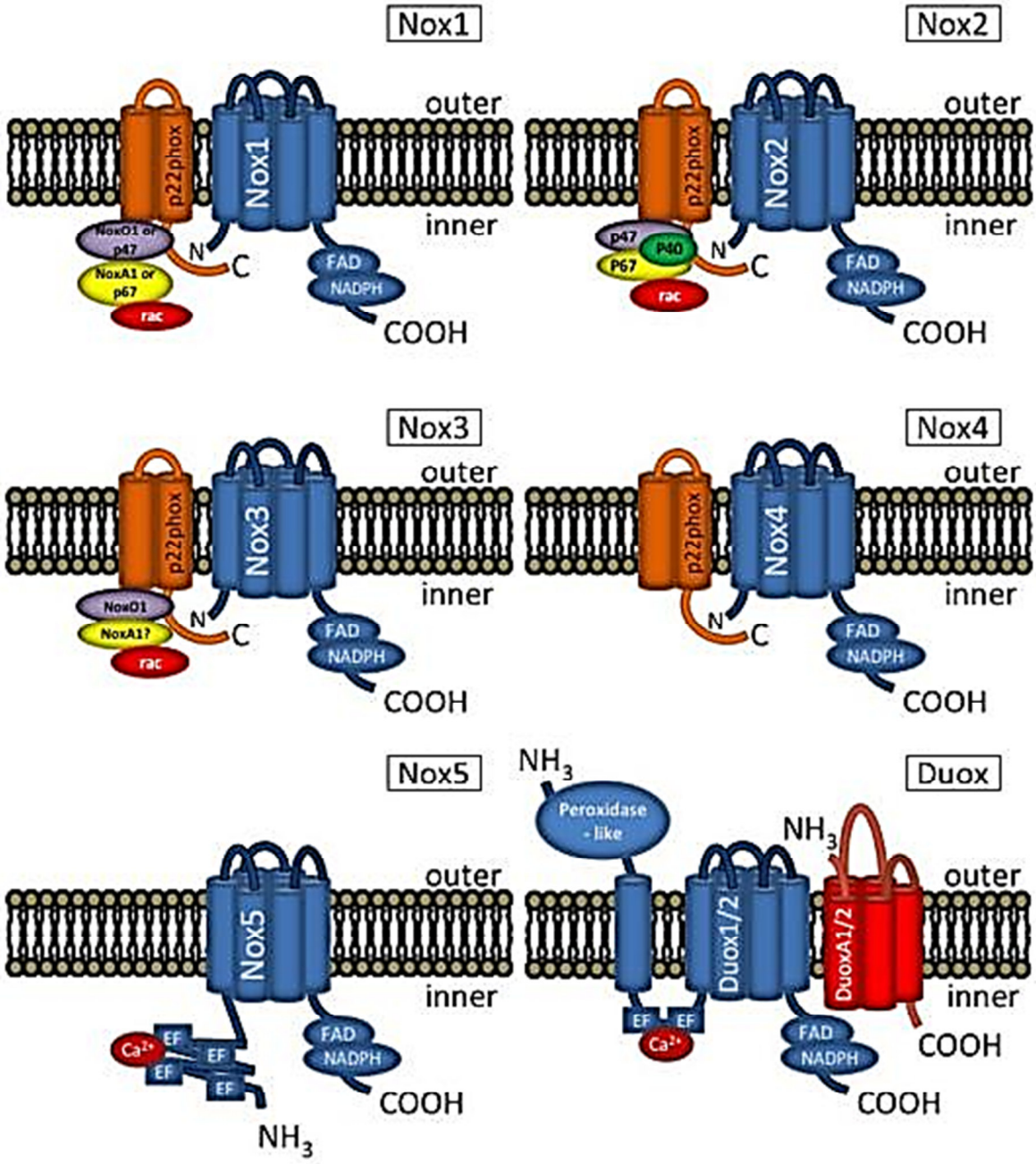


Figure 35: Organisation des NOX/DUOX et de leurs sous unités régulatrices.
(Brown and Griendling, 2009)

1.2.1.1. NADPH-Oxydases (NOX et DUOX)

La famille des NADPH-oxydases (**NOX**) comprend sept homologues: NOX-1, NOX-2, NOX-3, NOX-4, NOX-5, DUOX-1 et DUOX-2 **(Figure 35)**. Ces protéines membranaires traversent la double couche phospholipidique du plasmalemme au minimum par 6 hélices-α. Elles sont constituées également de deux groupements porphyriques (hème + fer) et possèdent deux sub-régions liant la coenzyme flavine adénine dinucléotide (**FAD**) et le substrat nicotinamide adénine dinucléotide diphosphate réduit (**NADPH)** (Geiszt 2006). Le complexe enzymatique membranaire NADPH oxydase catalyse la réaction d'oxydation du NADPH par le dioxygène ($\mathbf{O_2}$), ce qui produit du $\mathbf{NADP^+}$, du $\mathbf{H^+}$ et de $\mathbf{l'O_2^{\bullet -}}$:

$$\mathbf{NADPH + 2\ O_2 \longrightarrow\ NADP^+ + H^+ + 2\ O_2^{\bullet -}}$$

Cependant, la distribution tissulaire et les mécanismes d'activation des membres de la famille Nox sont très différentes selon les tissus, suggérant qu'elles exercent des fonctions physiologiques distinctes dans des mécanismes aussi variés que la défense de l'hôte, la croissance, la différenciation et l'apoptose. La modulation de la fonction des différentes Nox peut être à l'origine d'une grande variété d'événements physiopathologiques impliquant un déséquilibre du statut oxydatif (Jiang, Zhang, and Dusting 2011a).

La **NOX-2**, aussi appelée **gp91 phox**, est historiquement la première NADPH-oxydase décrite. Il s'agit d'une glycoprotéine de 91 kDa exprimée majoritairement dans les polynucléaires neutrophiles. Qualifiée de NADPH-oxydase phagocytaire, elle a un rôle central dans les défenses de l'organisme grâce à sa production d'ERO participant à la microbicidie de l'immunité innée. Stabilisée par la liaison à une autre protéine membranaire, la **p22phox**, ce complexe appelé cytochrome b558 a une activité NADPH oxydase très contrôlée. L'activation de Nox-2 se fait part la translocation d'une GTPase leucocytaire **Rac 2** et l'interaction avec les sous-unités régulatrices de gp91 phox : **p47 phox** ou **NoxO1** et **p67 phox** ou **NoxA**1 (Brandes and Kreuzer 2005). Une autre sous unité plasmatique, la **p40 phox**, se lie au complexe pour l'inhiber (Chan *et al.* 2009). La NOX-2 est responsable de la physiopathologie de la granulomatose septique chronique, d'un déficit immunitaire impliquant un dysfonctionnement du cytochrome b558 (Chan *et al.* 2009). Elle serait impliquée dans la maladie d'Alzheimer par sa présence au sein du tissu microglial (Zekry, Epperson, and Krause 2003; Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007).

La **NOX-1** est le premier homologue de **gp91 phox** qui a été identifié. Son mécanisme d'action est très proche de la NOX-2 puisque qu'elle doit se lier à **NoxO1** et à **NoxA1** ainsi qu'à la protéine ubiquitaire Rac 1 pour être actif (Geiszt 2006). La NOX-1 est hautement exprimée au niveau du tissu épithélial du colon (Krause 2004) et du tractus intestinal (Brandes and Kreuzer 2005). Elle est présente également au niveau des muscles lisses vasculaires, l'utérus, les reins, l'estomac et dans les ostéoclastes. Son rôle n'est pas encore bien défini. La similarité avec NOX-2 laisse sous-entendre l'implication de NOX-1 dans les défenses de l'organisme au niveau colique. Sa présence au sein du tissu vasculaire laisse envisager un impact dans la régulation de la pression artérielle. Ainsi, la NOX-1 semble impliquée dans l'hypertension induite par l'angiotensine II (Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007).

La **NOX-3** possède 58% d'homologie avec la NOX-2. Elle s'exprime uniquement au cours du développement fœtal et se retrouve au niveau des poumons, du foie, des reins et de la rate du fœtus. Son rôle prédominant s'exerce au niveau de la maturation de l'appareil auditif. NOX-3 forme également un complexe avec **p22 phox** mais semble être constitutivement active. L'implication de régulateurs tels que **NoxO1** et **Rac1**, ont été mis en évidence chez la souris (Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007).

La NOX-4 possède 39% d'homologie avec NOX-2. Elle est retrouvée majoritairement au niveau du tissu rénal d'où son autre nom, la Renox. Elle est présente également dans d'autres tissus incluant les cellules fœtales de foie, des cellules endothéliales vasculaires, des cellules musculaires lisses, les ostéoclastes, les cellules souches hématopoïétiques et les adipocytes. Cette enzyme n'est pas uniquement membranaire, elle est retrouvée dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le noyau. NOX-4 est active en présence de **p22 phox**. Sa régulation dépend de la production d'ERO et non de sous-unités régulatrices comme pour NOX-2 ou NOX-1 (Brandes and Kreuzer 2005). Ses fonctions ne sont pas clairement définies. Au niveau des reins, elle semble comme un senseur de l'oxygène pour réguler la synthèse de l'érythropoïétine. Elle semble impliquée dans la néphropathie diabétique (Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007).

La NOX-5 ne présente que 27% d'homologie avec NOX-2. Elle est exprimée principalement au niveau des organes lymphoïdes et des testicules. De même on la retrouve au niveau de la rate, des tissus fœtaux, ovariens, pancréatiques, vasculaires, de la moelle osseuse rouge et de l'utérus (Geiszt 2006). Elle n'est pas présente dans le génome de la souris et du rat (Sumimoto, Miyano, and Takeya 2005). 4 isoformes ont été mis en évidence dans différents tissus, NOX5α, NOX5β, NOX5δ, NOX5γ (Bánfi *et al.* 2001; G. Cheng *et al.* 2001).

Son activation est calcium-dépendante. Elle lie le calcium par son extrémité N-terminale intracellulaire possédant 4 motifs EF-hands (Geiszt 2006; Krause 2004; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007). Son activation est aussi constitutive et indépendante de toutes sous-unités cytoplasmiques ou membranaires (p22 phox). Seule l'isororme NOX5β qui nécessite une activation par ionomycine (Bánfi *et al.* 2001).

Les dual-oxydases-1 et 2 (**DUOX 1/2**) sont deux isoformes présentant 83 % d'homologie entre elles et 47 % avec la NOX-2. Leur particularité est d'avoir un septième fragment transmembranaire contenant un hème et une activité peroxydase. Ces enzymes ont la capacité de générer l'anion superoxyde d'une part et de le transformer en peroxyde d'hydrogène d'autre part. Cette dismutation peut être également par la superoxyde dismutase (SOD) ubiquitaire (Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007). Comme la NOX-5, les Duox sont calcium-dépendantes et possèdent 2 motifs EF-hands intracellulaires. *A contrario* des autres NOX, la sous unité p22 phox ne semble pas essentielle à leurs activités (Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007). Elles sont exprimées au sein des cellules épithéliales ainsi que dans la glande thyroïde où elles sont dénommées thyroperoxydases. Elles sont impliquées dans la physiopathologie de l'hypothyroïdie. DUOX-1 est de plus présente au niveau des poumons, du pancréas, du placenta, de la prostate et des testicules, alors que DUOX-2 se retrouve au niveau gastro-intestinal (Geiszt 2006; Lambeth, Kawahara, and Diebold 2007).

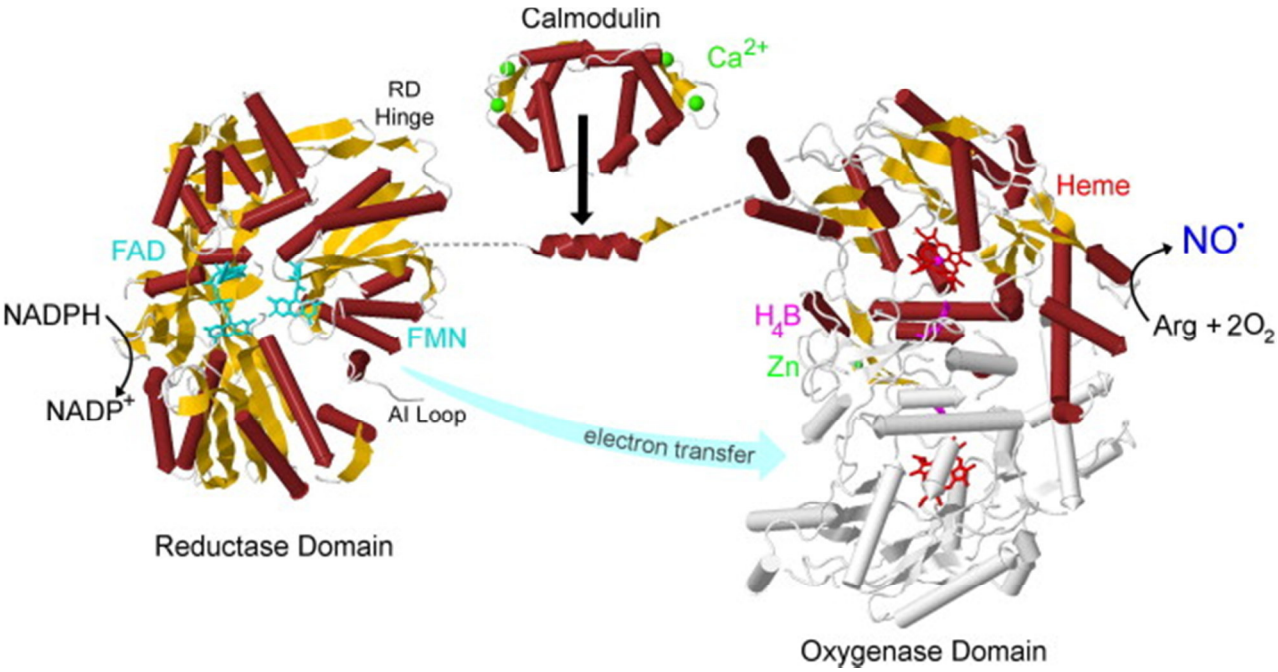


Figure 36 : Représentation schématique d'un monomère de NO synthase.
(Daff 2010)

1.2.1.2. NO-synthases (NOS)

Cette famille d'enzymes comprend quatre isoformes qui catalysent toutes une même réaction, la conversion de l'arginine en citrulline et monoxyde d'azote (**$^{\bullet}$NO**). Trois principale isoformes de NOS ont été isolées : la NOS neuronale (**nNOS**), la NOS inductible des macrophages (**iNOS**) et la NOS endothéliale (**eNOS**) (Fischmann *et al.* 1999; H. Li and Poulos 2005). Une quatrième NOS a également été décrite, la NOS mitochondriale (**mtNOS**) (Simon Daff 2010).

Les NO-synthases sont actives sous forme de dimères, chaque monomère étant constitué d'un domaine réductase et d'un domaine oxygénase, ainsi que de multiples sites pour les cofacteurs tels que FAD, NADPH, FMN, Calmoduline (CaM) **(Figure 36)** (S. Daff 2003) (Simon Daff 2010). Les isoformes diffèrent de part leurs structures et leurs fonctions. La NOS endothéliale (**eNOS**) est composée de deux dimères de 134 kDa et la NOS neuronale (**nNOS**) de deux dimères de 160 kDa. Elles sont constitutivement exprimées et leur activation est calcium-dépendante. La NOS inductible (**iNOS**) est calcium-indépendante, son expression est induite par les cytokines ou autres agents inflammatoires (Andrew and Mayer 1999). Le découplage des NOS catalyse la production d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène. De par cette propriété, les NOS jouent un rôle dans le statut oxydatif et l'apparition de pathologies. Elles sont mises en cause dans le processus de cancérogenèse par leur action sur l'angiogenèse. Plus particulièrement la iNOS serait augmentée dans les cellules épithéliales mammaires cancéreuses alors que la eNOS serait réprimée (Tschugguel *et al.* 1999).

1.2.1.3. Cytochrome P450

Les cytochromes sont composées d'un groupement porphyrique comme les NOX. Elles utilisent l'oxygène pour oxyder leurs substrats grâce à des réactions d'oxydoréduction mettant en jeux les cofacteurs : FAD, NADH et NADPH (D. X. Zhang and Gutterman 2007). Les cytochromes représentent une famille très diversifiée, comprenant le cytochrome P450 qui intervient dans la détoxification hépatique ainsi que les cytochromes de la chaîne respiratoire. Le découplage de ces cytochromes est à l'origine de la production d'ERO. Ces ERO constituent la production oxydative basale et participent au processus dégénératif.

Le réticulum endoplasmique est également une source d'ERO au sein de la cellule. La production d'ERO est notamment liée à la présence des cyclo-oxygénases (**COX**) et les cytochromes P450 mono-oxygénases (**CYP450**) (Sardina *et al.* 2012). La réaction de mono-oxygénation requiert le transfert de deux électrons fournis par la flavoprotéine réductase NADPH-cytochrome P450. Après fixation de l'oxygène par la mono-oxygénase, celle-ci peut dans certains cas libérer l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène (Zangar, Davydov, and Verma 2004). La réaction de dismutation par la superoxyde dismutase (SOD) entraîne la réduction de l'anion superoxyde (**$O_2^{\bullet-}$**) en peroxyde d'hydrogène (**H_2O_2**) (Klaunig, Kamendulis, and Hocevar 2010). L'anion superoxyde est rapidement transformé lors de la réaction de dismutation, ce qui explique sa courte demi-vie. En l'absence de SOD, il existe une dismutation spontanée (Inoue *et al.* 2003). Cette réaction peut favoriser, en présence de fer, la production de radical hydroxyle (**$^{\bullet}$OH**).

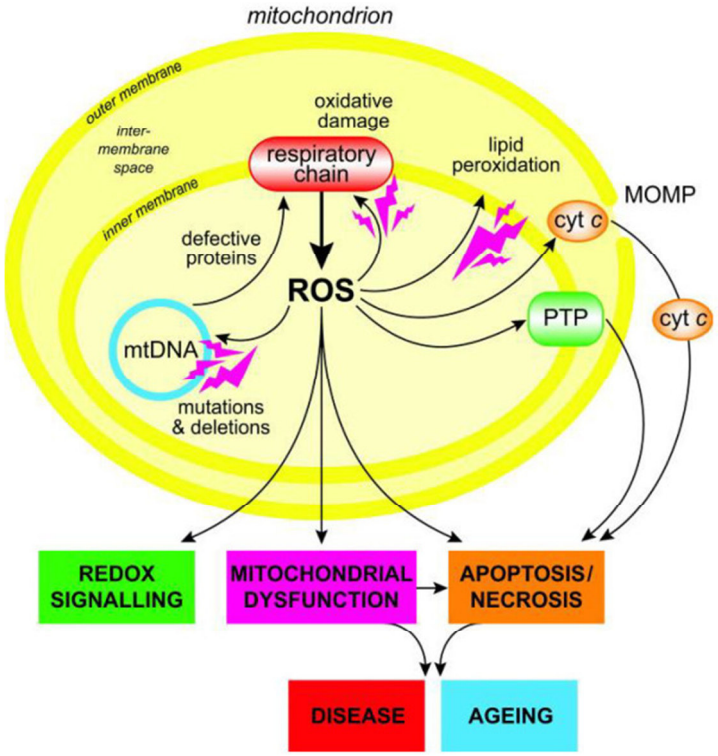


Figure 37 : Production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène.
(Galley *et al.* 2010)

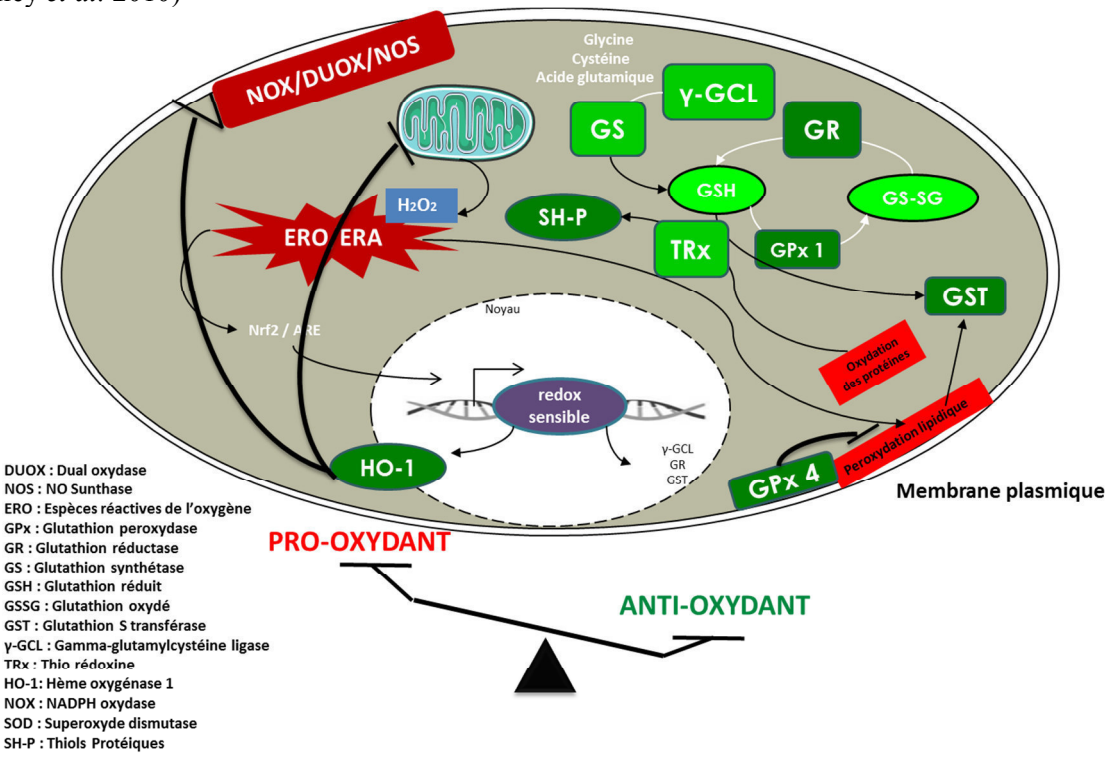


Figure 38 : Les acteurs de la réponse anti-oxydante.
Les enzymes qui composent la défense anti-oxydante sont des gènes redox sensibles. HO-1 inhibe les différents systèmes producteurs et les enzymes du métabolisme du GSH parmi celles-ci la GR importante pour recycler le glutathion oxydé sous forme réduite. La GST permette la détoxification des molécules délétères. La GPx inhibe la peroxydation lipidique au niveau de la membrane plasmique. Le GSH intervient aussi dans la protection des groupements thiols protéique par l'intermédiaire des deux systèmes complémentaires qui sont les glutarédoxines et thiorédoxines (permet de contrôler l'état d'oxydation des thiols).

1.2.2. La mitochondrie

La mitochondrie est un organite intracellulaire composé d'une membrane externe et d'une membrane interne délimitant un espace inter-membranaire et matriciel. A l'intérieur de la membrane mitochondriale se trouvent l'ATP synthase et les complexes de la chaîne respiratoire (Szabo and Zoratti 2014). La membrane interne étant imperméable aux ions, il existe des transporteurs mitochondriaux assurant le transport de divers métabolites et de nucléotides (Szabo and Zoratti 2014). Parmi ces transporteurs on peut citer le transporteur de phosphate inorganique Pi, les transporteurs de mono, di et tricarboxylates et le transporteur ADP/ATP qui assure l'entrée d'ADP dans la mitochondrie et la sortie de l'ATP après sa synthèse. La mitochondrie héberge de nombreuses voies métaboliques telles que la β oxydation des acides gras et le cycle de krebs (H. Xu, Martinoia, and Szabo 2015).

La mitochondrie a été longtemps perçue comme un organite cellulaire responsable uniquement de la production d'énergie. En outre, récemment, par ses rôles décrits dans les processus de vieillissement et d'apoptose ou dans des maladies impliquant les ERO telles que le cancer et le diabète **(Figure 37)** (Leanza *et al*. 2014; Rasola and Bernardi 2014), ont confirmé sa place essentielle dans le fonctionnement de la cellule. Toutes les mitochondries produisent des ERO au cours de la respiration mitochondriale (Bonnefont-Rousselot *et al.* 2003). La mitochondrie produit essentiellement l'anion superoxyde et peut le dismuter grâce à une SOD présente dans la matrice mitochondriale (Kowaltowski *et al*. 2009).

Il existe 3 sites de production des ERO (dans la mitochondrie) : le complexe I, le complexe III et le coenzyme Q réduit. Une force proton motrice élevée ralentit le flux d'électrons dans la chaîne respiratoire et favorise ainsi la fuite dans la matrice où ils réagissent avec l'oxygène conduisant à la formation du radical superoxyde $\mathbf{O_2^{\bullet -}}$, ce phénomène a principalement lieu au niveau des complexes I et III (Turrens 1997). Au niveau du complexe III, la fuite d'électrons se produit au cours du cycle du coenzyme Q qui génère un intermédiaire radicalaire hautement réactif, le radical ubisemiquinone, $\mathbf{QH^{\bullet}}$ (Y. Chen and Cai 2003). Dans ce cas, la formation des ERO dépend de la durée de vie de ce radical.

Ainsi, la production des ERO dépend de l'activité mitochondriale, la production est maximale quand la force proton motrice est maximale. La relation entre le potentiel de membrane et la production mitochondriale des ERO est très forte. Ainsi une diminution de 10 % du potentiel de membrane par un «découplage léger» peut diminuer la production des ERO de 50 à 70 % (Starkov 2006). En cas de pathologies, la production des ERO peut augmenter ou diminuer indépendamment de la force proton motrice.

2. Défenses anti-oxydantes

Autour de l'équilibre entre la nécessité de l'oxygène et les effets néfastes des radicaux libres sur les fonctions cellulaires, l'organisme a développé de puissants systèmes de défense antioxydants permettant de contrôler et de maîtriser ce métabolisme **(Figure 38)**. La défense contre ces ERO repose sur deux mécanismes distincts ; les enzymes antioxydantes et les systèmes non enzymatiques tels que les vitamines C et E, les caroténoïdes, les polyphénols et le glutathion réduit qui représente la première ligne de défense (Vertuani, Angusti, and Manfredini 2004). Dans cette catégorie, nous retrouvons aussi les oligoéléments (le cuivre, le

fer, le manganèse, le sélénium et le zinc). Lorsque cette première ligne de défense anti-oxydante n'est pas suffisante, des mécanismes secondaires sont mobilisés pour réparer les dommages subis et protéger les tissus contre les futures attaques oxydantes. Ces mécanismes inclus l'expression des protéines induite par le stress telles que les protéines de choc thermique (Thannickal and Fanburg 2000). Dans cette partie ces deux systèmes de défense antioxydants seront présentés, une première partie focalisée sur les mécanismes de défense enzymatiques et une deuxième partie sur les mécanismes non enzymatiques.

2.1. Systèmes antioxydants enzymatiques

2.1.1. La superoxyde dismutase

La première enzyme impliquée dans la défense antioxydante est la superoxyde dismutase (SOD), une métalloenzyme retrouvée à la fois chez les cellules procaryotes et eucaryotes (Roessner *et al.* 2008). Cette enzyme catalyse l'anion superoxyde $\mathbf{O_2^{\bullet-}}$ en une forme plus réactive, l'H_2O_2 qui pourra être pris en charge ensuite par des enzymes à activité peroxydase :

$$(\mathbf{2O_2^{\bullet-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2})$$

Il existe 3 isoformes de SOD chez les mammifères : une forme cytosolique et nucléaire associée aux ions cuivre et zinc (**SOD-Cyto**), une forme extracellulaire (**SOD-EC**). La forme mitochondriale (**SOD-Mn**) permet la dismutation quasi instantanée de l'anion superoxyde. Si la SOD-Mn semble indispensable à la vie, ce n'est pas le cas pour la forme cytosolique, même si celle-ci joue un rôle important dans l'élimination des ERO (Matés and Sánchez-Jiménez 1999). La SOD-EC est située sur la face externe de la membrane plasmique. Elle se retrouve dans les espaces interstitiels des tissus et dans liquides extracellulaire. Si les formes cytosoliques et mitochondriales sont régulés par leurs substrats, la SOD-EC sera régulée par des cytokines plutôt que par les ERO (Matés, Pérez-Gómez, and Núñez de Castro 1999).

2.1.2. La catalase

La catalase (**CAT**) est une enzyme héminique capable de transformer le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2) (V. Valko *et al.* 2006). Cette enzyme est une des enzymes anti-oxydantes les plus efficaces ; elle n'est saturable par aucune concentration d'H_2O_2 (Lledías, Rangel, and Hansberg 1998). Elle possède un turnover plus élevé que les autres enzymes : une molécule de catalase peut convertir environ 6 millions de molécules de H_2O_2 par minute selon la réaction suivante (Ko *et al.* 2000) :

$$(\mathbf{2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2}).$$

L'affinité de la catalase pour l'H_2O_2 est élevée seulement lorsque les teneurs en H_2O_2 sont accrues. Cette enzyme est abondante dans le foie et les globules rouges. Elle se retrouve préférentiellement dans les peroxysomes et en plus faible quantité dans le cytosol (V. Valko *et al.* 2006).

2.1.3. Les enzymes du métabolisme du glutathion (la glutathion peroxydase, réductase et S transférase)

La glutathion peroxydase (**GPx**) est une enzyme clé. Elle nécessite la présence de glutathion réduit (**GSH**) comme donneur d'électron. La GPx catalyse la détoxification d'hydroperoxydes en présence de GSH pour former le disulfure de glutathion (**GSSG**) et le produit de réduction de l'hydroperoxyde :

$$\mathbf{2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow\ GSSG + 2\ H_2O}$$

$$\mathbf{2\ GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O}$$

La GPx agit en synergie avec la SOD puisque elles permettent d'accélérer la dismutation du H_2O_2. Leur rôle principal consiste en l'élimination des peroxydes lipidiques résultant de l'action du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés (AGPI) (Haleng *et al.*, 2007). Il s'agit de sélénoenzyme retrouvée principalement dans le cytosol et dans les mitochondries. Il existe plusieurs isoformes de GPx chez les eucaryotes contenant du sélénium (Haleng *et al.* 2007) (Ursini *et al.* 1995; Matés, Pérez-Gómez, and Núñez de Castro 1999; Comhair and Erzurum 2002). La **GPx1** est l'enzyme la plus abondante, elle est exprimée dans la plupart des cellules et localisée principalement dans le cytoplasme et aussi dans les mitochondries. La **GPx2** est une isoforme située dans le cytoplasme des cellules du tractus gastro-intestinal et détectable également dans le foie. La **GPx3** est présente dans le plasma mais également dans les reins, les poumons, le cœur et le placenta. La **GPx4** ou **PH-GPx** (GPx phospholipidique) est localisée à l'interface de la membrane interne et du cytoplasme. La **GPx5** est l'isoforme épididymaire.

La glutathion réductase (**GR**), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG grâce au NADPH qui est utilisé comme donneur d'électrons.

$$\mathbf{GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2\ GSH + NADP^+}$$

Cette capacité de la GR à régénérer le glutathion réduit joue un rôle pivot dans le mécanisme antioxydant du glutathion et prévient la déplétion des thiols cellulaires (J. D. Hayes and McLellan 1999).

La glutathion S transférase (**GST**), enzyme polymorphe occupe une place très importante dans le système de défense cellulaire. La GST est une enzyme soluble, elle se retrouve sous forme dimérique dans la cellule. Elle est divisée en trois groupes, les enzymes cytoplasmiques, mitochondriaux et microsomaux. Trois isoformes de la GST cytoplasmique soluble ont été identifiées : la GST-π, la GST-α et la GST-μ (de Waziers *et al.* 1990; Krishna, Getchell, and Getchell 1994). La GST mitochondriale est aussi une enzyme soluble, la GST membranaire microsomale, est bien moins connue (John D. Hayes, Flanagan, and Jowsey 2005).

En effet, la GST catalyse la conjugaison du GSH réduit à différents substrats électrophiles, nocifs pour la cellule. Par conséquent, elles constituent une importante ligne de défense protégeant les composants cellulaires (ADN, lipides et protéines) des effets délétères induits par ces composés toxiques. Ces composés sont alors transformés en dérivés mercapturiques éliminés de la cellule par un mécanisme de transport ATP dépendant *via* les

protéines de résistance aux drogues (MRP : Multidrug Resistance Protein), (Keppler 1999) qui seront ensuite excrétés à travers les voies biliaires principalement et urinaires (J. D. Hayes and Strange 1995). La GST joue aussi un rôle important dans le transport de composés endogènes (les hormones, les stéroïdes, l'acide urique et la bilirubine), dans le métabolisme des éicosanoïdes (synthèse des prostaglandines et des leucotriènes) et dans la détoxification des xénobiotiques en les conjuguant au sur le glutathion (John D. Hayes, Flanagan, and Jowsey 2005; J. D. Hayes and Strange 2000).

2.1.4. La thiorédoxine peroxydase

Les thiorédoxines peroxydases (**TRX**) constituent les enzymes antioxydants majeures ubiquitaires responsables du maintien des protéines à l'état réduit (Wood, Gibson, and Garg 2003). Elles sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, le noyau, les mitochondries, les peroxysomes, associées aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant à travers une activité peroxydase, que dont le H_2O_2, le peroxynitrite et de nombreux hydroperoxydes sont les substrats. Malgré leur plus faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et à la CAT, ces enzymes jouent un rôle majeur dans l'élimination des hydroperoxydes du fait de leur quantité importante (0,1 à 0,8% de protéines solubles cellulaires) et de leur large distribution dans la cellule. L'enzyme thiorédoxine protège les protéines contre la formation de ponts disulfures et régule l'activité des récepteurs de fixation à l'ADN et de certains facteurs de transcription tels qu'AP-1 (activator protein 1) et NF-κB (Nuclear Factor kappa B) (Arnér and Holmgren 2000).

2.1.5. L'hème-oxygénase

Dans les cellules, deux enzymes hème-oxygénases, l'une inductible (**HO-1**) et l'autre constitutive (**HO-2**) assurent la dégradation des groupements porphyriques en biliverdine libérant l'atome de fer, qui sera immédiatement capté et recyclé (Y. Liu *et al.* 1997). L'homologue inductible, HO-1, correspond à la protéine de choc thermique, **Hsp 32** (Prawan, Kundu, and Surh 2005) et s'avère une enzyme de protection importante de l'organisme. L'expression de cette enzyme est induite par un grand nombre de stimuli (Prawan, Kundu, and Surh 2005) et permet de contrecarrer les effets pro-oxydants des groupements héminiques libres (Jeney *et al.* 2002). L'importance des groupements héminiques dans le métabolisme cellulaire (détection et transport de l'oxygène, cytochromes, chaîne respiratoire, enzymes d'oxydoréduction) fait que HO-1 est une enzyme clé dans le contrôle du statut oxydatif de la cellule (Ryter, Alam, and Choi 2006). Comme les groupements héminiques ne sont pas recyclés entre les cellules, cette régulation est proprement intra-cellulaire (Shibahara *et al*. 2003). Toutefois, il semble que les effets observés aprés activation de HO-1 sont liés à des propriétés paracrines, renforçant son rôle de molécule-signal à l'image des autres espèces réactives (H. P. Kim, Morse, and Choi 2006).

2.2. Systèmes antioxydants non enzymatiques

2.2.1. Le glutathion

Le glutathion est un tripeptide (acide glutamique-cystéine-glycine) stable qui participe à de nombreuses réactions d'oxydo-réduction par l'intermédiaire du couple rédox

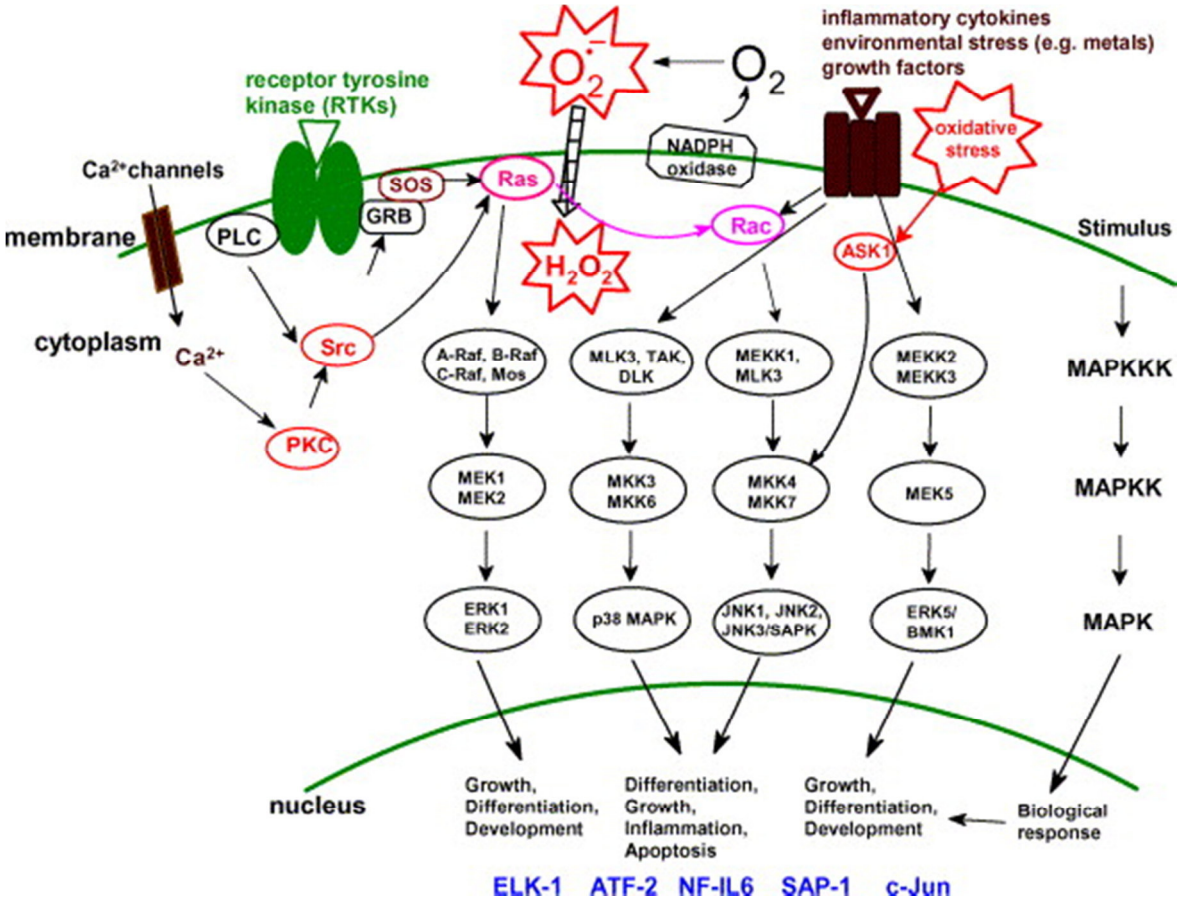


Figure 39 : Voies de signalisation des ERO.
(Valko *et al.* 2007). Les ERO sont capables de moduler de nombreuses voies de signalisation intervenant dans la cancérogenèse telles que PI3K, MAPK et JAK. Le statut oxydatif est régulé par la cellule qui peut activer les défenses anti-oxydantes suite à une production d'ERO.

thiol/disulfure GSH/GSSG, retrouvé en forte concentration (10 mM) dans les cellules (Sies 1999). Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d'H_2O_2 est important, plus le GSH est consommé et le GSSG augmenté (Hwang, Sinskey, and Lodish 1992).

Le glutathion est le principal protecteur intracellulaire face au déséquilibre redox de la cellule (Pocernich *et al*. 2001). Par la fonction thiol de la cystéine, il peut réduire les ERO et participer ainsi à la détoxification cellulaire (Pocernich *et al*. 2001). En tant qu'antioxydant, le glutathion peut intervenir par deux types de mécanismes : la capture d'espèces radicalaires et la participation à l'activité d'enzymes antioxydantes. Le métabolisme du glutathion fait intervenir plusieurs enzymes. Parmi celles-ci, La γ-glutamylcystéine ligase (**γ-GCL**) est responsable de la première étape de sa synthèse.

Par ailleurs, le GSH intervient dans la protection des groupements thiols protéiques par l'intermédiaire de deux systèmes complémentaires que sont les glutarédoxines et thiorédoxines (Holmgren *et al*. 2005). Le GSH est capable également de régénérer certaines vitamines, notamment les vitamines C et E. Il protège aussi la cellule de l'apoptose et participe à la réparation des atteintes oxydatives à l'ADN (M. Valko *et al.* 2006). Le GSH est donc lui aussi un acteur de la signalisation cellulaire (André and Felley-Bosco 2003).

2.2.2. Les thiols protéiques

Les groupements thiols (-SH) des protéines sont soumis à de nombreuses modifications par oxydation : nitrosylation, gutathionylation ou formation de ponts disulfures sont autant de réactions susceptibles de modifier ou d'altérer les fonctions des protéines (Forman and Dickinson 2004). Ces modifications ont longtemps été considérées comme des dommages du stress oxydant sur les protéines. Il semble actuellement que certaines d'entre elles participent directement à la régulation de l'activité des protéines (Dalle-Donne *et al*. 2007) telles que des kinases (Ward *et al*. 2000), des facteurs de transcription, des protéines de choc thermique ou encore des canaux ioniques (Holmgren *et al.* 2005). Cette régulation semble couplée à la S-glutathionylation faisant de ces mécanismes un puissant système de régulation des fonctions des protéines lié au statut oxydatif cellulaire.

3. Homéostasie redox et régulation des voies de signalisation et de transcription

Les propriétés physico-chimiques des ERO leurs permettent de diffuser rapidement au travers des membranes et de jouer un rôle important dans la signalisation cellulaire autocrine et paracrine (Beckman 1999). Les ERO sont capables d'activer des voies de signalisation cellulaire communes à celles induites par la leptine telles que les JAK, MAPK et PI3K mais également *via* des facteurs de transcription (FTs) **(Figure 39)** (Faraonio *et al.* 2006). Ces voies de signalisation, sensibles à l'homéostasie redox cellulaire, modulent la transcription de gènes dits « redox sensibles » possédant dans leur région promotrice des éléments de réponse anti-oxydante (ARE) ; parmi ces gènes, figurent ceux des enzymes du métabolisme du glutathion. Par ailleurs, les ERO activent les facteurs de transcription comme NF-kB (Nuclear Factor-kappa B), Nrf-2 (N-related factor-2), AP-1(Activator Protein 1) (Thannickal and Fanburg 2000), alors qu'elles inhibent p53 (tumor protein 53) un suppresseur de tumeur

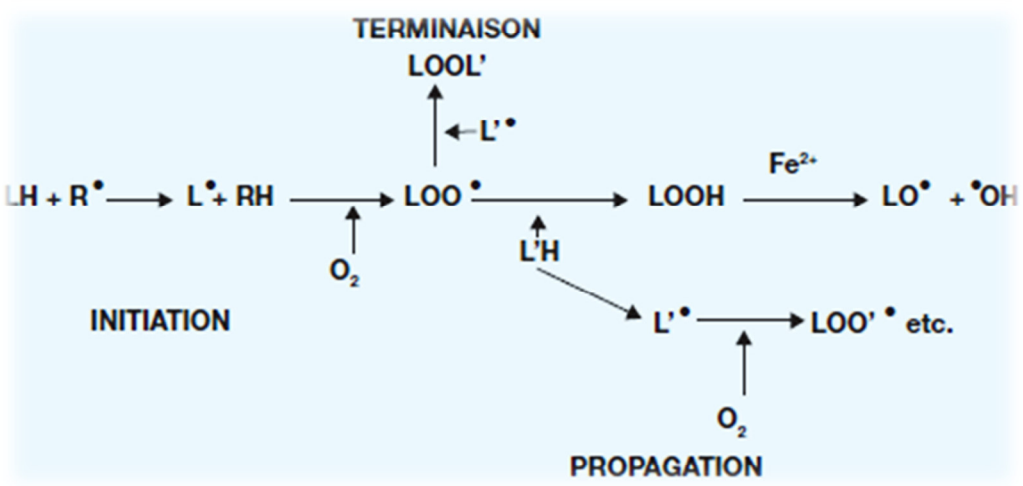


Figure 40: Phases de la peroxydation lipidique.
(D'après Michel F *et al*. 2008). **R˙** : radical initiateur ; **LH** : acide gras polyinsaturé ; **L˙** : radical lipidique **; LOO˙** : radical alkoxyle ; **˙OH** : radical hydroxyle ; **O_2** : oxygène ; **LOOL˙**: produit stable .

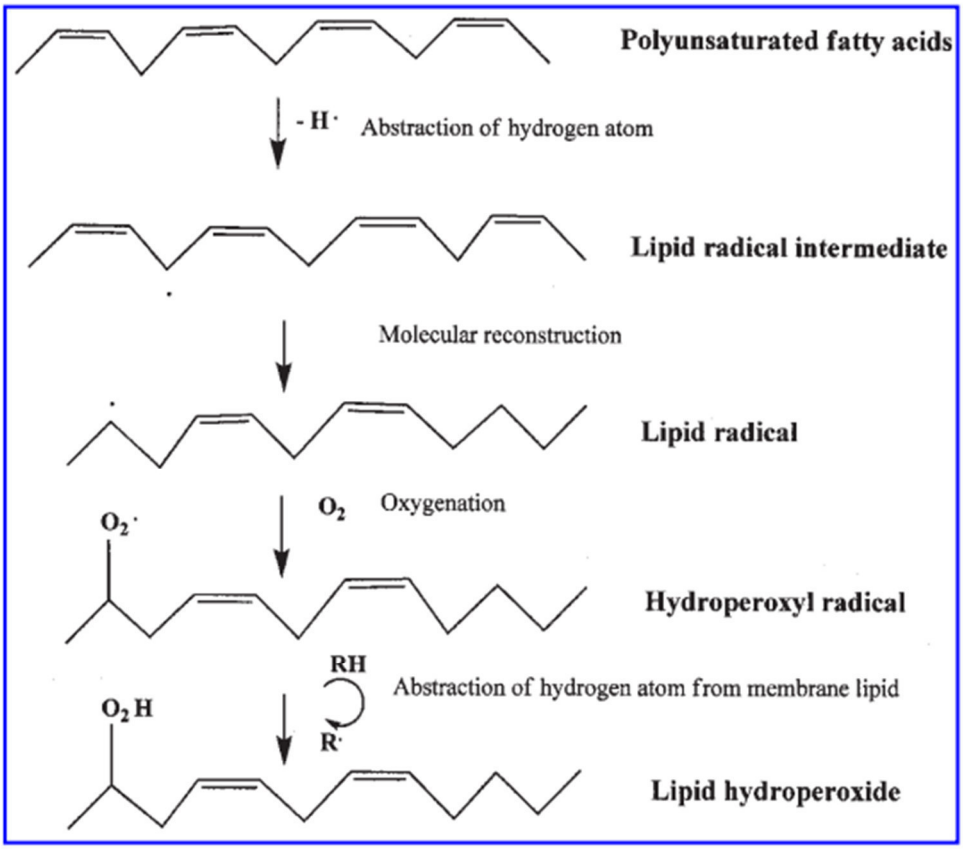


Figure 41 : Attaque radicalaire des acides gras polyinsaturés.
(Basu S 2008)

impliqué dans les processus néoplasiques. p53 possède un rôle clé dans la réponse cellulaire en contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Arrigo 1999). L'activation de la transcription de ces gènes induit la synthèse des enzymes du métabolisme du glutathion, des cytokines pro-inflammatoires, des protéines pro- et anti-apoptotiques.

4. Stress oxydant et dommages oxydatifs

La production d'espèces pro-oxydantes favorise les oxydations cellulaires et notamment les altérations des lipides (peroxydation lipidique), des protéines et de l'ADN.

4.1. Dégâts cellulaires

4.1.1. Peroxydation lipidique

Le stress oxydant est un état caractérisé par un déséquilibre entre la production des espèces réactives et les capacités anti-oxydantes de l'organisme. Cela se traduit par une accumulation de produits d'oxydation des biomolécules.

Les premières cibles des ERO sont les lipides, notamment ceux des membranes cellulaires. Les ERO peuvent induire la peroxydation lipidique, réaction en chaîne initiée par l'attaque d'un radical tel que le radical hydroxyle sur un AGPI. La peroxydation lipidique, oxydation non enzymatique des lipides (*via* les ERO) englobe trois étapes : l'initiation, la propagation et la terminaison (**Figure 40**). Les AGPI, se caractérisent par un ou plusieurs motifs (- CH = CH - CH2 -) répétés, la présence de doubles-liaisons les rend particulièrement sensibles à l'oxydation radicalaire **(Figure 41)** (Michel *et al.* 2008). L'initiation : l'AGPI cède un hydrogène à l'espèce réactive oxygénée pour se transformer en radical lipidique, qui sous l'action de l'O_2, donne un peroxyle réactif. Deux orientations sont alors possibles pour ce dernier : soit l'espèce peroxyle s'empare d'un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras générant un nouveau radical peroxyle et se convertit en hydroperoxyde : c'est la propagation. Soit la situation se stabilise par dimérisation de deux radicaux $LOO^{\bullet}$: c'est l'étape de terminaison (Dalle-Donne *et al.* 2006).

Ces radicaux transforment les AGPI en hydroperoxydes, produits primaires très instables (les isoprostanes) pouvant se décomposer facilement en produits secondaires tels que des aldéhydes. Ces derniers peuvent franchir les membranes et gagner d'autres compartiments, agissant ainsi comme des « seconds messagers toxiques » de la peroxydation lipidique (Esterbauer, Schaur, and Zollner 1991). Les principaux aldéhydes stables formés lors de la peroxydation lipidique sont le malondialdéhyde (MDA) formé par un bêta clivage des endoperoxydes, reconnu comme étant un biomarqueur de la peroxydation lipidique et le 4-hydroxy-2-nonénal (4-HNE) (Dalle-Donne *et al.* 2006).

La peroxydation lipidique est bien connue pour créer des altérations de la membrane telles que des modifications de la fluidité, l'inactivation de récepteurs ou d'enzymes. En effet, l'exposition des protéines aux ERO/ERA peut altérer les différents niveaux de la structure des protéines (primaire à quaternaire) et ainsi causer des changements physiques et fonctionnels majeurs comme l'inhibition enzymatique, l'augmentation de l'agrégation plaquettaire.

4.1.1.1. Marqueurs de la peroxydation lipidique

a. Les éicosanoïdes

Les éicosanoïdes jouent un rôle dans l'inflammation en tant que facteurs pro- ou anti-inflammatoires. Leur action anti-inflammatoire est surtout due à l'inhibition de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation, comme certaines cytokines le TNF (Wang *et al*. 2011). Ils sont également impliqués dans des fonctions très variées, telles que la fonction rénale, l'agrégation plaquettaire, la libération de neurotransmetteur, la modulation de la réponse immunitaire, la contraction du muscle lisse (Norel 2007) (Basu 2008). Les éicosanoïdes ont un impact sur les maladies cardio-vasculaires ainsi que sur le diabète (pour les éicosanoïdes des familles ω6 et ω3). Cependant leurs modes d'action complexes et leurs courtes demi-vies sont des obstacles à une bonne compréhension de leurs potentialités dans le domaine thérapeutique (Harizi, Corcuff, and Gualde 2008).

Les éicosanoïdes constituent une vaste famille de dérivés d'oxydation des acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbone comme l'acide arachidonique. Les éicosanoïdes, présents dans tous les organes et les tissus, sont généralement des médiateurs lipophiles autocrines ou paracrines qui sont capables de traverser la membrane plasmique des cellules pour atteindre leur site récepteur. On distingue deux grands types d'éicosanoïdes, les leucotriènes et les prostanoïdes parmi lesquelles les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines (PGI).

Les Leucotriènes, dont la synthèse a lieu dans toutes les cellules dont les leucocytes, renferment quatre doubles liaisons dont trois conjuguées et portent souvent un groupement peptidique, constitué d'un, deux ou trois acides aminés liés par des liaisons peptidiques. Leur formation passe par la voie des lipoxygénases (**LOX**).

Les Prostanoïdes, sont des éicosanoïdes cycliques formés à partir des phospholipides. Par la phospholipase A_2 l'acide arachidonique (précurseur le plus abondant) est libéré et converti en prostanoïdes par la voie des cyclooxygénases (**COX**). Cette voie est inhibée par les corticostéroïdes *via* la PLA_2.

b. Les isoprostanes

Les isoprostanes sont des éicosanoïdes cycliques formés de façon non-enzymatique *in vivo* (Basu *et al.* 2013), lors de la peroxydation lipidique des AGPI libres ou estérifiés dans les phospholipides membranaires (Morrow *et al.* 1990; Milne, Yin, and Morrow 2008).

Les F2-isoprostanes font partie des marqueurs les plus spécifiques du dommage oxydatif *in vivo* (Basu 2008). En plus de leur implication dans le stress oxydatif, ils se caractérisent par une puissante activité vasocontructive, principalement au niveau rénal et pulmonaire (Basu 2010) et par des effets globalement pro-inflammatoires. De ce fait, ces composés peuvent être considérés comme des marqueurs *in vivo* du stress oxydatif mais aussi de l'inflammation (Roberts and Milne 2009).

D'autres acides gras ω3 polyinsaturés, EPA (acide eicosapentaénoïque C20:5n-3) ou DHA (acide docosahexaénoïque C22:6n-3), conduisent à la formation de composés terminaux, les F3-isoprostanes ou F4-neuroprostanes. Ces derniers ont des propriétés anti-

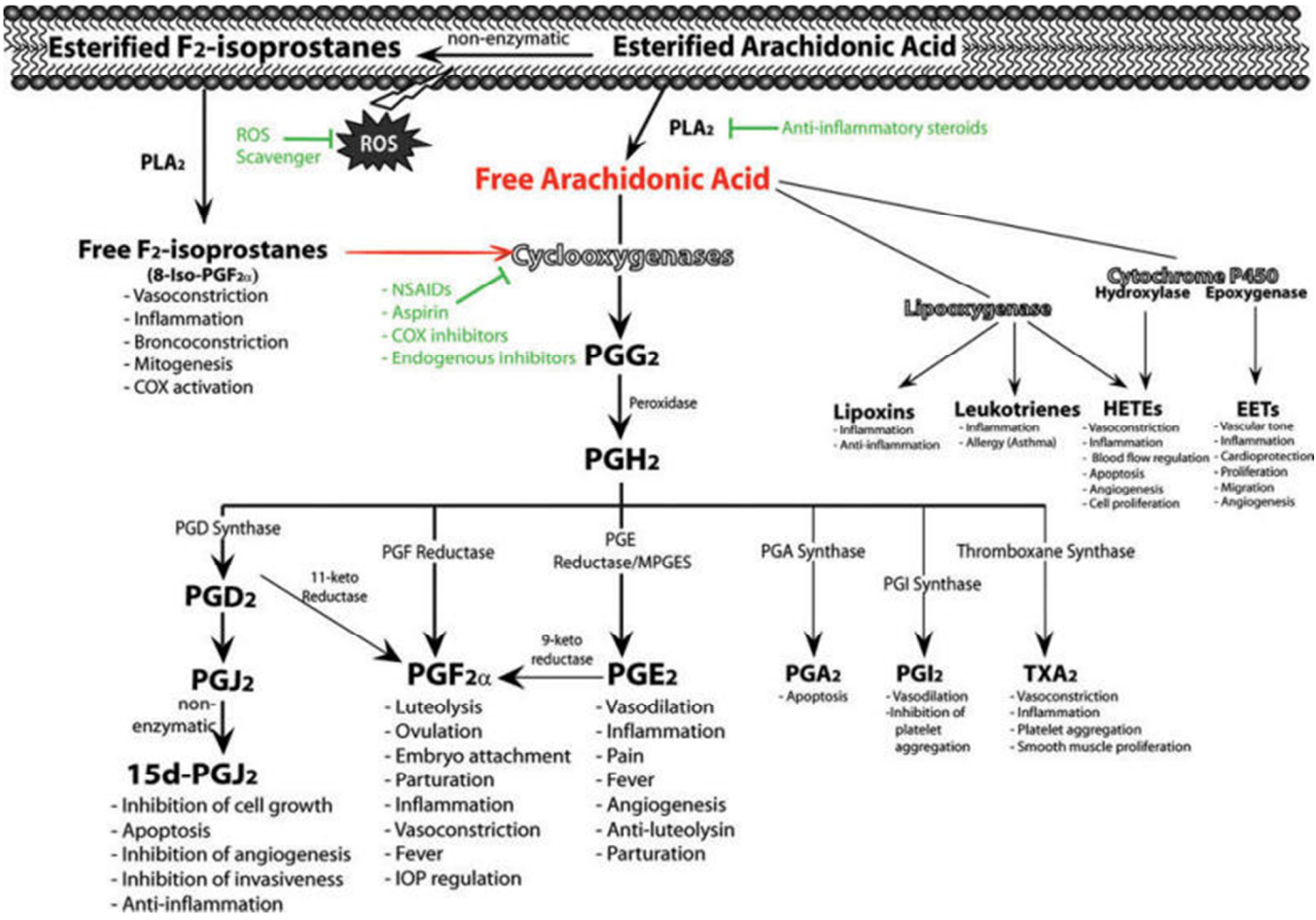


Figure 42 : Voies de synthèse des éicosanoïdes.
(Basu S *et al.* 2013). Les eicosanoïdes possèdent de nombreuses propriétés biologiques : La PGE2 et la PGI2 agissent sur les fibres musculaires lisses des vaisseaux : vasodilatation, augmentation de la perméabilité, œdème. La PGE2 facilite l'action des médiateurs de la douleur. Elle inhibe l'activité des lymphocytes T suppresseurs, augmente la production d'immunoglobulines, diminue la production d'IL2 par les lymphocytes. Le leucotriène B4 est le plus important des leucotriènes. Il est l'agent chimiotactique des polynucléaires le plus puissant. Il active les phagocytes. Le thromboxane A2 entraine une vasoconstriction et favorise l'agrégabilité des plaquettes.

inflammatoires par opposition aux isoprostanes F2 plutôt pro-inflammatoires. (Roberts and Milne 2009). Le DHA, lipide présent plus sélectivement au niveau des membranes du cerveau est le précurseur des neuroprostanes (Arneson and Roberts 2007; Musiek *et al.* 2008). De ce fait, les F2-isoprostanes reflètent plutôt un stress oxydatif global, et les neuroprostanes un dommage oxydatif cérébral. Leur quantification est d'intérêt dans l'évaluation de la sévérité des attaques oxydantes associées aux pathologies neurodégénératrives (Dalle-Donne *et al.* 2006).

c. Le malondialdéhyde (MDA)

Le MDA correspond à un produit terminal de la peroxydation lipidique (Stocker and Keaney 2004). De par ses fonctions aldéhydes, ce composé, est relativement stable est très réactif envers les protéines et les acides nucléiques (Steghens *et al.* 2001). Le MDA piégé par les protéines altère leurs propriétés biologiques. Elles acquièrent notamment un pouvoir immunogène se traduisant par une production d'auto-anticorps contre ces protéines modifiées. La détermination des produits terminaux de la peroxydation lipidique, ce fait par le dosage des TBARS (thiobarbituric acid-reactive substances). Le dosage des TBARS est en effet un dosage permettant une évaluation globale de la peroxydation lipidique, par un dosage non spécifique (dosage d'un ensemble de produits aldéhydiques).

d. Le 4-hydroxynonénal (HNE)

Autre marqueur de peroxydation lipidique, le HNE est un aldéhyde toxique majeur. Il est généré par l'attaque des radicaux libres sur les acides gras polyinsaturés ω6. Il est formé en permanence en faible quantité en condition physiologique mais sa production augmente en situation pathologique en lien avec la peroxydation lipidique accrue. Ainsi, en situation de stress oxydant, le taux plasmatique et intracellulaire sont considérablement augmentés comme par exemple dans les maladies rhumatologiques sévères (Imazato *et al.* 2014).

4.1.1.2. Voie de synthèse enzymatique des éicosanoïdes

Les éicosanoïdes sont produits par deux voies enzymatiques qui impliquent les cyclo-oxygénases (**COX**) et lipo-oxygénases (**LOX**) produisant respectivement les prostaglandines et les leucotriènes **(Figure 42)**. L'acide arachidonique métabolisé par la voie du cytochrome P450 (**CYP450**), couplé soit à une **ω-hydroxylase**, soit à une **epoxygénase.**

L'ω-hydroxylase converti l'acide arachidonique en acide hydroxy-eicosatétraénoïque (HETEs) et l'**epoxygénase** le converti en acide époxy-eicosatriénoïque (EETs). Il existe 8 EETs au total produits sous l'action des isoformes CYP2C et CYP 2J au niveau des cellules endothéliales, des astrocytes et des myocytes (Panigrahy *et al.* 2010). Les EETs sont ensuite métabolisés par une époxyhydrolase en acide dihydroxyeicosatriénoïque (DHETs) moins actifs. La synthèse des HETEs, notamment de la 20-HETE (vasoconstrictrice) est contrôlée par un mécanisme de rétrocontrôle impliquant les MAPK et la PLA_2.

Plus de 90% des EETs sont incorporés dans les phospholipides de la membrane cellulaire et dans les lipoprotéines de basse densité (Panigrahy *et al.* 2010). Ils peuvent agir comme les acides gras à longue chaîne et se lier à des protéines réceptrices et à des récepteurs activés *via* PPARγ et PPARα par un mécanisme intracellulaire (Panigrahy *et al.* 2010).

4.1.1.3. Voie de synthèse non enzymatique des éicosanoïdes

Les isoprostanes, analogues des prostaglandines, sont produits *in vitro* et *in vivo via* la peroxydation de l'acide arachidonique libre ou estérifié par une attaque radicalaire **(Figure 42)** (Basu *et al.* 2013; Södergren, Vessby, and Basu 2000).

Les plus étudiés, les F_2-isoprostanes proviennent de l'acide arachidonique. L'attaque radicalaire par l'oxygène peut avoir lieu sur différents atomes de carbone et conduire ainsi à quatre séries de composés (F_2-isoprostanes des séries 5, 8, 12 et 15) et 64 isomères. Dans les liquides biologiques et les tissus, les plus abondantes sont les isoprostanes de la série 5 puis celles de la série 15 (Li *et al.* 1999). Le composé le plus étudié est le 8-isoprostaglandine $F_{2\alpha}$ (8-isoPGF2α) (Morrow and Roberts 1997).

Les isoprostanes sont d'excellents marqueurs du stress oxydatif mis en évidence notamment, dans l'asthme, le diabète, la maladie d'Alzheimer (Walsh *et al.* 2000). Ils sont formés au niveau de la membrane lipidique et relargués dans la circulation sanguine puis filtrés et excrétés au niveau rénal où ils sont facilement quantifiés.

4.1.2. Oxydation des protéines

Les fonctionnalités des protéines peuvent être affectées par la modification de leur structure par oxydation des acides aminés (Brot and Weissbach 2000; Finkel 2000). Les protéines oxydées perdent leurs propriétés biologiques, deviennent beaucoup plus sensibles à l'action des protéases et peuvent se fragmenter ou se dénaturer du fait de l'altération de leurs structures primaire et secondaire. Certains acides aminés sont particulièrement sensibles à l'oxydation comme la cystéine (Cyst) et son groupement thiol. La fonction thiol de la cystéine peut être régénérée après oxydation *in vivo* par le glutathion réduit ou la thiorédoxine réduite. L'oxydation réversible de la cystéine joue un rôle important dans l'activation ou l'inactivation de certaines protéines (Huggins *et al.* 1993). Les protéinés carbonylées et les nitrotyrosines sont stables ce qui en fait des marqueurs biologiques utiles et fiables du stress oxydant (Stadtman *et al.* 2002). Lors d'un stress oxydant important, les cellules sont incapables d'éliminer par protéolyse les protéines carbonylées accumulées, ce qui induit à des modifications comme celles observées dans le diabète. L'histidine, la proline, l'arginine et la lysine sont également sensibles à l'attaque oxydative. La formation de nitrotyrosines est due au peroxynitrite hautement toxique produit par la réaction du monoxyde d'azote et du superoxyde.

4.1.3. Oxydation de l'ADN

Il est bien établi que les ERO peuvent induire un large spectre de modifications de l'ADN, tels que notamment l'oxydation des bases puriques et pyrimidiques, les cassures simple et double-brin (Cadet *et al.* 1999; Muller *et al.* 1998). Les ERO constituent la plus importante source endogène de dommages à l'ADN. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est la cible privilégiée des ERO (Stevnsner *et al.* 2002).

Le radical hydroxyle est connu pour réagir avec tous les composants de la molécule d'ADN et endommager à la fois les bases puriques et pyrimidiques et le squelette désoxyribose (Halliwell, Clement, and Long 2000). Ceci déterminé par le marquer 5-

hydroxyméthyluracil (5HMU). La lésion de l'ADN la plus étudiée est la formation de la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG). En outre, les produits de la lipoperoxydation (MDA, 4-HNE) réagissent avec l'ADN pour former divers types d'adduits. Ces diverses modifications du matériel génétique représentent la première étape de la mutagenèse et de la cancérogenèse (Marian Valko *et al.* 2007).

4.2. Implication du stress oxydant en pathologie

Lorsque la production de pro-oxydant devient trop importante, l'état d'équilibre est rompu. Les défenses anti-oxydantes sont submergées, la cellule est alors dans un état de stress oxydant (Basu 2010). Cet état est reconnu comme favorisant l'apparition de pathologies chroniques. Ainsi, l'athérosclérose, le diabète de types 1 et 2, l'hypertension, l'obésité s'accompagnent d'une réponse inflammatoire corrélée positivement au stress oxydant (Basu *et al.* 2013). Il en est de même pour certaines pathologies neurodégénératives, les fibroses pulmonaires et les cancers (Thannickal and Fanburg 2000).

4.2.1. Obésité

Un état de stress oxydant a été rapporté au cours de l'obésité, aussi bien dans les modèles animaux que chez l'homme (Fernández-Sánchez et al. 2011). Ainsi, des protéines carbonylées, modifiées par un aldéhyde issu de l'oxydation des lipides, le 4-hydroxynonénal, ont été identifiées dans le tissu adipeux de souris obèses insulino-résistantes, par analyse protéomique et spectrométrie de masse (Grimsrud *et al.* 2007). Plusieurs protéines impliquées dans la réponse au stress cellulaire, peuvent subir une carbonylation, processus directement lié à l'oxydation, témoignant ainsi de la présence d'un stress oxydant (Grimsrud *et al.* 2007). Une étude récente mené sur des rats rendus obèses a confronté le lien entre obésité et stress oxydant (Franco *et al.* 2013). Ces rats, comparativement aux animaux témoins, ont développé une obésité viscérale accompagnée d'hypertension et de dyslipidémie. Les animaux présentaient également une stéatose hépatique et un état de stress oxydant objectivé par l'augmentation des TBARS, et par la diminution de l'activité des enzymes anti-oxydantes (SOD, GSH, GPx) au niveau plasmatique et hépatique. Parmi les rats obèses, ceux ayant reçu du resvératrol, antioxydant naturel retrouvé en particulier dans le raisin, ne présentaient pas ces altérations liées au stress oxydant.

La production de H_2O_2 est augmentée seulement dans le tissu adipeux blanc de souris KKAy obèses diabétiques et pas dans les autres tissus suggérant que le tissu adipeux est le site principal de production d'ERO (Furukawa *et al.* 2004). L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la NADPH oxydase diminue la production de ERO dans le tissu adipeux de souris KKAy et améliore l'hyperinsulinémie, l'hyperglycémie, l'hypertriglycéridémie et la stéatose hépatique. De même on observe une diminution du TNFα et une augmentation de l'expression d'adiponectine, suggérant que la diminution du stress oxydant pourrait normaliser la réponse adipocytaire. De plus, une augmentation de la production des ERO au niveau des artères prélevées chez des souris obèses en comparaison à des animaux normopondéraux a été notée (Ketonen, Pilvi, and Mervaala 2010).

Chez l'homme l'association de l'obésité à un état de stress oxydant a été montrée par Keaney *et al*., (Keaney *et al.* 2003) dans la cohorte Framingham (3000 sujets obèses) grâce au

suivi de la concentration des isoprostanes urinaires (Morrow 2000). Ceci confirment les observations précédemment rapportées chez des populations de moindre effectif (Block e*t al.* 2002; Davì *et al.* 2002; Zemel *et al.* 2010; Dorjgochoo *et al.* 2011; Il'yasova *et al.* 2012; D'Archivio *et al.* 2012). De même, une sensibilité accrue du plasma à l'oxydation à était décrite chez des sujets obèses (Fidler *et al.* 2011). Les sujets obèses présentant les plus fortes valeurs d'IMC semblent montrer le plus fort niveau de stress oxydant (Olusi 2002; Pihl *et al.* 2006). Réciproquement, chez des sujets obèses, une perte de poids suite à une modification du régime alimentaire et une activité physique accrue permet de diminuer le stress oxydant ainsi que la surcharge pondérale. De Marchi *et al.,* (De Marchi *et al.* 2013) soulignent le rôle clé de la protéine kinase C (PKC) sensible au stress oxydant et impliquée dans l'obésité. L'augmentation des taux plasmatique de TBARS et de 8-epi-prostaglandine F2α est corrélée avec l'IMC et le tour de hanche (Olusi 2002; Keaney *et al.* 2003).

Au cours de l'obésité, l'accumulation excessive de lipides stimule le développement du tissu adipeux en activant la prolifération des pré-adipocytes, leur différenciation en adipocytes et en augmentant la taille des adipocytes. Or, il a été montré que le stress oxydant induit par le peroxyde d'hydrogène favorise la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes, en régulant positivement des activateurs transcriptionnels intervenant dans le programme de différenciation adipocytaire (Yang *et al.* 2012). La concentration plasmatique en adiponectine, adipokine possédant des propriétés anti-inflammatoire et protectrice est inversement corrélée aux indicateurs du stress oxydant (Furukawa *et al.* 2004).

4.2.2. Cancer mammaire

Le stress oxydatif semble être une caractéristique importante dans la cancérogenèse mammaire (Basu *et al.* 2013; Cortes *et al.* 2011). Des travaux récents de Maddedu *et al,.* ont montré que les paramètres de stress oxydant ont été positivement corrélés au cancer du sein chez des femmes en post-ménopause (Madeddu *et al.* 2014).

Les ERO sont des carcinogènes potentiels puisqu'ils facilitent la mutagenèse, la promotion des tumeurs et leur progression (Dreher and Junod 1996; Ha *et al.* 2000). Ainsi des cellules saines exposées au peroxyde d'hydrogène et au superoxyde, montrant une augmentation de l'expression de gènes de croissance (Burdon 1995). De plus, certaines cellules cancéreuses produisent des quantités notables d'ERO (Ha *et al.* 2000). Le NO participe également à la croissance tumorale et à la perméabilité vasculaire (Ziche *et al*. 1997), le potentiel angiogénique ou l'augmentation de la perméabilité vasculaire induit par le NO peut faciliter la croissance rapide de tumeurs solides.

Dans des cellules épithéliales cancéreuses mammaire en culture MCF-7, le taux de 5HMU, est plus élevé que dans des cellules non cancéreuses MCF-10A (Djuric, Everett, and Luongo 1993). Cette production résulte d'un défaut d'action des systèmes antioxydants dans la cellule tumorale. Cet excès d'ERO dans la cellule cancéreuse peut maintenir une croissance tumoral incontrôlée associée à l'oxydation de l'ADN et l'accumulation des mutations, en favorisant les tumeurs à caractère invasif et l'apparition des métastases (Galeotti *et al.* 1991).

A l'aide d'un modèle de co-culture en 2D, Martinez-Outschoorn UE *et al*. (Martinez-Outschoorn *et al.* 2010) ont montré que les fibroblastes hTERT co-cultivés avec les cellules

cancéreuses mammaires MCF-7, ont une production d'ERO et de NO capable d'entraîner une instabilité génomique avec des cassures de l'ADN des cellules MCF-7. Ceci contribue l'effet «bystander» ou effet de voisinage, est un phénomène par lequel des dommages cellulaires tels que des aberrations chromosomiques et des mutations sont exprimés dans les cellules (les fibroblastes) à proximité des cellules cancéreuses. Par conséquent, le traitement des cellules avec des antioxydants (tels que la N-acétyl-cystéine, la metformine) ou des inhibiteurs de NO semble être suffisant pour renverser le phénotype des fibroblastes associé au cancer (Martinez-Outschoorn *et al.* 2010).

Globalement, au niveau du tissu mammaire, l'activation des voies de signalisation de la leptine, est associée à une augmentation des médiateurs cellulaires de l'inflammation telles que, les prostaglandines PGE2, PGF2 et les F2-isoprostanes, *via* l'induction de l'activité COX-2 et une production accrue d'ERO (Basu *et al.* 2013). L'étude de lignées cellulaires tumorales confirme la présence de PGE2, surtout dans les lignées les plus invasives (Schrey and Patel 1995).

III. Impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif

L'hypothèse de l'implication de la leptine dans le statut oxydatif cellulaire découle des données aussi bien cliniques qu'expérimentales. En effet, la leptine est une adipokine produite par le tissu adipeux, dérégulée dans l'obésité. Il existe une corrélation entre la concentration plasmatique de leptine, l'indice de masse corporelle (IMC) et le pourcentage de masse grasse. L'obésité s'accompagne d'un stress oxydant important avec une diminution des défenses antioxydantes (Vincent, Bourguignon, and Vincent 2006) associé à un état inflammatoire à bas bruit (Suzuki *et al.* 2013).

De plus, des études ont mis en évidence un lien étroit entre l'obésité mais également le surpoids et l'augmentation de la production plasmatique de molécules pro-oxydantes (Keaney *et al.* 2003) ainsi le taux urinaire d'isoprostanes augmente parallèlement à l'IMC (Pou *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent que le tissu adipeux est capable de produire des ERO. En effet, les enzymes pro-oxydantes telles que les NADPH oxydases, sont présentes au niveau de la membrane adipocytaire (Krieger-Brauer, Medda, and Kather 1997), et produisent des espèces réactives de l'oxygène, qui peuvent être responsables de l'oxydation des lipides constituant les membranes, notamment les acides gras polyinsaturés. Cette augmentation de la production d'ERO peut en outre s'accompagner d'une réduction de la réponse anti-oxydante (Furukawa *et al*. 2004). Ainsi, La production d'ERO, initiée par la leptine, entraîne des modifications oxydatives au niveau de l'ADN favorisant la formation des bases oxydées la plus abondante est la 8-hydroxy-2-désoxyguanosine (8-OHdG) et des biomarqueurs de la peroxydation lipidique (Basu *et al.* 2013).

Néanmoins, à l'heure actuelle il n'a jamais été montré que le stress oxydatif des cellules épithéliales mammaires néoplasiques avait un lien direct avec la leptinémie. Partageant de nombreuses voies de signalisation (Arrigo 1999; Barr, Lane, and Taylor 1999), il est envisageable que la leptine qui induit la prolifération de cellules puisse également moduler leur métabolisme *via* une perturbation de leur statut oxydatif.

Tableau 3: Impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif : modèles expérimentaux *in vitro* utilisés.

Modèle *in vitro*	Concentrations d'adipokines	Traitement	Les effets observés	Références
HUVEC : Cellules endothéliales primaires de la veine de cordon ombilical humain	Leptine (ng/ml) : 0, 1, 10,100	NAC : 30 mmol/l (antioxydant) (pour ↓ production d'ERO)	↑ : production des ERO, dose dépendante ↑ : activité NF-kB ↑ : expression MCP-1 ↑ : expression et activité de JNK/SAPK ↓ : effet de la leptine avec NAC	Bouloumié *et al.* (1999)
BAEC : Cellules endothéliales vasculaires d'aorte bovine	Leptine (ng/ml) : 10	leptine à 10ng/ml pendant 45min	↑ : production des ERO ↑ : activité CPT-1 ↑ : oxydation AG ↓ : inhibe ACC ↑ : production de MCP-1 ↑ : activité PKA	Yamagishi *et al.* (2001)
3T3-L1 : Cellules pré-adipocytes murines		Stimulées avec : - Xanthine oxydase - Hypoxanthine - H_2O_2 - 10mM NAC	↑ : production des EROs ↑ : ARNm PAI-1, IL-6 et MCP-1 avec H_2O_2 ↑ : expression d'adiponectine avec NAC	Furukawa *et al.* (2004)
3T3-L1 : Cellules pré adipocytes murines		Leptine pendant 24h : [10^{-1}M, 10^{-9}M, 10^{-6}M]	↓ : prolifération cellulaire ↑ : activité SOD et GSH-Px ↑ : activité CAT dose dépendante ↓ : MDA dose dépendante	Zwirska-Korczala *et al.* (2007)
HUVEC : Cellules endothéliales primaires de la veine de cordon ombilical humain	Leptine (ng/ml) : 1, 10, 100		↑ : ARNm COX-2 ↑ : protéine COX-2 - : ARNm et protéine COX-1 ↑ : synthèse de 6 keto-PGF1α et PGE2	Garonna *et al.* (2011)
RINm : Cellules pancréatiques d'insulinomes de rat MIN6 : Cellules pancréatiques d'insulinomes de souris	Leptine (ng/ml) : 10, 100 Adiponectine (nM) : 1, 100 Leptine (ng/ml) : 10, 100 Adiponectine (nM) : 1, 100	Stimulées avec (pendant 40 min) : - H_2O_2 - NAC Stimulées avec (pendant 40 min) : - H_2O_2 - NAC	↑ : TBARS ↑ : production des ERO dose dépendante avec la leptine et adiponectine ↑ : prolifération des cellules β ↑ : viabilité des cellules β avec leptine et adiponectine ↓ : ARNm SOD avec leptine et adiponectine ↓ : activité SOD avec adiponectine ↑ : activité GPx et CAT avec H_2O_2	Chetboun *et al.* (2012)
MCF-7 : Cellules épithéliales cancéreuses mammaires	Leptine (ng/ml) : 0, 50	24h de leptine à 0, 50 (ng/ml)	↑ : prolifération cellulaire avec leptine ↑ : production d'ATP ↓ : production des ERO ↓ : protéines carbonylées ↓ : ARNm de PGC-1α ↑ : protéine MFN2 et DRP1	Blanquer-Rosselló *et al.* (2015)

↑, augmentation ; ↓, diminution ; - : pas d'effet ; NAC : anti-oxydant N-acétylcystéine ; TBARS : thiobarbituric reactive substances ; MFN2 : Mitofusin-2 ; DRP1 : Dynamin-1-like protein ; SAPK : stress-activated protein kinase ; AG : acides gras ; PGC-1α : peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1α; ACC : acétyl CoA carboxylase ; PKA : protéine kinase A ; 6 keto-PGF1α : 6 keta-prostaglandine F1α ; PGE2 : prostangalandine E2 ; CPT-1 : Carnitine palmitoyltransferase 1 ; ATP : Adénosine Tri Phosphate ; COX-1 : Cyclooxygenase-1 ; COX-2 : Cyclooxygenase-2 ; ERO : espèces réactives d'oxygène ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; MDA : malondialdéhyde ; PAI-1 : plasminogen activator inhibitor-1 ; IL-6 : Interleukine 6 ; MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1.

1. Effets de la leptine dans la modulation du statut oxydatif *in vitro*

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées pour étudier les effets de la leptine au niveau cellulaire (cellules endothéliales vasculaires d'origine humaine telles que la lignée HUVEC ou bovine telles que les cellules BAEC, des cellules épithéliales mammaires humaine les MCF-7, des pré-adipocytes murines 3T3-L1, des lignées pancréatiques d'insulinomes provenant de rongeurs telles que les cellules RINm et MIN6) (**Tableau 3**).

Les études *in vitro* montrent que la leptine peut agir sur le statut oxydatif cellulaire par la production des espèces pro-oxydantes. Dans un modèle *in vitro* de cellules endothéliales d'aortes bovines (BAEC), la leptine augmente la production des ERO telles que l'anion superoxyde (O_2•-) de manière dose dépendante (Yamagishi *et al.* 2001) et induit en parallèle une activation de l'enzyme mitochondriale CPT-1 (la carnitine palmitoyltransférase), la surproduction de MCP-1 et l'inhibition de l'acétyl-CoA (ACC). Ces résultats suggèrent que la leptine stimule la production des ERO en augmentant l'oxydation des acides gras par l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Yamagishi *et al.* 2001).

Les cellules endothéliales HUVEC expriment le récepteur fonctionnel Ob-Rb de la leptine. Des résultats montrent que la leptine augmente la production des espèces réactives de l'oxygène (ERO), cette production était proportionnelle à la dose de leptine testée (Bouloumie *et al*. 1999). L'activation des récepteurs de la leptine dans la cellule endothéliale était liée à la stimulation d'ERK1/2. La leptine induit à l'activation d'une autre famille des MAP kinases, les kinases JNK/SAP. NF-kB, facteur de transcription redox sensible, est également activé par la présence de la leptine de manière dose dépendante. Cette activation est associée à l'expression accrue de la protéine MCP-1. Ces effets de la leptine, sont contrecarrés par un antioxydant, la N-acétylcystéine (NAC). Ainsi, les ERO sont des seconds messagers de la signalisation leptinique dans les cellules endothéliales. Le stress oxydatif chronique induit par l'hyperleptinémie peut contribuer au risque pro-athérogène et participer au développement d'une pathologie vasculaire (Bouloumie *et al.* 1999).

Dans les pré-adipocytes la production des ERO est sensiblement augmentée au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1. Cette production passe par la voie NADPH oxydase (NOX). La NADPH oxydase semble être la principale source des ERO dans les adipocytes, et contribuer à l'augmentation des espèces pro-oxydantes dans le tissu adipeux du sujet obèse. Furukawa *et al.* (Furukawa *et al.* 2004) ont examiné si les acides gras peuvent induire la production d'ERO dans les adipocytes 3T3-L1. Ils ont constaté que cette production est significativement augmentée par une incubation avec concentration élevée d'acide linoléique *via* l'activation de la NADPH oxydase (Furukawa *et al.* 2004).

Dans un autre modèle de cellules pancréatiques murines, le traitement par la leptine induit un déséquilibre de l'homéostasie redox par la production d'ERO NADPH oxydase dépendante, cet effet est aboli par un traitement antioxydant (NAC). En outre la leptine réduit l'expression de la SOD et diminue l'activité des enzymes anti-oxydantes SOD et catalase et en revanche augmente l'activité de GPx en présence de H_2O_2 et la viabilité cellulaire. Ces données montrent l'importance de l'état redox dans le maintien de la prolifération des cellules β (Chetboun *et al.* 2012).

Tableau 4 : Impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif : des modèles expérimentaux *in vivo* utilisés.

Modèle *in vivo*	Concentration de leptine	Traitement	Les effets observés	Références
Rats wistar groupe contrôle groupe avec ttt leptine groupe avec contrôle de la prise alimentaire	Leptine (ng/ml) : 3.98±0.15 12.26±0.82 1.93±0.15	Leptine (0,25 mg/kg) deux fois /j pendant 7j	↑ : activité de PON1 avec la leptine ↑ : taux 8-ispoprostanes urinaire avec la leptine ↑ : MDA, 4-HNE, hydroperoxydes avec la leptine vs contrôle	Beltowski *et al.* (2003)
Rat spague-Dawley groupe contrôle groupe avec syndrome d'ischémie reperfusion (IR) rénale groupe IR +Leptine		Leptine (10µg/kg)	↑ : protéine TNF-α pour groupe traité avec leptine vs IR groupe ↓ : MDA avec le traitement de leptine vs IR groupe ↓ : taux PC contrôle vs IR groupe ↓ : taux SH contrôle vs IR groupe ↓ : taux nitrite (NO) contrôle vs IR groupe	Erkasap *et al.* (2004)
Souris C57BL/6 groupe contrôle groupe obèse et diabétique (souris KKAy)	–		↑ : production ERO plasmatique et tissulaire chez souris KKAy vs contrôle ↑ : peroxydation lipidique dans TAB des souris KKAy vs contrôle ↑ : ARNm de la NADPH oxydase dans TAB des souris KKAy ↓ : ARNm enzymes anti-oxydantes chez souris KKAy ↓ : activité des enzymes anti-oxydantes dans le TA des souris KKAy	Furukawa *et al.* (2004)
Rats Wistar groupe contrôle régime standard groupe avec régime hyper lipidique	Leptine (ng/ml) : 3.36 ±1.01 14.26 ± 2.01		↑ : masse grasse ↑ : poids corporel ↑ : apport calorique ↑ : taux d'insuline ↑ : glucose ↑ : HOMA ↑ : triglycérides ↑ : MDA (hépatique) ↑ : ARNm leptine et G3PDH ↑ : poids foie	Milagro *et al.* (2006)
Souris C57BL/6 souris *ob/ob* groupe C57BL/6 à jeun groupe C57BL/6 nourrie avec régime standard (RS) groupe C57BL/6 nourrie régime hyperlipidique (DIO)		Avec ou sans Rosiglitazone (agoniste des PPARγ) Leptine : 420 ng μl^{-1} (que pour le groupe *ob/ob*)	↑ : taux de leptine DIO ↑ : production d'ERO dans les neurones POMC du groupe RS et DIO, corrélée au taux de leptine ↑ : expression PPARγ DIO ↓ : production d'ERO avec rosiglitazone	Diano *et al*. (2011)
Souris C57BL/6 groupe contrôle groupe obèse 6 régime hyper lipidique (HL) groupe résistant à l'obésité (OR)	–		↑ : poids corporel groupe HL vs groupe contrôle et RO ↑ : gras abdominal groupe HL vs groupe contrôle et RO ↑ : ARNm de leptine, IL-6, PAI-1, MMP-9, NF-kb ↓ : ARNm : adiponectine, IFN-γ ↑ : ARNm NOX-1 et NOX-2 ↑ : protéines NOX-1 et NOX-2 ↑ : ARNm Bax, Caspase 3 et Bcl 2	Wang *et al.* (2012)

Pour déterminer l'impact de la leptine dans le métabolisme mitochondrial des cellules épithéliales mammaires MCF-7, Blanquer-Rosselló *et al.* (Blanquer-Rosselló *et al.* 2015) ont mesuré l'expression des marqueurs clés de la biogenèse et de la fonction mitochondriale. Les résultats obtenus suggèrent que la leptine favorise la biogenèse de la mitochondrie, entraîne un meilleur contrôle du stress oxydatif, une production accrue d'ATP, la stimulation de la prolifération cellulaire et enfin la diminution de l'expression d'un modulateur important du métabolisme, le facteur PGC-1α (peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1α). Ces changements métaboliques observés au niveau des mitochondries des cellules MCF-7 peuvent être associés avec l'action de la leptine dans la survie des cellules cancéreuses mammaires (Blanquer-Rosselló *et al.* 2015).

2. Effets de la leptine dans la modulation du statut oxydatif *in vivo*

De nombreuses études expérimentales *in vivo* ont mis en évidence l'effet pro-oxydant de la leptine (**Tableau 4**). Chez le rat, l'administration de leptine diminue l'activité des enzymes anti-oxydantes contenues dans les lipoprotéines telles que PON1 (paraxonase-1) et PAF-AH (platelet activating factor-acetylhydrolase) (Ma *et al.* 2014) (Beltowski *et al.* 2005). Dans un autre modèle de rat rendu obèse avec un régime obésogène (DIO) pendant dix semaines, Weiwei Ma *et al.* (Ma *et al.* 2014) ont constaté que ces animaux présentaient des dommages oxydatifs élevés au niveau circulant et tissulaire, par rapport aux rats témoins nourris avec un régime standard et aux rats OR (résistants à l'obésité). Ces résultats sont corrélés avec la concentration plasmatique de la leptine (Ma *et al.* 2014).

Ces observations ont été par la suite confirmées et enrichies par des résultats montrant un déclenchement potentiel d'une résistance à l'insuline par la production des ERO (Matsuzawa-Nagata *et al.* 2008).

Bilbao MG *et al*. (Bilbao *et al.* 2015) ont montré que la leptine peut moduler *in vivo* le statut oxydatif du tissu ovarien pendant le processus d'ovulation, en fonction de la concentration plasmatique. A faible concentration, la leptine semble jouer un rôle protecteur contre le stress oxydant par l'activation des enzymes anti-oxydantes comme la SOD, alors qu' à forte dose, elle entraîne la mort cellulaire *via* l'augmentation de l'expression des marqueurs d'apoptose tels que Bcl2, Bax et caspase-3 (Bilbao *et al.* 2015).

Contrairement à la ghréline qui module la production d'ERO dans les neurones orexigènes NPY/AgRP *via* la protéine mitochondriale UCP2 (Andrews *et al.* 2008), la leptine semble agir dans les neurones anorexigènes POMC du noyau arqué des souris *ob/ob* (Diano and Horvath 2012).

De même, l'effet de la leptine est potentialisée par le Ca^{2+} intracellulaire comme la ghréline (Qiu *et al.* 2010; Drougard *et al.* 2015). En effet Diano *et al.* (Diano *et al.* 2011) ont mis en évidence le niveau après un traitement de 48 h de leptine, une augmentation des ERO dans les neurones à POMC. Cette augmentation de production est retrouvée dans les neurones POMC des souris sauvages C57BL/6 (WT) nourries par rapport aux souris à jeun, montrant un rôle clé de signalisation des EROs au niveau des neurones POMC, selon l'état nutritionnel. En outre, le niveau d'ERO dans les neurones POMC est en corrélation avec le taux circulant de leptine chez les souris WT et les souris *ob*/*ob*. Toutefois, cette corrélation n'est pas

			↑ : ARNm anti-oxydant : HO-1 et NQO 1	
Souris C57BL6/J groupe contrôle avec RS groupe régime obésogène DIO groupe de souris *ob/ob*		-CCL4 : pour induire stéatose hépatique (pendant 16 semaines) - anticorps anti-leptine - inhibiteurs spécifiques : 1400W (inhibe iNOS), apocynine (inhibe Nox)	↑ : taux plasmatique de leptine avec régime DIO ↑ : stress oxydant dans le foie des souris DIO ↓ : des marqueurs du stress oxydant avec les inhibiteurs ↑ : production EROs chez souris ob/ob avec leptine	Chatterjee *et al*. (2013)
Rat spague-Dawley groupe contrôle (CON) groupe modèle stress oxydant (MOD) groupe obèse (DIO) groupe résistant à l'obésité (DR)	Leptine (ng/mg) 3.86 ± 0.64 ↑ : 6.00 ± 0.62 ↑: 5.60 ± 0.40 ↑ 6.21 ± 0. 42	d-Galactose (pour induire stress oxydant dans le groupe MOD)	↑ : Peroxydation lipidique dans groupe DIO et DR MDA CAT ↑ : leptine tissulaire dans groupe DIO, MOD et DR	Weiwei *et al.* (2014)
Rat		Leptine : à faible dose Leptine : à forte dose	↑ : stimule ovulation ↑ : activité SOD ↓: expression caspase 3 ↓ : production des EROs ↓ : expression de Bax ↓ : taux GSH ↓ : inhibe ovulation ↓ : activité SOD ↑ : expression caspase 3	Bilbao *et al.* (2015)

↑, augmentation ; ↓, diminution ; - : pas d'effet ; HOMA : homeostasis model assessment ; MDA : malondialdehyde ; SOD : superoxyde dismutase ; ERO : espèces réactives d'oxygène ; RS : régime standard ; GSH : glutathion ; RHF : régime high fat ; PPARγ : peroxysome proliferator-activated receptor γ ; POMC : pro-opiomélanocortine ; CON : contrôle ; MOD : ; DR : DIO : diet induced obesity ; TAB : tissu adipeux blanc ; TA : tissu adipeux, ; HFD : high fat diet ; OR : ; MMP-9 : Métalloprotéinase matricielle 9 ; NF-kb : nuclear factor κB ; IFN-γ : interferon γ ; NOX-1 : NADPH oxidase 1 ; NOX-2 : NADPH oxidase2 ; Bcl 2 ; HO-1 : hème oxygenase 1 ; NQO 1 ; G3PDH : ; PON1 : ; 4-HNE ; CCL4 : ; iNOS : ; TNF-α : tumor necrosis factor α. ; IR : syndrome d'ischémie reperfusion ; PC : protéines carbonylées ; SH : ; NO

retrouvée chez les souris nourries avec un régime obésogène. Les auteurs ont également noté que la réduction des ERO induite par un agoniste de PPARγ (la rosiglitazone) entraîne une diminution de l'activité des neurones POMC et induit l'activité des neurones NPY/AgRP des souris nourries avec le régime hyperlipidique. A l'inverse la production d'EROs au niveau neuronale induit l'activation des neurones POMC et donc la diminution de la prise alimentaire (Diano *et al*., 2011). Cette étude montre que le niveau des ERO intracellulaire peut inverser la fonction des neurones POMC et moduler l'effet de leptine dans le contrôle de la prise alimentaire (Diano *et al.* 2011; Drougard *et al.* 2015).

Dans un modèle de stéatose hépatique non-alcoolique (NASH) chimiquement induite par l'administration chronique de tétrachlorure de carbone (CCL4) chez des souris C57BL/6 nourries avec un régime obésogène (DIO) et des souris *ob/ob,* le stress oxydant est significativement plus élevé dans le foie des souris DIO, par rapport aux souris *ob/ob* ou chez les souris DIO traitées avec un anticorps anti-leptine. Le traitement des souris *ob/ob* avec la leptine restaure un état de stress oxydant. De plus ce traitement induit une activation des macrophages, les cellules küpffer dans le tissu hépatique des souris obèses. Cette activation entraîne une production plasmatique élevée des cytokines pro-inflammatoires MCP-1 et TNF-α (Chatterjee *et al.* 2013). Dans le même modèle de souris, les marqueurs pro-oxydants sont considérablement réduits suite à l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'iNOS (1400W), de la NADPH oxydase (l'apocynin) et la xanthine oxydase (l'allopurinol) et également chez des souris déficientes en p47-phox (Chatterjee *et al*. 2013). Ces résultats sont corrélés avec la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires, TNF-α et MCP-1(Chatterjee *et al.* 2013).

Cette étude a mis en évidence, pour la première fois, d'une part, le rôle de la leptine dans la stimulation des cellules immunitaires au niveau du foie stéatosique (les cellules de küpffer) et d'autre part, l'activation des systèmes pro-oxydants telles que l'iNOS et la NOX (Chatterjee *et al*. 2013).

Dans certains modèles expérimentaux, la leptine semble avoir un effet protecteur vis-à-vis, du stress oxydant et stimulateur de la réponse anti-oxydante. En effet il a été montré que chez la souris *ob/ob* l'activité réduite des enzymes anti-oxydantes telles que la catalase (CAT) et la glutathion peroxydase (GPx) est normalisée après administration de leptine (Watson *et al.* 1999). Dans une autre étude, réalisée chez des rats présentant un syndrome d'ischémie-reperfusion (IR) après transplantation rénale, il est mis en évidence une diminution du taux de MDA, des protéines carbonylées et des protéines à groupement thiols (SH) après traitement par la leptine (Erkasap *et al.* 2004). Ceci traduit une diminution de la production des ERO au cours de la phase de reperfusion (Erkasap *et al.* 2004). Le prétraitement avec la leptine semble limiter les lésions du tissu rénal liées au syndrome IR en diminuant la production de TNF-α, la libération d'ERO au niveau tissulaire et la synthèse de monoxyde d'azote (NO).

3. Etudes cliniques évaluant les effets de la leptine sur le statut oxydatif

Plusieurs études cliniques ont évalué les effets de la leptine dans la perturbation de l'équilibre redox (**Tableau 5**). Bien que le surpoids et l'obésité soient souvent associés à une perturbation du métabolisme et principalement à une modification du profil lipidique, ces perturbations jouent également un rôle important dans l'intensification du phénomène

Tableau 5 : Etudes cliniques évaluant les effets de la leptine sur le statut oxydatif

Cas clinique	Concentrations plasmatique de leptine	effets observés	Références
140 sujets (69 M et 71 F âge = 56 ± 13) 20 (Kg/m2) < IMC < 45(Kg/m2)	–	↓ : Adiponectine avec IMC ↑ : Peroxydation lipidique avec IMC ↑ : taux TBARS p avec IMC ↑ : taux 8-epi-PGF2α avec IMC	Furukawa S *et al.* (2004)
groupe contrôle (n=60), âges (8.96 ± 1.05) (M/F) 25/35, IMC = (17.51 ± 2.33) (Kg/m2) groupe obèses (n=60), âges (8.80 ±1.26) (M/F) 25/35, IMC = 24.03±4.09 (Kg/m2)	Leptine (ng/ml) = 7,96 ±5,15 Leptine (ng/ml) = 19,89 ± 7,40	↑ : taux Homocystéine chez obèses ↑ : taux MDA chez obèses ↓ : taux SOD chez obèses ↓ : taux GSH-Px chez obèses	Ustundag *et al*. (2007)
groupe contrôle : n= 134, IMC = 26,2±4, âge = 50,8±6,1 groupe diabétiques : n= 178, IMC = 29,1±5,2 ; âge = 52,4±5,9	Leptine ng/ml : 8,6 (2,9-25,2) 12,9 (3,8-44)	↑ : taux Anion superoxyde (O_2•-) dans groupe diabétique ↑ : taux TBARS dans groupe diabétique ↑ : taux SOD dans groupe diabétique ↓ : taux SH group dans groupe diabétique	Stefanović *et al.* (2007)
148 femmes groupe contrôle : n= 102, poids normale, IMC (Kg/m2) = 20.4±1.5, âge= 49.7±3.6 groupe surpoids : n=46, IMC (Kg/m2)= 25.4±2.0, âge= 50.0±3.7	Leptin (ng/ml) 11,3±6,0	↑ : taux urinaire de 8-epi-PGF2α dans groupe surpoids ↓ : Adiponectine dans groupe surpoids ↑ : taux PAI-1 dans groupe surpoids ↑: Log CRP dans groupe surpoids	Wu *et al.* (2009)
groupe contrôle, femmes non-porteuses de tumeurs mammaires (n= 50) avec un IMC = 23,80 ± 1,3 (Kg/m2) groupe malade, femmes porteuses de tumeurs mammaires (n= 38) avec un IMC = 27,84 ± 1,7 (Kg/m2)	Leptine ng/ml : ↑7,96 ± 1,33 ↑13,75 ± 1,79	↑ : taux d'insuline, triglycérides et LDL-Cholestérol chez le groupe malade vs groupe contrôle ↓ : des taux plasmatiques des vitamines anti-oxydantes vitamine C et E ↑ : hydroperoxydes plasmatique ↓ : activité SOD et GPx ↑ : concentration de leptine chez groupe malade ↑ : stress oxydaif chez groupe malade	Badid *et al.* (2010)
groupe patientes porteuses de tumeurs mammaires ER+ post-ménopausées (n=156) avec un IMC = 26,7 ± 4,6 (Kg/m2), âges = 65,8 ± 5,4 groupe patientes porteuses de tumeurs mammaires ER- post-ménopausées (n=65) avec un IMC = 24,6 ± 3,9 (Kg/m2), âges = 64,8 ± 8,5	↑53,1 ± 38 24,2 ± 14,2	↑ : taux IL-6 groupe ER+ ↑ : production d'ERO groupe ER+ ↑ : pourcentage de Ki67 groupe ER+	Madeddu *et al.* (2014)

↑, augmentation ; ↓, diminution ; - : pas d'effet ; ER : œstrogène receptor ; IMC, indice de masse corporelle; IL : interleukin; TNF : tumour necrosis factor ; ERO : espèces réactives d'oxygène ; GPx : glutathione peroxidase; SOD : superoxide dismutase.; COX-2,cyclooxygénase-2 ; GPX : glutathion peroxydase ; GSH, : glutathion ; GST, : glutathion S transférase ; IFN-γ : interferon γ ; iNOS, : nitric oxyde synthase inductible ; LTB4 : leucotriène B4 ; MDA, : malondialdéhyde ; MPO : myéloperoxydase ; NF-κB : nuclear factor κB ; PGD2 : prostaglandine D2 ; PGE2 : prostaglandine E2 ; PTGES, PGE-1, prostaglandine-E synthase ; SOD : superoxyde dismutase ; TBARS : thiobarbituric reactive substances ; TNF- α, : tumor necrosis factor α.

oxydant (Pihl *et al*. 2006). Différentes études ont permis de mettre en évidence un lien existant entre certaines pathologies métaboliques et le stress oxydant (Urakawa *et al.* 2003; Furukawa *et al.* 2004; Ustundag *et al.* 2007).

Une étude clinique de Badid *et al*. (Badid *et al.* 2010) réalisée chez des patientes en surpoids atteintes du cancer mammaire consiste à caractériser le statut oxydatif de ces patientes par la détermination du rapport entre la leptinémie et le statut redox. Des marqueurs du stress oxydant (MDA, hydroperoxydes), du statut antioxydant (activité des enzymes : SOD, CAT, GPx, GR), taux plasmatiques des vitamines (A, C, E) ont été étudiés. Les résultats ont montré qu'il y a d'une part une corrélation positive significative entre la leptinémie et le taux des hydroperoxydes et l'activité SOD, et d'autre part une corrélation négative significative entre la leptine et le statut anti-oxydant global. Cette étude confirme que le cancer du sein est associé à une peroxydation lipidique et à une augmentation du stress oxydant lié à l'hyperleptinémie (Badid *et al.* 2010). Une autre étude clinique a montré que le niveau circulant des ERO est significativement plus élevé chez les patientes présentant un cancer mammaire hormono-dépendant (ER+) et corrélé avec l'IMC et la leptinimie (Madeddu *et al.* 2014). Ceci induit à l'initiation et au développement du cancer du sein (Cavalieri *et al*. 2000; Madeddu *et al*. 2014). Ainsi, le rôle du stress oxydatif dans développement du cancer mammaire semble associé à l'indice d'adiposité (Dai and Zhu 2009).

L'augmentation de la leptine est associée fréquemment à un accroissement des médiateurs de la peroxydation lipidique, comme le MDA et de facteurs pro-inflammatoires tels que le 8-épi-prostaglandine F2-α (8-épi-PGF2α). En revanche, l'activité des enzymes anti-oxydantes telles que la SOD et la GPx, est significativement réduite avec une production accrue d'ERO au niveau du plasma dans le groupe des patientes obèses. Ceci traduit une défense anti-oxydante moins efficace (Stefanović *et al.* 2008; Wu *et al.* 2009).

Ces résultats sont observé aussi chez un groupe d'enfants obèses (Ustundag *et al*. 2007). La diminution de la capacité anti-oxydante est due à l'accumulation du tissu adipeux (Gletsu-Miller *et al.* 2009). Cette accumulation induit une réponse immunitaire conduisant à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF-α, IL-1, IL-6) et à la diminution de la production des facteurs anti-inflammatoires (Tang *et al.* 2014). L'accumulation excessive des lipides stimule l'activité NADPH oxydase (NOX), qui contribue à la production d'ERO (Furukawa *et al.* 2004). Les ERO, en retour, augmentent l'expression de la NOX, y compris la NOX4 adipocytaire, avec la mise en place d'un cercle vicieux qui entretient le stress oxydant au niveau tissulaire et circulant (Furukawa *et al.* 2004). Ces perturbations observées en situation d'obésité sont corrigées par la perte de poids et par la restriction alimentaire. La perte de poids entraîne d'une part, la diminution du stress oxydatif systémique (Gletsu-Miller *et al.* 2009) et d'autre part limite l'état inflammatoire lié à l'obésité (Tang *et al.* 2014).

Partie II :

Application de la fluorescence native

Les lipides composent près de la moitié de la masse des membranes biologiques sous la forme de phospholipides. Outre ce rôle de structure, les lipides sont aussi des précurseurs de messagers lipidiques produits en réponse à diverses stimulations cellulaires (Gago-Dominguez and Castelao 2008). La présence d'acides gras poly insaturés dans les lipides, notamment membranaires, rend ces composés sensibles aux phénomènes oxydatifs. Ainsi, le stress oxydant est à l'origine de la production de nombreux composés : isoprostanes, neuroprostanes, isofuranes, 4 hydroxy-nonénale (4-HNE), 4 hydroxy-hexénale (HHE), malondialdéhyde (MDA) (Bacot *et al.* 2003) (Onyango and Baba 2010) qui s'ajoutent à ceux produits enzymatiques : prostaglandines, leucotriènes, thromboxanes, acides hydroxy-eicosatétraenoiques (HETE), acides epoxy-eicosatrienoiques (EET) (Panigrahy *et al.* 2010). Les lipides constituent ainsi une famille avec une très grande diversité moléculaire qui doit être caractérisée et quantifiée pour appréhender les différentes situations physiopathologiques. Cette caractérisation des lipides ou lipidomique requiert la connaissance structurale, fonctionnelle et métabolique de ces diverses molécules (Martin-Venegas, Jáuregui, and Moreno 2014) qui constituent le lipidome.

Parmi ces produits issus *in fine* de la peroxydation lipidique nous nous concentrerons sur les molécules de la famille des éicosanoïdes (Basu 2010a). Ces molécules, dont font partie entre autres les prostaglandines et les isoprostanes, sont des médiateurs cellulaires de l'inflammation et participent à la régulation de nombreux métabolismes cellulaires (Girotti 1998). Ayant des caractéristiques physicochimiques (lipohilie, polarité, instabilité) et biologiques (demi-vie courte, médiateurs cellulaires) limitant leur temps de présence dans les liquides biologiques, la détection et la quantification de ces composés présentent un défi pour le biologiste (Spickett *et al.* 2010). La détection des dérivés issus de la peroxydation lipidique dans les matrices biologiques est actuellement un champ d'investigation important de la lipidomique en pleine expansion.

Après un rappel sur les méthodes actuellement disponibles pour l'évaluation de ces composés, nous présenterons en quoi l'approche par fluorescence native est une solution potentiellement intéressante en regard de ses applications actuelles.

I. Etat de l'art

1. Méthodes actuellement disponibles

Actuellement, l'analyse des composés de la vaste famille des éicosanoïdes se fait par deux grandes approches selon le nombre de classe de molécules que l'on cherche à doser. L'analyse focalisée sur quelques composés est réalisée par méthode immunologique. L'établissement d'un profil de molécules en une seule analyse est permis par l'arrivée des techniques à haut débit couplant une méthode séparative par chromatographie gazeuse ou liquide à une détection en spectrométrie de masse couplée (Kortz, Dorow, and Ceglarek 2014).

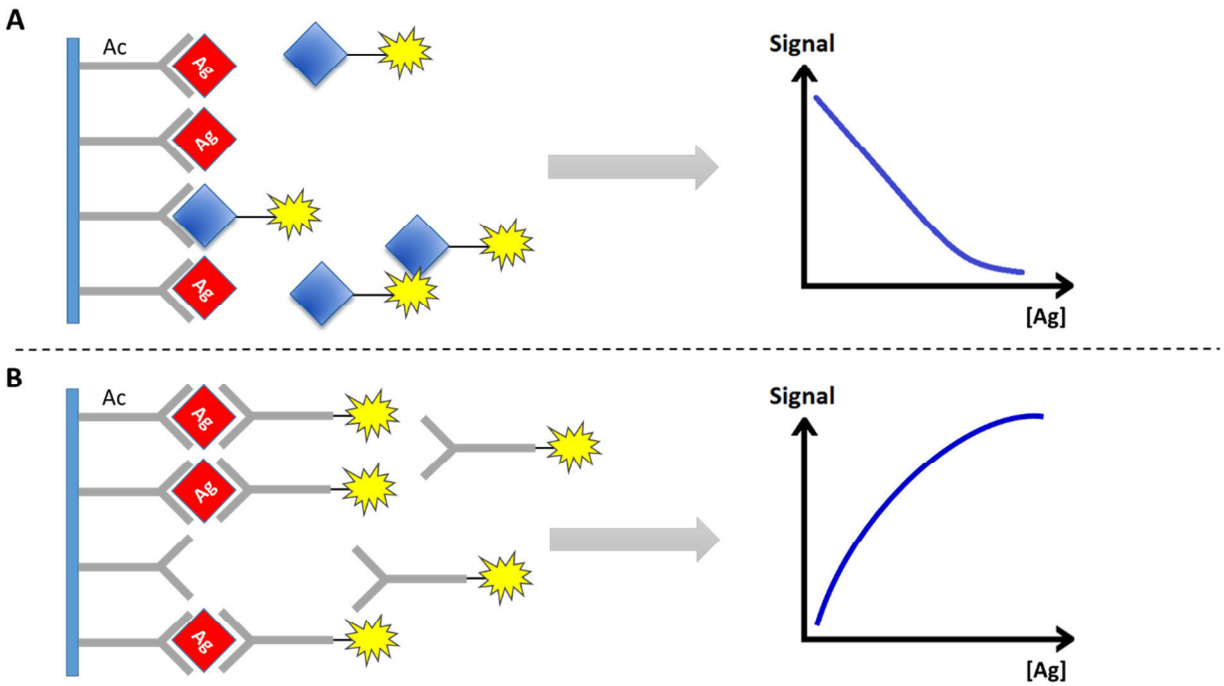


Figure 43 : Principes des méthodes d'immunodosage
A : Dosage radio-immunologique par compétition (RIA)
B : Dosage radio-immunométrique de type sandwich (IRMA)

1.1. Technique immunologique

Historiquement, c'est au cours des années 70 que les méthodes d'immunodosage des éicosanoïdes ont fait leur apparition. Elles ont permis initialement le dosage des prostaglandines dans les urines (Cornette *et al*. 1975) ou le plasma (Zia, Golub, and Horton 1975) puis peu à peu se sont étendues à d'autres catégories d'éicosanoïdes telles que les thromboxanes (Granström and Kindahl 1978), les métabolites des prostaglandines (Metz, Rice, and Robertson 1979) ou les HETE (Eskra, Levine, and Carty 1980).

Le système antigène-anticorps obéit aux règles de l'interaction ligand-récepteur et est à la base de tous les immunodosages. Il est caractérisé par une capacité de liaison entre l'antigène (Ag) et l'Anticorps (Ac). Cette réaction met en jeu des liaisons non covalentes de types hydrophobes, forces de Van der Waals, interstatiques et hydrogènes (Burton 1990). Cette liaison, qui obéit à la loi d'action de masse, est réversible : l'équilibre est atteint lorsque la quantité de complexe Antigène-Anticorps (Ag-Ac) formé est égale à la quantité de ce même complexe dissocié par unité de temps.

1.1.1. Radio-immunodosage

Les radio-immunodosages (Radio Immuno Assay : RIA) ont été les premiers dosages mis au point pour l'exploration biologique des éicosanoïdes. Ils sont restés longtemps le dosage de référence du fait de leur spécificité, lié à l'anticorps, et de leur sensibilité, du fait du radio-traceur. Au fil des développements ultérieurs, toute une série de tests est apparue pour doser un nombre toujours plus grand d'analytes. Cependant, l'emploi d'un radio-traceur limite l'utilisation de ces tests aux seuls laboratoires disposant des autorisations nécessaires (*Directive 96/29/Euratom* 1996). En effet, dans un souci de santé publique, l'octroi d'autorisation d'utiliser des substances radioactives est devenu de plus en plus difficile afin de limiter leur diffusion et donc le risque de contamination accidentelle des personnels et de l'environnement (*Directive 96/29/Euratom* 1996).

Les radio-immunodosages (RIA) font intervenir un anticorps dirigé contre le composé à doser. Ces techniques sont dites par compétition de liaison entre l'antigène à doser dans l'échantillon et un antigène marqueur ajouté au dosage. Le développement des anticorps monoclonaux, a permis une meilleure sélection des épitopes, et a conduit au développement de dosages immunoradiométriques (Immuno-Radio-Metric Assay : IRMA) par liaison de type sandwich avec deux anticorps, l'Ac de capture et l'Ac de reconnaissance marqué, dirigés contre deux épitopes. Toutefois, la masse réduite des isoprostanes limite l'utilisation de ce type d'approche (Dudal *et al.* 2014).

La spécificité et la limite de détection sont a priori meilleures en IRMA qu'en RIA. En effet, dans les techniques RIA, un seul épitope de l'Ag est révélé, alors qu'en IRMA, l'Ag doit posséder au moins deux épitopes **(Figure 43)**. Dans le premier cas, la mesure repose sur une diminution d'un signal initial très élevé. Des fragments ou des métabolites présents dans le milieu réactionnel peuvent être reconnu par l'Ac du dosage, ce qui va augmenter la fixation non spécifique, diminuer le signal détecté et donc entraîner des erreurs par excès et un manque de sensibilité. Au contraire, dans le cas des techniques IRMA, le signal détecté ne peut provenir que de la formation du triple complexe Ac-Ag-Ac. On mesure ainsi une

augmentation du signal par rapport à un signal initial très faible (bruit de fond). Le fait de révéler deux épitopes de l'Ag diminue les risques d'erreur. Mais cette obligation rend les techniques IRMA inaptes à doser les petites molécules. De plus, l'ajout d'un second anticorps ne diminue pas les risques d'interférences. L'effet crochet « hook effect ou effet cloche » apparaît dans les méthodes « sandwich » lorsqu'un excès massif d'antigène ou de substances partageant un des épitopes à révéler dépasse les capacités de liaison de l'anticorps fixé au support solide (10 à 10 000 fois le dernier point de gamme). Les anticorps ne sont plus en excès par rapport à l'Ag à doser. Ainsi le signal détecté diminue, entraînant une erreur par défaut de sous-estimation (Granström and Kindahl 1978).

Le système de détection est également important pour les techniques radio-immunologiques. Celui-ci doit être adapté au type de rayonnement émis par le traceur (Tran, Beijnen, and Huitema 2009). Au vu des traceurs les plus communément employés, on distingue : les rayonnements électromagnétiques (γ, X) obtenus avec l'iode 125 ou le cobalt 57 ; les rayonnements particulaires β^- mou de très faible énergie (tritium, carbone 14) et β^- dur d'énergie élevée (phosphore 32, soufre 35). Pour détecter et quantifier les rayonnements électromagnétiques ou particulaire β^- dur, on utilise une sonde constituée d'un scintillateur solide et d'une cellule photosensible, l'ensemble constitue le photomultiplicateur. Dans le cas d'un rayonnement particulaire β^- mou, le scintillateur est liquide pour qu'il soit au contact de la source radioactive (Tran, Beijnen, and Huitema 2009).

La spécificité du rayonnement mesuré et le temps d'exposition font que les méthodes radio-immunologiques ont une bonne sensibilité pouvant permettre la détection de quantité d'antigène inférieure au ng/l (Benkirane *et al.* 1991). Cependant, le phénomène de quenching est une limitation importante des méthodes de radio-immunodosages utilisant les rayonnements électromagnétiques (γ, X). Il s'agit d'un phénomène d'affaiblissement du signal provoqué par l'introduction de diverses substances (eau, solvants organiques, protéines, etc.) dans le milieu de mesure. On définit deux types de quenching : le quenching « chimique », dû aux composés qui captent l'énergie d'émission et la restituent sous forme de chaleur (conversion interne) et le quenching « couleur » produit par des colorants qui constituent une sorte de filtre absorbant pour les photons. Quel que soit le type de quenching, il convient de vérifier pour chaque échantillon l'efficacité de comptage et de procéder aux corrections nécessaires (Eskra, Levine, and Carty 1980).

1.1.2. Enzymatic Immuno Assay (EIA)

Dans le contexte d'une limitation de l'emploi des radio-traceurs, le développement de techniques de détection dites « froides » a permis une plus large diffusion des méthodes de dosages immunologiques. Dans cette optique de nombreux systèmes de détection ont été couplés aux anticorps offrant un large panel de méthodes utilisables.

Sur la base des méthodes présentées précédemment, on retrouve des méthodes par compétition faisant appel à un seul anticorps et des méthodes dites « sandwich » avec deux anticorps. La révélation met en œuvre un chromogène couplé au système anticorps – antigène. Suivant la méthode de détection employée on distingue :

- La chimiluminescence avec le couple Luniférine/luciférase ;

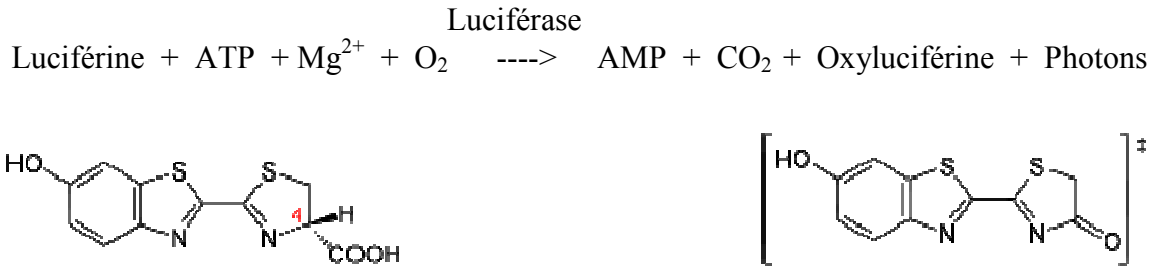


Figure 44: Réaction simplifiée du couple luciférine/Luciférase

- La fluorimétrie avec l'ajout d'un fluorochrome (FITC, Rhodamine…) ;
- La colorimétrie UV-visible avec l'utilisation de la réaction de Trinder, ou un équivalent.

Ces méthodes offrent le grand avantage d'être réalisables dans toutes les structures sans contrainte de sécurité particulière. Des évolutions techniques, telles que le couplage des marqueurs à la biotine, ont permis d'améliorer ces dosages aussi bien en termes de spécificité que de sensibilité.

Les avantages et inconvénients du couplage anticorps-antigène sont identiques à ceux décrits dans la partie de radio-immunologie. Seuls les avantages et inconvénients liés aux méthodes de détections sont présentés ici :

- La chimiluminescence

Les composés chimiques à l'origine de la luminescence sont la luciférine (protéine substrat) et la luciférase (enzyme biocatalyseur).

La luciférase catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine par le dioxygène (O_2) en présence d'ATP (Adénosine Triphosphate) et de magnésium **(Figure 44)**. Cette oxydation fait passer le radical benzothiazole de la luciférine d'un état stable à un état électroniquement excité et instable. En retournant à son état stable, la luciférine émet un photon qui produit une lumière dans les longueurs d'ondes du bleu et du vert généralement.

La chimiluminescence présente l'avantage d'une sensibilité et une spécificité proche de celles des techniques radio-immunologiques. Cependant, elle nécessite un équipement dédié, un luminomètre. Par ailleurs, la détection étant basée sur l'émission de photons, cette technique est limitée par les effets de quenching et les lumières parasites.

- La fluorimétrie

L'utilisation de fluorochromes en biologie est un peu plus récente que celle d'isotopes radioactifs. Elle a l'avantage de donner des résultats très rapidement, voire immédiatement.

Plusieurs fluorochromes sont utilisés pour le marquage des anticorps permettant ainsi différentes méthodes de détection : cytométrie en flux, immunofluorescence, immunohistochimie, western-blot… Les fluorochromes sont caractérisés par leurs longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les plus utilisés sont la phycoérythrine (PE, 480 nm / 578 nm), la fluorescéine isothiocyanate (FITC, 495nm / 519 nm), la protéine fluorescente verte (green fluorescent protein, GFP, 488 nm / 508 nm), et la gamme d'Alexa Fluor couvrant un large spectre d'excitation (340 nm à 720 nm) et d'émission (440 nm à 800 nm).

La fluorescence offre une excellente sensibilité et la possibilité de détermination rapide mais a le désavantage de ne pas être permanente. L'intensité de la fluorescence diminue avec le temps jusqu'à devenir indétectable. Tout comme les autres méthodes de détection dépendantes des rayonnements électromagnétiques, la fluorescence est limitée par le phénomène de quenching.

- La colorimétrie UV-visible

La réaction de Trinder repose sur la réaction entre le peroxyde d'hydrogène, le phénol et la 4-aminoantipyrine pour former une quinone (quinone imine). Cette réaction est catalysée par la présence d'une peroxydase (telle que la peroxydase de raifort). Le peroxyde d'hydrogène est quant à lui produit par une réaction initiale ou apporté par le réactif. L'absorption de la quinone de coloration violet-rouge est mesurée à 505 nm, 510 nm, ou 540 nm. L'intensité de la couleur est proportionnelle à la concentration en peroxyde engagé dans la réaction et globalement stable une demi-heure. D'autres systèmes colorimétriques ont été mis au point afin d'obtenir des colorations plus stables et plus spécifiques comme le couple acétylthiocholine / acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque. L'hydrolyse par l'acetylcholine estérase de l'acétylthiocholine en thiocholine permet sa condensation non enzymatique avec l'acide 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoïque qui donne par clivage de l'acide 5-thio-2-nitrobenzoïque dont la coloration stable est mesurée à 412 nm (Pradelles, Grassi, and Maclouf 1985).

Les méthodes colorimétriques présentent l'avantage de la simplicité de mise en œuvre et ne nécessitent pas de matériel particulier à l'exception d'un spectrophotomètre. Cependant cela se traduit par une perte de sensibilité, en partie corrigée par le couplage avidine-biotine qui permet d'augmenter le signal en augmentant la quantité de marqueur sur un anticorps donné (Ren *et al*. 2015) à raison de 4 molécules de biotine par avidine.

1.1.3. Limites des méthodes immunologiques

Le développement des méthodes d'immunodosages est directement corrélé à la qualité des anticorps produits. L'apparition des anticorps monoclonaux puis plus récemment des anticorps chimères a permis d'obtenir des anticorps plus spécifiques d'un épitope et de limiter les inconvénients tels que les anticorps anti-souris. Cependant, dans le cadre de l'étude des produits de la peroxydation lipidique et des eicosanoïdes, l'usage des méthodes immunologiques est limité pour au moins trois raisons :

- Premièrement, la taille des éicosanoïdes est trop réduite pour permettre la formation de deux anticorps contre deux épitopes limitant ainsi les techniques de types « sandwich » pour le dosage de ces composés.
- Deuxièmement, la forte homologie de structure de certains composés (prostaglandines/isoprostanes) ne permet pas d'obtenir des anticorps suffisamment spécifique pour s'affranchir des réactions croisées.
- Troisièmement, ces méthodes immunologiques s'appliquent à la détermination d'un seul composé à la fois et ne permettent pas la détermination simultanée de plusieurs composés (Metz, Rice, and Robertson 1979). Les techniques multiplexe offrent des possibilités de détection multiple mais restent actuellement tournées sur la détection de médiateurs protéiques (Y. Lu *et al.* 2015).

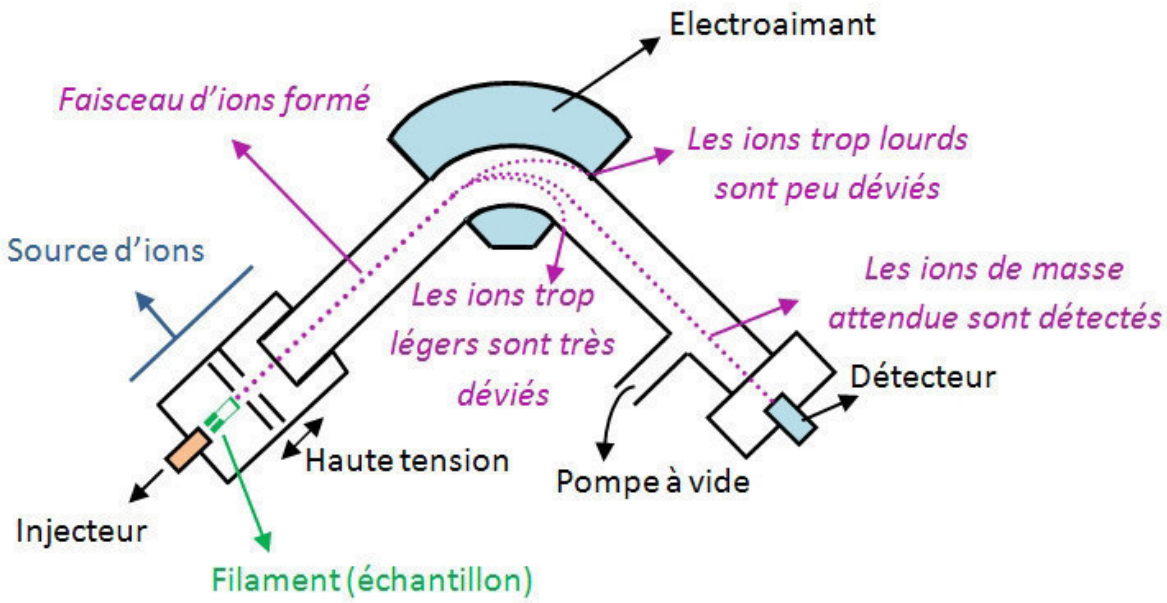


Figure 45 : Principe générale de la spectrométrie de masse.
(Trouillet 2010)

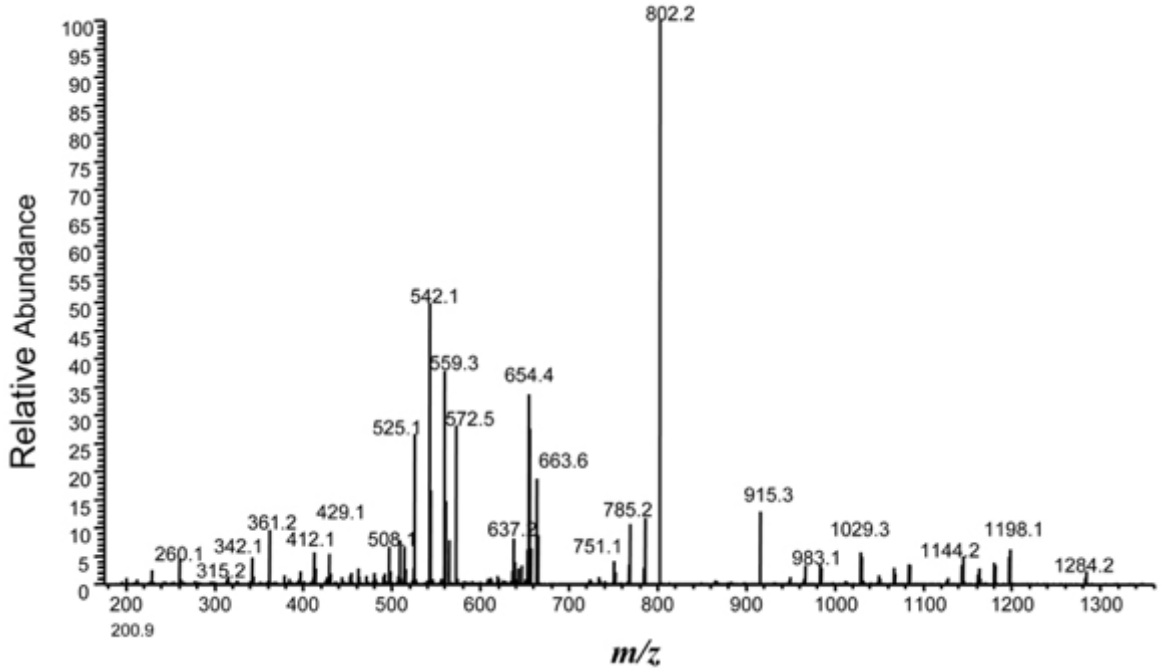


Figure 46 : Spectre de masse
Sur l'axe des abscisses figure la taille des ions détectés exprimée en ratio m/z.
Sur l'axe des ordonnées est représentée l'abondance relative des ions détectés (100% est affecté à l'ion le plus abondant)

1.2. Méthode chromatographique couplée à la spectrométrie de masse

L'application de la spectrométrie de masse à l'analyse des éicosanoïdes est apparu dès les années 80 (Gréen *et al.* 1980).

1.2.1. Séparation chromatographique

Les éicosanoïdes dérivent des acides gras polyinsaturés à 20 atomes de carbones et présentent une forte homologie de structure. Cependant la grande variété des modifications de cette structure de base fait que la séparation chromatographique de ces composés nécessite de long temps d'analyse pour une séparation optimale (Kortz, Dorow, and Ceglarek 2014).

L'analyse des eicosanoïdes par chromatographie en phase gazeuse nécessite un temps de préparation du fait de la dérivation obligatoire des composés pour protéger les fonctions thermolabiles nécessaires à leur identification. Cette étape pré-analytique incontournable est une des principales limitations de l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse pour l'analyse des eicosanoïdes (Tsikas and Zoerner 2014).

Les développements récents en chromatographie liquide haute performance (HPLC) et l'apparition des systèmes ultra performants (UPLC) à très haute pression ont radicalement changé la situation ces dernières années (Vigor *et al.* 2014). Couplant de multiples innovations (pression hydraulique, granulosité et porosité des silices, greffage), la chromatographie liquide est aujourd'hui une technique fiable et rapide à mettre en œuvre, s'affranchissant de l'étape pré-analytique limitante. Avec des temps d'analyse de quelques minutes tout en conservant une excellente séparation des pics, la chromatographie liquide tend à remplacer la chromatographie en phase gazeuse dans l'analyse lipidomique (Schwedhelm and Böger 2003).

1.2.2. Détection en spectrométrie de masse

Que ce soit par chromatographie en phase gazeuse ou en phase liquide, la détection des éicosanoïdes suite à leur séparation repose sur la spectrométrie de masse (Naz *et al.* 2014). Cette technique physique d'analyse permet de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation par un champ magnétique de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z) **(Figure 45)** (Trouillet 2010). Après détection et analyse, le résultat obtenu est un spectre de masse **(Figure 46).** Cette technique permet le contrôle et l'identification des pics élués, et ce d'autant plus que la tendance actuelle est au configuration d'appareil couplant deux détecteurs de masse en tandem afin d'accroître les capacités analytiques (Kruve *et al.* 2015).

En effet, il existe plusieurs types d'analyseur en spectrométrie de masse :

- des analyseurs basse résolution tels que le quadripôle ou le piège à ions 3D ;
- des analyseurs haute résolution, permettant une mesure de masse plus précise tels que le temps de vol (TOF), la résonance cyclotronique ionique à transformée de Fourier (FT-ICR) et l'Orbitrap.

Ces analyseurs peuvent être couplés entre eux pour réaliser des mesures de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) (Montuschi *et al*. 2014). En général, un premier

analyseur sépare les ions, puis une cellule de collision permet de fragmenter ces ions, et un second analyseur sépare les fragments. Certains analyseurs, comme les pièges à ions ou le FT-ICR, permettent de fragmenter les ions et d'analyser les fragments directement (Kruve *et al.* 2015).

1.2.3. Avantages

Seule une approche par spectrométrie de masse permet d'avoir une sensibilité adéquate pour détecter les concentrations d'éicosanoïdes rencontrées en biologie. Le spectromètre de masse est un détecteur universel et très sensible. Sa gamme linéaire permet des quantifications fiables de 10^3 à 10^7 offrant un large domaine d'investigation (Spickett and Pitt 2012).

Selon le type d'ionisation utilisé, un spectre de masse peut être caractéristique d'une molécule. En effet, les ions peuvent se fragmenter selon des lois précises de chimie en phase gazeuse dans la source d'ionisation, dans l'analyseur ou dans une cellule de collision. L'étude de ces fragments à partir du spectre de masse permet de déterminer la structure des ions. Comme chaque atome possède un ou plusieurs isotopes qui sont de masses différentes, la proportion de chaque isotope observé sur un spectre de masse forme un massif isotopique caractéristique de la présence et du nombre de ces atomes dans l'ion mesuré. Ainsi en le comparant avec des banques de spectres, il est possible d'identifier la molécule (Verrastro *et al*. 2015).

La spectrométrie de masse peut être appliquée à l'imagerie ce qui lui donne un intérêt supplémentaire. L'analyse point par point d'une surface par spectrométrie de masse avec ionisation adéquate (désorption-ionisation laser assistée par matrice (MALDI)) permet de générer des images ioniques, représentant la répartition de chaque ion issu de cette surface. Cette technique d'imagerie est très utilisée pour la recherche de bio marqueurs (identification dans une coupe de tissu de composés spécifiques d'une région définie) et l'analyse *in situ* de tissus (Dudley 2014).

1.2.4. Inconvénients

Les inconvénients majeurs de ces approches sont de deux ordres. Le premier reste lié à la nature même des molécules à doser : leur grande réactivité et leur faible concentration dans les liquides biologiques font que des étapes pré-analytiques peuvent s'avérer indispensables, particulièrement avec les méthodes chromatographiques, pour tenter de les stabiliser en faisant d'elles le point limitant de la méthode. De ce point de vue, les approches par ionisation de surface issues de l'imagerie présentent un grand avantage.

Le deuxième inconvénient est directement lié à la spectrométrie de masse est plus particulièrement à l'étape d'ionisation. Plusieurs types de source peuvent être utilisés en fonction de la nature de l'échantillon introduit, des molécules analysées et du résultat recherché. En effet, l'échantillon peut être introduit directement dans la source, sous forme gazeuse, liquide ou solide (canne d'introduction directe, dépôt sur plaque...), puis être vaporisé et ionisé soit en mode positif pour étudier les ions positifs, soit en mode négatif pour étudier les ions négatifs. Chacune des techniques d'ionisations génèrent une fragmentation

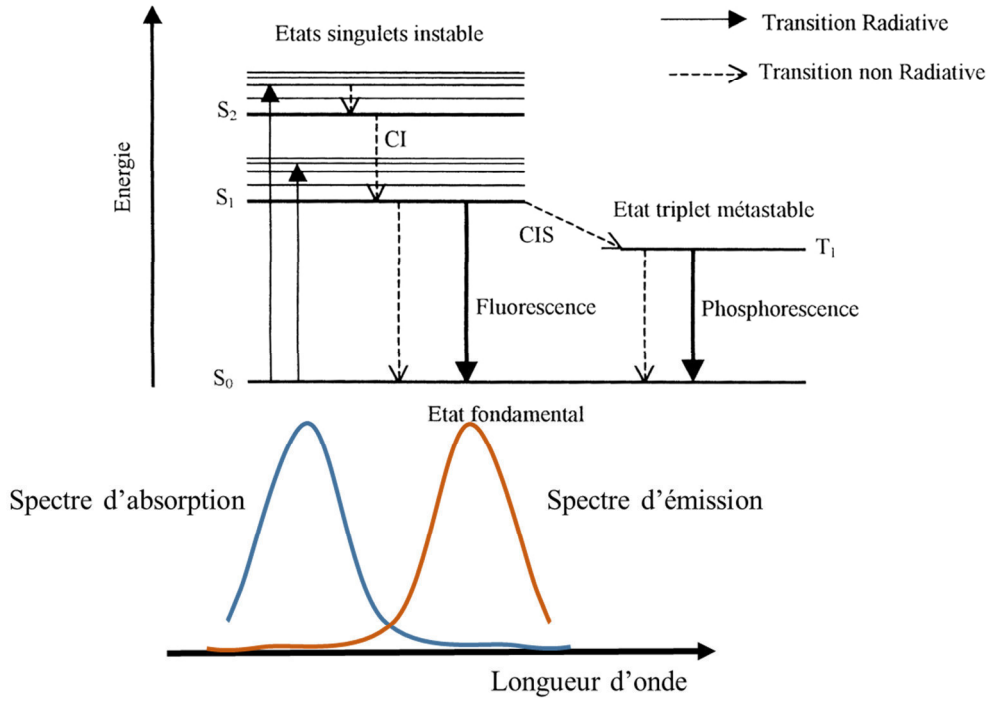


Figure 47 : schéma simplifié des transitions énergétiques en luminescence.
(Mathis, 1995). Le processus de luminescence se décompose toujours au minimum en deux phases : l'excitation du système électronique et sa désexcitation pendant laquelle l'émission lumineuse se produit. L'excitation et l'émission sont cependant séparées par des phases intermédiaires dont le mécanisme permet de distinguer deux types d'émission lumineuse : la fluorescence et la phosphorescence qui correspond à une transition interdite (métastable). Dans le cas de la fluorescence l'émission suit l'excitation d'un temps très court (durée de vie de l'ordre de 10^{-8} s).

plus ou moins poussée et des ions différents. Il en résulte pour une même molécule des spectres variés ce qui rend difficile la comparaison entre techniques (Fenn *et al.* 1989).

2. Place de la fluorescence native

La fluorescence native est la capacité naturelle d'une molécule à donner un signal de fluorescence sans étape préliminaire et sans ajout d'un fluorochrome. La fluorescence est un phénomène radiatif de luminescence. La détection de fluorescence native peut être réalisée sur un mélange moléculaire complexe ou couplée à une technique chromatographique pour l'identification de molécules isolées.

2.1. Bases physico-chimiques

La luminescence est un processus au cours duquel est engendrée une émission d'un rayonnement électromagnétique (lumière) d'origine non thermique. C'est une émission de photons optiques (proche UV, lumière visible, infrarouge) en excès qui continue pendant un temps largement supérieur à la période d'oscillation de l'onde associée au photon ($>10^{-10}$ s (100 picoseconde)). Le mécanisme d'émission des photons permet de faire la distinction entre deux phénomènes proches et souvent confondus : la fluorescence et la phosphorescence **(Figure 47)**. La luminescence est un phénomène qui peut s'observer dans toutes les formes de matière condensée ou non, organique ou inorganique, cristalline ou amorphe telles les gaz, les liquides, les solides, les substances minérales, organiques ou biologiques. Cependant, très peu de molécules sont fluorescentes. Il existe de nombreuses transitions non radiatives pour lesquelles l'énergie absorbée est restituée sous forme de chaleur (Mathis 1995).

La fluorimétrie étudie l'émission de lumière par des molécules, en solution ou à l'état solide, après excitation par des photons appartenant au domaine du visible ou du proche ultraviolet. Lorsque qu'une molécule fluorescente absorbe un photon, les électrons vont passer de l'état fondamental S0 à l'état excité S1 (instable). Après un phénomène de relaxation, ils vont finalement retourner à l'état fondamental S0 avec émission d'un photon de fluorescence. Le rayonnement de luminescence émit correspond ainsi à la restitution d'une partie de l'énergie absorbée issue de la source d'excitation extérieure (Murata 2009). Seules certaines transitions donnent lieu à une fluorescence. Ainsi, l'énergie émise est inférieure à l'énergie d'excitation (inverse pour la λ) donc le spectre d'émission est l'image du spectre d'absorption dans un miroir **(Figure 47)**. L'intensité de fluorescence est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence. De fait, l'intensité de fluorescence va dépendre de la température, de la nature du solvant, du pH, de la longueur d'onde λ d'excitation de la source lumineuse, du détecteur et de la concentration en fluorochrome (J.-S. Lee *et al.* 2009).

Pour que la fluorescence se manifeste dans une molécule, plusieurs caractéristiques sont nécessaires (Croce and Bottiroli 2014). La molécule doit absorber dans l'UV bien que seulement 5% des substances absorbantes dans l'UV soient fluorescentes. Elle doit également présenter une forte probabilité d'absorption, une faible énergie de transition électronique et être dépourvue d'atomes ou de groupements favorisant les phénomènes non radiatifs. Ainsi, les molécules les plus fluorescentes sont des polycycles aromatiques avec des structures planes et rigides. Les substituants ortho ou para-directeurs (-NR >-NH>-OR >-OH) sont

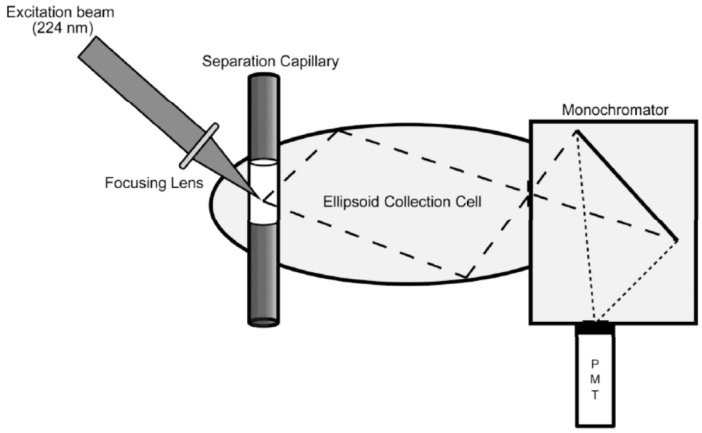


Figure 48 : Schéma de principe de la cellule de détection de fluorescence native
(Dailey *et al.,* 2013).La forme particulière du système optique en double ellipse permet la récupération maximale des photons de fluorescence émis au point focal de la cellule de détection sans contamination de photons résiduels du rayon d'excitation.

activateurs de la fluorescence. Les substituants méta-directeurs (-COOH,-COOR,-CHO_2-COR,-NO_2,-NO) sont désactivateurs de la fluorescence. Au niveau cellulaire, les molécules fluorescentes les plus connues sont : les co-facteurs NADH, FAD, FMN, (H.-W. Wang, Wei, and Guo 2009) les catécholamines et les acides aminés aromatiques : Tyrosine, tryptophane (Timperman, Oldenburg, and Sweedler 1995).

La fluorescence est une méthode sensible, sélective et possédant un large éventail d'applications en biologie (Bastos *et al.* 2012). Cependant, la mise en œuvre de ces techniques est assez délicate. Elle dépend de l'appareillage et surtout de sa source lumineuse qui conditionne toute la mesure. Les lampes employées sont à arc au xénon, permettant une émission continue entre 220 et 700 nm, ou à vapeur de mercure, ayant un spectre de raies discontinu entre 254 et 366 nm. Récemment l'apparition de sources lasers émettant dans l'UV profond permet l'exploration de fluorescence native induite par laser (LNIF) nécessitant une énergie d'excitation plus importante (Zipfel *et al.* 2003).

2.2. Applications actuelles et intérêt pour l'étude des produits de peroxydation lipidique

La fluorescence native présente deux caractéristiques essentielles :

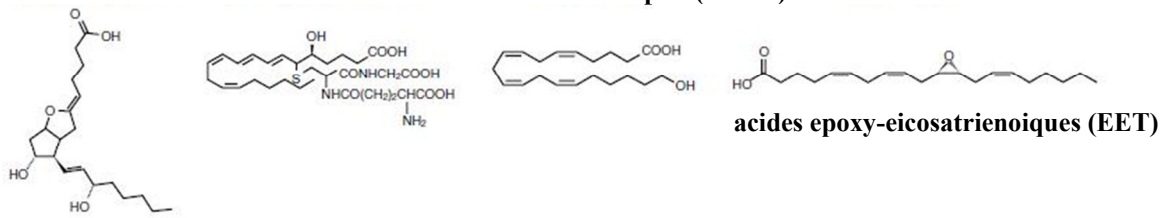
- l'universalité : pratiquement tous les composants fluorescents, que ce soit sous forme solide, liquide ou gazeuse sans marquage préalable lorsqu'ils sont excités par des photons en UV profond (Bonnin *et al.* 2007) ;
- la sensibilité : l'utilisation d'un laser permet de focaliser son énergie lumineuse sur un point précis, et donc d'induire un signal de fluorescence important (Dailey *et al.* 2013). Cette technique présente une sensibilité similaire à celle obtenue après marquage fluorescent classique (Fili and Toseland 2014).

Le développement de la fluorescence native comme méthode de détection a été rendu possible par deux avancées majeures : d'une part, l'obtention de laser efficace dans l'UV profond (longueur d'onde < 280 nm) (X. Zhang and Sweedler 2001) et d'autre part la discrimination entre les photons de fluorescence et les photons d'excitation du laser. Ce second point est obtenu par l'utilisation d'une cellule de mesure originale en double ellipse (**Figure 48)** (Dailey *et al.* 2013). La miniaturisation du système permet son adaptation aux différentes techniques d'analyses et séparation existantes comme un système chromatographie pour l'analyse de liquides biologiques (Siméon *et al.* 2001), l'électrophorèse capillaire pour l'analyse des protéines (X. Zhang and Sweedler 2001) ou la cytométrie en flux pour l'analyse des cellules (Pu *et al.* 2014).

Les applications de la fluorescence native apparaissent au cours des années 90. Très rapidement se sont ces capacités de détection sans avoir recours au greffage d'un chromophore qui sont mises en avant (Mathis 1995). Ainsi la fluorescence native va être appliquée à la détection de molécules dans les matrices complexes comme :

- l'identification de molécules dans les tissus ou les cellules (Lillard and Yeung 1996) (Lapainis *et al.* 2007) ;

Prostaglandines **Leucotriènes** **acides hydroxy-eicosatétraenoiques (HETE)**



acides epoxy-eicosatrienoiques (EET)

Figure 49 : Structure chimique des principales familles d'eicosanoïdes

- la détection de drogues et de métabolites dans les urines (Alnajjar, Butcher, and McCord 2004) (Kanamori *et al*. 2015) ;
- l'adsorption de molécules sur les protéines (Schulze *et al*. 2005) ;
- l'identification de contaminants (Giamarchi *et al.* 2002) (Huhn *et al.* 2005) (Uzaşçı and Erim 2014) ;
- la détermination de profil métabolique plasmatique (Shirshin *et al.* 2015) ;
- l'étude des composés pharmacologiques *in vivo* (de Kort, de Jong, and Somsen 2013).

Cependant la majeure partie des travaux sur la fluorescence native induite par laser s'est focalisée sur l'étude des protéines (Tseng, Li, and Barrett 2010). Ces applications découlent directement des propriétés naturelles de fluorescence des acides aminés aromatiques conférant aux protéines des propriétés de fluorescence native (Dailey *et al.* 2013). Ainsi la fluorescence native des protéines est exploitée pour étudier :

- la conformation des protéines (Holtom *et al.* 2001) ;
- l'interaction ligand-récepteur (Dwiecki *et al.* 2015) ;
- les dommages protéiques (Schulze *et al.* 2005) ;
- le métabolisme protéique et les flux cellulaires (Schüttpelz *et al.* 2006).

Ces propriétés sont également exploitées en imagerie pour l'observation des structures protéiques extracellulaires (Moghissi, Stringer, and Dixon 2008).

Enfin, plusieurs études ont portés sur l'auto fluorescence cellulaire principalement due aux co-facteurs flaviniques (Qin *et al.* 2004). Ces observations ont débouchés sur plusieurs tentatives d'études directes des cellules aussi bien bactériennes (Bhartia *et al.* 2010) qu'humaines (Pu *et al.* 2014). Cependant, l'utilisation de la fluorescence native reste limitée aux suspensions cellulaires (Demchenko 2012) et peu applicables *in situ* dans les tissus (Zipfel *et al.* 2003). Cette technique reste donc anecdotique en terme d'outil de recherche malgré un potentiel reconnu (Monici 2005) (Croce and Bottiroli 2014).

II. Objectif de l'étude :

Dans notre problématique de quantification des composés issus de la peroxydation lipidique, une approche analytique sur la base de la fluorescence native peut permettre d'accéder à la quantification des composés dans les matrices biologiques sans étape préanalytique (Matos *et al.* 2010). Ainsi, il s'agit de caractériser et de quantifier les molécules d'eicosanoïdes **(Figure 49)** présentant un certain nombre de caractéristiques moléculaires (électron π, cycle, présence d'hétéro-atome, double liaisons conjuguées…) qui laisse envisager une possibilité d'émission de fluorescence native après excitation laser à 224 nm (Bonnin *et al.* 2007).

Pour cela, en partenariat avec l'industrie Flowgene (Saint Beauzire, France), une étude de faisabilité a été conduite en deux temps :

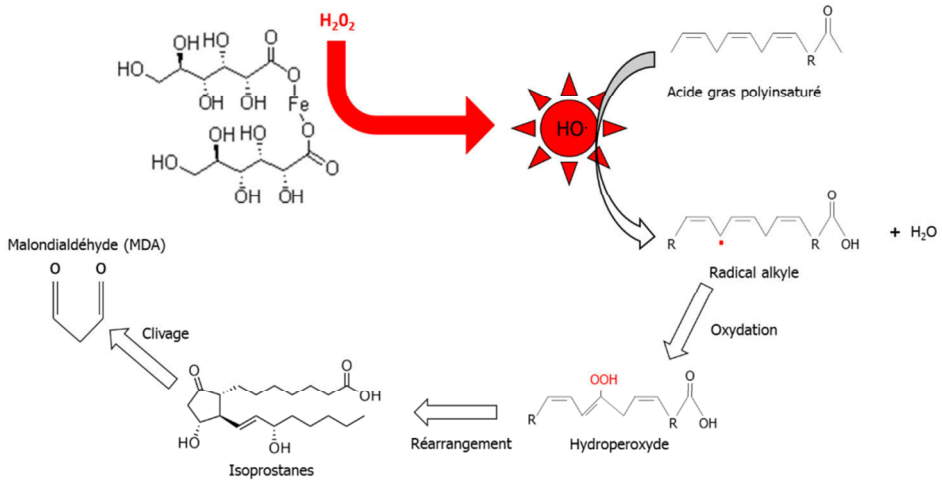


Figure 50 : Principe général de la réaction de peroxydation.
(Flourie *et al*. 2006). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en présence de gluconate de fer génère du radical hydroxyle qui va pouvoir peroxyder les acides gras polyinsaturés du mélange. Après oxydation du radical alkyle par l'air, il y a formation d'hydroperoxyde lipidique puis réarrangement en isoprostanes plus stables. Les produits de peroxydation peuvent subir un clivage spontané libérant du malondialdéhyde (MDA)

Tableau 6 : Composition lipidique des huiles alimentaires (Ahuja *et al.* 2013)

Composition g/100g	Huile de Tournesol	Huile d'Arachide	Huile de Colza
AGS	10,3	16,9	7,4
Dont acide stéarique	4,5	2,2	2,1
AGMI	19,5	46,2	63,3
Dont acide oléique	19,5	44,8	61,7
AGPI	65,7	32	28,1
Oméga 6 / Oméga 3	126	47,6	2,04
Vitamine E (mg/100g)	41,08	33,4	45,8

AGS : acides gras saturés ; AGMI : acides gras mono-insaturés ; AGPI : acides gras poly-insaturés ; EPA : acide eicosapentaénoïque ; DHA : acide docosahexaénoïque ; U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2013. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 26. Nutrient Data Laboratory Home Page, http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl

Tableau 7 : Caractéristiques de fluorescence native des huiles alimentaires

	λ max (nm)	**I max (URF)**	**n**	**CV%**
Huile de tournesol				
Contrôle	380	0,83	5	3,6
Peroxydation	380	1,05	5	2,4
Huile d'arachide				
Contrôle	360	0,56	5	9,2
Peroxydation	360	0.58	5	4,6
Huile de colza				
Contrôle	360	0,36	5	8,0
Peroxydation	410	0,32	5	5,6

- 1er temps : Conduite d'essais sur des mélanges lipidiques (huiles alimentaires) pour évaluer la capacité de la fluorescence native à détecter des produits de peroxydation lipidique ;
- 2ème temps : Conduite d'essais sur des tissus biologiques (cerveau de rat) pour évaluer la capacité de la fluorescence native à détecter des produits de peroxydation lipidique dans un environnement biologique complexe.

Par la suite, cette approche par fluorescence native sera comparée à une technique immuno-enzymatique colorimétrique pour évaluer sa capacité de quantification des eicosanoïdes.

III. Travaux réalisés en fluorescence native induite par laser à 224 nm

Les eicosanoïdes sont des dérivés oxydés des acides gras poly-insaturés. Ces composés présentent donc des insaturations faisant d'eux des molécules potentiellement détectables en fluorescence native. Afin de vérifier notre hypothèse de départ, nous avons travaillé avec différents mélanges lipidiques complexes qui sont les huiles alimentaires et un tissu biologique riche en acides gras polyinsaturés. La peroxydation des lipides de ces mélanges a été obtenue par l'ajout d'un réactif de peroxydation (gluconate de fer, peroxyde d'hydrogène) **(Figure 50)** (Flourie *et al.* 2006). Pour chaque analyse, un blanc de fluorescence native est réalisé sur le milieu réactionnel puis est déduit des mesures avec l'échantillon (huiles alimentaires ou tissu). Le résultat est exprimé en unité relative de fluorescence (URF).

1. Exploration de la peroxydation lipidique à partir d'huiles alimenaires

Afin de vérifier notre hypothèse de départ, nous avons réalisé des essais sur trois huiles présentant des caractéristiques différentes (**Tableau 6**) en termes de composition lipidique et de nature des acides gras.

Ainsi, un volume (1 ml) d'huile de tournesol, d'arachide et de colza ont été traitées ou non avec le réactif de peroxydation. Pour cela, les huiles sont diluées dans de l'éthanol au demi puis dans du tampon (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2mM, pH 7,4) au cinquième. Le mélange est divisé en deux, une fraction sert de contrôle et ne subit aucun traitement, l'autre fraction est traité avec le réactif de peroxydation. Les échantillons sont mis en incubation de 30 minutes à 37°C pour générer des peroxydes. Après l'incubation, une aliquote est prélevée dans chaque fraction pour réaliser le dosage des hydroperoxydes lipidiques (HPLIP) (Arab and Steghens 2004) et du MDA (Steghens *et al.* 2001). Le reste des fractions est injecté dans la cellule de fluorescence native pour déterminer le spectre d'émission de fluorescence.

La fluorescence native des trois huiles sans traitement montre une longueur d'onde maximale d'émission à 380 nm pour l'huile de tournesol et à 360 nm pour les huiles d'arachide et de colza. L'intensité maximale de fluorescence est respectivement de 0,83, 0,56 et 0,36 AU pour l'huile de tournesol, d'arachide et de colza (**Tableau 7**).

Après peroxydation, les spectres de fluorescence pour les trois huiles sont peu modifiés **(Figure 51)**. Seule l'huile de tournesol montre une élévation de l'intensité de fluorescence passant de 0,86 URF à 1,05 URF sans modification de la longueur d'onde

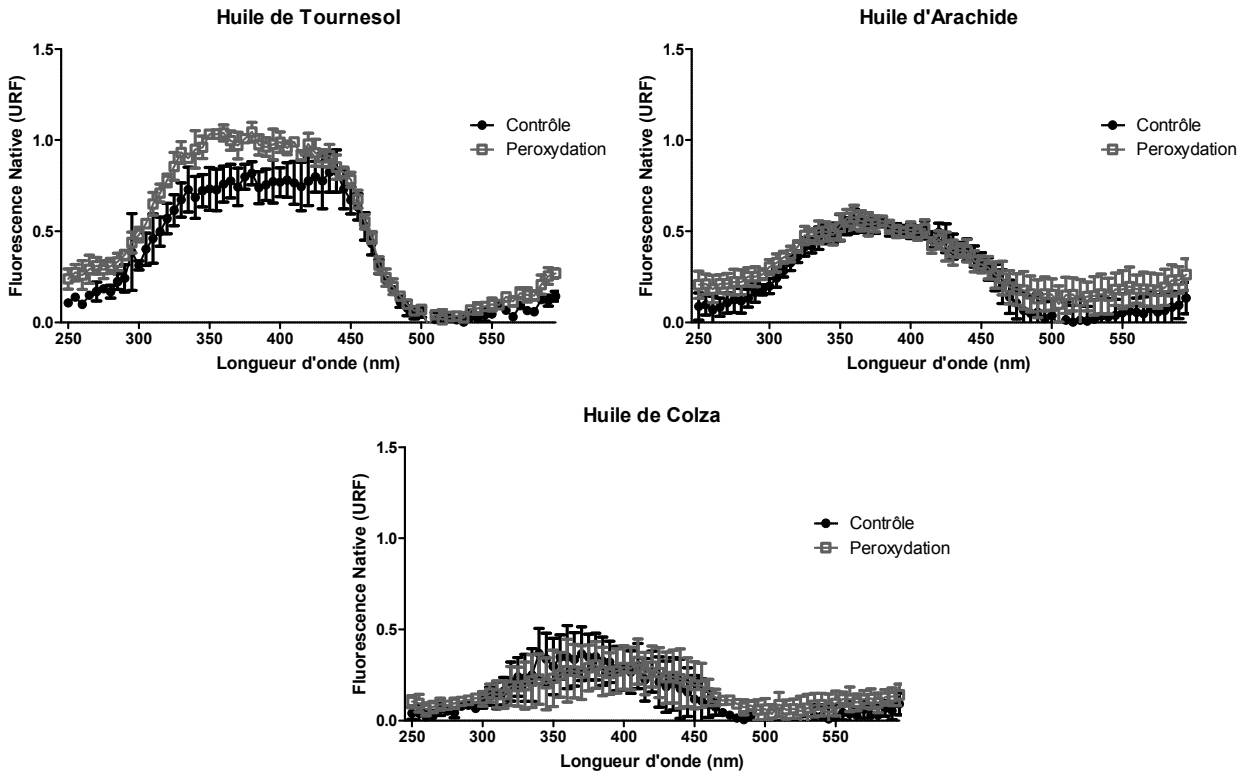


Figure 51: Spectres de fluorescence native des huiles alimentaires
Le spectre de fluorescence native des huiles alimentaires n'est pas modifié au cours de la peroxydation lipidique sauf pour l'huile de tournesol, la plus riche en acides gras polyinsaturés (n=5).

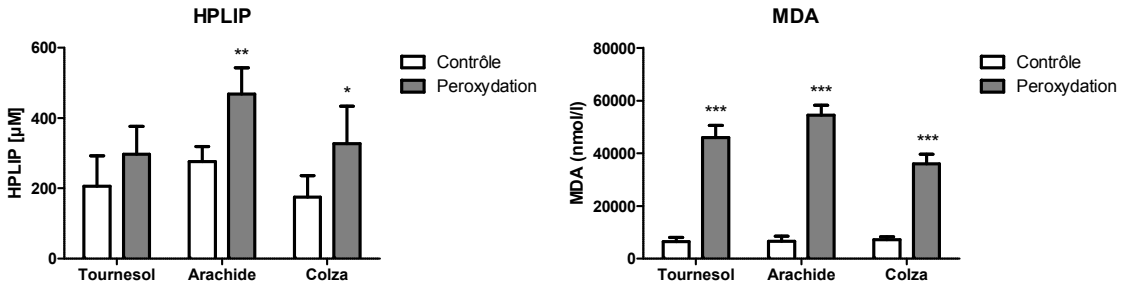


Figure 52 : Quantification des produits de peroxydation lipidique dans les huiles alimentaires.
Les hydroperoxydes lipidiques et le MDA sont des marqueurs de la peroxydation lipidique. L'augmentation de leurs concentrations signe l'efficacité du réactif de peroxydation (n=5). Test T, ***, $p<0,001$.

maximale d'émission. Il est intéressant de noté qu'il s'agit de l'huile la plus riche en acides gras polyinsaturés donc la plus susceptible à la peroxydation lipidique. Afin de nous assurer de l'efficacité du réactif de peroxydation, le dosage des produits de peroxydations est conduit en parallèle sur les mélanges réactionnels (**Figure 52**). Le dosage des hydroperoxydes lipidiques montre pour toutes les huiles une augmentation de ces composés qui est statistiquement significative que pour les huiles d'arachide et de colza. Le dosage du MDA qui est un produit terminal de la peroxydation, montre une augmentation significative dans toutes les huiles. Ainsi le réactif de peroxydation est bien efficace dans notre modèle. Cependant, la peroxydation lipidique semble avoir qu'un faible impact sur le signal de fluorescence native.

2. Exploration de la peroxydation lipidique dans les tissus biologiques

En parallèle nous avons conduit une expérimentation sur un tissu riche en lipides (50% de la masse sèche) et principalement en acides gras poly-insaturés (Woods and Jackson 2006) : le cerveau. Ainsi, des morceaux de cerveaux de rats (1g) sont broyés dans 4 ml de tampon de lyse (Tris-HCl 100 mM, EDTA 2mM, pH 7,4). Puis le broyat obtenu est divisé en deux, une fraction sert de contrôle et ne subit aucun traitement, l'autre fraction est traité avec le réactif de peroxydation. Les échantillons sont mis en incubation de 30 minutes à 37°C pour générer des peroxydes. Après l'incubation, une aliquote est prélevée dans chaque fraction pour réaliser le dosage du MDA et des HPLIP. Le reste des fractions est injecté dans la cellule de fluorescence native pour déterminer le spectre d'émission de fluorescence.

Des broyats de cerveau montrent un spectre d'émission de fluorescence native basal (sans traitement) de faible intensité (15 URF) avec une longueur d'onde d'émission maximale à 305 nm **(Tableau 8)**. Le réactif de peroxydation sur les broyats de tissus induit une élévation de l'intensité de fluorescence du mélange à 683 URF et un déplacement de la longueur d'onde d'émission maximale à 345 nm (**Figure 53**). L'efficacité de la peroxydation lipidique est validée par le dosage en parallèle des HPLIP et du MDA (**Figure 54**). Les deux marqueurs présentent une augmentation significative ($p<0,001$) de leur concentration dans le milieu réactionnel signant une peroxydation efficace.

Afin d'évaluer la part des lipides dans l'élévation du signal de fluorescence native, une extraction lipidique est réalisée sur les tissus peroxydés par le réactif de Folsch. Pour cela, 1 ml de milieu réactionnel est extrait par 4 ml de solution de Folsch (Chloroforme/Méthanol 2 :1). Après 30 minutes d'agitation, la phase organique est récupérée puis évaporée sous vide. Le résidu lipidique est repris dans de l'éthanol et du tampon Tris pour un volume final de 1 ml. Le spectre de fluorescence native de l'extrait lipidique est ensuite déterminé. L'extrait lipidique montre un spectre d'intensité diminuée (334 URF d'intensité maximale) avec cependant toujours la même longueur d'onde maximale d'émission (345 nm). Les lipides représentant 50% de la masse sèche du tissu, il est intéressant de noté qu'ils semblent contribuer pour moitié (48,9%) au signal de fluorescence native après peroxydation **(Figure 54)**.

Pour évaluer la part des eicosanoïdes dans ce signal de fluorescence native, une extraction des isoprostanes (8-isoPGF 2 α) par chromatographie d'affinité est alors réalisée sur la fraction lipidique obtenue précédemment. 0,5 ml de fraction lipidique est chargée sur

Tableau 8 : Caractéristiques de fluorescence native du tissu cérébral et de ses différentes fractions d'extraction

	λ max (nm)	I max (URF)	n	CV%
Tissu total avant peroxydation (contrôle)	305	15	7	7,8
Tissu total après peroxydation	345	683	7	9,9
Fraction lipidique après peroxydation	345	334	7	9,9
Fraction des isoprostanes après peroxydation	345	203	7	9,8

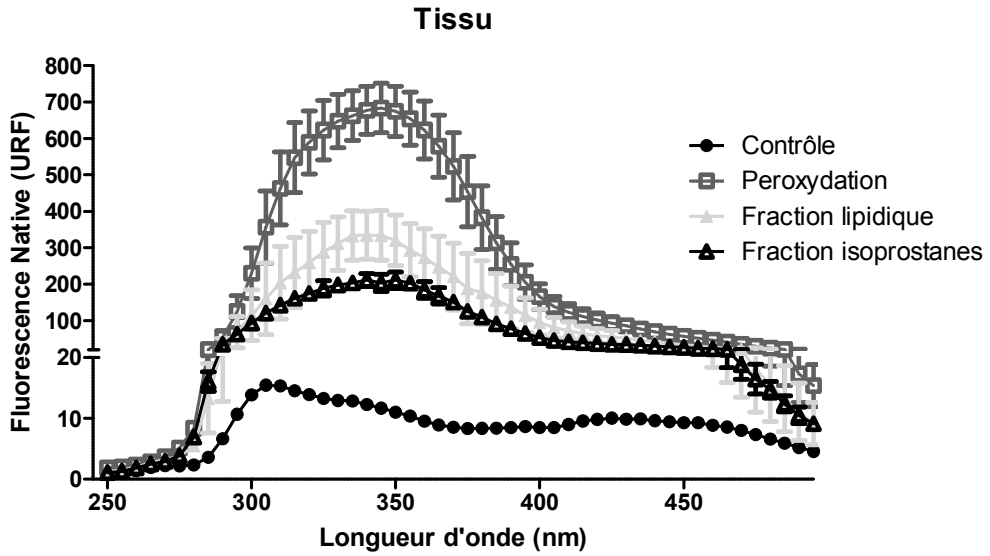


Figure 53 : Spectre de fluorescence native du tissu
Le spectre de fluorescence native du tissu est modifié au cours de la peroxydation lipidique. Il y a une augmentation de l'intensité de fluorescence. Une part de cette intensité de fluorescence peut être attribuée aux composés de peroxydation lipidiques tels que les isoprostanes (n=7).

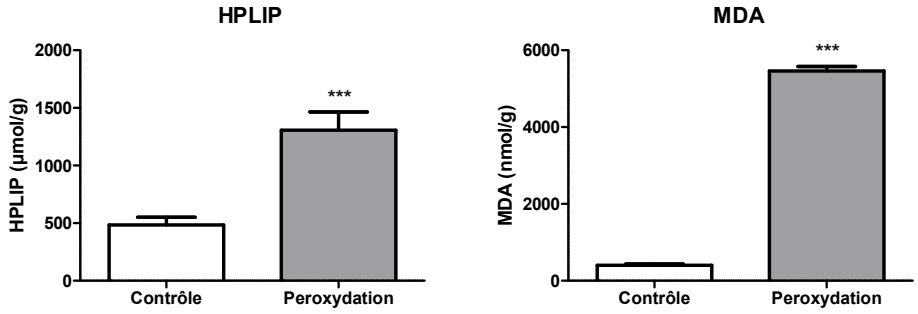


Figure 54 : Quantification des produits de peroxydation lipidique dans le tissu
Les hydroperoxydes lipidiques et le MDA sont des marqueurs de la peroxydation lipidique. L'augmentation de leurs concentrations signe l'efficacité du réactif de peroxydation (n=7). Test T, ***, $p<0,001$.

une colonne d'affinité (Cayman, réf : 10368, Interchim, Montluçon, France). Après fixation et lavage, les isoprostanes sont décrochés de la colonne par le tampon d'élution selon les recommandations du fabricant. L'éluât est récupéré puis évaporé sous vide. Le résidu est repris dans de l'éthanol et du tampon Tris pour un volume final de 0,5 ml. L'éluât contenant les isoprostanes montre également un spectre d'émission de fluorescence native ayant une longueur d'onde maximale d'émission à 345 nm et une intensité de 203 URF **(Figure 54)**.

Suite de ces expérimentations, une solution standard de 8-iso PGF 2a a été évaluée en fluorescence native. Un signal de fluorescence native de 0,7 URF a été enregistré pour une concentration de 2,8 mmol/l, soit 1000 fois plus que la concentration maximale rencontrée dans l'organisme.

IV. Discussion – Conclusion

Il semble que la peroxydation des lipides, objectivée par les élévations de concentrations en HPLIP et MDA, est capable d'induire une modification du signal de fluorescence native de mélange complexe lipidique d'huiles alimentaires ou d'extrait tissulaire (cerveau). Les modèles étudiés sont riches en acides gras polyinsaturés peroxydables : en effet, les quantités obtenues de MDA ou d'HPLIP sont bien supérieures à celles rencontrées dans les liquides biologiques (urines, plasma) ou au niveau des tissus dans de conditions physiologiques. Dans des conditions physiologiques, l'intensité du signal dû aux isoprostanes ne peut être détecté par rapport au bruit de fond généré par les protéines qui sont des contributeurs majeurs de la fluorescence native (Dailey *et al.* 2013).

Par nos expérimentations, nous avons montré que les lipides présentent un signal de fluorescence native faible pour une utilisation comme technique de détection et de quantification. Par ailleurs, la peroxydation lipidique, objectivée par des marqueurs tels que les hydroperoxydes lipidiques ou le MDA, ne modifie pas les propriétés de fluorescence native (λ max, intensité de fluorescence). Ces observations obtenues dans un mélange exclusivement lipidique comme les huiles alimentaires, sont en partie retrouvées dans un mélange biologique complexe comme un broyat tissulaire.

Dans ce dernier modèle, le traitement par le réactif de peroxydation montre une forte élévation de l'intensité de fluorescence native. Cependant cette augmentation est principalement due aux protéines tissulaires. La fluorescence native de la fraction lipidique après extraction, réduite de 50%, peut être liée à la présence des composés de peroxydation comme les isoprostanes. Enfin, l'interférence de protéines de faible masse moléculaire ne peut être exclue sachant que le traitement à la solution de Folsch et la chromatographie d'affinité ne les éliminent pas complétement.

En conclusion de ces deux expérimentations, il ne semble pas que l'identification par la fluorescence native soit une technique adaptée pour la quantification des produits de peroxydation lipidique de la famille des isoprostanes. Par la suite, nos dosages seront donc réalisés par une technique immuno-enzymatique avec détection colorimétrique disponible au laboratoire.

Objectifs de la thèse

Modifiées au cours de l'obésité, les adipokines (leptine et adiponectine) ont fait l'objet des travaux antérieurs de l'équipe en termes d'effets sur la croissance cellulaire et la survie. Par ailleurs, chez les sujets obèses, plusieurs études rapportent une activation du système immunitaire et un état sub-inflammatoire chronique, le tout associé à une insulino-résistance. Ces altérations sont liées à un stress oxydant conduisant à la formation de médiateurs pro-inflammatoires issus de la peroxydation lipidique. L'inflammation et le stress oxydant pourraient avoir un impact majeur dans la carcinogenèse chez le sujet obèse. En effet, l'installation d'une inflammation chronique à bas bruit favorise l'apparition des métastases au cours de la pathologie cancéreuse. Ainsi, l'obésité, dont la prévalence s'accroît, apparaît comme un facteur de risque de cancer, particulièrement dans le cancer du sein en post-ménopause. Chez les patientes, un indice de masse corporelle élevé est associé d'une part à une forte prévalence du cancer mammaire et d'autre part à une moindre survie indépendamment de l'âge et du statut ménopausique.

Différents travaux ont étudiés le lien entre obésité et cancer mammaire, notamment en se focalisant sur les voies de signalisation cellulaire. Néanmoins, peu de données rapportent à ce jour un rôle direct de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires saines ou tumorales. Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier et à comprendre l'impact de la leptine d'une part dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales et du tissu mammaire, et d'autre part sur le statut inflammatoire par l'étude des marqueurs de peroxydation lipidique tels que les isoprostanes.

- Tout d'abord, nous avons étudié les effets *in vitro* de la leptine à des concentrations normo-pondérale et d'obésité sur la réponse pro-oxydante des cellules épithéliales mammaires humaines à différents stade néoplasique (*Publication N°1*). Par la suite la modulation de la défense anti-oxydante et de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales mammaire à été mise en evidence (*Publication N°2*).
- Par la suite, l'extrapolation des données *in vitro* vers un modèle experimental *in vivo a* été conduite. Ainsi, l'étude de l'implantation des tumeurs syngéniques chez la souris C57BL/6 en situation d'obésité, permet de replacer les cellules dans un micro-environnement cellulaire complexe. L'influence *in vivo* d'un régime hyperlipidique sur le développement tumoral et sur la balance énergétique des souris C57BL/6 a été explorée (*Publication N°3*). Puis, l'impact de l'activité physique en situation d'obésité associée à la ménopause sur la cancérogenèse mammaire, a été évalué dans ce modèle par la mise en place d'un environnement enrichi qui stimule l'activité physique spontanée et l'interaction social (*Publication N°4 en cours de rédaction*).

Partie III :

Approche expérimentale *in vitro*

Publication n°1

Impact de la leptine sur la réponse oxydatif des cellules épithéliales mammaires

Sinda Mahbouli, Jérémie Talvas, Audrey der Vartanian, Sophie Ortega, Stéphanie Rougé,

Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary.

PLos ONE - Soumise

Présentation de la publication n°1

Introduction

Il est clairement établi aujourd'hui que le statut oxydatif des cellules est directement corrélé aux capacités de prolifération, de migration mais aussi de survie des cellules dans leur environnement. En situation d'obésité, un stress oxydant accru caractérisé par la production d'espèces réactives d'oxygènes (ERO), pourrait avoir un impact majeur dans la carcinogenèse chez le sujet obèse par, entre autre, l'installation d'une inflammation chronique à bas bruit. Ces évènements favorisent l'apparition de pathologies chroniques ou leur aggravation, et sont liés à l'activation de nombreuses voies de signalisation cellulaire par les sécrétions adipocytaires telle que la leptine.

But de l'étude

Cette étude a pour finalité d'une part, de déterminer, les systèmes enzymatiques producteurs des ERO dans des cellules épithéliales mammaires humaines avec un statut néoplasique différent (HMEC primaires saines et les cellules néoplasiques MCF-7 et MDA-MB-231). D'autre part d'évaluer l'effet de la leptine sur la réponse pro-oxydante des cellules épithéliales.

Matériels et Méthodes

Les cellules épithéliales mammaires ont été cultivées pendant 1h, 6h, 24h en présence de concentrations variables de leptine (10 ng/ml concentration en situation normo-pondérale ou 100 ng/ml concentration en situation d'obésité). L'expression génique des systèmes producteurs d'ERO ont été déterminés par RT-qPCR et la production des ERO a été évaluée par fluorimétrie cinétique à l'aide de divers fluorochromes ayant des affinités différentes pour les ERO ((dichlorofluorescéine (DCF), diaminofluorescéine (DAF), dihydroéthidine (DHE), dihydrorhodamine (DHR)). L'implication du calcium dans la production des ERO a été confirmée par l'inhibition des canaux calciques avec un antagoniste chimique le vérapamil (20 μM) et par la transfection des cellules avec des ARNs interférents (siRNA) dirigés contre l'enzyme NOX-5 calcium-dépendante. L'expression protéique du récepteur de la leptine Ob-R et des protéines p-STAT3, SOCS3 ont été mise en évidence par western blot.

Résultats majeurs

Dans nos conditions expérimentales, la leptine module la réponse pro-oxydante dans les cellules épithéliales mammaires. Quelle que soit la dose employée, la leptine augmente la production des ERO totales dans les trois modèles cellulaires. La production des espèces réactives azotées et des anions superoxydes mitochondriaux n'étant pas modifiée. La production d'ERO suite au signal de la leptine est essentiellement cytosolique. Les NADPH oxydases (NOX) sont l'une des principales sources de production d'ERO. Dans nos conditions de culture, l'enzyme NOX-5 a été exprimée de manière significative dans les cellules épithéliales mammaires. L'implication de cette enzyme a été confirmée par l'utilisation des siRNA-NOX5, suite à cette inhibition la production des anions superoxydes cytosoliques par la leptine a été inhibée.

Conclusion

Cette étude *in vitro* a permis d'établir que les cellules épithéliales mammaires répondent au signal hormonal transmis par son récepteur Ob-R, et que la leptine pourrait moduler la réponse oxydative des cellules épithéliales mammaires par l'activation de l'enzyme NOX-5. Ces observations laissent penser que la leptine est un des facteurs impliqués dans l'apparition du stress oxydant en situation d'obésité *via* une augmentation de la production d'ERO. Il serait donc intéressant de déterminer l'effet de la leptine sur la réponse anti-oxydante afin de caractériser l'impact de cette adipokine dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires.

Induction of NADPH oxidase 5 – reactive oxygen species production and SOCS-3 expression by leptin depends on the neoplastic states of epithelial mammary cells

Sinda Mahbouli[1], Jérémie Talvas[1], Audrey der Vartanian[1], Sophie Ortega[1], Stéphanie Rougé[1], Marie-Paule Vasson[1,2], Adrien Rossary[1]

[1]Clermont Université, Université d'Auvergne, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH-Auvergne, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2]CHU Clermont-Ferrand, Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, CLARA, F-63000 Clermont-Ferrand, France3

Running title: *Neoplastic state of mammary cells modulates leptin effects*

Corresponding author :

Adrien Rossary; **Address:** Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, Equipe ECREIN, UMR 1919 INRA-UdA, Faculté de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand cedex 01, France; **Phone:** +00334 73 17 80 46; **Fax:** +00334 73 17 80 38; **E-mail:** adrien.rossary@udamail.fr

Keywords:

adipokines, ROS production, breast carcinogenesis, NADPH oxidases, cell signalling

Abstract

Obesity is linked to oxidative stress, a major factor in carcinogenesis, and to higher leptin concentration. We hypothesized that leptin is able to induce reactive oxygen species (ROS) production in cells and therefore to modulate many signalling pathways. The aim of this study was to determine the effects of leptin on ROS production and to characterise the enzymes involved in this production in three human mammary epithelial cells with different neoplastic status (healthy primary HMECs, and neoplastic cells MCF-7 and MDA-MB-231).

NADPH oxidases (NOX) family (seven isoforms) are one of the major cellular sources of ROS. In our culture conditions, the three cell models significantly expressed NADPH oxidase isoform 5 (NOX5). Whatever the concentration of leptin used, ROS production was induced in all cell models. Treatment with a calcium influx inhibitor (verapamil) and SiRNA against NOX5 confirmed the involvement of the NOX5 iso-enzyme in ROS production. Both treatments suppressed ROS production under leptin. Leptin signalling *via* its receptor Ob-R resulted in activation of the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and modulation of the suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) expression.

Leptin, which induces ROS production *via* the activation of NADPH oxidase 5, could modulate the oxidative response of epithelial mammary cells. This novel finding could shed light on the molecular mechanisms of the oxidative response in mammary cells under leptin and on the role of obesity-associated hyperleptinemia in carcinogenesis.

Introduction

Obesity, which is characterized by an accumulation of fat (Ceddia 2005), is related to metabolic disorders (Gregor and Hotamisligil 2007a). Studies have focused particularly on humoral dysregulation (X.-F. Huang et al. 2004), oxidative stress (Esposito et al. 2006a) and sub-inflammatory status (Fernández-Sánchez et al. 2011) in the attempt to explain the adverse effect of obesity on health (Gletsu-Miller et al. 2009). The production of reactive oxygen species (ROS) has been shown to play important roles in cellular processes (Jiang, Zhang, and Dusting 2011b). Under physiological conditions, ROS production is involved in cell signalling (J. Li et al. 2006), gene expression (Delledonne et al. 2001) and cell growth (Xia et al. 2007). Excessive ROS production contributes to the pathogenesis of several diseases including inflammation, diabetes, obesity and cancer (Fernández-Sánchez et al. 2011).

Epidemiological (Basu et al. 2013b), clinical (T Jardé et al. 2009a) and experimental data (Nalabolu, Palasamudram, and Jamil 2014a) have clearly identified obesity, owing to its hormonal dysfunctions, as a major risk factor for chronic diseases such as post-menopausal breast cancer (Antonio Macciò and Madeddu 2011). Among the different adipokines modulated during obesity, leptin has been widely studied in carcinogenesis. This adipokine, upregulated in obesity, has many signalling pathways (Guo et al. 2012) involved in critical steps of pathogenesis such as cell proliferation (Dubois, Jardé, Delort, et al. 2014)(Barone et al. 2012a), inflammatory response (Vona-Davis and Rose 2013) and modulation of the cell micro-environment (Andò and Catalano 2012).

Oxidative stress is known to play a part in carcinogenesis (M. Valko et al. 2006), to modulate many signalling pathways in cells (Adler et al. 1999) and to be linked to inflammation (Sun et al. 2011). Numerous factors contribute to oxidative stress but

surprisingly data are scarce on how it is affected by leptin (Dattaroy et al. 2014) especially in breast cancer (Badid et al. 2010), (M. D. M. Blanquer-Rosselló et al. 2015). NADPH oxidases (NOX) family are the main contributors to cellular ROS production in physiological and pathological processes (Meitzler et al. 2014). There are seven related NOX isoforms, NOX 1 to 5 and the dual oxidases (DUOX) 1 and 2, some of which are expressed in cancer cells (Juhasz et al. 2009a). Although ROS production is involved in the pathogenesis of both obesity (Fernández-Sánchez et al. 2011) and cancer (M. Valko et al. 2006), very few studies have assessed the ability of adipokines to modulate ROS production (Martínez-Martínez et al. 2014) *via* NOX enzymes in cancer cells.

In this study, we hypothesize that leptin could affect ROS production of human mammary epithelial cells. In experiments with healthy (HMEC) and neoplastic (MCF-7 and MDA-MB-231) mammary epithelial cells, we attempted to determine whether leptin, mimicking normal and obesity situations, modulates the activity and the gene expression of NADPH oxidases (NOX) and NO synthases (NOS), which are ROS-producing enzymes.

Materials and Methods

Cell culture

Healthy human mammary epithelial cells (HMEC) obtained from 55-year-old Caucasian women (Lonza, Basel, Switzerland) were grown in complete MEBM medium, supplemented with hydrocortisone (0.5 µg/ml), epithelial growth factor (10 ng/ml), insulin (5 µg/ml), gentamicin (50 µg/ml) / amphotericin-B (50 ng/ml) and bovine pituitary extract (0,4%) as recommended by the manufacturer (Lonza, Basel, Switzerland). Neoplastic human mammary epithelial cells, MCF-7 and MDA-MB-231, obtained from 69-year-old and 51-year-old Caucasian women, respectively, (ATCC, Molsheim, France) were grown in RPMI 1640 medium (Biowest, Nuaillé, France) containing 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2. For experiments, human mammary epithelial cells were cultured at a density of 22,500 cells/cm^2.

Treatment with leptin

Mammary epithelial cells were synchronized in serum-free medium for 24 h before initiation of leptin treatment. Cells (HMEC, MCF7 and MDA-MB-231) were grown for 0, 1, 6 or 24 hours in their respective medium either with or without human recombinant leptin (R&D, Abingdon, United Kingdom) at physiological (10 ng/ml) or obese (100 ng/ml) concentrations. Cells were harvested after trypsinisation. The total cell lysates were obtained by two successive thawing-freezing cycles in Tris HCl 25 mM buffer pH 7.4 containing Tween 20 0.1% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), with 15-second periods in an ultra-sound bath, and were stored at -80°C until analysis.

RNA isolation and reverse transcription

After treatment with leptin, total RNA was isolated from epithelial cells by Trizol® reagent (Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol and quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop®2000, Thermo scientific,

Table1. Summary of PCR primers

Gene name	Accession number	Primer sequences		Amplicon length
NOX 1	AJ_438989	5' TCG-ACC-ACC-AAT-ATT-CAC-CA 3'	Foward	225bp
		5' TGG-CCT-TGT-CAA-AGT-TTA-AT 3'	Reverse	
NOX 2	NM_000397	5' AGA-GTT-CGA-AGA-CAA-CTG-GA 3'	Foward	233bp
		5' CCT-CCT-TCA-GGG-TTC-TTT-AT 3'	Reverse	
NOX 4	NM_016931	5' CTT-TTG-GAA-GTC-CAT-TTG-AG 3'	Foward	231bp
		5' ATC-AAG-CGG-CCC-CCT-TTT-TTC-AC 3'	Reverse	
NOX 5	NT_010194	5' CTC-ATT-CTC-ACA-CTC-CTC-GAC-AGC 3'	Foward	238 bp
		5' GTC-TGT-TCT-CTT-GCC-AAA-AC 3'	Reverse	
DUOX1	NP_059130	5' GCA-GGA-CAT-CAA-CCC-TGC-ACT-CTC 3'	Foward	348 bp
		5' CTG-CCA-TCT-ACC-ACA-CGG-ATC-TGC 3'	Reverse	
DUOX2	NP_054799	5' GAT-GGT-GAC-CGC-TAC-TGG-TT 3'	Foward	303 bp
		5' GCC-ACC-ACT-CCA-GAG-AGA-AG 3'	Reverse	
iNOS	NP_000616	5' AGC-ATG-TAC-CCT-CGG-TTC-TG 3'	Foward	250 bp
		5' GGG-GAT-CTG-AAT-GTG-CTG-TT 3'	Reverse	
eNOS	NP_000594	5' GAA-GAG-GAA-GGA-GTC-CAG-TAA-CA 3'	Foward	438 bp
		5' GGA-CTT-GCT-GCT-TTG-CAG-GTT-TTC 3'	Reverse	
SOCS3	NP-003946	5' TCC-CCC-CAG-AAG-AGC-CTA-TTA-C 3'	Foward	107 bp
		5' TCC-GAC-AGA-GAT-GCT-GAA-GAG-TG 3'	Reverse	
β actin	NM_001101	5' TCG-TGC-GTG-ACA-TTA-AGG-AG 3'	Foward	262 bp
		5' AGC-ACT-GTG-TTG-GCG-TAC-AG 3'	Reverse	

Waltham, USA). Reverse transcription was performed in a thermocycler (Mastercycler ® gradient, Eppendorf, Montesson, France), with 1 µg of total RNA for each condition with a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Saint Aubin,France) with random hexamer pdN6 primers.

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR was performed using SYBR®Green reagents according to the manufacturer's instructions on a StepOne system (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). Each condition was assayed in triplicate. Relative quantification was obtained by the comparative CT method, based on the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Expression levels were normalized to the expression of the housekeeping gene (β actin) for each time and expressed as fold change from the basal expression level corresponding to untreated cells at time 0. Sequences and fragment sizes of human-specific primers used for analysis are shown in table I.

Cellular reactive oxygen species (ROS) production

ROS production was measured by fluorescence using a microplate reader (Fluoroscan Ascent Microplate Fluorometer®, Thermo Scientific, Waltham, USA) and by flow cytometry (FC 500 MPL, Beckman Coulter, Villepinte, France). Oxidation of the probe was measured at a wavelength of 488 nm for excitation and 520 nm for emission. Results were expressed in relative fluorescence units (RFU).

After synchronization, cells were incubated for 30 minutes in the dark at 37°C in the appropriate growth medium with dichlorofluorescein (DCF) (2 µM, Interchim, Montluçon, France). After addition of leptin (10 ng/ml or 100 ng/ml) or medium (for control condition), cells were assayed for fluorescence every 10 minutes over 120 minutes in the microplate reader.

After synchronization, cells were incubated in presence of leptin (10 ng/ml or 100 ng/ml) or medium (for control condition). After trypsinisation, cell suspension loaded with DCF (2 µM) was submitted to fluorescent flow cytometry analysis on a log scale for 10,000 events (cell counts).

Intracellular calcium influx

To assess calcium-dependent signalling pathway in cell ROS production, calcium influx was measured by fluorescence on the microplate reader using the Fluo-3 calcium probe (Interchim, Montluçon, France) at 2 µM as described previously (Minta, Kao, and Tsien 1989). The effects of calcium influx inhibition were measured in the presence of verapamil (20 µM) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and incubated for 30 minutes before addition of fluorescent probes. After synchronization, cells were incubated for 30 minutes in the dark at 37°C in the appropriate growth medium with Fluo-3 or dichlorofluorescein. After the addition of leptin (10 ng/ml or 100 ng/ml) or medium (for control condition) with or without verapamil, cells were assayed for fluorescence every 10 minutes over 120 minutes. Oxidation of the probe was measured at a wavelength of 488 nm for excitation and 520 nm for emission. Results were expressed in relative fluorescence units (RFU).

Silencing of NOX5

To confirm the involvement of NOX5 in ROS production, its expression was inhibited with small interfering RNA (siRNA). Twenty-one nucleotide double-stranded siRNAs (5 nM) (Qiagen HP genome wide siRNA databank, Forward 5'-GCC CUA UUU GAC UCC GAU ATT-3', Reverse 5'-UAU CGG AGU CAA AUA GGG CAA-3') targeting the NOX5 mRNA sequence were used. Non-silencing RNA (5 nM) was used as the negative siRNA control (scrambled siRNA).

SiRNA transfection of cells was performed according to the manufacturer's instructions (Qiagen, Courtaboeuf, France). Briefly, 22,500/cm^2 cells were cultured in 6-well plates. After 1 h incubation with siRNA, wells were completed with the serum-free medium for 24 h. Synchronized cells were assayed for ROS production by fluorescence using a microplate reader for 120 minutes as described above, either with or without human recombinant leptin at 10 ng/ml or 100 ng/ml. Cells were then harvested and quantitative RT-PCR was performed to compare NOX5 mRNA silencing in the presence and absence of siRNA.

Western blot analysis

Human mammary epithelial cells exposed from 1h to 24 h with or without leptin (10 and 100 ng/ml) were washed twice with ice-cold phosphate buffer saline and lysed with RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The homogenates were centrifuged and the supernatants were kept at -80 C° until used.

Proteins were quantified by the bicinchonic acid method (Interchim, Montluçon, France) according to the manufacturer's instructions. Standard curve was obtained with a standard solution of bovine serum albumin (2 g/l). Equal amounts of proteins were resolved on 10% SDS–PAGE then transferred to nitrocellulose membrane (Whatman GmbH, Dassel, Germany) and blocking for revelation.

Monoclonal Phospho-Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) (Tyr705) antibodies and polyclonal leptin receptor (Ob-R) antibodies were used (Cell Signaling Tech. Inc., Danvers, USA). Protein expression was normalized to actin content (Monoclonal actin, Abcam, Cambridge, United Kingdom). Revelation was performed by luminescent assay using horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibody (Thermo scientific, Waltham, USA). Densitometric analysis of bands was carried out with Quantity One software (BioRad, Marnes-la-Coquette, France).

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate and the average value treated as a single data point. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA). Data are expressed as mean ± standard deviation. For fluorescence measurements, values are expressed as a ratio of the control at baseline. Between-groups comparison was performed by one- way ANOVA or two-way ANOVA as appropriate, followed by Kruskal-Wallis or Bonferroni multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Significances are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ or by use of different letters.

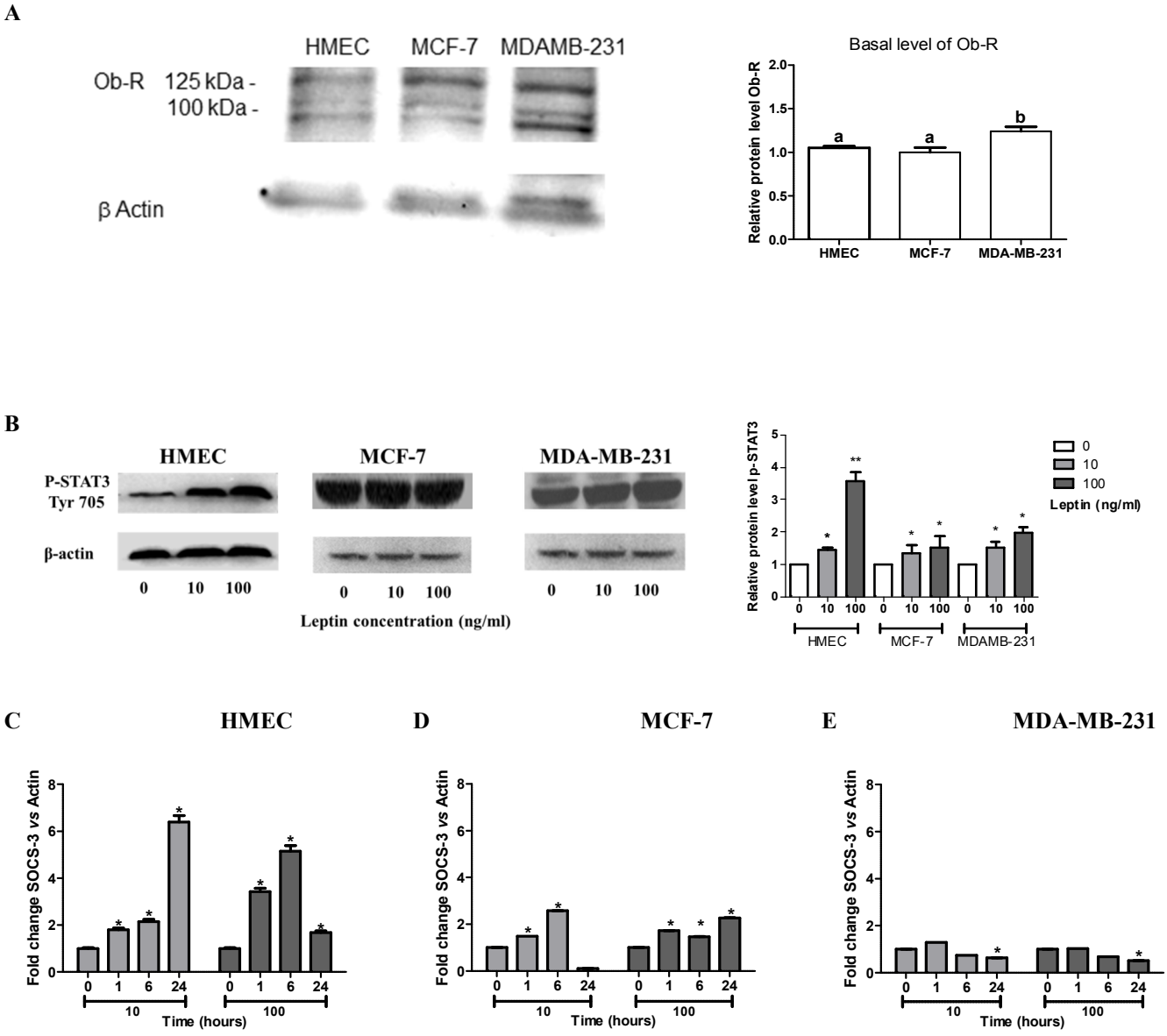


Figure 1: Characterization of leptin signalling pathway in human mammary epithelial cells

A: Western blotting and densitometric analysis of Ob-Rb normalized to β-actin on human mammary epithelial cell lysates (HMEC, MCF-7 and MDA-MB-231) in basal condition.

B: Assessment of phospho-STAT3: human mammary epithelial cell lysates (HMEC, MCF-7 and MDA-MB-231), cultured with leptin (10, 100 ng/mL) for 1h. Western blotting and densitometric analysis of phosphorylated forms of STAT3 normalized to β-actin.

C: mRNA expression of SOCS-3 for HMEC cultured with leptin (10, 100 ng/mL) for 0, 1, 6 and 24 h.

D: mRNA expression of SOCS-3 for MCF-7 cultured with leptin (10, 100 ng/mL) for 0, 1, 6 and 24 h.

E: mRNA expression of SOCS-3 for MDA-MB-231 cultured with leptin (10, 100 ng/mL) for 0, 1, 6 and 24 h.

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by different letters ($a \neq b$, $p < 0.05$).Statistical significance between time or leptin concentration is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Results

Leptin down-regulation depended on the neoplastic status of cells

Only a slight increase in protein expression of leptin receptor (Ob-R) for MDA-MB-231 (1.24 fold) compared to HMEC and MCF-7 ($p<0.05$, figure 1A) was observed. We assessed the signaling pathway of Ob-R in response to leptin *via* the phosphorylation of STAT3 and the expression of the suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS-3). The two concentrations of leptin used induced STAT3 tyrosine 705 phosphorylation at 1h, with a greater effect under 100 ng/ml of leptin in HMEC ($p<0.05$, figure 1B). The expression of SOCS-3 was highly induced in HMEC ($p<0.05$, figure 1C). In contrast, leptin induced a moderate level of SOCS3 expression in MCF-7 ($p<0.05$, figure 1D), and down regulated SOCS-3 expression in MDA-MB-231 at 24h ($p<0.05$, figure 1E).

Leptin induced ROS production in human mammary epithelial cells

Basal ROS production was similar in the HMEC and neoplastic cell models and increased in the presence of leptin ($p<0.05$, figure 2A) without any difference between the two concentrations used.

The time course of ROS production in the presence of leptin showed, irrespective of the cell models or the dose of leptin, an increase at 10 minutes (126 ± 4%, 115 ± 2%, 155 ± 19 % of basal production, respectively for HMEC, MCF-7, MDA-MB-231, $p<0.05$, figures 2B, C and D). This short-term increase was followed by middle-term production for at least 1 hour at 108% for HMEC and MCF-7 and at 135% for MDA-MB-231 *vs* their basal productions.

NOX5 was the only ROS-producing system expressed in our model conditions

The ROS production enzymes of the mammary epithelial cells were characterized in our culture cell condition without leptin by qRT-PCR (table I). Of the different producing systems of ROS studied, i.e. the NADPH oxidase (NOX) iso-enzyme 1, 2, 4 and 5, the dual oxidase (DUOX) iso-enzymes 1 and 2 and the two nitric oxide synthase isoforms, endothelial (eNOS) and inducible (iNOS), only the NADPH oxidase 5 (NOX5) iso-enzyme was expressed in our cell models (figure 3A).

In neoplastic cells, mRNA expression for NOX5 was 6-fold higher than in healthy cells ($p<0.05$, figure 2B). After addition of 10 or 100 ng/ml of leptin, gene expression of the ROS production enzymes was determined at 1h, 6h and 24h by qRT-PCR. Only the NADPH oxidase 5 (NOX5) iso-enzyme mRNA expression showed a down-regulation in the three cell models: neither the other NOX isoforms nor the NOS isoforms presented a detectable expression (data not shown).

ROS production under leptin depended on NOX5 activity

To confirm the potential implication of NOX5 in ROS production its expression was inhibited using small interfering RNA (siRNA) against NOX5 (siNOX5). NOX5 silencing powerfully inhibited NOX5 mRNA expression under basal condition (-74%, -80% and -87% of mRNA expression, respectively, for HMEC, MCF-7 and MDA-MB-231; figures 4A1, B1 and C1) and at both leptin concentrations. Surprisingly, despite a marked inhibition of mRNA

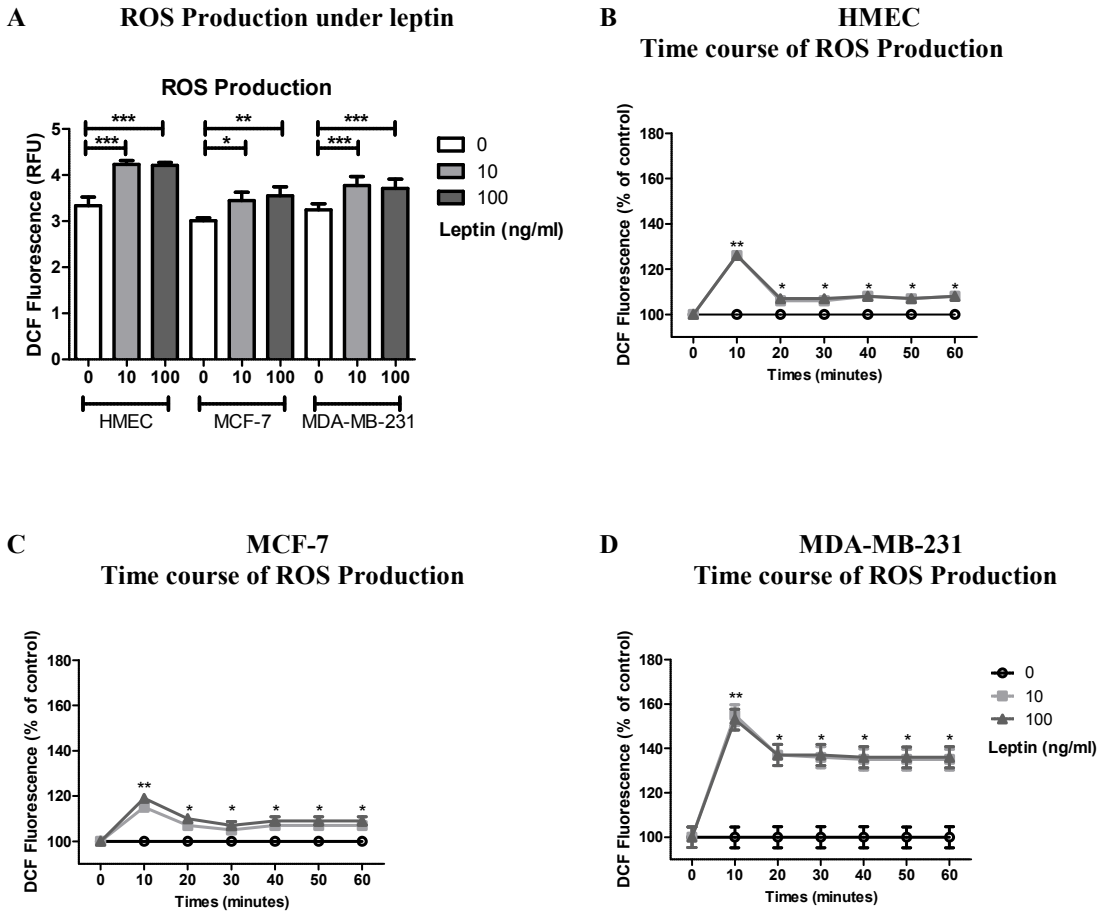


Figure 2: ROS production under leptin in human mammary epithelial cells

A: Cellular production at 10 min for total ROS (DCF).

B: Time course of total cellular ROS production (DCF) in HMEC.

C: Time course of total cellular ROS production (DCF) in MCF-7.

D: Time course of total cellular ROS production (DCF) in MDA-MD-231.

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between time or leptin concentration is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

expression, ROS production under basal condition in HMEC was less affected by the silencing than in the neoplastic cells (-2%, -33% and -26% of inhibition, respectively, for HMEC, MCF-7 and MDA-MB-231, figures 4A2, B2 and C2). However, after NOX5 silencing, ROS production did not increase at either leptin concentration (-22%, -32% and -37 % of ROS production respectively for HMEC, MCF-7, MDA-MB-231, with10 ng/ml of leptin, $p<0.05$).

Leptin induced NOX5 activity via calcium flux

Involvement of the calcium-dependent NOX5 iso-enzyme in ROS production was verified in the presence of 20µM verapamil (a calcium channel inhibitor). Whatever the cell model, leptin at both concentrations induced an increase in fluorescence of the calcium influx probe Fluo-3 (+19%, +23% and +20% increase, respectively, for HMEC, MCF-7 and MDA-MB-231, figures 5A1, B1 and C1) which was totally inhibited with verapamil. In the presence of verapamil, ROS production decreased in both basal and leptin conditions (HMEC: -40%, -55% and -60%, MCF-7: -25%, -35% and -37%, MDA-MB-231: -20%, -28% and -25% respectively for 0, 10, 100 ng/ml of leptin, figures 5A2, B2 and C2).

Discussion

Except for a significantly higher Ob-R protein level in MDA-MD-231, the protein level of the three cells lines were very close. In response to leptin, the protein expression of phosphorylated STAT3 at 1h increased for both concentrations and cell lines, with a greater effect under the condition mimicking obesity (100 ng/ml). As previously described in other cell types (Piao et al. 2014), STAT3 activation led to an over-expression of SOCS3, the down-regulator of Ob-R. In our models, the over-expression of SOCS-3 was observed in HMEC and MCF-7 but not in MDA-MB-231. In addition, in each cell model for the obesity-like condition, the expression of SOCS3 was lower at 24h. These results could be related to the adverse effects of obesity (Vona-Davis and Rose 2013), and also to the involvement of STAT3 (Bourgeais, Gouilleux-Gruart, and Gouilleux 2013b) in carcinogenesis and are consistent with those obtained in a clinical study which reported alterations in SOCS3 expression in the tumorous tissues of overweight women (Santillán-Benítez et al. 2014).

The crosslink between ROS production and leptin signalling has been reported in several tissues such as endothelium (Bouloumie et al. 1999b) and the ovaries (Bilbao et al. 2015a). ROS production could also be one of the signalling pathways activated through Ob-R in the presence of leptin (Bourgeais, Gouilleux-Gruart, and Gouilleux 2013b). Several studies have investigated the impact of leptin in carcinogenesis (Dubois, Jardé, Delort, et al. 2014), (Barone et al. 2012a), (Nalabolu, Palasamudram, and Jamil 2014a) but few of them focused on intracellular ROS production (M. D. M. Blanquer-Rosselló et al. 2015). The NOX iso-enzyme family is one of the most powerful generators of ROS in cells (J.-M. Li and Shah 2003a). These enzymes are clearly involved in many pathological situations (Cave et al. 2006a) especially in carcinogenesis (Antony et al. 2013a). Until recently, there have been scant data concerning the NOX iso-enzyme family and the ROS production system in mammary epithelial cells (Juhasz et al. 2009a) despite their important role as cellular signalling pathways (Jiang, Zhang, and Dusting 2011b).

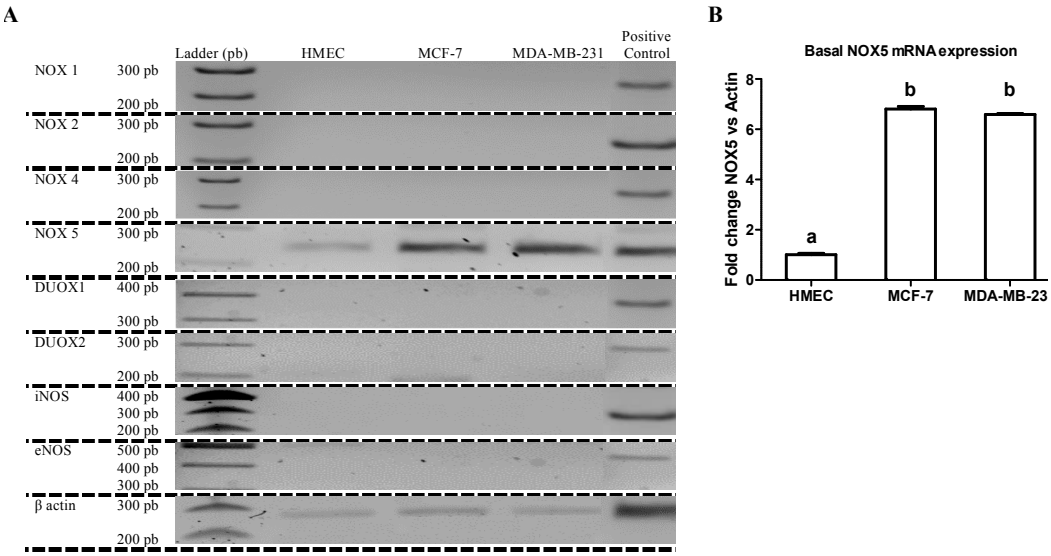


Figure 3: Characterization of ROS production systems in human mammary epithelial cells

A: mRNA expression of ROS production systems: Electrophoresis of amplicon for NOX1, NOX2, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2, iNOS, eNOS and actin in human mammary epithelial cells.

B: Basal expression by qRT-PCR of NOX5 in human mammary epithelial cells.

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by different letters ($a \neq b$, $p < 0.05$).Statistical significance between time is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

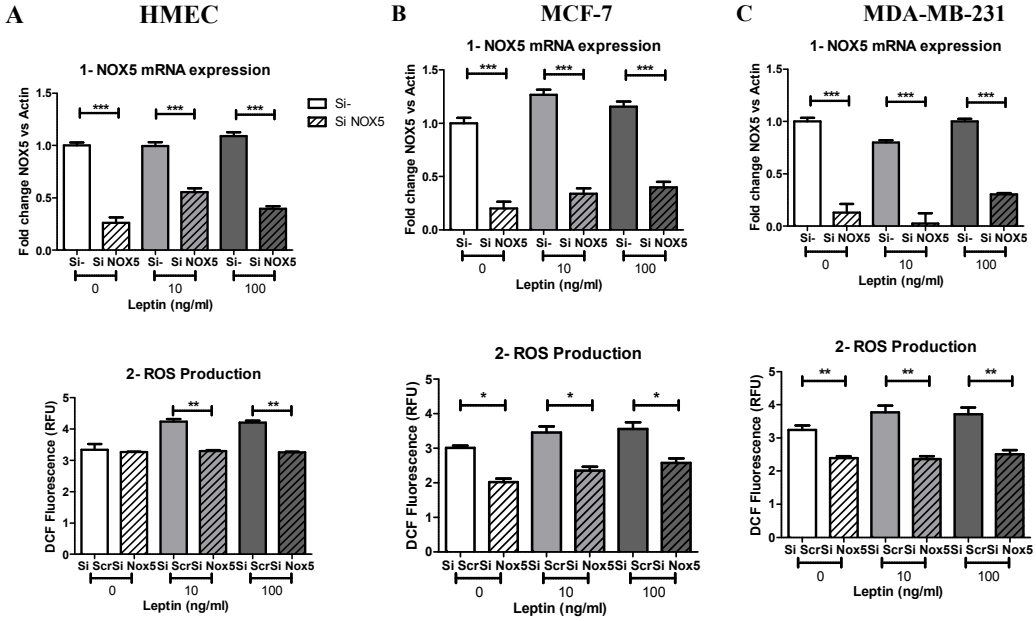


Figure 4: Involvement of the calcium-dependent NOX5 in ROS production in presence of leptin (0, 10, 100 ng/ml)

A: Effects of siRNA against NOX5 on HMEC in terms of: 1- NOX5 mRNA expression, 2- total ROS production (DCF).

B: Effects of siRNA against NOX5 on MCF-7 in terms of: 1- NOX5 mRNA expression, 2- total ROS production (DCF).

C: Effects of siRNA against NOX5 on MDA-MB-231 in terms of: 1- NOX5 mRNA expression, 2- total ROS production (DCF).

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=6). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

In the present study, we assessed the effect of leptin on ROS production and the characterization of the production system in three mammary epithelial cell lines representing different neoplastic states, from healthy to metastatic. Whatever the cell line, leptin briefly increased ROS production, which remained significantly higher than the basal level for more than 1 hour. These results are the first evidence of the implication of leptin in short time ROS production in epithelial mammary cells and are in agreement with previous work linking leptin to the oxidative stress (Bouloumie et al. 1999b). As performed elsewhere in cancer cells (Juhasz et al. 2009a), we assessed the expression of several NOX isoforms in our models. At variance with previous data, neither NOX2 (Rao Malla, Raghu, and Rao 2010) nor NOX4 (Graham et al. 2010a), two other NOX isoforms observed in breast cancer cells, presented significant mRNA expression during our 24-hour experiments. In our conditions, only the NOX5 isoform presented a significant level of expression. These results are in agreement with the expression profile found in tumour cell lines MCF-7 where NOX5 is the major NOX isoform expressed (Juhasz et al. 2009a) and in breast tumours where the expression for the NOX5 iso-enzyme is positive in around 60% of the tumours assessed (Antony et al. 2013a).

To better understand and confirm the involvement of NOX5 in ROS production, we used in a first step siRNA against NOX5 to inhibit expression. Silencing was effective: more than 70% of inhibition of expression was observed after treatment. Basal production seemed to be independent of NOX5, since only 25% of the basal signal was inhibited in neoplastic cells. Surprisingly in HMEC, NOX5 silencing did not affect basal ROS production, confirming potential other sources of ROS such as mitochondria. However, the increase in ROS production in the presence of leptin was completely suppressed under NOX5 siRNA. In the three cell models, ROS production under leptin stayed at the same level as under control condition. These results confirm the involvement of NOX5 in ROS production under leptin.

In a second step, we used the calcium channel inhibitor verapamil to block calcium influx, which is a potent NOX5 activator (Bedard, Jaquet, and Krause 2012). All the cell models were sensitive to verapamil, which is able to reduce calcium flux. Consequently, ROS production declined below the basal level whatever the leptin dose used. These data confirm the involvement of a calcium-dependent pathway in ROS production under leptin (Yuan et al. 2008). However, basal production seemed to be largely independent of calcium influx, since at least 45% of ROS production remained in the presence of the inhibitor verapamil. In the absence of another NOX family gene expression detected, we suggest, as previously shown, that ROS detected in basal condition is due to mitochondria (M. D. M. Blanquer-Rosselló et al. 2015), (Graham et al. 2010a) and the respiratory chain (Ameri et al. 2015).

In summary, these experiments confirm the involvement of NOX5 in the induction of ROS production secondary to the presence of leptin. Taken as a whole, our results allowed us to hypothesize that leptin *via* its receptor Ob-R activated the calcium-dependent signalling pathway *via* PI3K (Martín-Romero and Sánchez-Margalet 2001), (Trachootham et al. 2008). Calcium influx results in NOX5 activation (F. Chen et al. 2014a), which produces a ROS-dependent cascade (Gupta et al. 2014a) in parallel to the canonical leptin JAK/STAT cascade (Gao et al. 2009a).

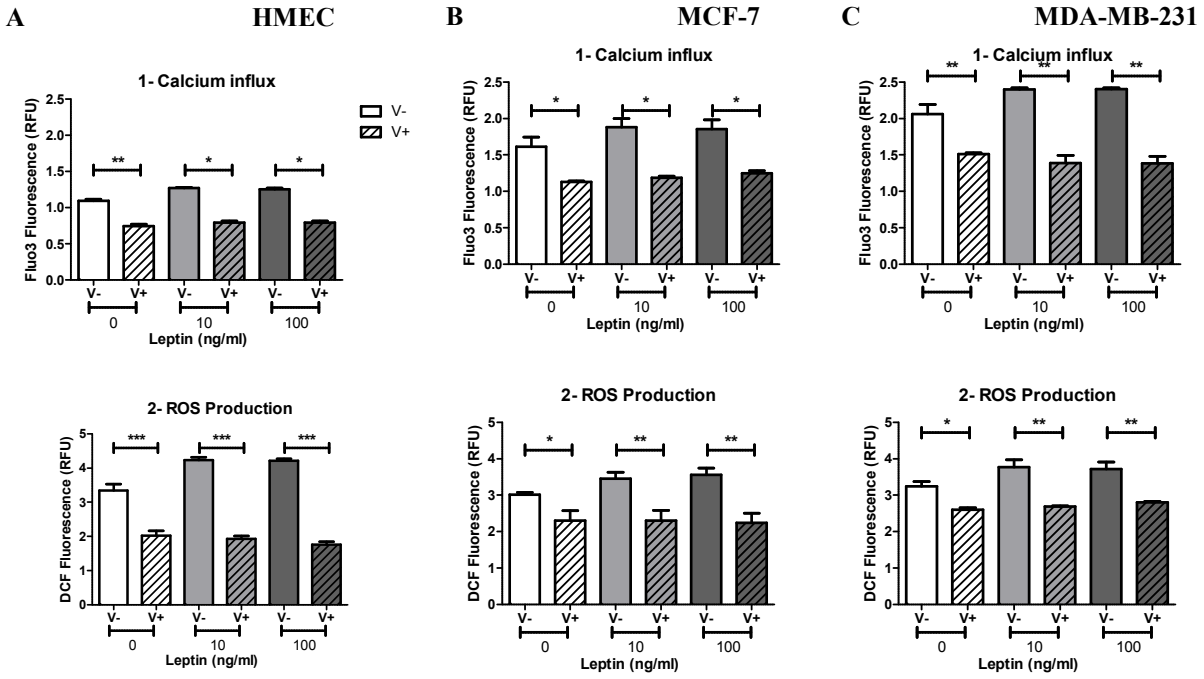


Figure 5: Involvement of the calcium influx in ROS production in presence of leptin (0, 10, 100 ng/ml)

A: Effects of verapamil, a calcium channel inhibitor, on HMEC in terms of: 1- Calcium influx (Fluo3), 2- total ROS production (DCF).

B: Effects of verapamil, a calcium channel inhibitor, on MCF-7 in terms of: 1- Calcium influx (Fluo3), 2- total ROS production (DCF).

C: Effects of verapamil, a calcium channel inhibitor, on MDA-MB-231 in terms of: 1- Calcium influx (Fluo3), 2- total ROS production (DCF).

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=6). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

References

1. Ceddia, R. B. (2005) Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. Int. J. Obes. 2005. 29, 1175–1183
2. Gregor, M. F., and Hotamisligil, G. S. (2007) Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. J. Lipid Res. 48, 1905–1914
3. Huang, X.-F., Xin, X., McLennan, P., and Storlien, L. (2004) Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptin receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. Diabetes Obes. Metab. 6, 35–44
4. Esposito, K., Ciotola, M., Schisano, B., Misso, L., Giannetti, G., Ceriello, A., and Giugliano, D. (2006) Oxidative stress in the metabolic syndrome. J. Endocrinol. Invest. 29, 791–795
5. Fernández-Sánchez, A., Madrigal-Santillán, E., Bautista, M., Esquivel-Soto, J., Morales-González, A., Esquivel-Chirino, C., Durante-Montiel, I., Sánchez-Rivera, G., Valadez-Vega, C., and Morales-González, J. A. (2011) Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int. J. Mol. Sci. 12, 3117–3132
6. Gletsu-Miller, N., Hansen, J. M., Jones, D. P., Go, Y.-M., Torres, W. E., Ziegler, T. R., and Lin, E. (2009) Loss of total and visceral adipose tissue mass predicts decreases in oxidative stress after weight-loss surgery. Obes. Silver Spring Md. 17, 439–446
7. Jiang, F., Zhang, Y., and Dusting, G. J. (2011) NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. Pharmacol. Rev. 63, 218–242
8. Li, J., Stouffs, M., Serrander, L., Banfi, B., Bettiol, E., Charnay, Y., Steger, K., Krause, K.-H., and Jaconi, M. E. (2006) The NADPH oxidase NOX4 drives cardiac differentiation: Role in regulating cardiac transcription factors and MAP kinase activation. Mol. Biol. Cell. 17, 3978–3988
9. Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., and Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 13454–13459
10. Xia, C., Meng, Q., Liu, L.-Z., Rojanasakul, Y., Wang, X.-R., and Jiang, B.-H. (2007) Reactive oxygen species regulate angiogenesis and tumor growth through vascular endothelial growth factor. Cancer Res. 67, 10823–10830
11. Basu, S., Nachat-Kappes, R., Caldefie-Chézet, F., and Vasson, M.-P. (2013) Eicosanoids and adipokines in breast cancer: from molecular mechanisms to clinical considerations. Antioxid. Redox Signal. 18, 323–360
12. Jardé, T., Caldefie-Chézet, F., Goncalves-Mendes, N., Mishellany, F., Buechler, C., Penault-Llorca, F., and Vasson, M. P. (2009) Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. Endocr. Relat. Cancer. 16, 1197–1210
13. Nalabolu, M. R., Palasamudram, K., and Jamil, K. (2014) Adiponectin and leptin molecular actions and clinical significance in breast cancer. Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res. 8, 31–40
14. Macciò, A., and Madeddu, C. (2011) Obesity, inflammation, and postmenopausal breast cancer: therapeutic implications. ScientificWorldJournal. 11, 2020–2036
15. Guo, S., Liu, M., Wang, G., Torroella-Kouri, M., and Gonzalez-Perez, R. R. (2012) Oncogenic role and therapeutic target of leptin signaling in breast cancer and cancer stem cells. Biochim. Biophys. Acta. 1825, 207–222
16. Dubois, V., Jardé, T., Delort, L., Billard, H., Bernard-Gallon, D., Berger, E., Geloen, A., Vasson, M.-P., and Caldefie-Chezet, F. (2014) Leptin induces a proliferative response in breast cancer cells but not in normal breast cells. Nutr. Cancer. 66, 645–655
17. Barone, I., Catalano, S., Gelsomino, L., Marsico, S., Giordano, C., Panza, S., Bonofiglio, D., Bossi, G., Covington, K. R., Fuqua, S. A. W., and Andò, S. (2012) Leptin mediates tumor-stromal interactions that promote the invasive growth of breast cancer cells. Cancer Res. 72, 1416–1427
18. Vona-Davis, L., and Rose, D. P. (2013) The obesity-inflammation-eicosanoid axis in breast cancer. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 18, 291–307
19. Andò, S., and Catalano, S. (2012) The multifactorial role of leptin in driving the breast cancer microenvironment. Nat. Rev. Endocrinol. 8, 263–275
20. Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem. Biol. Interact. 160, 1–40
21. Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D., and Ronai, Z. (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. Oncogene. 18, 6104–6111
22. Sun, Y., Huang, L., Mackenzie, G. G., and Rigas, B. (2011) Oxidative stress mediates through apoptosis the anticancer effect of phospho-nonsteroidal anti-inflammatory drugs: implications for the role of oxidative stress in the action of anticancer agents. J. Pharmacol. Exp. Ther. 338, 775–783
23. Dattaroy, D., Pourhoseini, S., Das, S., Alhasson, F., Seth, R. K., Nagarkatti, M., Michelotti, G. A., Diehl, A. M., and Chatterjee, S. (2014) Micro RNA 21 inhibition of SMAD 7 enhances fibrogenesis via leptin mediated NADPH oxidase in experimental and human nonalcoholic steatohepatitis. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 10.1152/ajpgi.00346.2014

24. Badid, N., Ahmed, F. Z. B., Merzouk, H., Belbraouet, S., Mokhtari, N., Merzouk, S. A., Benhabib, R., Hamzaoui, D., and Narce, M. (2010) Oxidant/antioxidant status, lipids and hormonal profile in overweight women with breast cancer. Pathol. Oncol. Res. POR. 16, 159–167
25. Blanquer-Rosselló, M. D. M., Santandreu, F. M., Oliver, J., Roca, P., and Valle, A. (2015) Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells. J. Cell. Biochem. 10.1002/jcb.25158
26. Meitzler, J. L., Antony, S., Wu, Y., Juhasz, A., Liu, H., Jiang, G., Lu, J., Roy, K., and Doroshow, J. H. (2014) NADPH oxidases: a perspective on reactive oxygen species production in tumor biology. Antioxid. Redox Signal. 20, 2873–2889
27. Juhasz, A., Ge, Y., Markel, S., Chiu, A., Matsumoto, L., van Balgooy, J., Roy, K., and Doroshow, J. H. (2009) Expression of NADPH oxidase homologues and accessory genes in human cancer cell lines, tumours and adjacent normal tissues. Free Radic. Res. 43, 523–532
28. Martínez-Martínez, E., Jurado-López, R., Valero-Muñoz, M., Bartolomé, M. V., Ballesteros, S., Luaces, M., Briones, A. M., López-Andrés, N., Miana, M., and Cachofeiro, V. (2014) Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity. J. Hypertens. 32, 1104–1114; discussion 1114
29. Minta, A., Kao, J. P., and Tsien, R. Y. (1989) Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. J. Biol. Chem. 264, 8171–8178
30. Bouloumie, A., Marumo, T., Lafontan, M., and Busse, R. (1999) Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 13, 1231–1238
31. Bilbao, M. G., Di Yorio, M. P., Galarza, R. A., Varone, C., and Faletti, A. G. (2015) REGULATION OF THE OVARIAN OXIDATIVE STATUS BY LEPTIN DURING THE OVULATORY PROCESS IN RATS. Reprod. Camb. Engl. 10.1530/REP-14-0536
32. Bourgeais, J., Gouilleux-Gruart, V., and Gouilleux, F. (2013) Oxidative metabolism in cancer: A STAT affair? JAK-STAT. 2, e25764
33. Li, J.-M., and Shah, A. M. (2003) ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy. J. Am. Soc. Nephrol. JASN. 14, S221–226
34. Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D. J., Walker, S., and Shah, A. M. (2006) NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. Antioxid. Redox Signal. 8, 691–728
35. Antony, S., Wu, Y., Hewitt, S. M., Anver, M. R., Butcher, D., Jiang, G., Meitzler, J. L., Liu, H., Juhasz, A., Lu, J., Roy, K. K., and Doroshow, J. H. (2013) Characterization of NADPH oxidase 5 expression in human tumors and tumor cell lines with a novel mouse monoclonal antibody. Free Radic. Biol. Med. 65, 497–508
36. Rao Malla, R., Raghu, H., and Rao, J. S. (2010) Regulation of NADPH oxidase (Nox2) by lipid rafts in breast carcinoma cells. Int. J. Oncol. 37, 1483–1493
37. Graham, K. A., Kulawiec, M., Owens, K. M., Li, X., Desouki, M. M., Chandra, D., and Singh, K. K. (2010) NADPH oxidase 4 is an oncoprotein localized to mitochondria. Cancer Biol. Ther. 10, 223–231
38. Bedard, K., Jaquet, V., and Krause, K.-H. (2012) NOX5: from basic biology to signaling and disease. Free Radic. Biol. Med. 52, 725–734
39. Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L., and Prabhakar, N. R. (2008) Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca2+ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. J. Cell. Physiol. 217, 674–685
40. Ameri, K., Jahangiri, A., Rajah, A. M., Tormos, K. V., Nagarajan, R., Pekmezci, M., Nguyen, V., Wheeler, M. L., Murphy, M. P., Sanders, T. A., Jeffrey, S. S., Yeghiazarians, Y., Rinaudo, P. F., Costello, J. F., Aghi, M. K., and Maltepe, E. (2015) HIGD1A Regulates Oxygen Consumption, ROS Production, and AMPK Activity during Glucose Deprivation to Modulate Cell Survival and Tumor Growth. Cell Rep. 10.1016/j.celrep.2015.01.020
41. Piao, L., Park, J., Li, Y., Shin, S., Shin, S., Kong, G., Shrestha, R., Tran, Q., Hur, G. M., Kim, J.-L., and Park, J. (2014) SOCS3 and SOCS6 are required for the risperidone-mediated inhibition of insulin and leptin signaling in neuroblastoma cells. Int. J. Mol. Med. 33, 1364–1370
42. Santillán-Benítez, J. G., Mendieta-Zerón, H., Gómez-Oliván, L. M., Ordóñez Quiroz, A., Torres-Juárez, J. J., and González-Bañales, J. M. (2014) JAK2, STAT3 and SOCS3 gene expression in women with and without breast cancer. Gene. 547, 70–76
43. Martín-Romero, C., and Sánchez-Margalet, V. (2001) Human leptin activates PI3K and MAPK pathways in human peripheral blood mononuclear cells: possible role of Sam68. Cell. Immunol. 212, 83–91
44. Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Valle, N. R.-D., and Huang, P. (2008) Redox Regulation of Cell Survival. Antioxid. Redox Signal. 10, 1343–1374
45. Chen, F., Yu, Y., Haigh, S., Johnson, J., Lucas, R., Stepp, D. W., and Fulton, D. J. R. (2014) Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. PloS One. 9, e88405

46. Gupta, S. C., Singh, R., Pochampally, R., Watabe, K., and Mo, Y.-Y. (2014) Acidosis promotes invasiveness of breast cancer cells through ROS-AKT-NF-κB pathway. Oncotarget. 5, 12070–12082
47. Gao, J., Tian, J., Lv, Y., Shi, F., Kong, F., Shi, H., and Zhao, L. (2009) Leptin induces functional activation of cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT pathways in human endometrial cancer cells. Cancer Sci. 100, 389–395

Acknowledgments

This work was supported by the Conseil Régional d'Auvergne and the European research fund (FEDER).

List of abbreviations

ROS: reactive oxygen species; NOX: NADPH oxidase; DUOX: dual oxidases; HMEC: human mammary epithelial cells; NOS: NO synthases; qRT-PCR: Quantitative real-time PCR; DCF: Dichlorofluorescein; RFU: Relative fluorescence unit; siRNA: Small interfering RNA; STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3; Ob-R: leptin receptor; SOCS-3: Suppressor of cytokine signaling 3; JAK: Janus Kinase;; PI3K: Phospo inositol 3 kinase;

Publication n°2

La leptine induit une défense anti-oxydante et une réponse inflammatoire dépendante du statut néoplasique des cellules épithéliales mammaires

Sinda Mahbouli, Jérémie Talvas, Audrey der Vartanian, Sophie Ortega, Stéphanie Rougé,

Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary.

En vue d'une soumission à ***Journal of cellular Biochemistry***

Présentation de la publication n°2

Introduction

Dans cette étude nous nous somme principalement intéressés à l'impact de la leptine sur le statut redox des cellules qui découle de l'équilibre entre la production d'espèces réactives de l'oxygène sous la dépendance de systèmes enzymatiques finement régulés (NADPH oxydases (NOX)) et des systèmes protecteurs enzymatiques ou non, dont le plus important tant du point de vue qualitatif que quantitatif est constitué par le glutathion (GSH) intracellulaire et les enzymes de son métabolisme.

But de l'étude

Dans la suite de l'étude *in vitro*, nous avons repris une des questions soulevées au vu des premiers résultats, à savoir : est-ce que la leptine induit une défense anti-oxydante et une réponse inflammatoire similaire dans les trois modèles cellulaires étudiés.

Matériels et Méthodes

Pour répondre à cette question, nous avons traité les cellules épithéliales mammaires humaines à différents stade néoplasique, HMEC (cellules saines primaires), MCF-7 (cancéreuses non invasives) et MDA-MB-231 (cancéreuses invasives), avec deux concentrations de leptine, 10ng/ml de leptine (situation physiologique) et 100ng/ml de leptine (situation d'obésité). Nous avons suivi l'expression et l'activité catalytiques des enzymes impliquées dans la défense anti-oxydante (GR, GST, GPx, γ GCL et HO-1). En outre, nous avons caractérisé la réponse inflammatoire des cellules épithéliales mammaire par la détermination de l'expression et de l'activité enzymatique de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et le dosage du 8-isoPGF$_2\alpha$ par ELISA, ainsi par la mesure de la peroxydation lipidique par dosage du MDA et des hyroperoxydes lipidiques (HPLIP).

Résultats majeurs

En réponse à la production des ERO par la leptine, les cellules saines HMEC induisent leur défense anti-oxydante avec une augmentation de l'expression à 1h puis de l'activité catalytique à 6h de l'hème-oxygénase 1 (HO-1) et de la glutathion peroxydase (GPx). Ceci s'accompagne d'une peroxydation lipidique stable à 679 ± 248 µmol/l d'hydroperoxydes lipidiques (HPLIP). Pour les lignées néoplasiques, la réponse anti-oxydante est incomplète avec une induction d'expression génique à 1h et d'activité catalytique à 6h de HO-1 et GPx uniquement chez MCF-7 pour une concentration de leptine de 10 ng/ml. L'absence de réponse anti-oxydante pour MCF-7 à 100 ng/ml et chez MDA-MB-231 quelle que soit la concentration de leptine, conduit à une forte augmentation des HPLIP dans ces modèles (MCF-7 : 524 ± 227 *vs* 1045 ± 187 µmol/l ; MDA-MB-231 : 642 ± 376 *vs* 1082 ± 374 µmol/l, respectivement pour 0 *vs* 100 ng/ml de leptine) associée à une induction de l'enzyme COX-2 exprimée majoritairement en situation inflammatoire et l'augmentation de la production des composés bio actifs les isoprostanes (8-isoPGF$_2\alpha$) marqueurs du stress oxydant ce qui contribuerait au caractère agressif des cellules MDA-MB-231.

Conclusion

A travers ces résultats, nous avons montré que la leptine contribue à l'apparition d'un stress oxydant non compensée par une réponse anti-oxydante cellulaire varie en fonction du statut néoplasique de la lignée considérée. Ainsi une concentration de leptine similaire à la situation d'obésité réduit les défenses anti-oxydantes de cellules néoplasiques favorisant la peroxydation lipidique et de ce fait la production de médiateurs de l'inflammation. Ceci peut expliquer en partie l'augmentation du risque de récidive de cancer mammaire observée en situation d'obésité. Par la suite, il serait intéressant de replacer les cellules dans un micro-environnement cellulaire complexe. Ceci permet d'extrapoler les données *in vitro* afin de déterminer l'impact des sécrétions adipocytaires à partir d'un modèle expérimental de tumeur mammaire syngénique (lignée EO771) chez la souris sauvage C57BL/6.

Original Research Communication

Activation of antioxidant defences of human epithelial mammary cell under leptin depend on the neoplastic state

Sinda Mahbouli[1], Jérémie Talvas[1], Audrey der Vartanian[1], Sophie Ortega[1], Stéphanie Rougé[1], Marie-Paule Vasson[1,2], Adrien Rossary[1]

[1]Clermont Université, Université d'Auvergne, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, CRNH-Auvergne, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[2]CHU Clermont-Ferrand, Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, CLARA, F-63000 Clermont-Ferrand, France

Running title: **Leptin differently modulates antioxidant defences**

Corresponding author :

Adrien Rossary; **Address:** Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, Faculté de Pharmacie, 28 place Henri Dunant, 63000 Clermont-Ferrand cedex 01, France; **Phone:** +00334 73 17 80 46; **Fax:** +00334 73 17 80 38; **E-mail:** adrien.rossary@udamail.fr

Word count: 4290

Reference numbers: 50

Greyscale illustrations: 5 (4 figures and 1 tables)

Abstract

Aims: Obesity is linked to oxidative stress, which is a major factor in carcinogenesis, and to increased leptin concentration. Leptin should therefore be able to modulate oxidative status. The aim of this study was to determine the effects of leptin on the anti-oxidant response in three human mammary epithelial cells with different neoplastic status (healthy primary HMEC cells, MCF-7, MDA-MB-231).

Results: In similar culture conditions, leptin induced ROS production in each cell models whatever the concentration used. Interestingly, this ROS production contributed to various anti-oxidant responses with regard to neoplastic cell status. In HMEC, a highly inducible anti-oxidant response based on anti-oxidant enzyme activation and an increase in cellular GSH content was observed. However, at the concentration mimicking obesity, activation of anti-oxidant response was lower. Conversely in tumour cells, MCF-7 and MDA-MB-231, leptin did not induced an anti-oxidant response, whatever the concentration used.

Innovation and conclusion: Leptin induced similar ROS production in the three cell models but the anti-oxidant response was different. This suggests that leptin could modulate the oxidative status of epithelial mammary cells in different ways according to their neoplastic state. These novel results could shed light on the oxidative status in mammary cells and provide new evidence of why leptin induced oxidative stress.

Introduction

In obesity, accumulation of fat (Ceddia 2005) is related to metabolic disorders (Gregor and Hotamisligil 2007a), which is a risk factor for chronic diseases such as cancers (Vargas-Hernández et al. 2013a). Leptin, an adipokine that is up regulated during obesity, has been widely studied in carcinogenesis because it has many signalling pathways (Guo et al. 2012) involved in critical steps of pathogenesis such as cell proliferation (Dubois, Jardé, Delort, et al. 2014)(Barone et al. 2012a), inflammatory response (Vona-Davis and Rose 2013) and modulation of the tumoral micro-environment (Andò and Catalano 2012). Studies have clearly identified obesity, owing to the humoral secretions it entails, as a major risk factor in post-menopausal breast cancer (Antonio Macciò and Madeddu 2011). However, very few studies have assessed the ability of these secretions to change the metabolism of cells, especially that of primary healthy cells, with regard to oxidative status (Martínez-Martínez et al. 2014). Oxidative stress is known to take a part in carcinogenesis (M. Valko et al. 2006), to modulate many signalling pathways in cells (Adler et al. 1999) and to be linked to inflammation (Sun et al. 2011), but data are scarce on how it is affected by leptin in breast cancer (Badid et al. 2010).

Because oxidative stress can be induced by obesity (Fernández-Sánchez et al. 2011) and has a known role in carcinogenesis (M. Valko et al. 2006) we decided to study the oxidative status of different mammary epithelial cells. Previous work by our team showed that leptin induces an inflammatory response in breast cancer in mice (Nachat-Kappes et al. 2012b) and a different proliferative effect on cells (Dubois, Jardé, Delort, et al. 2014)(T Jardé et al. 2009b). We hypothesized that the differential integration of the leptin signalling between healthy and neoplastic cells is not only due to their neoplastic status (Ru et al. 2011), but also to their oxidative status (Butturini et al. 2014). Using healthy mammary epithelial

cells (HMEC), and MCF-7 and MDA-MB-231 cells, we characterized the anti-oxidant response of cells by investigating cellular anti-oxidant compounds (glutathione (GSH) and protein thiols) and anti-oxidant enzymes. The oxidative stress generated by leptin is evidenced by the products of lipid peroxidation (Basu 2010b)(Basu et al. 2013c). The aim of this work was to determine whether leptin at two concentrations (mimicking normal weight and obesity concentrations) modulates oxidative status, in terms of both oxidative and anti-oxidative responses and subsequently leads to an oxidative stress.

Materials and Methods

Cell culture

Healthy human mammary epithelial cells (HMEC, Caucasian women 55 years old; Lonza, Basel, Switzerland) were grown in complete MEBM medium, supplemented with hydrocortisone (0.5 µg/ml), epithelial growth factor (10 ng/ml), insulin (5 µg/ml), gentamicin (50 µg/ml) / amphotericin-B (50 ng/ml) and bovine pituitary extract (0,4%) as recommended by the manufacturer (Lonza, Basel, Switzerland). Neoplastic human mammary epithelial cells (MCF-7, Caucasian women 69 years old and MDA-MB-231, Caucasian women 51 years old; ATCC, Molsheim, France) were grown in RPMI 1640 medium (Biowest, Nuaillé, France) containing 10% fetal calf serum, L-glutamine (2 mM), penicillin (50 units/ml) and streptomycin (50 µg/ml) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2.

Treatment with leptin

Mammary epithelial cells were synchronized in serum free medium for 24 h before initiation of leptin treatment. Cells (HMEC, MCF7 and MDA-MB-231) were grown for 0, 1, 6 or 24 hours in their respective medium either with or without human recombinant leptin (R&D, Abingdon, United Kingdom) at physiological (10 ng/ml) or obese (100 ng/ml) concentrations.

Cells were harvested after trypsinisation and three phosphate buffer saline washes. The total cell lysates were obtained by two successive thawing-freezing cycles in TrisHCl 25 mM buffer pH 7.4 containing Tween 20 0.1% (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), with 15-second periods in an ultra-sound bath. The total cell lysates were stored at -80°C until analysis.

RNA isolation and reverse transcription

After treatment with leptin, total RNA was isolated from epithelial cells by Trizol® reagent (Invitrogen, Saint Aubin, France) according to the manufacturer's protocol and quantified using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop®2000, Thermo scientific, Waltham, USA). Reverse transcription was performed in a thermocycler (Mastercycler ® gradient, Eppendorf, Montesson, France), with 1 µg of total RNA for each condition with high-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Saint Aubin,France) with random hexamer pdN6 primers.

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR was performed using SYBR®Green reagents according to the manufacturer's instructions on a StepOne system (Applied Biosystems, Saint Aubin, France). Each condition

Table1. Summary of PCR primers

Gene name	Accession number	Primer sequences		Amplicon length
HMOX1	BC_001491	5′ ACA-GTT-GCT-GTA-GGG-CTT-TA 3′	Foward	247 bp
		5′ CTC-TGA-AGT-TTA-GGC-CAT-TG 3′	Reverse	
GPx1	NP_002076	5′ GCA-CCC-TCT-CTT-CGC-CTT-C 3′	Foward	222 bp
		5′ TCA-GGC-TCG-ATG-TCA-ATG-GTC 3′	Reverse	
GR	BC_069244	5′ GTC-AGT-GGG-AAA-AAG-TAC-AC 3′	Foward	244 bp
		5′ GTA-CCT-TAT-CAT-GCC-GTA-TC 3′	Reverse	
δGCL	NM_001498	5′ GAA-CTG-GCT-TGT-ACA-TTT-T 3′	Foward	204 bp
		5′ CAA-AGG-AAA-ATT-AAC-GAG-AG 3′	Reverse	
COX-2	NM_000963	5′-TCT-CCT-TGA-AAG-GAC-TTA-TG -3′	Foward	198 bp
		5′-CAT-TGA-TGG-TGA-CTG-TTT-TA -3′	Reverse	
β actin	NM_001101	5′ TCG-TGC-GTG-ACA-TTA-AGG-AG 3′	Foward	262 bp
		5′ AGC-ACT-GTG-TTG-GCG-TAC-AG 3′	Reverse	

was assayed in triplicate. Relative quantification was obtained by the comparative CT method, based on the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Expression levels were normalized to the housekeeping gene (actin) for each time and expressed as fold change from the basal expression level corresponding to untreated cells at time 0. Sequences and fragment sizes of human-specific primers used for analysis are shown in table I.

Quantification of cellular reactive oxygen species (ROS) production

ROS production was measured by fluorescence using a microplate reader (Fluoroscan Ascent Microplate Fluorometer®, Thermo Scientific, Waltham, USA). Briefly, human mammary epithelial cells were plated at a density of 22,500 cells/cm^2 in a 96 well plate. After synchronization, cells were incubated for 30 minutes in the dark at 37°C in the appropriate growth medium with Dihydroethidine (2 µM). Experimentation started by the addition of leptin (10 ng/ml or 100 ng/ml) or medium (for control condition) and plates were assayed for fluorescence every 10 minutes over 120 minutes. Fluorescence was determined with an excitation wavelength of 485 nm and at an emission wavelength of 520 nm. For each well, background fluorescence was corrected.

Assessment of enzymes activities

Heme oxygenase activity

Heme oxygenase (HO-1) activity was measured by following the degradation of heme in biliverdin using a modified method of Shih and Yang (Shih and Yang 2010a). Hemin (10 µM) transformation by cell lysate was determined in presence of the reagent buffer (100 mM TrisHCl, 2 mM EDTA, 2 mM MgCl2, 0.5% Tween 20, 2 mM NADPH, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Saint-QuentinFallavier, France) by a kinetic measurement at 405 nm and 37 ° C, in a microplate spectrophotometer reader (Multiskan FC, Thermo Scientific, Waltham, USA). Hemeoxygenase activity was expressed as UI/g of proteins using an extinction coefficient of 5, 84 10^4 cm^{-1} M^{-1} for hemin.

Glutathione reductase activity

Glutathione reductase (GR) activity was determined as described elsewhere (Arab et al. 2006a). The cell lysate was incubated with reagent buffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0.16 mM NADPH and 4.6 mM GSSG, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The kinetic analysis of NADPH oxidation was carried out at 340 nm and 37 C° for 3 minutes, in a microplate spectrophotometer reader. GR activity, normalized to the protein content of the cell lysates, was expressed in UI/g.

Glutathione peroxidase activity

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined by the oxidation of glutathione (GSH) in the presence of tert-butyl-hydroperoxide. Secondarily oxidized glutathione (GSSG) was recycled by GR in the presence of NADPH (W. H. Cheng et al. 1997). The cell lysate was incubated with reagent buffer (100 mM Tris-HCl , 1 mM EDTA, 22 mM tert-butyl-hydroperoxide, 5 mM GSH , 0.1 UI/ml GR, 2 mM NADPH, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Kinetic measurement of NADPH oxidation due to GSH recycling

was performed at 340 nm and 37°C, in a microplate spectrophotometer reader. GPx activity, normalized to the protein content of the cell lysates, was expressed in UI/g.

Glutathione S-transferase activity

Glutathione S-transferase (GST) activity was quantified as previously described (Arab et al. 2006a) using the conjugation reaction of reduced glutathione with an artificial substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene. The cell lysate was incubated with reagent buffer (50 mM HEPES, 5 mM GSH, 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, pH 7.4) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Kinetic measurement of the glutathionylation of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene was performed at 340 nm and 37°C, in a microplate spectrophotometer reader. GST activity, normalized to the protein content of the cell lysates, was expressed in IU/g.

Cyclo-oxygenase-2 activity

Cyclo-oxygenase-2 (COX-2) activity was measured by a COX measurement kit from Cayman chemical (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). The cell lysates at 24h were incubated according to the manufacturer's instructions. Kinetic measurement was performed at 590 nm and 37°C, in a microplate spectrophotometer reader. COX-2 activity, normalized to the protein content of the cell lysates, was expressed in IU/g.

Determination of protein

Proteins were quantified by the bicinchonic acid method (Interchim, Montluçon, France) according to the manufacturer's instructions. Standard curve was obtained with a standard solution of bovine serum albumin (2 g/l).

Determination of total glutathione

Concentrations of total cellular glutathione were determined by the method of Cereser *et al*.'s (Cereser et al. 2001a). Briefly, cell lysate was reduced by dithiothreitol for 10 minutes at room temperature and glutathione ethyl ester was added as an internal standard. After protein precipitation, supernatant was derived by the addition of ortho-phthal-aldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). The HPLC separation of GSH–OPA adducts was achieved on a UP3 HDO C-18 reversed-phase silica column (150x3.60 mm; 3µ particle size) from Phenomenex (Interchim, Montluçon, France) maintained at 37°C followed by fluorimetric detection at 420 nm after excitation at 340 nm (Summit HPLC system, Dionex SA, Courtaboeuf, France). Derivatives were eluted using an acetonitrile gradient from 10% to 50% in a 25 mM Phosphate buffer, pH 6 for 5 min. The flow-rate was 0.25 ml/min for an elution run of 20 minutes. Integration of chromatograms was performed using Chromeleon software from Dionex (Version 6.80, Dionex SA, Courtaboeuf, France). GSH content was calculated using a standard curve established under the same conditions. GSH content of cell lysates was expressed in µmol/g of protein.

Determination of protein thiols

Protein thiols were measured using the method described by Himmelfarb *et al*. (Himmelfarb, McMonagle, and McMenamin 2000). Free thiol groups were oxidized by dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Measurements were carried out at 405 nm on a microplate spectrophotometer reader. The concentration of free

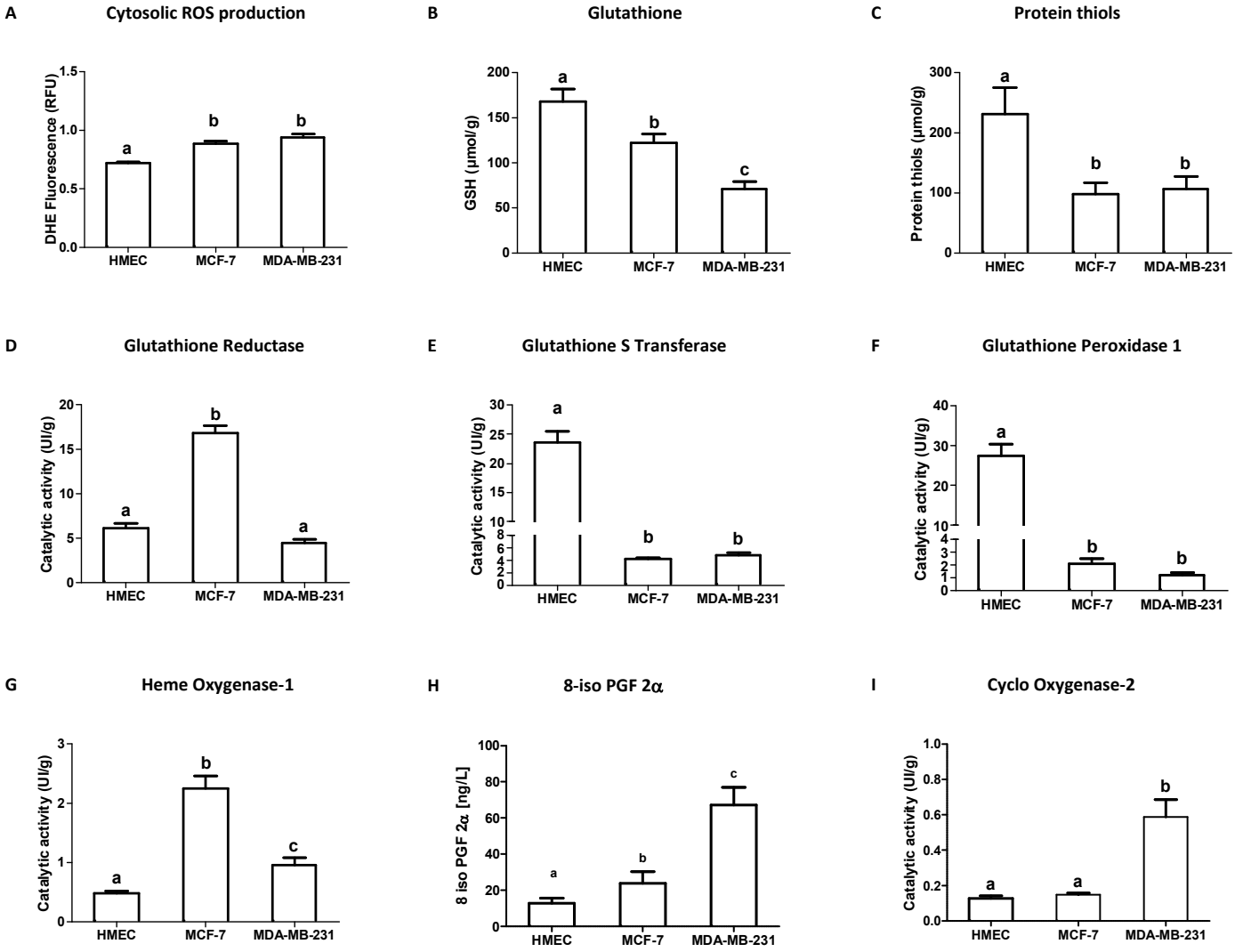


Figure 1: Basal oxidative status of human mammary epithelial cells

A: Basal fluorescence of dihydroethidine (DHE) for cytosolic ROS production.
B: Basal cellular content for total glutathione.
C: Basal cellular content for free protein thiols.
D: Catalytic activity for glutathione reductase (GR).
E: Catalytic activity for glutathione peroxidase 1 (GPx1).
F: Catalytic activity for glutathione S-transferase (GST).
G: Catalytic activity for heme oxygenase (HO-1).
H: Basal production of 8-iso PGF 2□ in culture medium.
I: Catalytic activity for cyclooxygenase 2 (COX-2).

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=6). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by different letters ($a \neq b \neq c$, $p < 0.05$).

thiols of the cell lysates was expressed as a ratio of the protein content of cell lysates and expressed in µmol/g.

Determination of lipid peroxidation

Lipid hydroperoxides

Quantification of lipid hydroperoxides (HPLIP) in culture medium at 24h was obtained by the method described by Arab *et al*. (Arab and Steghens 2004). Culture media were treated by reagent buffer (40 mM H_2SO_4, 20 mM formic acid, 150 µM iron D-gluconate and 120 µM xylenol orange in glycerol) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Standard curve was obtained using a tert-butyl-hydroperoxide solution. Measurements were carried out at 570 nm on a microplate spectrophotometer reader. The concentration of HPLIP was expressed in µmol/l.

Isoprostanes

Quantification in culture medium of isoprostane (8-iso-PGF 2α at 24h was obtained by the STAT-8-isoprostane EIA measurement kit (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) according to the manufacturer's instructions. Measurements were carried out at 405 nm on a microplate spectrophotometer reader. The concentration of 8-iso-PGF 2α was expressed in ng/l.

Statistical analysis

Each experiment was performed in triplicate and the average value treated as a single data point. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism5 (GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA). Data are expressed as mean ± standard deviation. Between-groups comparison was performed by one or two-way ANOVA as appropriate, followed by a multiple comparison test of Kruskal-Wallis or Bonferroni. The significance level was set at 0.05. Significances are indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ or by use of different letters.

Results

Human mammary epithelial cells exhibited differences in basal oxidative status (figure 1)

The oxidative status of the mammary epithelial cells was characterized under basal condition without leptin by the determination of cytosolic ROS production, glutathione and proteins thiols cellular content and enzymatic activities of several anti-oxidant enzymes. Cytosolic ROS production of superoxide anion ($O_2^{\circ -}$) was higher in the neoplastic cells (125% in MCF-7 and 132% in MDA-MB-231 compared to HMEC, $p<0.05$, figure 1A). Moreover, healthy cells had a higher content of glutathione (168 ± 31 µmol/g) than the neoplastic cells (-73% in MCF-7 and -42% in MDA-MB-231 compared to HMEC, $p<0.05$, figure 1B). A similar profile was observed for the protein thiols content (230 ± 117 µmol/g for HMEC and -42% in MCF-7 and -46% in MDA-MB-231 compared to HMEC, $p<0.05$, figure 1C). In terms of catalytic activity, glutathione reductase (GR) catalytic activity had a 3 fold higher level in MCF-7 than in HMEC and MDA-MB-231 (figure 1D). HMEC had a 10 fold higher level of glutathione peroxidase 1 (GPx1) and a 5 fold higher level of glutathione S-transferase (GST)

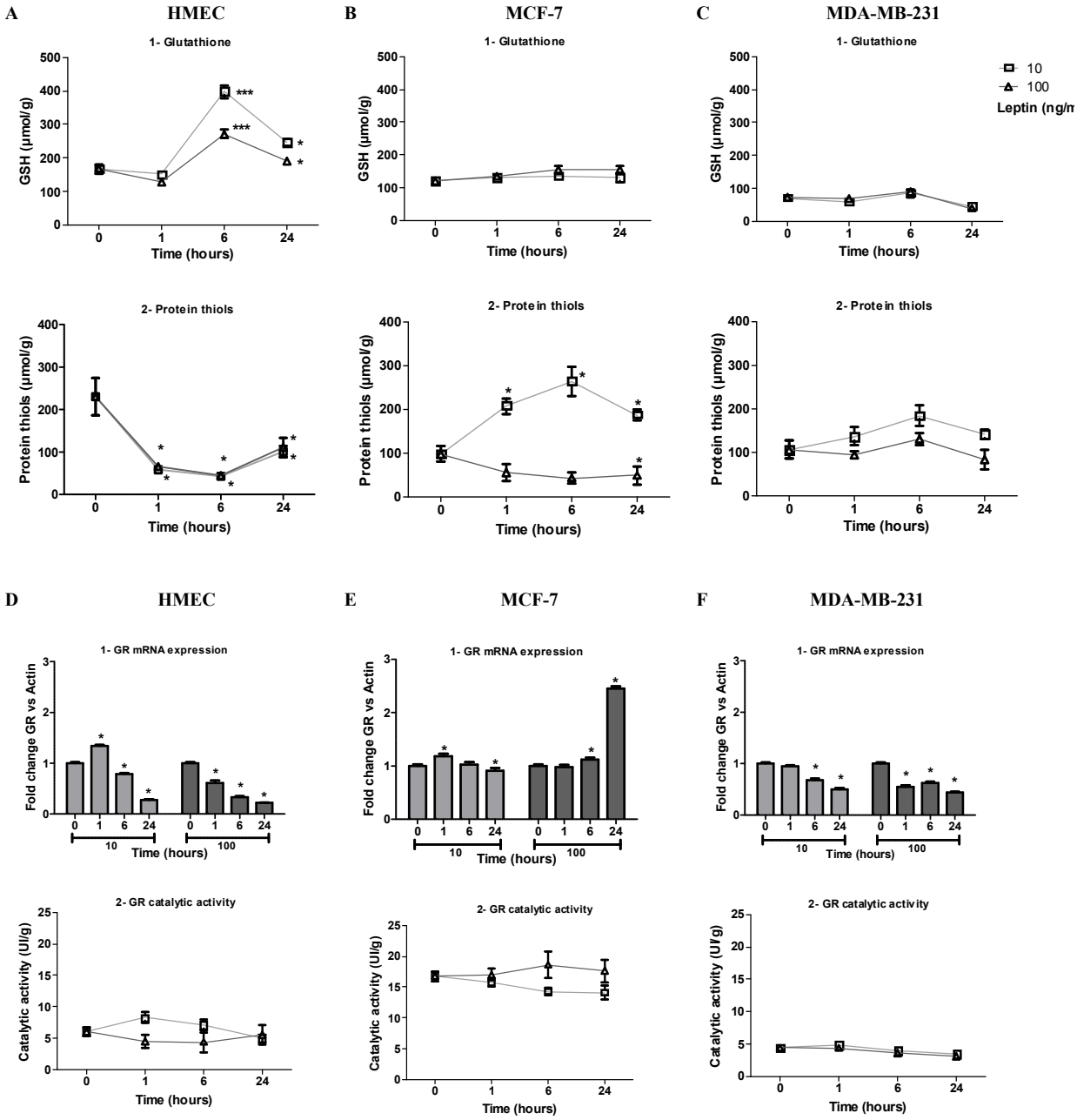


Figure 2: Characterization of anti-oxidant response time course in presence of leptin (10, 100 ng/ml) in human mammary epithelial cells

A: Total glutathione and protein thiols cellular contents in HMEC.

B: Total glutathione and protein thiols cellular contents in MCF-7.

C: Total glutathione and protein thiols cellular contents in MDA-MB-231.

D: Glutathione reductase (GR) in HMEC in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

E: Glutathione reductase (GR) in MCF-7in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

F: Glutathione reductase (GR) in MDA-MB-231in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=6). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

than the neoplastic cells ($p<0.05$, figure 1E and 1F). Conversely, neoplastic cells significantly induced heme oxygenase-1 (HO-1) (4 fold in MCF-7 and 2 fold in MDA-MB-231 compared to HMEC, $p<0.05$, figure 1G).

The balance between pro and anti-oxidative systems resulted under basal conditions to an increase in 8 iso PGF 2α content in neoplastic cells MCF-7 and MDA-MB-231 ($p<0.05$, figure 1H). In addition, a higher catalytic activity of the cyclo-oxygenase 2 (COX-2) was observed in MDA-MB-231 (figure 1I).

Leptin modulated non enzymatic and enzymatic anti-oxidant response in a different manner in human mammary epithelial cells (figures 2 and 3)

Non enzymatic anti-oxidant response

In response to leptin at both concentrations, cellular GSH content increased in HMEC at 6h from 168 ± 31 µmol/g to 398 ± 40 µmol/g and 272 ± 27 µmol/g (respectively for 10 and 100 ng/ml of leptin). GSH content then decreased at 24h (figure 2 A1). Protein thiols content decreased from 231 ± 116 µmol/g to 43 ± 6 and 45 ± 6 µmol/g until 6h, then the content increase to 101 ± 23 and 111 ± 45 µmol/g at 24h for 10 and 100 ng/ml of leptin, respectively (figure 2 A2).

In MCF-7 and MDA-MB-231, GSH remained stable at 123 ± 21 µmol/g and 71 ± 20 µmol/g respectively (figures 2 B1 and C1). For 10 ng/ml of leptin, protein thiols content increased from 97 ± 69 µmol/g to 187 ± 17 µmol/g at 24h whereas a slight decrease was observed with 100 ng/ml of leptin (figure 2B2) in MCF-7. In MDA-MB-231, no significant effect on protein thiols content was observed (figure 2 C2).

Enzymatic anti-oxidant response

Whatever the leptin concentration, the expression of glutathione reductase (GR) decreased steadily from 1h to 24h without modification of the catalytic activity which remained stable (figure 2 D) in HMEC. In MCF-7, GR expression remained quite stable until 24h except for a 2.45 fold increase with 100 ng/ml of leptin (figure 2 E, $p<0.05$). However, GR catalytic activity remained stable during the time course and was 3 fold greater than in the other cell models. In MDA-MB-231, GR expression slightly decreased and its lowest catalytic activity remained stable (figure 2 F).

The time course of heme oxygenase-1 (HO-1) expression in HMEC showed a huge increase at 1h and 6h followed by a decrease at 24h characterized by a higher level for 10 ng/ml than 100 ng/ml of leptin ($p<0.05$, figure 3 A1). As expected, catalytic activity increased from 1h to 6h ($p<0.05$, figure 3 A2). In MCF7 and in MDA-MB-231, mRNA expression increased at a low level (MCF-7: 2.2 ± 0.1 fold expression at 1h; MDA-MB-231: 2.0 ± 0.1 fold expression at 24h, figures 3 B and C), resulting in MCF7 in an increase in catalytic activity at 6h to 9.6 ± 3.1 UI/g for 10 ng/ml of leptin. In MDA-MB-231, activity remained stable at 1.0 ± 0.4 UI/g from 0 to 6 h then slightly decreased at 24h (figure 3 C2).

In HMEC, leptin induced an increase in glutathione peroxidase 1 (GPx1) expression at 24h to 2.4 ± 0.1 and 5.0 ± 0.1 fold expression, which resulted in marked activation of the catalytic activity from 27.3 ± 2.9 UI/g to 113.4 ± 3.7 and 105.3 ± 6.8 UI/g at 24h for 10 and 100ng/ml of leptin, respectively ($p<0.05$, figure 3 D). In neoplastic cells, mRNA expression

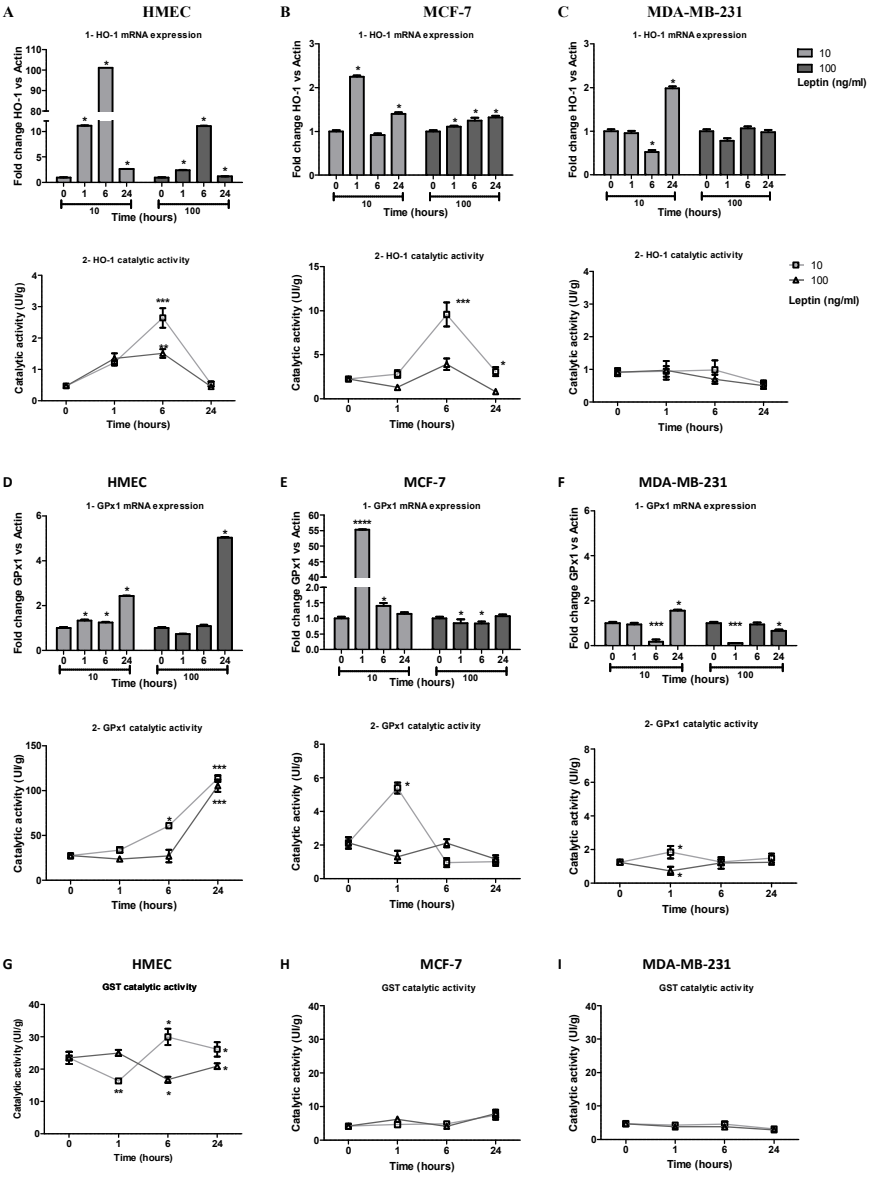


Figure 3: Characterization of anti-oxidant response time course in presence of leptin (10, 100 ng/ml) in human mammary epithelial cells

A: Heme oxygenase 1 (HO-1) in HMEC in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

B: Heme oxygenase 1 (HO-1) in MCF-7 in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

C: Hemexygenase 1 (HO-1) in MDA-MB-231 in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

D: Glutathione peroxidase 1 (GPx1) in HMEC in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

E: Glutathione peroxidase 1 (GPx1) in MCF-7 in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

F: Glutathione peroxidase 1 (GPx1) in MDA-MB-231 in terms of: 1- mRNA expression, 2- Catalytic activity.

G: Catalytic activity of Glutathione S-transferase (GST) in HMEC.

H: Catalytic activity of Glutathione S-transferase (GST) in MCF-7.

I: Catalytic activity of Glutathione S-transferase (GST) in MDA-MB-231.

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=6). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

A B Lipid Hydroperoxides C 8-iso PGF 2α

was induced principally for MCF-7 at 1h with 10 ng/ml of leptin, which resulted in a time limited increase in catalytic activity (figure 3 E). In MDA-MB-231, a huge but time limited decrease in expression was observed at 6h at both leptin concentrations, without effect on catalytic activity (figure 3 F).

In the presence of leptin, in HMEC at 24h, a slight increase to 26.1 ± 2.3 UI/g for 10 ng/ml of leptin and a slight decrease to 20.9 ± 0.9 UI/g for 100 ng/ml of leptin, were observed (figure 3 G). Whereas no significant change was observed in the catalytic activity of glutathione S-transferase (GST) in neoplastic cells MCF-7 and MDA-MB-231 (figure 3 H and I).

Leptin resulted in an oxidative stress via lipid peroxidation in human mammary epithelial cells (figure 4)

Whatever the cell model, cytosolic ROS production increased in the presence of leptin (119%, 107% and 125% of basal production, respectively for HMEC, MCF-7, MDA-MB-231; figure 4 A). Consequently, of the ROS production and the antioxidant response, at 24h and whatever the dose of leptin in HMEC, no lipid peroxidation was observed as lipid hydroperoxides (HPLIP) and isoprostane (8-iso PGF2α contents stayed stable in culture medium (figure 4 B and C). Furthermore, an overexpression of cyclo-oxygenase 2 (COX-2) mRNA at 1 and 6h was observed and resulted in a significant increase in COX-2 activity at 24h (figure 4 D and G).

Conversely, in neoplastic cells, a 2-fold increase in HPLIP content was observed (figure 4 B). In the same way, 8-iso PGF2α content increased for both concentrations of leptin in the two neoplastic cell lines at a higher level for MDA-MD-231 cells (figure 4 C). At both concentrations of leptin, an overexpression of COX-2 mRNA at 1h was observed in MCF-7 (figure 4 E). In MDA-MB-231 the overexpression observed at 1h persisted up to 24h (figure 4 F) resulting in an increase in COX-2 activity at 24h in the neoplastic cells, which was greater at the concentration of 100 ng/ml of leptin (figure 4 G).

Discussion

Several studies have investigated the impact of leptin in carcinogenesis (Dubois, Jardé, Delort, et al. 2014), (Barone et al. 2012a), (Nalabolu, Palasamudram, and Jamil 2014a), but few have focused on the oxidative status of cells (M. D. M. Blanquer-Rosselló et al. 2015). In the present study, we compared the effect of leptin on the regulation of oxidative status in three cell lines representing different states, from healthy to metastatic state.

As leptin is able to increase cell ROS production, the anti-oxidant response was characterised by the determination of different systems involved in much regulation of cell metabolism. GSH and the redox state of protein thiols may have overlapping as well as compartmentalized functions in the activation and regulation of many pathways like kinases and transcription factors (Butturini et al. 2014),(Ghezzi 2005), (Lumb and Bulleid 2002). Among the anti-oxidant enzymes, we focused on those involved in the GSH metabolism. GR reduces oxidized glutathione disulphide back to the reduced form GSH. γ GCL is the limiting enzyme in glutathione synthesis. GPx1 catalyses the reduction of harmful lipid peroxides with GSH and protects the lipid membranes against oxidative damage (Loschen et al. 1974). GSTs

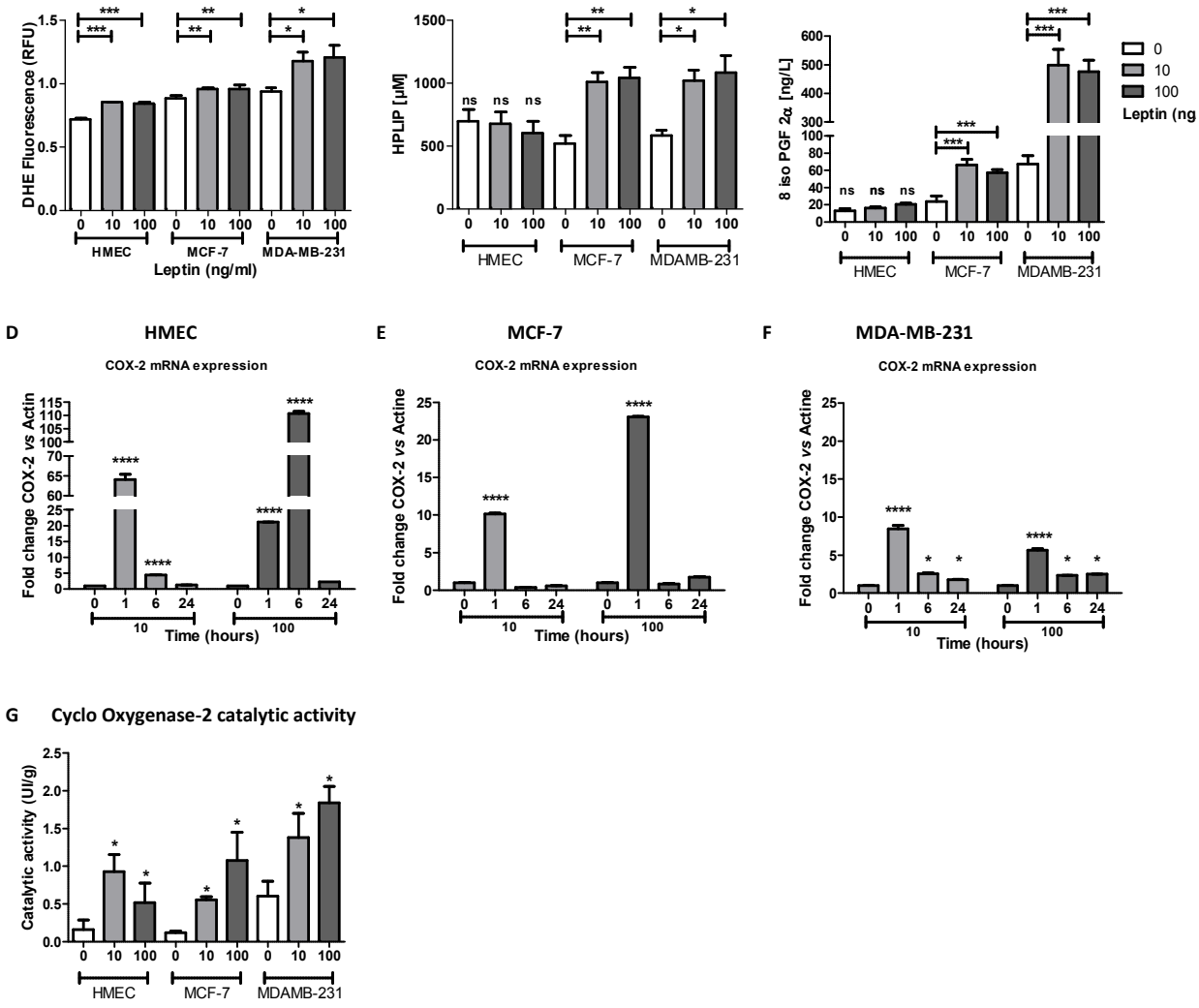


Figure 4: Characterization of non-enzymatic and enzymatic lipid peroxidation in presence of leptin

A: Cellular production at 10 min for cytosolic ROS production (DHE).
B: Evaluation of lipid hydroperoxides in culture medium at 24h.
C: Evaluation of 8-iso PGF 2□ in culture medium at 24h.
D: mRNA expression of COX-2 in HMEC.
E: mRNA expression COX-2 in MCF-7.
F: mRNA expression of COX-2 in MDA-MB-231.
G: Catalytic activity of cyclo-oxygenase 2 (COX-2) in cells at 24h.

Values are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Between-groups comparison was performed by one-way ANOVA followed by the Kruskal-Wallis multiple comparison test. The significance level was set at 0.05. Statistical significance between groups is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$.

are involved in cellular detoxification by catalysing the conjugation of GSH to lipophilic compounds thereby increasing their solubility and excretion from the cell (Matés, Pérez-Gómez, and Núñez de Castro 1999). Finally, HO-1, a key regulator of cellular redox homeostasis, is strongly induced (Was, Dulak, and Jozkowicz 2010a) for protecting cells or tissues against various toxic metabolites, oxidative stress and cellular injury (Abraham and Kappas 2008), (Balla et al. 1993), (W.-Y. Lee et al. 2014a).

Oxidative status is a powerful mechanism for the regulation of cell metabolism, (Adler et al. 1999), (Acharya et al. 2010b), (Jiang, Zhang, and Dusting 2011b). We showed that cytosolic ROS production at basal level was higher in neoplastic cells than in healthy mammary cells. With regard to the antioxidant systems, HMEC had higher intracellular concentrations of glutathione and enhanced GPx and GST catalytic activity, whereas MCF-7 had greater GR and HO-1 catalytic activity. MDA-MB-231 cells exhibited lower activity except for COX-2 as previously reported (Jana et al. 2014), (Sezgin Alikanoglu et al. 2014). These different results are in agreement with the constitutive oxidative stress that is widely observed in cancer cells (Antonio Macciò and Madeddu 2011), (Sun et al. 2011). The stress results from a greater cytosolic ROS production and a lower anti-oxidative protection, which leads to an increase in 8-isoPGF2□ in culture medium of MDA-MB-231 at basal level.

To assess the occurrence of oxidative stress under leptin, lipid peroxidation products in culture media such as HPLIP and 8-isoPGF2 α were measured in parallel with mRNA expression and the catalytic activity of several antioxidant enzymes and the cellular GSH content. As COX-2 is a prognostic factor in early breast cancer (Kargi et al. 2013a), the modulation of its mRNA expression and catalytic activity was measured in our cell models.

At both leptin concentrations, HMEC exhibited an anti-oxidant response due to the mRNA overexpression of the major anti-oxidant enzymes (HO-1, GPx1) which results in an increase in their catalytic activity. In addition, a considerable increase in GSH was observed and the protein thiols were oxidized evidence of an anti-oxidant defence (O Leary et al. 2014). However at 100 ng/ml of leptin, HO-1 was expressed 10 times less than at 10 ng/ml. Surprisingly, both GR expression and GST catalytic activities were stimulated only when leptin was at 10 ng/ml. Owing to the activation of GPx1, no increase was observed in the HPLIP content and for the non-enzymatic product 8-isoPGF2α in culture medium in the presence of leptin. Under the condition mimicking obesity, the anti-oxidant response was less powerful in protecting the cells. Antioxidant defences were not sufficiently stimulated in HMEC since there was a lesser production of GSH along with a lack of activation of GST and GR activities and a lower activation of HO-1 and GPx1. These results, from a short time kinetic model, can partly explain the adverse effects of obesity on oxidative stress, as healthy cells would be expected to be less protected (Esposito et al. 2006a).

In our conditions, as in previous observations (D.-H. Kim et al. 2014), (Tehan, Taparra, and Phelan 2013), MCF-7 exhibited a different and incomplete anti-oxidant response. At a leptin concentration of 10 ng/ml, only HO-1 and GPx1 were stimulated for both mRNA expression and catalytic activity. The efficacy of the anti-oxidant response seems to be related to the high GR activity (3 times higher than that of the other cells) and to the availability of protein thiols, whose concentrations increased throughout the 24h experiment. However, at a leptin concentration of 100 ng/ml none of these changes were observed, which

resulted in a substantial increase in HPLIP and in 8-isoPGF2α in the culture medium at both concentrations. Moreover the overexpression of COX-2 induces an increase of the catalytic activity at 24h for 100 ng/ml of leptin. These data indicate that leptin, in the condition mimicking obesity neither affects the antioxidant status nor activates an inflammatory response. These observations are in agreement with the significant oxidative stress observed in breast cancer (Vargas-Hernández et al. 2013a).

Whatever the concentration of leptin used, and despite a similar ROS production to that of the two other cell models, MDA-MB-231 did not modulate anti-oxidant response. There was no significant change in gene expression nor enzyme catalytic activity. Many of these observations are in agreement with previously described biological characteristic of this cell line (Chacón and Costanzo 2010a), (Mazhar, Ang, and Waxman 2006). Mitochondrial ROS production was greater with a very low cytosolic ROS production consistent with the cell metastatic ability (U. Martinez-Outschoorn, Sotgia, and Lisanti 2014). HO-1 lost its induction capacities and its basal catalytic activity was greater than that of the healthy cells (Was, Dulak, and Jozkowicz 2010b). Moreover, the COX-2 expression and catalytic activity was greater than in the other cells (Sezgin Alikanoglu et al. 2014).

This study shows that in human mammary epithelial cells, leptin induces cytosolic ROS production resulting in the induction of varied anti-oxidant responses. Consequently, healthy cells exhibit a highly inducible anti-oxidant response, which seems to be less effective under conditions mimicking obesity. Conversely, in tumour cells, leptin did not induce a global anti-oxidant response. In MCF-7, only a short activation of the anti-oxidant response was observed for 10 ng/ml of leptin. In MDA-MB-231, leptin induced ROS production without activation of the anti-oxidant system and without down-regulation. These *in vitro* results help to better understand the molecular mechanisms of oxidative status in carcinogenesis in response to leptin signalling. The novel findings data point to a potential link between obesity, adipokine-related secretions and the adverse effects of breast cancer (Vona-Davis and Rose 2013). In the presence of hyperleptinemia 100 ng/ml, the lack of anti-oxidant response in tumour cells, associated with the less effective anti-oxidant response in healthy cells, could be related to major oxidative stress in the tumour environment. Taken together these results shed new light on the impact of leptin in carcinogenesis.

Acknowledgments

We thank Samar Basu for his valuable advice and expert knowledge of eicosanoids. This work was supported by the Conseil Régional d'Auvergne and the European research fund (FEDER).

List of abbreviations

8-iso PGF2α : isoprostane;
COX-2: Cyclo-oxygenase-2;
DHE: Dihydroethidine;
GPx1: Glutathione peroxidase 1;
GR: Glutathione reductase;
GSH: Glutathione;
GST: Glutathione S-transferase;
HMEC: human mammary epithelial cells;
HO-1: Heme oxygenase-1;
HPLIP: Lipid hydroperoxides;
Ob-R: leptin receptor;
qRT-PCR: Quantitative real-time PCR;
RFU: Relative fluorescence unit;
ROS: reactive oxygen species;

References

Abraham, Nader G., and Attallah Kappas. 2008. "Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase." Pharmacological Reviews 60 (1): 79–127. doi:10.1124/pr.107.07104.

Acharya, Asha, Ila Das, Des Chandhok, and Tapas Saha. 2010. "Redox Regulation in Cancer: A Double-Edged Sword with Therapeutic Potential." Oxidative Medicine and Cellular Longevity 3 (1): 23–34. doi:10.4161/oxim.3.1.10095.

Adler, V, Z Yin, K D Tew, and Z Ronai. 1999. "Role of Redox Potential and Reactive Oxygen Species in Stress Signaling." Oncogene 18 (45): 6104–11. doi:10.1038/sj.onc.1203128.

Andò, Sebastiano, and Stefania Catalano. 2012. "The Multifactorial Role of Leptin in Driving the Breast Cancer Microenvironment." Nature Reviews. Endocrinology 8 (5): 263–75. doi:10.1038/nrendo.2011.184.

Arab, Khelifa, Adrien Rossary, Françoise Flourié, Yves Tourneur, and Jean-Paul Steghens. 2006. "Docosahexaenoic Acid Enhances the Antioxidant Response of Human Fibroblasts by Upregulating Gamma-Glutamyl-Cysteinyl Ligase and Glutathione Reductase." The British Journal of Nutrition 95 (1): 18–26.

Arab, Khelifa, and Jean-Paul Steghens. 2004. "Plasma Lipid Hydroperoxides Measurement by an Automated Xylenol Orange Method." Analytical Biochemistry 325 (1): 158–63.

Badid, Naima, Fatima Zohra Baba Ahmed, Hafida Merzouk, Slimane Belbraouet, Nassima Mokhtari, Sid Ahmed Merzouk, Riad Benhabib, Djalloul Hamzaoui, and Michel Narce. 2010. "Oxidant/antioxidant Status, Lipids and Hormonal Profile in Overweight Women with Breast Cancer." Pathology Oncology Research: POR 16 (2): 159–67. doi:10.1007/s12253-009-9199-0.

Balla, J., H. S. Jacob, G. Balla, K. Nath, J. W. Eaton, and G. M. Vercellotti. 1993. "Endothelial-Cell Heme Uptake from Heme Proteins: Induction of Sensitization and Desensitization to Oxidant Damage." Proceedings of the National Academy of Sciences 90 (20): 9285–89.

Barone, Ines, Stefania Catalano, Luca Gelsomino, Stefania Marsico, Cinzia Giordano, Salvatore Panza, Daniela Bonofiglio, et al. 2012. "Leptin Mediates Tumor-Stromal Interactions That Promote the Invasive Growth of Breast Cancer Cells." Cancer Research 72 (6): 1416–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2558.

Basu, Samar. 2010. "Bioactive Eicosanoids: Role of Prostaglandin F(2α) and F_2-Isoprostanes in Inflammation and Oxidative Stress Related Pathology." Molecules and Cells 30 (5): 383–91. doi:10.1007/s10059-010-0157-1.

Basu, Samar, Rachida Nachat-Kappes, Florence Caldefie-Chézet, and Marie-Paule Vasson. 2013. "Eicosanoids and Adipokines in Breast Cancer: From Molecular Mechanisms to Clinical Considerations." Antioxidants & Redox Signaling 18 (3): 323–60. doi:10.1089/ars.2011.4408.

Blanquer-Rosselló, M. Del Mar, Francisca M. Santandreu, Jordi Oliver, Pilar Roca, and Adamo Valle. 2015. "Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells." Journal of Cellular Biochemistry, March. doi:10.1002/jcb.25158.

Butturini, Elena, Elena Darra, Giulia Chiavegato, Barbara Cellini, Flora Cozzolino, Maria Monti, Piero Pucci, Daniele Dell'Orco, and Sofia Mariotto. 2014. "S-Glutathionylation at Cys328 and Cys542 Impairs STAT3 Phosphorylation." ACS Chemical Biology, June. doi:10.1021/cb500407d.

Ceddia, R B. 2005. "Direct Metabolic Regulation in Skeletal Muscle and Fat Tissue by Leptin: Implications for Glucose and Fatty Acids Homeostasis." International Journal of Obesity (2005) 29 (10): 1175–83. doi:10.1038/sj.ijo.0803025.

Cereser, C, J Guichard, J Drai, E Bannier, I Garcia, S Boget, P Parvaz, and A Revol. 2001. "Quantitation of Reduced and Total Glutathione at the Femtomole Level by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Application to Red Blood Cells and Cultured Fibroblasts." Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications 752 (1): 123–32.

Chacón, Reinaldo D, and María V Costanzo. 2010. "Triple-Negative Breast Cancer." Breast Cancer Research: BCR 12 Suppl 2: S3. doi:10.1186/bcr2574.

Cheng, W H, Y S Ho, D A Ross, Y Han, G F Combs Jr, and X G Lei. 1997. "Overexpression of Cellular Glutathione Peroxidase Does Not Affect Expression of Plasma Glutathione Peroxidase or Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Mice Offered Diets Adequate or Deficient in Selenium." The Journal of Nutrition 127 (5): 675–80.

Dubois, Virginie, Thierry Jardé, Laetitia Delort, Hermine Billard, Dominique Bernard-Gallon, Emmanuelle Berger, Alain Geloen, Marie-Paule Vasson, and Florence Caldefie-Chezet. 2014. "Leptin Induces a Proliferative

Response in Breast Cancer Cells but Not in Normal Breast Cells." Nutrition and Cancer 66 (4): 645–55. doi:10.1080/01635581.2014.894104.

Esposito, K, M Ciotola, B Schisano, L Misso, G Giannetti, A Ceriello, and D Giugliano. 2006. "Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome." Journal of Endocrinological Investigation 29 (9): 791–95.

Fernández-Sánchez, Alba, Eduardo Madrigal-Santillán, Mirandeli Bautista, Jaime Esquivel-Soto, Angel Morales-González, Cesar Esquivel-Chirino, Irene Durante-Montiel, Graciela Sánchez-Rivera, Carmen Valadez-Vega, and José A Morales-González. 2011. "Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity." International Journal of Molecular Sciences 12 (5): 3117–32. doi:10.3390/ijms12053117.

Ghezzi, P. 2005. "Oxidoreduction of Protein Thiols in Redox Regulation." Biochemical Society Transactions 33 (Pt 6): 1378–81. doi:10.1042/BST20051378.

Gregor, Margaret F, and Gökhan S Hotamisligil. 2007. "Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipocyte Stress: The Endoplasmic Reticulum and Metabolic Disease." Journal of Lipid Research 48 (9): 1905–14. doi:10.1194/jlr.R700007-JLR200.

Guo, Shanchun, Mingli Liu, Guangdi Wang, Marta Torroella-Kouri, and Ruben R Gonzalez-Perez. 2012. "Oncogenic Role and Therapeutic Target of Leptin Signaling in Breast Cancer and Cancer Stem Cells." Biochimica et Biophysica Acta 1825 (2): 207–22. doi:10.1016/j.bbcan.2012.01.002.

Himmelfarb, J, E McMonagle, and E McMenamin. 2000. "Plasma Protein Thiol Oxidation and Carbonyl Formation in Chronic Renal Failure." Kidney International 58 (6): 2571–78. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00443.x.

Jana, Debarshi, Diptendra Kumar Sarkar, Suvro Ganguly, Shilpi Saha, Gaurisankar Sa, Asim Kumar Manna, Abhirup Banerjee, and Syamsundar Mandal. 2014. "Role of Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Prognosis of Breast Cancer." Indian Journal of Surgical Oncology 5 (1): 59–65. doi:10.1007/s13193-014-0290-y.

Jardé, T, F Caldefie-Chézet, N Goncalves-Mendes, F Mishellany, C Buechler, F Penault-Llorca, and M P Vasson. 2009. "Involvement of Adiponectin and Leptin in Breast Cancer: Clinical and in Vitro Studies." Endocrine-Related Cancer 16 (4): 1197–1210. doi:10.1677/ERC-09-0043.

Jiang, Fan, Yun Zhang, and Gregory J Dusting. 2011. "NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair." Pharmacological Reviews 63 (1): 218–42. doi:10.1124/pr.110.002980.

Kargi, A., M. Uysal, H. Bozcuk, H. S. Coskun, B. Savas, and M. Ozdogan. 2013. "The Importance of COX-2 Expression as Prognostic Factor in Early Breast Cancer." Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology 18 (3): 579–84.

Kim, Do-Hee, Na-Young Song, Eun-Hee Kim, Hye-Kyung Na, Yeonsoo Joe, Hun-Taeg Chung, and Young-Joon Surh. 2014. "15-Deoxy-Δ(12,14)-Prostaglandin J2 Induces p53 Expression through Upregulation of Heme Oxygenase-1 in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells." Free Radical Research, February. doi:10.3109/10715762.2014.897343.

Lee, Wen-Ying, Yen-Chou Chen, Chwen-Ming Shih, Chun-Mao Lin, Chia-Hsiung Cheng, Ku-Chung Chen, and Cheng-Wei Lin. 2014. "The Induction of Heme Oxygenase-1 Suppresses Heat Shock Protein 90 and the Proliferation of Human Breast Cancer Cells through Its Byproduct Carbon Monoxide." Toxicology and Applied Pharmacology 274 (1): 55–62. doi:10.1016/j.taap.2013.10.027.

Loschen, G, A Azzi, C Richter, and L Flohé. 1974. "Superoxide Radicals as Precursors of Mitochondrial Hydrogen Peroxide." FEBS Letters 42 (1): 68–72.

Lumb, Richard A, and Neil J Bulleid. 2002. "Is Protein Disulfide Isomerase a Redox-Dependent Molecular Chaperone?" The EMBO Journal 21 (24): 6763–70.

Macciò, Antonio, and Clelia Madeddu. 2011. "Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast Cancer: Therapeutic Implications." TheScientificWorldJournal 11: 2020–36. doi:10.1100/2011/806787.

Martínez-Martínez, Ernesto, Raquel Jurado-López, María Valero-Muñoz, María Visitación Bartolomé, Sandra Ballesteros, María Luaces, Ana María Briones, Natalia López-Andrés, María Miana, and Victoria Cachofeiro. 2014. "Leptin Induces Cardiac Fibrosis through Galectin-3, mTOR and Oxidative Stress: Potential Role in Obesity." Journal of Hypertension 32 (5): 1104–14; discussion 1114. doi:10.1097/HJH.0000000000000149.

Martinez-Outschoorn, Ubaldo, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2014. "Tumor Microenvironment and Metabolic Synergy in Breast Cancers: Critical Importance of Mitochondrial Fuels and Function." Seminars in Oncology 41 (2): 195–216. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.002.

Matés, J M, C Pérez-Gómez, and I Núñez de Castro. 1999. "Antioxidant Enzymes and Human Diseases." Clinical Biochemistry 32 (8): 595–603.

Mazhar, D, R Ang, and J Waxman. 2006. "COX Inhibitors and Breast Cancer." British Journal of Cancer 94 (3): 346–50. doi:10.1038/sj.bjc.6602942.

Nachat-Kappes, Rachida, Alexandre Pinel, Kristell Combe, Bruno Lamas, Marie-Chantal Farges, Adrien Rossary, Nicolas Goncalves-Mendes, Florence Caldefie-Chezet, Marie-Paule Vasson, and Samar Basu. 2012. "Effects of Enriched Environment on COX-2, Leptin and Eicosanoids in a Mouse Model of Breast Cancer." PloS One 7 (12): e51525. doi:10.1371/journal.pone.0051525.

Nalabolu, Mohan Reddy, Kalyani Palasamudram, and Kaiser Jamil. 2014. "Adiponectin and Leptin Molecular Actions and Clinical Significance in Breast Cancer." International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research 8 (1): 31–40.

O Leary, Patrick C., Marta Terrile, Malgorzata Bajor, Pawel Gaj, Bryan T. Hennessy, Gordon B. Mills, Agnieszka Zagozdzon, et al. 2014. "Peroxiredoxin-1 Protects Estrogen Receptor Alpha from Oxidative Stress-Induced Suppression and Is a Protein Biomarker of Favorable Prognosis in Breast Cancer." Breast Cancer Research: BCR 16 (4): R79. doi:10.1186/bcr3691.

Ru, Peng, Robert Steele, Eddy C. Hsueh, and Ratna B. Ray. 2011. "Anti-miR-203 Upregulates SOCS3 Expression in Breast Cancer Cells and Enhances Cisplatin Chemosensitivity." Genes & Cancer 2 (7): 720–27. doi:10.1177/1947601911425832.

Sezgin Alikanoglu, Arsenal, Mustafa Yildirim, Dinc Suren, Mustafa Yildiz, Vildan Kaya, Utku Donem Dilli, and Cem Sezer. 2014. "Expression of Cyclooxygenase-2 and Bcl-2 in Breast Cancer and Their Relationship with Triple-Negative Disease." Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology 19 (2): 430–34.

Shih, Ruey-Horng, and Chuen-Mao Yang. 2010. "Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Mouse Brain Endothelial Cells." Journal of Neuroinflammation 7: 86. doi:10.1186/1742-2094-7-86.

Sun, Yu, Liqun Huang, Gerardo G Mackenzie, and Basil Rigas. 2011. "Oxidative Stress Mediates through Apoptosis the Anticancer Effect of Phospho-Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Implications for the Role of Oxidative Stress in the Action of Anticancer Agents." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 338 (3): 775–83. doi:10.1124/jpet.111.183533.

Tehan, Lauren, Kekoa Taparra, and Shelley Phelan. 2013. "Peroxiredoxin Overexpression in MCF-7 Breast Cancer Cells and Regulation by Cell Proliferation and Oxidative Stress." Cancer Investigation 31 (6): 374–84. doi:10.3109/07357907.2013.802798.

Valko, M, C J Rhodes, J Moncol, M Izakovic, and M Mazur. 2006. "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer." Chemico-Biological Interactions 160 (1): 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.

Vargas-Hernández, Víctor Manuel, Vm Vargas-Aguilar, Mario Adanm Moreno-Eutimio, Gustavo Acosta-Altamirano, and Jm Tovar-Rodriguez. 2013. "Metabolic Syndrome in Breast Cancer." Gland Surgery 2 (2): 80–90. doi:10.3978/j.issn.2227-684X.2013.04.02.

Vona-Davis, Linda, and David P. Rose. 2013. "The Obesity-Inflammation-Eicosanoid Axis in Breast Cancer." Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 18 (3-4): 291–307. doi:10.1007/s10911-013-9299-z.

Was, Halina, Jozef Dulak, and Alicja Jozkowicz. 2010a. "Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy." Current Drug Targets 11 (12): 1551–70.

Partie IV :

Approche expérimentale *in vivo*

Publication n°3

L'impact d'un régime hyperlipidique sur la balance énergétique et la croissance tumorale chez la souris C57BL/6

Sinda Mahbouli, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Christophe Montaurier, Imen Miladi, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary.

En préparation vue d'une soumission à ***Nutrition & Metabolism***

Présentation de la publication n°3

Introduction

Parmi les facteurs environnementaux, une alimentation à forte densité énergétique associée à une activité physique modérée est un facteur de surpoids et d'obésité impliqués dans le développement de certains cancers, en particulier le cancer du sein chez la femme ménopausée. De plus l'excès de tissu adipeux favorise la récidive du cancer mammaire et augmente l'incidence de la mortalité. En situation d'obésité, les perturbations métabolique touchent particulièrement les sécrétions adipocytaires et induisent une hyperliptinémie et une hypoadiponectinémie favorisant le développement tumoral.

But de l'étude

Après avoir montré que les sécrétions adipokiniques peuvent *in vitro* moduler le statut oxydatif et inflammatoire de cellules épithéliales mammaires en culture. Le but de cette étude est d'explorer l'impact d'un régime obésogène sur le développement tumoral mammaire et sur la balance énergétique dans un modèle expérimental de cancer mammaire induit par inoculation d'une lignée tumorale mammaire syngénique EO771 chez des souris C57BL/6.

Matériel et Méthodes

Des souris femelles C57BL/6 âgées (28 semaines), ont été randomisées en 2 groupes (n=11), sont nourries pendant 12 semaines avec soit un régime contrôle, normo-calorique (NC : 3,40 kcal/kg, L/G/P en % 10/75/15), soit avec un régime hyperlipidique (HL : 4,30 kcal/kg, L/G/P en % 45/39/16) pendant 14 semaines. Les apports en azote, en minéraux, en vitamines, en acides gras polyinsaturés (oméga 3 et oméga 6) sont homogènes pour les deux régimes. Après 8 semaines, les cellules tumorales mammaires syngéniques (lignée EO771, $5x10^5$ cellules) sont implantées dans la quatrième paire de glande mammaire par la technique « fat pad ». La prise de poids et la prise alimentaire des animaux ont été suivies tout au long de l'expérimentation. La composition corporelle a été déterminée par EchoMRI avant implantation des tumeurs et avant sacrifice des animaux. L'impact du régime sur la balance énergétique et l'activité locomotrice des souris a été analysé par calorimétrie indirecte. Le profil métabolique et inflammatoire des souris a été déterminé par dosage des adipokines et des cytokines pro-inflammatoire au niveau du plasma. La croissance tumorale est suivie par imagerie fonctionnelle à fluorescence en utilisant la sonde 2DG-750 (désoxyglucose) et par mesure anatomique.

Résultats majeurs

A la randomisation, les groupes présentent une répartition de poids homogène (28,1 ± 2,1 g ; 28,9 ± 2,3 g). Apres 8 semaines de régime, les poids ont significativement augmentés ($p<0,05$) dans le groupe recevant le régime HL (32,2 ± 5,0 g *vs* 26,5 ± 1,5 g) tout en ayant une prise alimentaire journalière identique (2,89 ± 0,46 g *vs* 2,88 ± 0,28 g). La composition corporelle à 7 semaines montre une prise de masse grasse significative sous régime HL par rapport au souris NC ($p<0,05$) (6,17 ± 2,82 *vs* 2,67 ± 0,34 g). Sous régime HL, les souris ont une activité locomotrice dans les cages de vie calorimétriques moins importante que les souris NC. Après implantation des tumeurs, le régime HL favorise la croissance des tumeurs. A 15 jours, le volume moyen est de 461 ± 365 *vs* 358 ± 265 mm^3. Le développement tumoral chez

les souris HL s'accompagne d'une perte d'appétit qui se traduit par une diminution de la prise alimentaire avec un volume et une masse tumorale significativement augmenté associée à une augmentation du métabolisme de base et de la dépense énergétique de ces souris. La leptinémie des souris nourries avec le régime HL est significativement plus élevée par rapport aux souris nourries avec le régime NC associée à une diminution de l'adiponectinémie. Le régime HL favorise un profil plutôt inflammatoire avec l'augmentation des taux des cytokines pro-inflammatoire tels qu'IL-6 et la résistine.

Conclusion

Chez la souris C57BL/6, le régime HL stimule la croissance tumorale cette diète réduit également l'activité locomotrice des souris dans les cages calorimétrique avec la modification de leur balance énergétique. Ces données *in vivo* confirment les différents aspects observés dans la littérature et contribuent à mieux comprendre l'influence d'une consommation d'aliments à forte densité énergétique sur le développement tumoral mammaire. Reste à déterminer l'impact d'un environnement enrichi favorisant l'activité physique sur les perturbations induites par le régime hyperlipidique et sur la croissance tumorale.

Impact of high-fat diet on energy balance in C57BL/6 mouse syngeneic model of mammary cancer

Sinda Mahbouli[1], Marie-Chantal Farges[1], Stéphanie Rougé[1], Christophe Montaurier[1,2], Imen Miladi, Marie-Paule Vasson[1,3], Adrien Rossary[1]

Abstract

Background: Obesity is a major risk factor for morbidity throughout the world obesity is an increasingly prevalent health problem, which is a risk factor for breast cancer in postmenopausal women and in particular for oestrogen receptor (ER) positive tumors. To understand the positive association of body weight with the risk to develop of breast cancer, we need to consider the role of adipose tissue in the development and differentiation of tumoral mammary glands.

This study investigated whether a High Fat diet (HFD) increases a breast tumor progression and modulates spontaneous animal's physical activity. Syngeneic murine model of mammary carcinoma was used to 16-week-old, female C57BL/6 mice were fed with high fat diet (HFD) or standard diet (SD) cages for 12 weeks and transplanted orthotopically with syngeneic EO771 adenocarcinoma cells into the right inguinal mammary fat pad.

Objectives: The purpose of this study was firstly to examine the influence of high fat diet (HFD) on energy balance, metabolism, and spontaneous activity and on the other hand determine the effect on tumor progression in C57BL/6 mice.

Results: We found that old mice fed with a HFD increased body weight, adiposity and leptin plasma levels. This fat phenotype was associated with a decrease in locomotor activity and a instead inflammatory profile resulting in increase of plasma level of pro-inflammatory cytokine IL-6. Moreover HFD mice group was a significant enhance of estradiol plasma concentration.

Conclusion: The data suggest that HFD could have positive effects on tumor progression, resulting in a marked increase in plasma level of leptin and a significant decrease of adiponectin/leptin ratio. There is also a significant change in spontaneous animal physical activity, a smaller activity observed in mice HFD group compared to SD. After tumor inoculation both of different group loss about 50 % of its spontaneous activity.

Introduction

Breast cancer is the most prevalent form of cancer and the second leading cause of death from cancer in women in developed countries, 1.7 million new cases diagnosed in 2012 worldwide) (Arnold et al. 2015). There are numerous risk factors that are known to influence the high incidence and mortality of breast cancer these include both genetic and environmental factors (Armstrong, Eisen, and Weber 2000; King et al. 2003). Of particular interest is the role that obesity plays in the development and progression of breast cancer, obesity is also associated with a high risk of recurrence and cancer-related death. The high incidence of breast cancer among women has been correlated to a major environmental influence consisting of a ‘‘western lifestyle,’’ (Löf et al. 2007) which is a combination of dietary excess energy intake along with a lack of exercise, and manifests itself as overweight and obesity (Calle et al. 2003). The pathophysiology of obesity involves various changes that may be implicated in the

Table 1: Composition of experimental diets, standard diet (SD), high-fat diet (HFD) prepared according to the AIN-93, and calories (kcal) for the macronutrients.

Ingredients (g/kg)	Standard diet (SD)	High-fat diet (HFD)
Casein	**180**	**230**
Corn starch	**420**	**200**
Sucrose	**220**	**220**
Cellulose	**80**	**80**
Lard	**2**	**189**
Soy bean oil	**32**	**-**
Canola oil	**6**	**21**
Ratio ω6/ω3	**6,2**	**6,2**
ω6 (mg/day)	**38,2**	**41,9**
ω3 (mg/day)	**6,2**	**6,8**
Choline bitratrate (%)	**0,2**	**0,2**
Mineral mixture[1] (AIN-93 M)	**50**	**50**
Vitamin mixture[2] (AIN-93 M)	**10**	**10**
Measured diet energy content (kcal/g)	**3,5**	**4,1**
Energy (%)		
Proteins (%)	**15**	**16**
Carbohydrates (%)	**75**	**39**
Fat (%)	**10**	**45**
Values of ingredients are grams per kilogram of diet and for each macronutrient levels are in percentage of energy.		

[1]**AIN-93 M mineral mixture (grams/kg)**: AIN-76 mineral mixture (grams/kg): calcium phosphate 500, sodium chloride 74, potassium citrate 2220, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganous carbonate 3.5, ferric citrate 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium celenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose 118.03.

[2]**AIN-93 M vitamin mixture (grams/kg):** thiamin HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, niacin 3, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, vitamin B12 1, vitamin A (500,000 U/gm) 0.8, vitamin D3(400,000 U/gm) 0.25, vitamin E acetate (500 U/gm) 10, menadione sodium bisulfite 0.08, sucrose 981.15.

relationship between obesity and cancer, such as excess inflammatory cytokines and chronic inflammation, hyperinsulinemia, insulin resistance, and raised leptin and oestrogens (Gregor and Hotamisligil 2007b).

High-fat diet induces obesity in humans and rodents and obesity is an established risk factor for breast cancer development, particularly for estrogen receptor (ER) positive tumors, in postmenopausal women (G. K. Reeves et al. 2007a; Stephenson and Rose 2003). Animal models exploring the effects of a high fat diet on breast cancer have generally used ER-negative cells (E. J. Kim et al. 2011; Rose, Connolly, and Meschter 1991).

The aim of this study was to investigate the impact of standard diet (SD) and high fat diets (HFD) which a similar ω3/ω6 ratio in the development of mammary tumors and in animal dietary behaviour. For this, experimental diets were used in a syngeneic murine model of mammary carcinoma. We have found that mice fed with HFD influenced spontaneous physical activity before and after tumor inoculation. Moreover mice fed with HFD diet are more susceptible to anorexia after orthotropic injection of tumor cells (EO771). We have observed that HFD mice group present a decrease in the plasma ratio of adiponectin/leptin levels, suggest mammary gland development and stimulated growth of mammary tumors.

Materials and Methods

Animal model and diets

This study was conducted in accordance with ethical guidelines (6) and with approval from the Local Ethics Committee (Universite´ d'Auvergne, Comité Régional d'Ethique sur l'Expérimentation Animale, CE-17-09). Old female C57BL/6 mice (4 months of old) were purchased from Charles River Laboratories, (Lyon, France). All animals were bred, housed locally at 22°C ± 2°C, and were acclimated to standard laboratory conditions (12-h light and 12-h dark cycle) with free access to rodent (ad libitum access) feed and water. And randomly divided after 2 weeks of acclimatization into 2 groups (n=10) differing in assigned diet, feed with tow made way diets according to AIN-93G recommendations (P. G. Reeves, Nielsen, and Fahey 1993; P. G. Reeves 1997) developed in collaboration with safe-laboratories (Safe, France) : Standard Diet (SD) (10 % of calories from fat), or High Fat Diet (HFD) (45 % of calories from fat) with the same ratio ω6:ω3 (omega-6/omega-3 polyunsaturated fatty acids (**Table 1**). Mice were continued fed with experimental diets until were sacrificed. Body weight and food intake were measured during the 14-week experimental period. Mice were anaesthetized by injection of with ketamine/xylazine (i.p., 100/10 mg/kg of body weight) (Sigma-Aldrich). Blood was collected by cardiac puncture. Plasma was obtained by centrifugation at 1000 × g for 15 min at 4 °C, and the plasma was separated to analyse the plasma biomarkers, aliquoted and stored at −80°C. Mice were then euthanized. Liver, spleen, white adipose tissue (WAT) and mammary tumor were collected, weighed, and stored at −80°C.

Measurement of food intake

Mice were given ad libitum access. Food was weighed and the daily amount of food consumed was calculated as the mean intake in grams per day. The food intake is expressed in grams per day per g of Body Weight (BW) or per g of Lean Body Mass (LBM). When

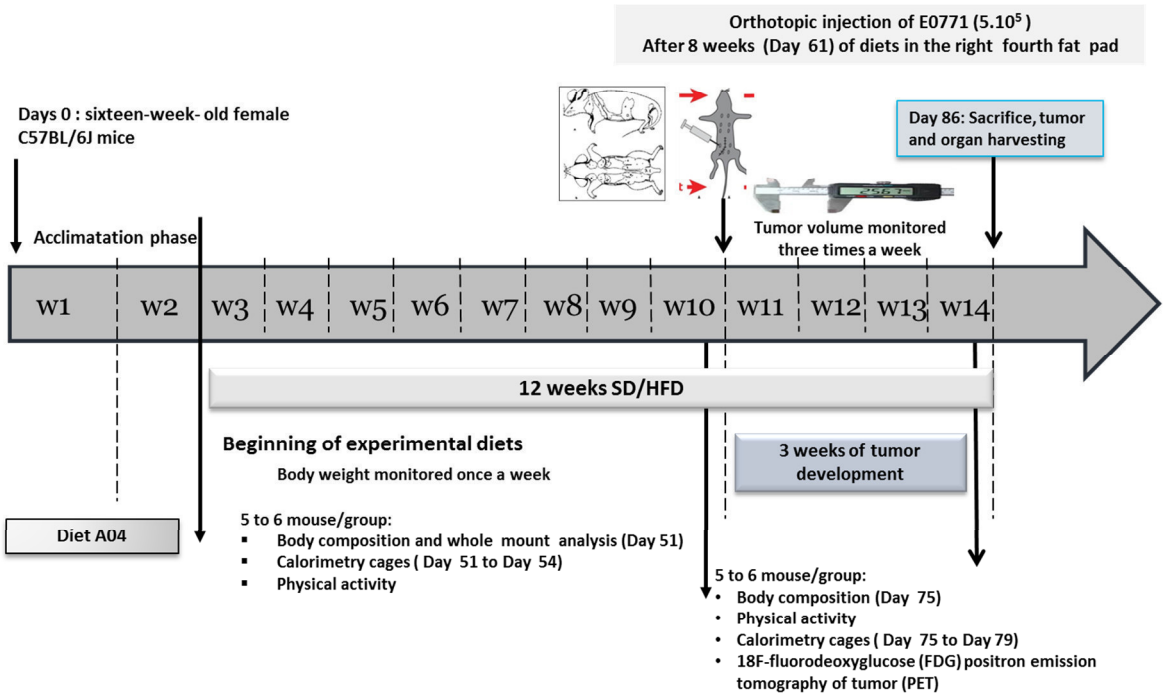


Figure 1: Experimental schedule and groups of the study.

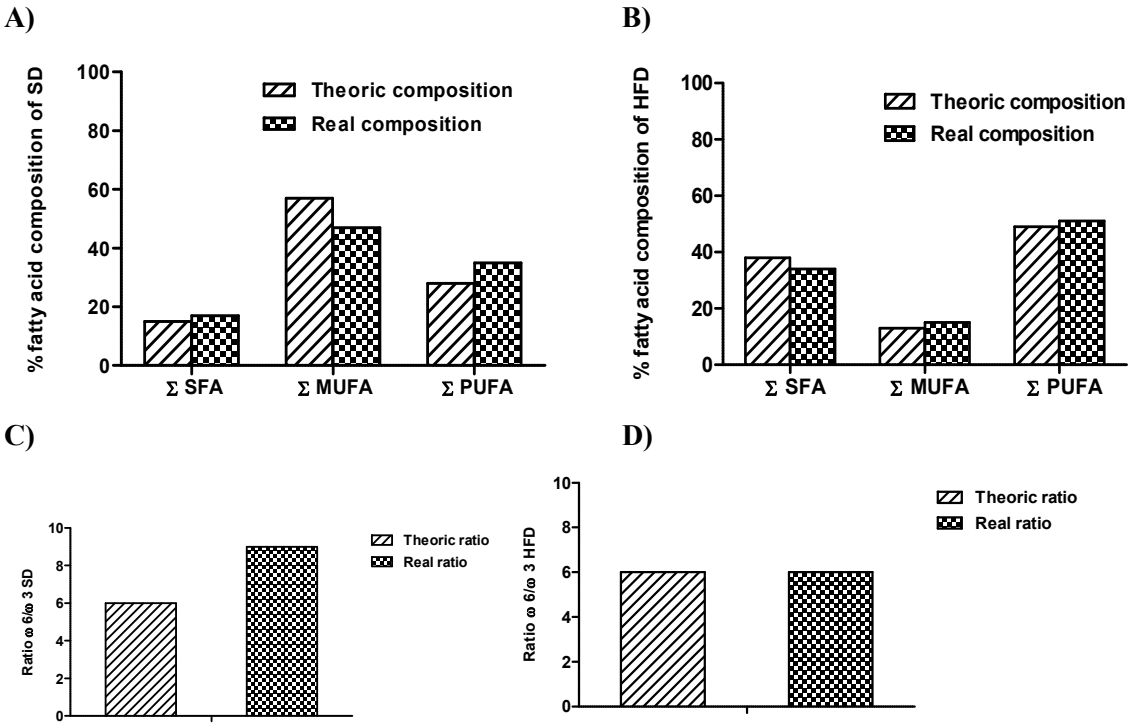


Figure 2. Fatty acid composition.

Comparison of theoric and real total saturated fatty acid composition (ΣSFA), total monounsaturated fatty acid composition (ΣMUFA) and total polyunsaturated fatty acid composition (ΣPUFA), in the low (A) and high fat diets (B). Ratio ω6/ω3 polyunsaturated fatty acids of the SD (C) and HFD (D).

indicated, the food intake is expressed in daily Kcal intake calculated according to the nutritional values of each diet (3.5 kCal/g for Chow diet and 4.3 kCal/g for HFD).

Fatty acid composition of experimental diets

Fatty acid profiling was determined by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). Briefly, FA were extracted as described by Folch et al and the organic phase was evaporated under nitrogen. FA methyl esters (FAMEs) were prepared via basic trans-esterification followed by acid trans-esterification. Analytic GC-FID analyses of FAMEs were performed using a gas chromatograph (Thermo Electron Corporation; Waltham, MA) equipped with a flame ionization detector. Helium was used as carrier gas. FAMEs were analyzed using a silica CP-Sil 88 capillary column (100 m/0.25 mm internal diameter/0.20 µm film thickness) (Varian; Palo Alto, CA).

Mammary Adenocarcinoma Cell Line

The syngeneic EO771 spontaneous mammary adenocarcinoma cell line (mouse ER_+ breast cancer) were maintained in complete RPMI 1640 Medium (Biowest, Nouaille, France) supplemented with 10% fetal calf serum (Biowest), 100 µg/mL streptomycin (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 100 U/mL penicillin (Sigma-Aldrich), 2 mM glutamine (Sigma-Aldrich) and cultured at 37°C in a 5% CO_2 humidified atmosphere. Prior to injection, EO771 cells (approximately 80% confluence) were trypsin detached, filtered to prevent cell clumping, mixed with growth factor–reduced Matrigel™ Matrix (BD Matrigel™ Matrix, BD Biosciences, Bedford, MA) and kept on ice until administration to mice.

Tumor Implantation and measurements

3-week-old C57BL/6 mice were randomized to live in Standard Environment (five mice per cage) for 10 weeks (**Figure 1**). Mammary cell line EO771 (5×10^5 cells in 100 µl) or vehicle only (Growth Factor Reduced BD Matrigel™ Matrix) were orthotopically transplanted into the fourth right mammary fat pad. From day 6 after tumor cells injection, tumor size was measured three times per week by measuring the perpendicular tumor diameters with a digital caliper and tumor volume was calculated according to the formula $V = 0.52\times \text{width}^2 \times \text{length}$, where width is the smaller of the two measurements. Twenty-five days after the cell injections, the mice were anesthetized with ketamine/xylazine (i.p., 100/10 mg/kg, Sigma-Aldrich), and blood samples were collected by cardiac puncture. After blood collection, the tumor and major organs were harvested. The tumors were stored frozen in liquid nitrogen for protein or embedded in Optimal Cutting Temperature compound (Tissue-Tek®, Sakura Finetek USA, Torrance, CA) for immunofluorescence study or formalin-fixed and paraffin-embedded for routine histological examinations with H&E staining.

Near-Infrared Fluorescence Imaging of Tumor-Bearing Mice

XenoLight RediJect 2-DeoxyGlucosone 750 (2-DG-750), a near-infrared fluorescent probe was purchased from Caliper Life Sciences (Hopkinton, MA). Near-infrared fluorescent 2-DG-750 has a peak excitation 745 nm and peak emission 780 nm. Near-infrared fluorescence imaging of the tumorbearing mice was conducted with an IVIS Spectrum instrument (PerkinElmer, Waltham, MA). At 3 to 4 h post injection of 70 to 100 µL of fluorescent 2-DG-750, near-infrared fluorescence images of the tumor-bearing mice were obtained with

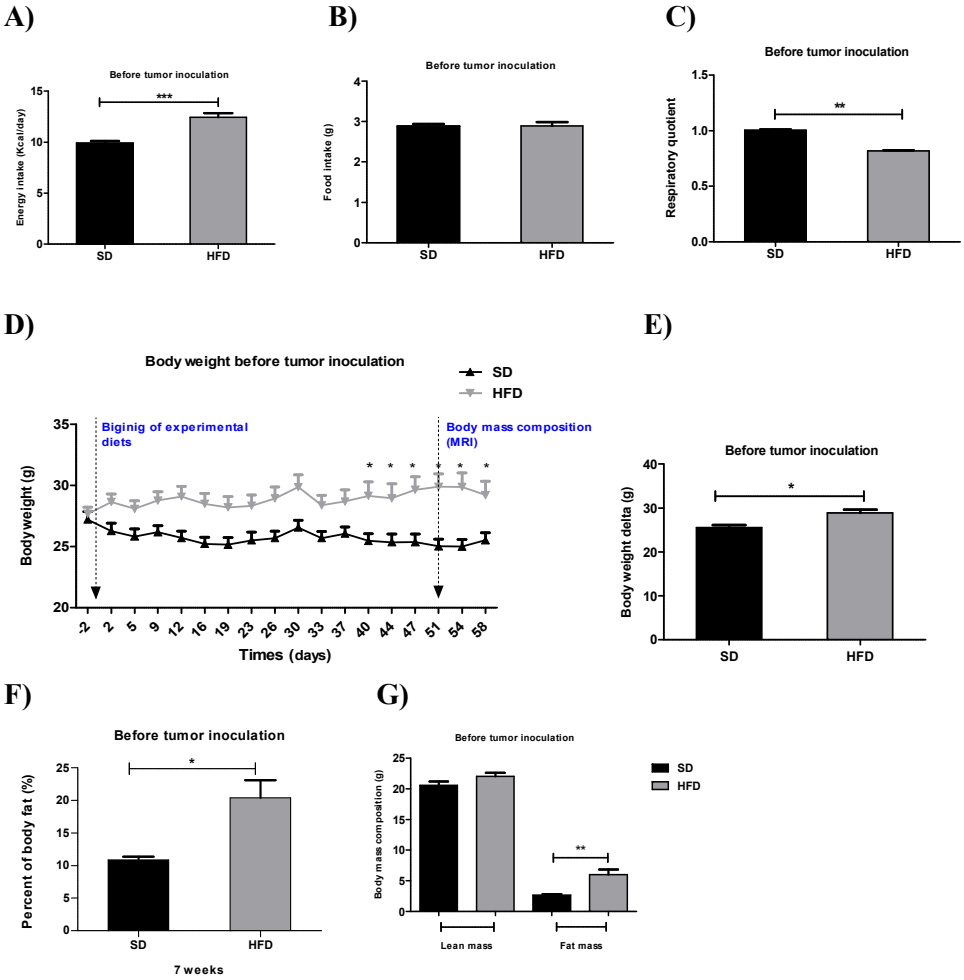


Figure 3. Characteristics of low and high fat diets and their Impact on weight gain and body composition of C57BL6 mice before orthotopic injection of EO771 cell.

(A) Energy intake was significantly higher in HFD group that SD mice. (B) Food intake was similar in both groups. (C) Respiratory Quotient of HFD was upper than SD. (D) and (E) Body weight gain before tumor inoculation were monitored (n= 10 mice/group). Representative animals are shown: SD mice group and HFD mice group. (F), (G), and (H) Body composition of 35 –week old mice was measured by MRI (n=5 mice / group). (F) Lean mass. (G) Fat mass. Body fat content as percentage of total weight. Results are mean ± SEM (n=10/group). * $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$ SD vs. HFD. Panel (B) were analyzed by ANOVA; panels A, C, D, E, F, G and H were analyzed by Man Whitney *t* test.

indocyanine green/indocyanine green (ICG)/ ICG) filter sets at a wave length of Ex745nm/Em820nm, in a protocol from the vendor (Caliper life Sciences). Nearinfrared fluorescence images were processed and analyzed with Living Image® 4.2 software (PerkinElmer).

Body composition analysis

Eight weeks after low and high fat feeding, 5 mice per group were subjected to magnetic resonance imaging (MRI) using Echo MRI (Echo Medical Systems, Houston, TX) to determine the body composition. The mice were placed in a clear plastic holder without anesthesia or sedation and inserted into the EchoMRI device to measure total body fat and lean mass. Following MRI analysis, the mice were sacrificed and blood was collected and other organs (mammary fat pad, visceral fat, kidneys, liver, lungs, spleen and brain) were excised and weighed.

Indirect calorimetry

Whole-body energy metabolism physical activity was measured with an indirect calorimetry system, mice *(n*= 5 per group) were tested for 4 days in calorimetry cages with infrared beam arrays to monitor activity during, twice during the experiment, both before and after tumor inoculation. Dioxygen consumption (VO_2), carbon dioxide production (VCO_2) and activity of SD and HFD mice were measured using a tow-cage TSE System PhenoMaster/LabMaster (Bad Homburg, Germany). Energy expenditure was calculated using Weir's equation (EE = 16.3 $V0_2$+4.57 VCO_2) (Weir 1990) from measurements of gas exchanges computed for each cage from data sampled every 5 min. Spontaneous activity was measured using a three dimensions meshing of light beams. Each cage has a volume of 4.9 l and the flow-rate was set to 0.4 l/min. The O_2 and CO_2 analyzer were calibrated before each measurement period. Ambient temperature was maintained at 28°C to reach the animal thermo-neutrality and the light was on from 08am to 08pm. During an adaptation period of twenty-four hours prior to data collection, mice were placed five per cage in separate calorimetry cages, with free access to food and water. Then VO_2, VCO_2 and activity were monitored during 24 h while fed ad libitum and thereafter, during 16 h while fasting. Locomotor activity in the metabolic cages was measured by the breaking of 32 infrared laser beams that span each cage in the *xy* and *yz* planes. TSE LabMaster software recorded in 10 min intervals each time a series of laser beams were broken by ambulatory and rearing activity. Metabolic activity was measured *via* indirect calorimetry recording maximal O_2 consumption (VO_2) and CO_2 production (VCO_2). VO_2 and VCO_2 values were normalized by the software to body weight in kilograms and are reported as ml/h/kg (J.-Y. Kim et al. 2007). Respiratory Quotient (RQ) was calculated as the ratio of VCO_2 to VO_2. Daily energy expenditure and activity were computed from the 24 h period when animals were fed. Minimal energy expenditure was calculated as the mean value of the 4 last values at the end of the fasting period.

Biochemical plasma analyses

Plasma analysis cardiac puncture blood samples were collected for evaluation of plasma concentrations of Free fatty acids (FFA), albumin, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol, glucose, total protein and triglycerides were measured on an automatic analyzer (Cobas-Mira plus, Roche Diagnostics, Meylan, France) by Anexplo

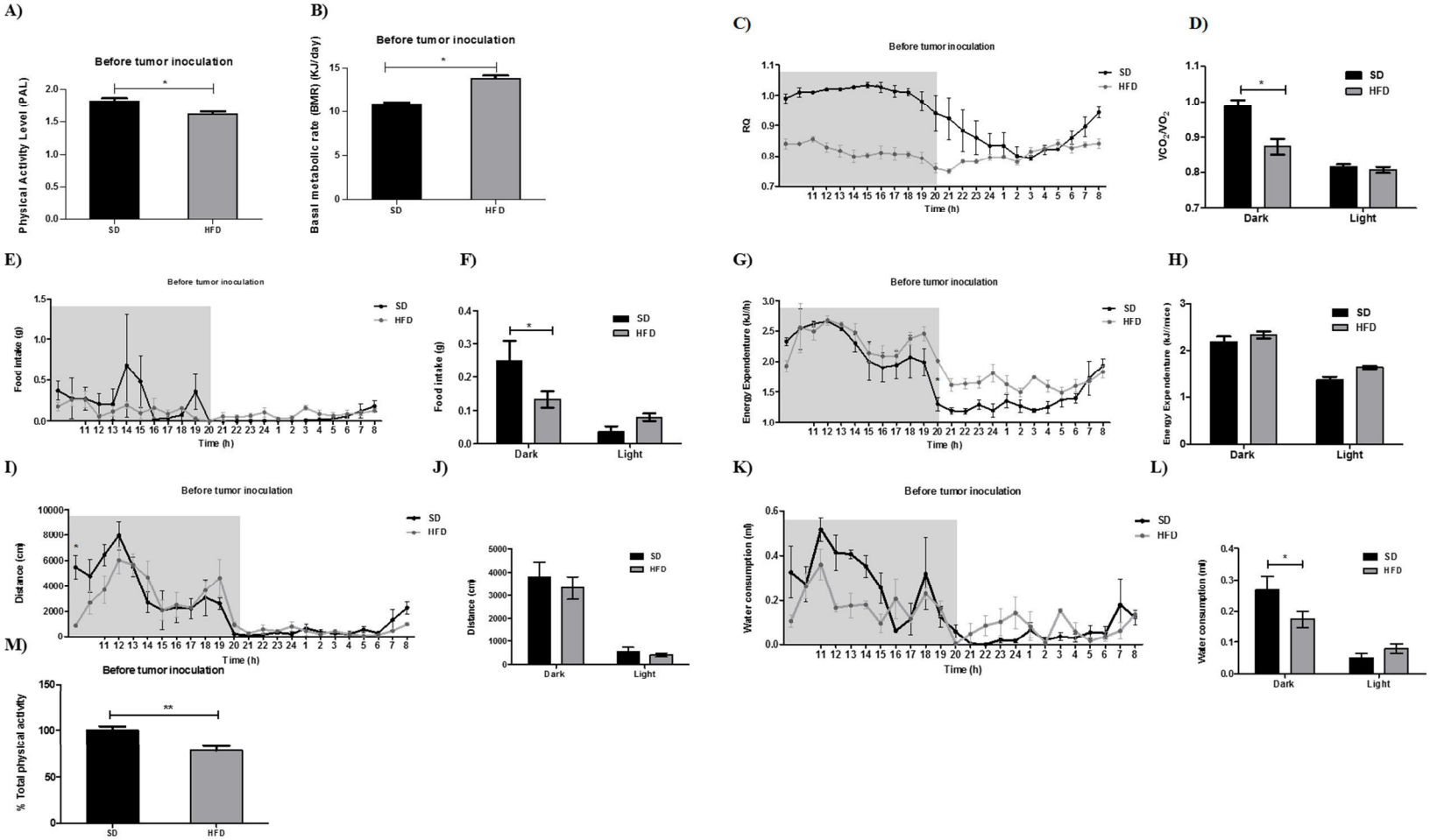


Figure 4. Calorimetric parameters of SD and HFD mice before tumor inoculation.

Shaded area represents dark phase. n =5 per group. (A) Physical Activity Level (PAL) was calculated from the basic metabolic rate (BMR) and total energy expenditure (EE) using the following equation: Resting Energy Expenditure (REE) = BMR * PAL. (B) Metabolic rate for 7-month-old female mice (n=5) as assessed by indirect calorimetry performed over a 24 hour period. (C) Respiratory Quotient (RQ). (E) Food intake for mice fed differing diets. (G) Total daily Energy Expenditure of SD and HFD mice, Energy Expenditure is expressed as KJ per day relatively to the total body weight (BW) or to the Lean Body Mass (LBM) of each mouse. (I) Spontaneous locomotor activity of SD and HFD mice were measured in the home cage using infrared light-beam represent the number of laser beams broken due to movement in the cage. Values are expressed as the mean distance (cm) ± SEM fo r5 mice/group. (K) Water consumption. (M) Percentage of total physical activity. Corresponding average light and dark cycle RQ (D), Food intake (F), EE (H), Distance (J), water consumption (L). Values are the mean ± sem for 6 mice/group.*$p \leq 0.05$; **$p < 0.01$.

platform (Genotoul, IFR BM-T, Toulouse, France). Albumin, ALP, ALT, total cholesterol, creatinine, glucose, LDL, total protein, and triglycerides were quantified with commercial kits from ABX Pentra Horiba (Montpellier, France).

Milliplex Map immunoassay

The serum concentrations of interleukin insulin, leptin, resistin and monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) were measured using Multiplex Biomarker Immunoassays for Luminex xMAP technology (Merck Millipore Bioscience, MA, USA; cat. no. MADKMAG-71 K-07), and the concentrations of serum adiponectin were evaluated with MADPK-71 K-01. The reading was performed using Luminex System, Bio-Rad laboratories software version 4.2. Plasma concentrations of interleukin (IL)-6, leptin, TNF-α, resistin, PAI-1, and MCP-1 were measured simultaneously using a Luminex xMAP system (MILLIPLEX MAP Mouse Adipokine Panel, Millipore, France). The mean fluorescence intensity (MFI) was detected by the Multiplex plate reader for all measurements (Luminex System, Bio-Rad Laboratories, Germany).

Quantification of 17 β-estradiol level

The 17 β-estradiol level was determined using the estradiol EIA kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) according to the manufacturer's instructions. The diluted sample, standards, AChE tracer and rabbit anti-estradiol were put into the appropriate wells of microtiter plates coated with mouse anti-rabbit IgG. After incubation for 60 min at room temperature, all wells were washed five times and developed with Ellman's reagent for 60 min. Absorbance at 405 nm was determined using the Bio-Rad Model 680 microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Data are expressed as pg of 17 β-estradiol per ml (plasma).

Quantification of 8-Isoprostane

Eluate from the silica Sep-Pak was dried and reconstituted in EIA buffer (1 ml) supplied by Cayman Chemical Co. An aliquot was taken to determine recovery, which averaged 75%. Ultrapure water (Cayman Chemical Co.) was used to make up all aqueous solutions. The EIA kits were purchased from Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI). The assay is based on the standards (8-iso-PGF2α) and unknowns competing with 8-iso-PGF2α-linked acetylcholinesterase enzyme (tracer) for sites on an antibody (raised against 8-isoPGF2α) which is coated onto a 96-well microtiter plate. The samples were assayed in duplicate with two dilutions, with standards (0–500 pg/ml of 8-iso-PGF2a), and blanks. After an incubation period of 24 h the plate was washed and the fraction bound to the antibody was reacted with Ellman’s reagent which provides the substrate for acetylcholinesterase enzyme (tracer). The resultant color reaction was read using a Bio-Rad plate reader at 405 nm, the color development being inversely proportional to the concentration of 8-isoPGF2α measured. To optimize the assay, it was necessary to use ultrapure water for all aqueous reagents and to manually wash the plates. The intra- and inter-assay variations for the enzyme immunoassay were 6 and 10%, respectively.

Statistical Analysis

All results are expressed as mean standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed with Prism 5 software (GraphPad). Blood chemistry data were analyzed with one-

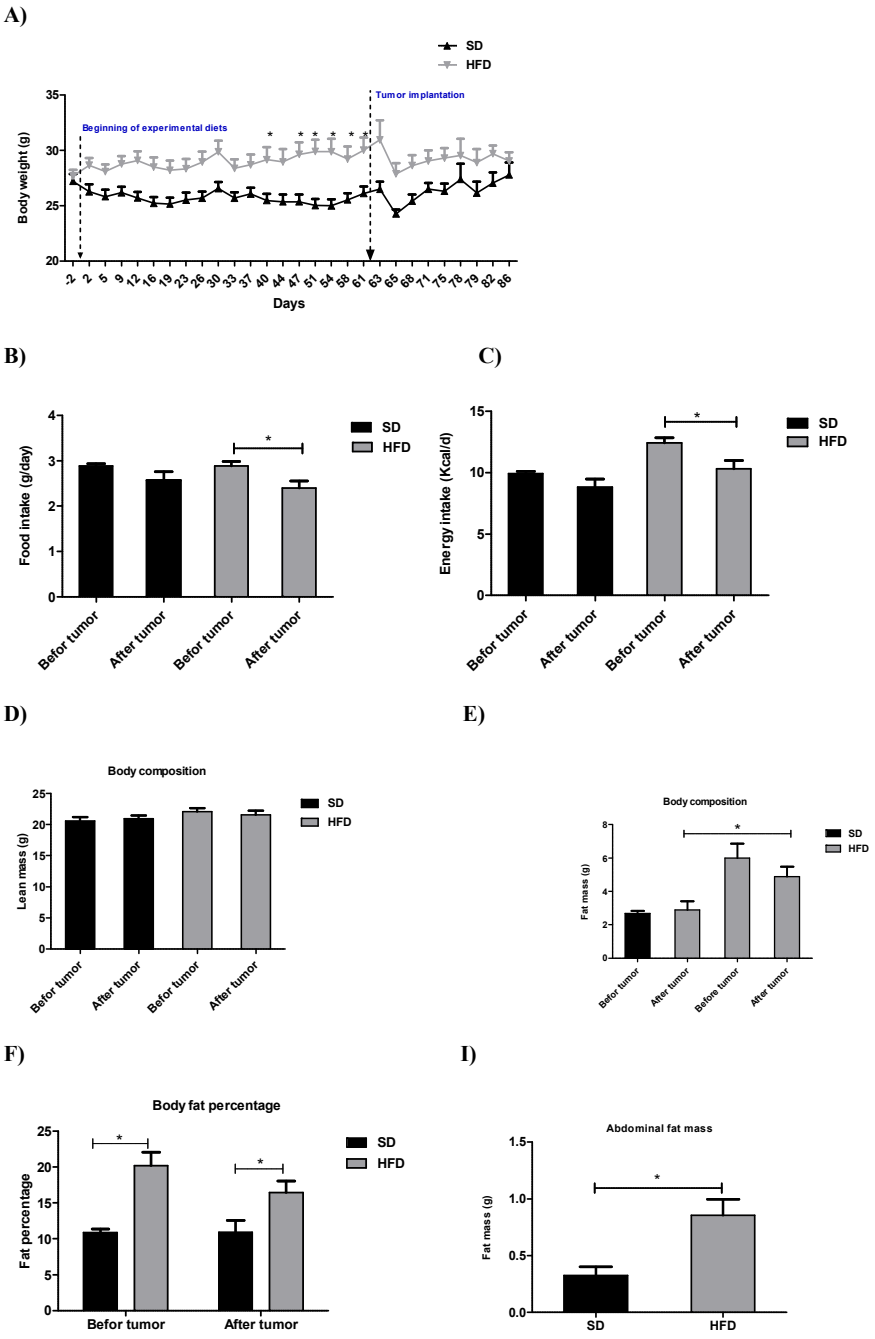


Figure 5. Modification of body composition after tumor inoculation.
(A) Changes in body weight gain were monitored after injection of EO771 cell in mammary gland of mice until sacrifice (n=10 mice/group). Food intake and body weight were measured throughout study. (B) Food intake, decreased food intake in HFD group. (C) Energy intake, decreased energy intake in HFD groups vs. LHF group after tumor implantation. (D) Lean body mass, (E) Fat body mass. Body fat and lean mass were determined by MRI before EO771 cell implantation and at the end of the experiment. Body fat after ~ 14 weeks of SD or HFD diet (E) and 3 weeks after EO771 cells or Matrigel injection. (D) Lean mass after 14 weeks of SD or HFD diet and 3 weeks after EO771 cells or Matrigel injection and (E) Fat mass, (E) Fat mass presented as percentage to total body weight, even after tumor implantation HFD mice group still retain a higher fat mass retain a higher fat mass *vs*. SD group. (I) Intraabdominal visceral fat pads from SD and HFD mice, were weighed and presented as percentage to total body weight (n=3-4 mice/group). Results are mean SEM. Statistical analysis was performed by Mann–Whitney test, $P < 0.05$.

tailed Mann Whitney test t-tests between HFD and SD groups. Average metabolic values (from indirect calorimetry) were calculated within subjects, then averaged across subjects for statistical analysis by Mann Whitney t-tests. Repeated measures ANOVA were performed on body weights as well as RQ, energy expenditure and an interaction between diet and tumor ($P < 0.05$, two-way ANOVA). Values were considered to be significant at $P < 0.05$

Results

Fatty acid composition

In order to verify the lipid composition of the experimental diets, we have conducted a lipid analysis to see if the real composition matches with the theoric formulation on fatty acids (Figure 2). We have analyzed 150 mg of SD and HFD diets by gas 306 chromatography. The real composition of experimental diets was quite close to the theoretical formulation. Whereas, the ratio of PUFAs (ω6/ω3), does not match perfectly with the theoric ratio.

Body weight, food consumption and Metabolic cage studies

Before orthotropic injection of tumor mammary cells

To investigate the influence of high fat diet on breast cancer, C57BL/6 mice were fed with SD or HFD (45 vs. 10 % Kcal from fat, respectively). To assess physiological mechanisms of HFD in C57BL/6 mice, food intake and physical activity were measured at 7-8 weeks after initiation on the experiment, and indirect calorimetry was performed to measure energy expenditure. Although there were no statistically significant differences in grams of food consumed per day between SD and HFD groups (Fig. 3A), energy intake was lower in SD group than HFD (Fig. 3B). Female C57BL/6 fed with HFD showed a slight, but significant increase in body weight up to 2.5 % after 8 weeks on diet as compared to SD mice (SD 25.52 ± 2.02 g vs. HFD 29.21 ± 3.89 g, $P < 0.05$) (Fig. 3D).

To determine whether the HFD altered body fat content, body composition was performed by MRI analysis assessed after ~ 7 weeks on diet. There was a significant increase in percent body fat in HFD compared to SD mice at 7 weeks (SD 10.87 ± 1.11 % vs. HFD 20.39 ± 6.11 %, $P < 0.01$) (Fig.3H). However, there were no significant differences were noticed in lean mass after adjusting for total body mass (Fig. 3F).

The respiratory quotient (RQ) was determined by indirect calorimetry. O_2 and CO_2 exchange and RQ data were logged using data acquisition software (TSE LabMaster software). Moreover, RQ measured during the high fat diet was 0.81 significantly lower than the standard diet, which was 1.005 ($P < 0.01$) indicating an increased fat oxidation. Diet with high fat content can reduce the RQ, this result is matches with literature (Suteerojntrakool et al. 2015). 24h before study initiation in calorimetry cages, with free access to food and water, mice were acclimatised to rest comfortably in the chamber. Energy expenditure referring to the amount of energy used for thermogenesis, physical activity and performance of cellular and organ function, we thus measured activity. Figure clearly shows that activity is significantly increased in SD mice compared to HFD animals (Fig. 4 I and M). It is noticeable that it is the diurnal activity of the mice that is mainly affected.

Mice fed HFD had higher energy expenditure than SD related to their basal metabolic rate. Figure shows that both minimal energy expenditure corresponding to basal metabolic rate and

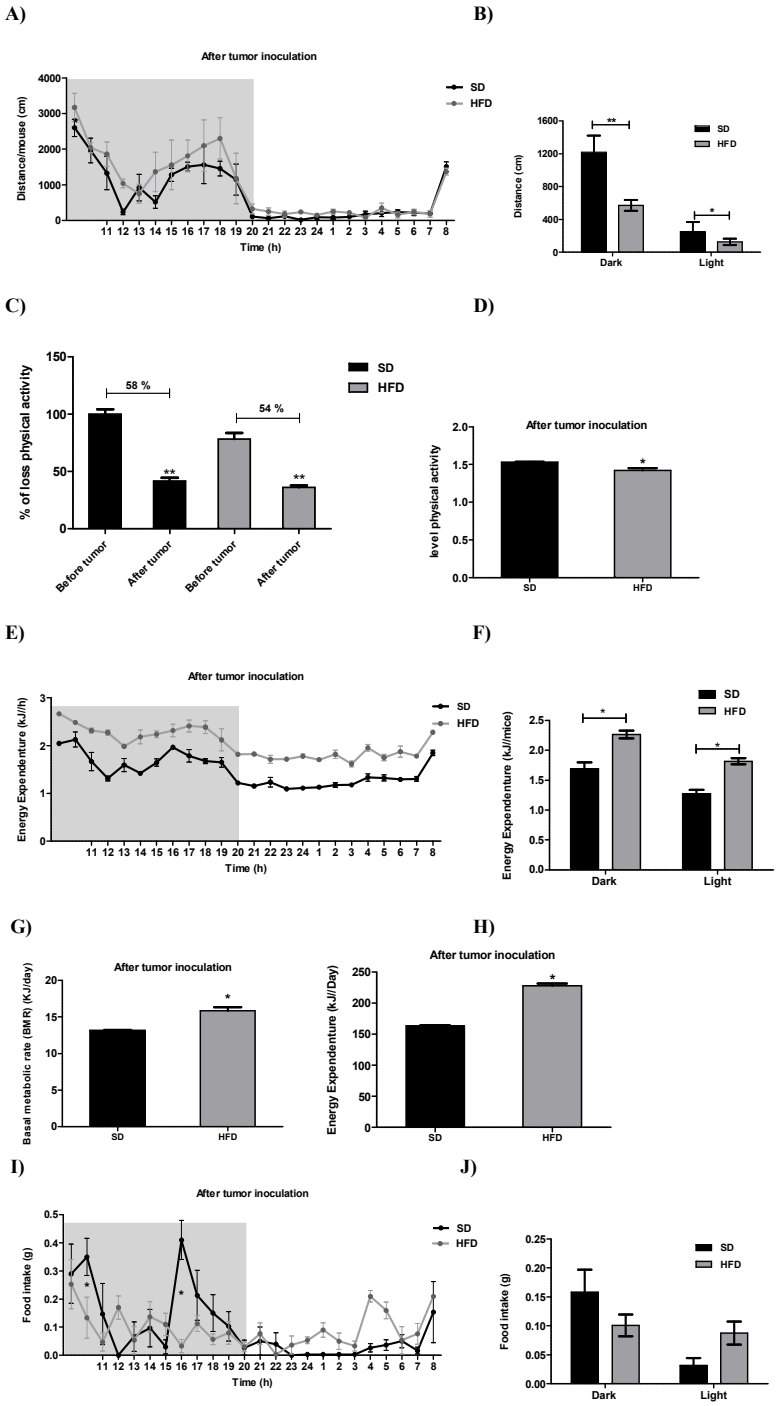


Figure 6: Calorimetric parameters of SD and HFD mice after tumor inoculation.
Effects of chronic consumption of a high fat diet on energy intake, body weight, composition and spontaneous physical activity in calorimetric cages. twenty eight week-old female C57BL6 mice were fed a SD or a HFD for a period of 16 wk. Twelve weeks after initiating feeding, EO771 (ER_+) cells or Matrigel were injected into the sides of the fourth pair of mammary fat pads. The mice remained on the same diets. One month after tumor cell implantation, the mice were sacrificed. Food intake and body weight were measured throughout study. (A) Distance (cm), distance covered by the mice in cages. (C) Percentage of loss of physical activity in the calorimetric cages after tumor inoculation. (D) Physical Activity Level (PAL). (E) EE (Energy Expenditure). (G) Basal Metabolic Rate (BMR). (H) Total Energy Expenditure after tumor inoculation. (I) Food intake. Corresponding average light and dark cycle (B) Distance (cm). (F) EE and (J) Food intake. Data are mean ± SEM, n = 5 mice per diet. Significance during the dark cycle compared to SD is indicated by *P < 0.05; **P < 0.001.

daily energy expenditure are significantly increased in HFD compared to SD animals (Fig. 4 G and H). Moreover, the physical activity level (PAL) was calculated by dividing minimal energy expenditure on total energy expenditure over 24 h, was lower in HFD compared to SD mice (Fig. 4 A and B). Total spontaneous physical activity in calorimetry cages was determined by calculating the distance covered by mice in cages (sum of the vertical and horizontal positions) on reporting the result as a percentage, this result indicating an increased activity in SD comparing to HFD group. Energy expenditure referring to the amount of energy used for thermogenesis, physical activity and performance of cellular and organ function, we thus measured spontaneous physical activity (Fig4 M). It is noticeable that it is the diurnal activity of the mice that is mainly affected. In accordance with the relative fat mass (Fig3 G) the weight of abdominal fat was greatly increased HFD group compared to SD group. While, no difference was observed for subcutaneous fat pads (data no shown).

Standard and high fat diets resulted in dissimilar body composition and energy intake Ad libitum access to diets containing resulted in different (body weight) BW over the experimental period (Fig.3 H). Body composition analysis revealed that body fat and lean mass were comparable between the two groups (Fig.3 F). Weekly food consumption and even cumulative intake were similar in standard diet and high fat-fed mice (Fig 4 E and F), there was a significant decrease in food intake during dark cycle with all of the diets relative to light cycle for all measurements (Fig. 4D-L). RQ and TEE (daily total energy expenditure) at week 7 exhibited circadian rhythmicity in energy expenditure, with significant differences in either standard dietor high fat-fed groups (Fig). Therefore metabolic and phenotypic alterations described below are related to the high fat diet. The time course of spontaneous physical activities is shown in Fig.4 (I and M). These data were used to calculate the average activity for the entire light and dark cycles (Fig 4. G). there were a statistical differences between the diets. The HF diet lowered average total physical by 78% relative to SD (Fig. 4 M).

After orthotropic injection of mammary tumor cell line (EO771)

After orthotropic injection of EO771, some modifications of body weight and food intake was observed. SD and HFD (Fig. 5 A) both of them lose weight (day 65) after one week of tumor implantation. It has found a significant decrease in food intake and caloric intake in (Fig. 5 B and C) mice fed with HFD vs. SD group, flowed by a modest decrease of fat content in HFD group ($p > 0.05$). In parallel, it was observed that mice loss about 50 % of their physical activity measured in calorimetry cages whatever the diet used (Fig. 6 C).

Effects of High fat diet on mammary tumor growth

Tumor volume was monitored with a caliper three times a week (Figure 7C and 7D). In the mice fed for 8 weeks prior to tumor implantation, the mean volumes of the mammary tumors were significantly increased at day 18 after the injection (Figure 7A and 3B), this result confirmed with the tumor bearing mice injected with 2- DesoxyGlucose 750 (2-DG 750) as a tracer for detection of hypermetabolic circulating tumor cells by fluorescence imaging (Fig. 7E, 7F). Hypermetabolic syngeneic tumors with increased uptake of 2-DG-750 were well visualized on near-infrared fluorescence images of the tumor-bearing mice obtained at 1 h post injection of the tracer. In the two mice with no visible tumors after implantation of EO771 cells, near-infrared fluorescent signals could be detected at the mammary gland fat

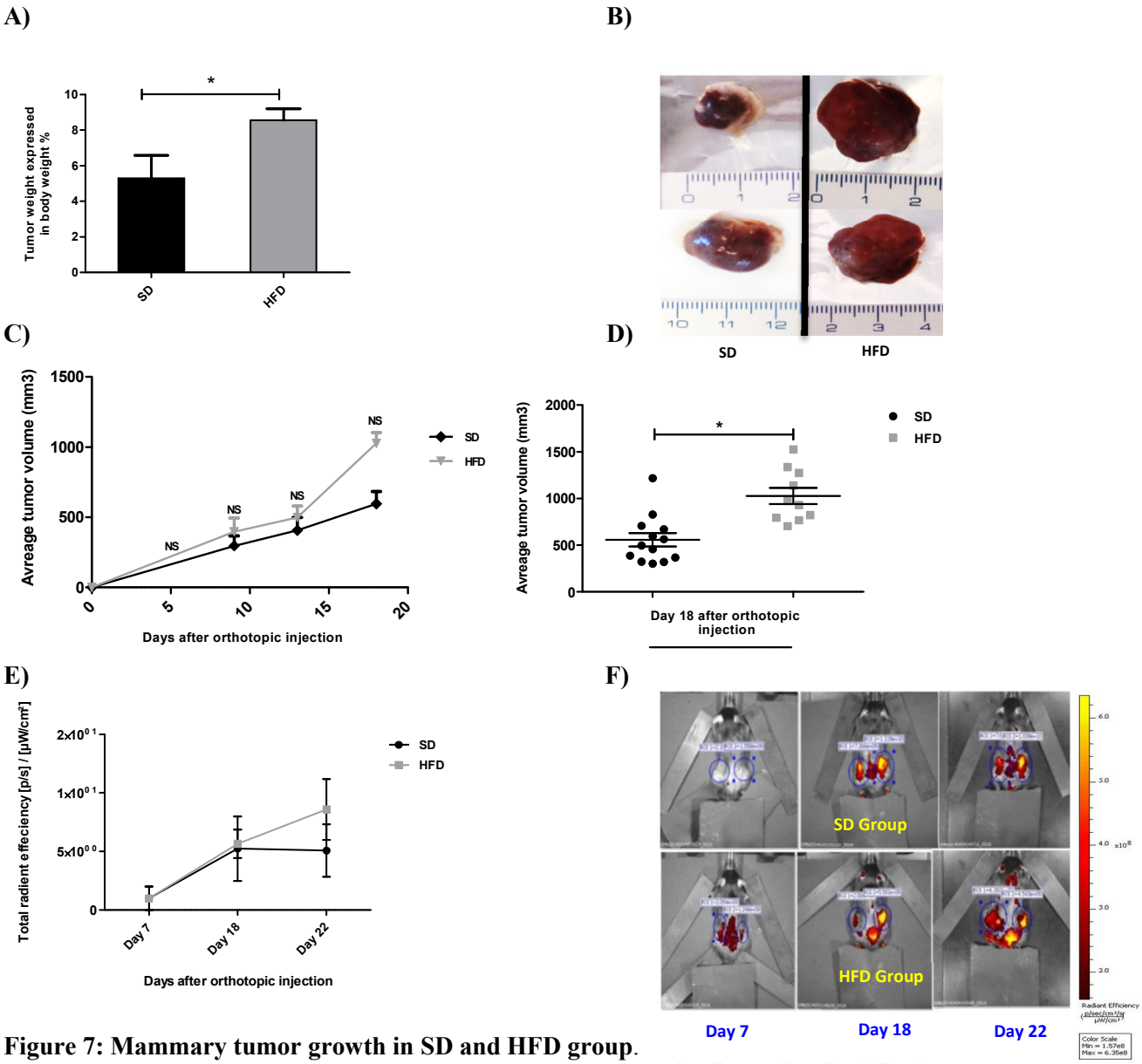


Figure 7: Mammary tumor growth in SD and HFD group.
A high fat diet stimulates tumor growth in C57BL/6 mice. (A) 25 days after the injection, the tumors were excised from SD and HFD mice and weighted (n = 7 in each group) P = 0.0825. (B) Representative EO771 adenocarcinoma dissected day 25 after orthotopic injection into the right fourth mammary fat pad, tumor weight at the end of investigations (B). The mice were fed continuously on the same diets. Tumor size was monitored three times a week by measuring the anteroposterior diameter with calipers. 25 days month after injections all mice were sacrificed. The tumors were removed and weighed. (C) and (D) Tumor volume evolution over time. Results are mean SEM, statistical analysis was performed by Mann–Whitney test, *P < 0.05. (E) et (F) Representative Near-infrared fluorescence images of tumor-bearing mice obtained at 3 h post injection of 2-DG-750: 2-DG-750 near infrared fluorescent signals were visualized at region of left mammary gland fat pad at 7, 18 and 22 days post implantation of EO771 tumor cells, indicating a hypermetabolic tumor with uptake of 2-DG-750; (F) tumor with increased uptake of 2-DG- 750 was visualized at region of left mammary gland fat pad, along with a small focus of 2-DG-750 fluorescent signal at right. Excretory 2-DG-750 fluorescent signals were also visualized in the region of urinary bladder.

pad injection site, although the amount of fluorescent signals for SD mice seems to was smaller than HFD mice to day 18 post-tumor implantation (Fig. 7E, 7F). The intensity of fluorescent increase after 18 days of orthotopic injection. This suggested that HF tumors of mice fed with HFD seems to be hypermetabolic *vs.* mice fed with SD. Seven days after the injection, all mice had developed solid tumors. However, 8 days after the transplantation all HFD mice exhibited palpable tumors, demonstrating that the occurrence of visible tumors can be delayed. From day 13 after the inoculation, SD mice had significance smaller tumors than HFD mice (Figure 7A). At variance the volume of the tumor reported on total weight determined at sacrifice was not significantly lower in the SD mice *vs.* HFD, (5.91 % SD *vs.* 8.55 % HFD, P = 0.0825) (Figure 7C, 7E). EO771 cells formed solid and highly hemorrhagic tumors (Figure 7B).

Plasma metabolic and inflammatory markers

Circulating levels of lipid metabolites and adipokines are tightly linked to metabolic state. We performed blood chemistry analysis on the HFD-fed and SD mice no observed differences in serum lipid Plasma. TG, FFA and total cholesterol were similar in the two groups (Table 2). All systemic inflammatory markers evaluated tented to increase in the HFD group compared to SD group (Table 3), a significant differences were observed in plasma levels interleukin-6 (IL-6), SD group = 49.70 ± 13.20 *vs.* HFD group = 140.3 ± 156.5, P=0.0225) but no significant differences was observed in plasma levels of tumor necrosis factor-α, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) in SD and HFD tumor-bearing mice. To evaluate systemic inflammation and oxidative stress, we measured the levels of 8 iso-PGF2α in the plasma of SD and HFD tumor-bearing mice. There were no significant changes in 8-iso-PGF2α between SD and HFD tumor-bearing (Table 3). Or adipokines profiles (leptin, adiponectin, resistin,) of HFD mice. Adipokine levels between the two groups of animals, plasma leptin and resistin levels were markedly higher in HFD group *vs.* SD group (Table 4), suggesting that the elevated serum adipokines levels in HFD mice group were caused by high content of lipids. We observed significantly differences in serum metabolite and adipokine profiles in the SD-fed and HFD mice. The mice fed with HFD and exhibited significantly higher serum estradiol levels than SD mice ($P<0.05$) (Table 2).

Discussion

This study was designed to assess whether physical and social environmental enrichment induces differential effects on tumor growth and, and if so, to determine their relation to oxidative stress, inflammatory and metabolic consequences using a mouse model of breast cancer. Studies of the relationship between high Fat diet and breast cancer have yielded conflicting results (Howe et al. 1990; E. H. J. Kim et al. 2006; E. J. Kim et al. 2011). The aim of this study was to determine whether an HF diet, in C57BL/6 mice, stimulated mammary syngeneic cancer growth and modulated spontaneous physical activity in calorimetric cages. The major finding to emerge was that high energy intake, without affecting other nutrients (except for lipids and carbohydrates) and body weight, increased ER+ mammary cancer growth. Although body weight was affected by the HF diet, body fat mass was increased in comparison to that of SD mice. In this study, we observed a significant increase in the body weight of female mice. However, the slower weight gain observed in HFD mice from week 5

Table 2: Plasma parameters in different groups after ~ 4 months SD and HF diets.

	SD	HFD	
TG (mmol/L)	1.45±0.24	1.90±0.99	P=0,1984
FFA (mmol/L)	0,56±0,04	0,59±0,02	P=0,04425
CH (mmol/L)	2,17±0,14	2,11±0,11	P=0,3744
Blood glucose (mmol/l)	9,54±1,17	9,63±0,78	P=0,4813
ALP (U/L)	20,88±3.98	14.02±1.31*	*P=0,046
ALT (U/L)	10.50±1.93	14.33±2.18	P=0,1417
Insulin (ng/ml)	231.8±37.58	308±40.17	P=0,1171
Estradiol (pg/ml)	31.78±3.65	44.84±6.82*	*P=0,0274

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; FFA, Free fatty acids; CH, Chomesterol; P < 0.05, least significant difference between groups SD and HFD. In absence of interaction, a Mann–Whitney test was realized.

Table 3: Effect of SE and EE housing on the levels of 8-IsoPGF2α metabolite and F2-isoprostane in the urine, and inflammatory markers in plasma of C57BL/6 mice injected with vehicle (no tumor cells) or with EO771 cells (tumor).

	SD	HFD	
8-ISO $PGF_2\alpha$ (pg/ml)	500.2 ± 170.5	618.1 ± 157.2	P= 0.1984
TNF-α (pg/ml)	26.05±6;31	22.91±8.16	P= 0.1577
IL-6 (pg/ml)	49.70±13.20	140,3±156,5*	P=0.0225*
MCP-1 (pg/ml)	552.3±291.4	576.7±206.7	P= 0.4381
PAI-1 (ng/ml)	3487±1238	3681±1053	P= 0.4333

Mice were subjected to SD or HFD Fed for ~ 16 weeks and injected with EO771 cells. At 25 days after the EO771 cells injection, urine and blood samples were collected from the mice. Plasma levels of adiponectin, interleukin (IL)-6, leptin, tumornecrosis factor (TNF)-a, resistin, plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) were measured with Luminex multiplexed assay. 8-iso-PGF2α was measured in plasma by EIA KIT. Different superscripts denote significant difference at P <0.05. Results are mean 8 SEM.

Table 4: Effect of low and high fat diets on the levels of various adipokines in plasma of C57BL/6 mice injected with EO771 cells (tumor).

	SD	HDF	
Adiponectin (µg/ml)	9.06±1.55[a]	5.65±0.48[b*]	*p=0.0213
Leptin (ng/ml)	0.15±0.07	0.74±0.22	*P=0.0087
Ratio Adiponectin/Leptin	72.77±32.42	13.77±4.49	*P= 0.0260
Resistin (ng/ml)	1.36±0.12	2.08±0.79	*P=0.0206

Different superscripts de note significant difference at p < 0.05 using the Mann-Whitney U test. A two-way multivariate analysis of variance was conducted to explore specific effects of the diet (d), the tumor (t) and the interaction between these two factors. Results are mean 8 SEM. *P < 0.05 SD tumor vs. HFD tumor.

to weeks 7 and 12 may have been in part be due to the enhanced visceral fat accumulation. Animals fed with SD have been shown to decrease adiposity.

n-3 Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are increasingly consumed as food additives and supplements; however, the side effects of these fatty acids, especially at high doses, remain unclear. We previously discovered a high fat n-3 PUFA diet made of fish/flaxseed oils promoted significant weight gain in C57BL/6 mice, relative to a control, without changes in food consumption. Therefore, here we tested the effects of feeding mice high fat (HFD) and standard diet (LF) n-3 PUFA diets, relative to a purified control diet (SD), on locomotor activity using metabolic cages. Relative to SD, the HF n-3 PUFA diet, but not the LF n-3 PUFA diet, dramatically reduced ambulatory, rearing, and running wheel activities. Furthermore, the HF n-3 PUFA diet lowered the respiratory exchange ratio. The data suggest mixed fish/flaxseed oil diets at high doses could exert some negative side effects and likely have limited therapeutic applications.

Our next question was whether or HFD impact the spontaneous physical activity of mice in calorimetric cage. It has been reported in previous studies that a high dose of n-3 PUFAs lowered mouse activity. The reduction in activity with the HF n-3 PUFA diet was consistent with other investigations demonstrating this diet promoted significant body weight gain in mice (Rockett et al. 2010). The SF n-3 PUFA diet also had a tendency to reduce energy expenditure in some of the measurements. This raises the question of whether mixing fish and flaxseed oils has some potential effect that does not promote body weight loss and perhaps even increase body weight gain after long-term feeding due to a reduction in activity. More studies are needed to address this in addition to determining the effects of other fat sources (i.e. hydrogenated oils, coconut oil) on activity. Overall, the reduction in all three measures of activity (ambulatory, rearing, and running wheel) appeared dose dependent with the n-3 PUFA diets.

It is difficult to directly compare our data to other studies since there are very few studies in this area, which are not in complete agreement. For instance, an EPA enriched oral food supplement provided to advanced pancreatic cancer patients, who are prone to losing weight, enhanced energy expenditure, and provided some improvement in their metabolism (Barber et al. 2000). However, in another set of studies, supplementing the diet of healthy males with fish or flaxseed oil had no effect on energy expenditure (Bortolotti, Tappy, and Schneiter 2007; Jones, Jew, and AbuMweis 2008). Clearly, more studies are needed in this area with n-3 PUFAs in both animals and humans.

There are a few cases where an increase in body fat mass due to lower activity could have some value. Of course, extensive functional and mechanistic studies in animals and eventually humans would be required to address at what specific dose, composition of n-3 PUFAs, and duration could these fatty acids be utilized for these cohorts.

Tumor growth seems reduced body fat only in the HFD group. In our experimental model, the HFD diet increased the solid tumor growth of EO771 murine mammary carcinoma cells in old female C57BL6 mice. Experimental models of HFD diet are associated with increased body weight and visceral fat accumulation. A similar HFD diet has been shown to increase the mRNA expression of uncoupling protein (UCP) 1 in brown adipose tissue (Begriche et al. 2008a). UCP1 is involved in lipid oxidation, which produces heat by thermogenesis (Enerbäck et al. 1997). Fat mobilization results not only from increased lipolysis and fatty acid oxidation but also from a leptin-independent adipocyte lipolysis control mediated by

adipose triglyceride degradation (Marcelin et al. 2012). HFD diets are generally rich in fat (up to 60%), particularly in saturated lipids (E. J. Kim et al. 2011; Rose, Connolly, and Meschter 1991). In our experiment the HFD diet contained only 45 % fat with same ratio of ω6/ω3 polyunsatured fatty acids, and this could be a reason to explain the modest weight gain.

Obesity is associated with altered lipid metabolism, as shown by the high circulating levels of triglycerides and LDL and the low concentrations of HDL Cholesterol , which are characteristic of the metabolic syndrome (Furberg et al. 2004; Kucharska-Newton et al. 2008). In our experimental conditions, the plasma level of triglycerides and total Cholesterol seems to be increased in response to the HF diet but it was not significant. Such a reduction was not observed in the HFD, probably as a result of reduced hepatic function as shown by the low plasma level of the ALP (HFD group = 14.02 ± 1.31 vs. SD group = 20,88 ± 3.98, P=0,046). *In vitro* studies have shown that HDL stimulates the proliferation of ER+ and ER− mammary tumor cell lines including human mammary epithelial cells, MCF-7 ER+ like EO771 murine cells (Jozan et al. 1985; Rotheneder and Kostner 1989).

In an experimental model of diet-induced obesity, the tumor plasma level of Interleukine 6 (IL-6) involved in inflammation was increased (Cui et al. 2014; Chung et al. 2014; Fujisaki et al. 2015). In the present study, the HFD diet increased plasmatic level of the pro-inflammatory cytokine, IL-6 and resistin. While, the plasma concentration of TNF-α and MCP-1 of mice fed the HC diet were not altered.

Obesity resulting from a high-fat diet and low physical activity is an established risk factor for breast cancer in postmenopausal women, and in particular for ER+ tumors (G. K. Reeves et al. 2007a; Stephenson and Rose 2003). Estrogens are involved in breast carcinogenesis *via* binding and activation of their own receptors. Increasing evidence indicates that the ER-α may be primarily associated with regulation of cell proliferation, while the ER-β form has been linked with cell apoptosis regulation (Hodges-Gallagher et al. 2008; Acconcia et al. 2005). In addition, the ER-α/ER-β ratio is elevated in proliferative, invasive mammary tumors compared to normal tissues (Roger et al. 2001) and it was observed that proliferation, migration and invasion of breast cells were greatly affected by high concentration 17-β Estradiol (E2) treatment and were not affected by low concentration E2 treatment in an ERα independent way (Fuentes-Mattei et al. 2014). In the present study, Estradiol level was changed with a high fat diet, it was higher in the plasma of mice fed with a HFD vs. SD.

The authors linked the relative tumor resistance to a significant decrease in the levels of leptin and increase in those of plasma adiponectin levels. Also, the adiponectin to leptin ratio is higher in individuals with a normal BMI than in overweight or obese individuals (Ruhl and Everhart 2001; Arita et al. 2012). Since leptin promotes breast tumor growth and adiponectin has anticancer properties, it has been suggested that the adiponectin:leptin ratio is a critical factor (35,36)in mammary cancer tumorigenesis (Mauro et al. 2007; Margot P. Cleary et al. 2009a). Our HFD increased adiposity and were accompanied with a significant decrease in the plasma levels of adiponectin with affecting plasma leptin levels, it was upper than plasm SD mice. The decrease in the adiponectin:leptin ratio and thus, the imbalance between these adipokines in HFD mice may have stimulated cancer cell growth in this group. Adiponectin:leptin ratio is significantly decreased in SD tumor-bearing mice compared to HFD tumor-bearing mice respectively. These results are consistent with previous observations

in vitro that an increase in the adiponectin:leptin ratio reduces MCF-7 and T47-D cells proliferation (Nkhata et al. 2009).

Finally, the role of free radicals is important in carcinogenesis. F2-isoprostanes, prostaglandin-like novel bioactive compounds are formed during free-radical catalyzed peroxidation of arachidonic acid, and are now regarded as one of the most reliable indicators of oxidative stress *in vivo* (Basu 2008; Basu 2010c). In addition, the role of PGF2α in inflammation is well documented (Basu 2007; Basu et al. 2013a). However, we observed that 8-Isoprostane plasmatic levels of these compounds were not statistically significant between the groups. This is possibly due to the fact that high individual variation in these parameters in plasmatic among mice exists.

This is the first study to show that HFD influences spontaneous animal's physical activity by reducing their physical activity by reducing their movements and displacements in calorimetric cages comparing to SD mice. Furthermore, mice fed with HFD less tolerant tumor implantation in mammary gland, resulting in loss of appetite, they are more sensitive to an anorexic effect after tumor inoculation. This study provides further evidence for the implication of HFD in breast cancer progression associated with a loss of physical activity.

References

1. Arnold M, Pandeya N, Byrnes G, Renehan AG, Stevens GA, Ezzati M, et al. Global burden of cancer attributable to high body-mass index in 2012: a population-based study. Lancet Oncol. 2015 Jan;16(1):36–46.
2. Armstrong K, Eisen A, Weber B. Assessing the risk of breast cancer. N Engl J Med. 2000 Feb 24;342(8):564–71.
3. King M-C, Marks JH, Mandell JB, New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science. 2003 Oct 24;302(5645):643–6.
4. Löf M, Sandin S, Lagiou P, Hilakivi-Clarke L, Trichopoulos D, Adami H-O, et al. Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. Br J Cancer. 2007 Dec 3;97(11):1570–6.
5. Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. N Engl J Med. 2003 Apr 24;348(17):1625–38.
6. Gregor MF, Hotamisligil GS. Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. J Lipid Res. 2007 Sep;48(9):1905–14.
7. Knekt P, Albanes D, Seppänen R, Aromaa A, Järvinen R, Hyvönen L, et al. Dietary fat and risk of breast cancer. Am J Clin Nutr. 1990 Nov;52(5):903–8.
8. Howe GR, Hirohata T, Hislop TG, Iscovich JM, Yuan JM, Katsouyanni K, et al. Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. J Natl Cancer Inst. 1990 Apr 4;82(7):561–9.
9. Kim EJ, Choi M-R, Park H, Kim M, Hong JE, Lee J-Y, et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. Breast Cancer Res BCR. 2011;13(4):R78.
10. Gu J-W, Young E, Patterson SG, Makey KL, Wells J, Huang M, et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. Cancer Biol Ther. 2011 May 15;11(10):910–7.
11. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D, et al. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. BMJ. 2007 Dec 1;335(7630):1134.
12. Stephenson GD, Rose DP. Breast cancer and obesity: an update. Nutr Cancer. 2003;45(1):1–16.
13. Rose DP, Connolly JM, Meschter CL. Effect of dietary fat on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. J Natl Cancer Inst. 1991 Oct 16;83(20):1491–5.
14. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. Pain. 1983 Jun;16(2):109–10.
15. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. J Nutr. 1993 Nov;123(11):1939–51.
16. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. J Nutr. 1997 May;127(5 Suppl):838S – 841S.
17. Weir JB. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism. 1949. Nutr Burbank Los Angel Cty Calif. 1990 Jun;6(3):213–21.

18. Kim J-Y, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, et al. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. J Clin Invest. 2007 Sep;117(9):2621–37.
19. Suteerojntrakool O, Sanguanrungsirikul S, Sritippayawan S, Jantarabenjakul W, Sirimongkol P, Chomtho S. Effect of a low-carbohydrate diet on respiratory quotient of infants with chronic lung disease. J Med Assoc Thail Chotmaihet Thangphaet. 2015 Jan;98 Suppl 1:S21–8.
20. Kim EHJ, Willett WC, Colditz GA, Hankinson SE, Stampfer MJ, Hunter DJ, et al. Dietary fat and risk of postmenopausal breast cancer in a 20-year follow-up. Am J Epidemiol. 2006 Nov 15;164(10):990–7.
21. Rockett BD, Salameh M, Carraway K, Morrison K, Shaikh SR. n-3 PUFA improves fatty acid composition, prevents palmitate-induced apoptosis, and differentially modifies B cell cytokine secretion in vitro and ex vivo. J Lipid Res. 2010 Jun;51(6):1284–97.
22. Barber MD, McMillan DC, Preston T, Ross JA, Fearon KC. Metabolic response to feeding in weight-losing pancreatic cancer patients and its modulation by a fish-oil-enriched nutritional supplement. Clin Sci Lond Engl 1979. 2000 Apr;98(4):389–99.
23. Bortolotti M, Tappy L, Schneiter P. Fish oil supplementation does not alter energy efficiency in healthy males. Clin Nutr Edinb Scotl. 2007 Apr;26(2):225–30.
24. Jones PJH, Jew S, AbuMweis S. The effect of dietary oleic, linoleic, and linolenic acids on fat oxidation and energy expenditure in healthy men. Metabolism. 2008 Sep;57(9):1198–203.
25. Begriche K, Lettéron P, Abbey-Toby A, Vadrot N, Robin M-A, Bado A, et al. Partial leptin deficiency favors diet-induced obesity and related metabolic disorders in mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 May;294(5):E939–51.
26. Enerbäck S, Jacobsson A, Simpson EM, Guerra C, Yamashita H, Harper ME, et al. Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. Nature. 1997 May 1;387(6628):90–4.
27. Marcelin G, Liu S-M, Li X, Schwartz GJ, Chua S. Genetic control of ATGL-mediated lipolysis modulates adipose triglyceride stores in leptin-deficient mice. J Lipid Res. 2012 May;53(5):964–72.
28. Furberg A-S, Veierød MB, Wilsgaard T, Bernstein L, Thune I. Serum high-density lipoprotein cholesterol, metabolic profile, and breast cancer risk. J Natl Cancer Inst. 2004 Aug 4;96(15):1152–60.
29. Kucharska-Newton AM, Rosamond WD, Mink PJ, Alberg AJ, Shahar E, Folsom AR. HDL-cholesterol and incidence of breast cancer in the ARIC cohort study. Ann Epidemiol. 2008 Sep;18(9):671–7.
30. Jozan S, Faye JC, Tournier JF, Tauber JP, David JF, Bayard F. Interaction of estradiol and high density lipoproteins on proliferation of the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to grow in serum free conditions. Biochem Biophys Res Commun. 1985 Nov 27;133(1):105–12.
31. Rotheneder M, Kostner GM. Effects of low- and high-density lipoproteins on the proliferation of human breast cancer cells In vitro: Differences between hormone-dependent and hormone-independent cell lines. Int J Cancer. 1989 May 15;43(5):875–9.
32. Cui R, Gao M, Qu S, Liu D. Overexpression of superoxide dismutase 3 gene blocks high-fat diet-induced obesity, fatty liver and insulin resistance. Gene Ther. 2014 Sep;21(9):840–8.
33. Chung H, Lee YS, Mayoral R, Oh DY, Siu JT, Webster NJ, et al. Omega-3 fatty acids reduce obesity-induced tumor progression independent of GPR120 in a mouse model of postmenopausal breast cancer. Oncogene. 2014 Sep 15;
34. Fujisaki K, Fujimoto H, Sangai T, Nagashima T, Sakakibara M, Shiina N, et al. Cancer-mediated adipose reversion promotes cancer cell migration via IL-6 and MCP-1. Breast Cancer Res Treat. 2015 Apr;150(2):255–63.
35. Hodges-Gallagher L, Valentine SD, El Bader S, Kushner PJ. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2008 May;109(2):241–50.
36. Acconcia F, Totta P, Ogawa S, Cardillo I, Inoue S, Leone S, et al. Survival versus apoptotic 17β-estradiol effect: Role of ERα and ERβ activated non-genomic signaling. J Cell Physiol. 2005 Apr 1;203(1):193–201.
37. Roger P, Sahla ME, Mäkelä S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2537–41.
38. Fuentes-Mattei E, Velazquez-Torres G, Phan L, Zhang F, Chou P-C, Shin J-H, et al. Effects of Obesity on Transcriptomic Changes and Cancer Hallmarks in Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer. J Natl Cancer Inst. 2014 Jul 1;106(7):dju158.
39. Ruhl CE, Everhart JE. Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures. Am J Clin Nutr. 2001 Sep;74(3):295–301.
40. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, Takahashi M, Maeda K, Miyagawa J, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. 1999. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 31;425(3):560–4.
41. Mauro L, Catalano S, Bossi G, Pellegrino M, Barone I, Morales S, et al. Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression. Cancer Res. 2007 Apr 1;67(7):3412–21.

42. Cleary MP, Ray A, Rogozina OP, Dogan S, Grossmann ME. Targeting the adiponectin:leptin ratio for postmenopausal breast cancer prevention. Front Biosci Sch Ed. 2009;1:329–57.
43. Nkhata KJ, Ray A, Schuster TF, Grossmann ME, Cleary MP. Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth. Oncol Rep. 2009 Jun;21(6):1611–9.
44. Basu S. F2-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. Antioxid Redox Signal. 2008 Aug;10(8):1405–34.
45. Basu S. Bioactive eicosanoids: role of prostaglandin F(2α) and F_2-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. Mol Cells. 2010 Nov;30(5):383–91.
46. Basu S. Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F2alpha from physiology to new principles in inflammation. Med Res Rev. 2007 Jul;27(4):435–68.
47. Basu S, Nachat-Kappes R, Caldefie-Chézet F, Vasson M-P. Eicosanoids and adipokines in breast cancer: from molecular mechanisms to clinical considerations. Antioxid Redox Signal. 2013 Jan 20;18(3):323–60.
48. Naznin F, Toshinai K, Waise TMZ, Namkoong C, Moin ASM, Sakoda H, et al. Diet-induced obesity causes peripheral and central ghrelin resistance by promoting inflammation. J Endocrinol. 2015 May 27;
49. Wei XJ, Sun B, Chen K, Lv B, Luo X, Yan JQ. Ghrelin signaling in the ventral tegmental area mediates both reward-based feeding and fasting-induced hyperphagia on high-fat diet. Neuroscience. 2015 Aug 6;300:53–62.

Publication n°4

Les effets de l'environnement enrichi sur la croissance tumorale et sur le statut oxydatif des tumeurs mammaires chez la souris C57BL/6 ovariectomisée sous régime hyperlipidique

Sinda Mahbouli, Marie-Chantal Farges, Stéphanie Rougé, Christophe Montaurier, Imen Miladi, Marie-Paule Vasson, Adrien Rossary.

En cours de rédaction

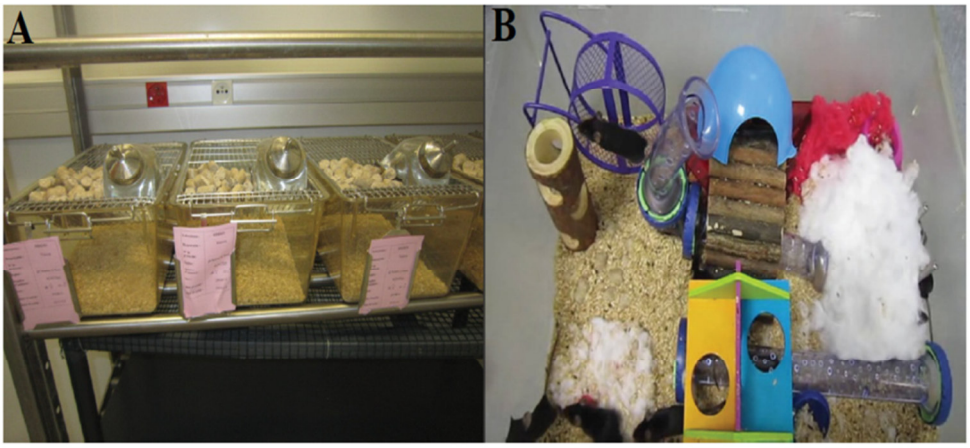


Figure 1 : Environnement standard et enrichi
(A) l'environnement standard (ES), cages classiques de laboratoire de dimension 25 × 20 × 15 cm et (B) de l'environnement enrichi (EE), cage de taille plus importante (60 × 38 × 20 cm).

Tableau 1 : Composition du régime hyperlipidique

% de l'AET (Apport Energétique Total)	Régime Hyperlipidique (RHL)
Carbohydrates	**39**
Protéines	**16**
Lipides	**45**
% Poids régime	
Fibres	**8**
Mix de vitamines et minéraux	**6**

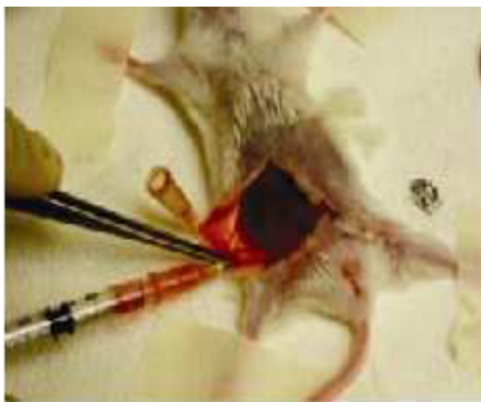


Figure 2: Injection orthotopique de la lignée cancéreuse EO771
L'injection de la lignée cancéreuse a été effectuée directement dans la quatrième paire de la glande mammaire.

Introduction

L'obésité est reconnue comme étant un facteur de risque du cancer du sein après la ménopause. Par ailleurs, l'activité physique est décrite comme un élément protecteur du risque néoplasique en réduisant l'inflammation à bas bruit (associée à l'obésité) et en favorisant l'utilisation des réserves énergétiques adipocytaires. La leptine est une adipokine majoritairement sécrétée par le tissu adipeux. Cette adipokine présente de nombreuses actions cellulaires favorisant la prolifération, la vascularisation et l'inflammation. Des taux plasmatiques élevés de leptine sont associés au développement et à la progression de nombreux cancers (prostate, endomètre, ovaire) dont le cancer du sein. Au contraire, un taux élevé d'adiponectine jouerait un rôle protecteur. Ainsi, un rapport leptine/adiponectine élevé a été rapporté comme facteur de risque de développement du cancer du sein, particulièrement chez la femme obèse et en post-ménopause. Les sécrétions adipokiniques peuvent *in vitro* moduler le statut oxydatif et inflammatoire de cellules épithéliales mammaires.

De nombreux modèles expérimentaux de tumeur mammaire ont été développés pour étudier le rôle de la leptine dans la croissance tumorale. Ces modèles sont soit des modèles d'injection de cellules tumorales, soit des modèles de tumeurs spontanées.

Des traitements pharmacologiques, des modifications du régime ou encore l'activité physique peuvent influencer les taux plasmatiques de leptine et permettent ainsi d'étudier les effets de leurs variations sur la tumorigenèse. L'environnement enrichi (EE), qui consiste à héberger des souris dans de grandes cages comportant des éléments stimulants la vie sociale et l'activité physique, a d'importantes répercussions sur la leptinémie et l'adiponectinémie. En effet, des souris hébergées en EE présentent une diminution significative de la leptinémie et une augmentation de l'adiponectinémie. Ces souris développent des mélanomes 80% moins volumineux que des souris hébergées dans un environnement standard (ES) (Cao *et al.* 2010).

Dans notre étude, l'environnement enrichi a été utilisé dans le but de caractériser *in vivo* l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur le développement tumoral, le statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs en situation de post-ménopause. Afin de pouvoir appréhender l'ensemble des phénomènes mis en jeu dans le micro-environnement tumoral cellulaire.

Pour cela, des souris femelles C57BL/6 âgées (28 semaines), reparties en 2 groupes (n=11), sont nourries pendant 12 semaines avec un régime hyperlipidique (4,30 kcal/g, L/G/P en % 45/39/16). Les deux groupes sont ovariectomisées dont l'un est placé en environnement enrichi. Après 8 semaines, les cellules tumorales mammaires syngéniques (lignée EO771) sont implantées dans la glande mammaire par la technique « fat pad ». La prise alimentaire, la prise de poids, l'activité physique et la composition corporelle des animaux ainsi que la croissance tumorale sont mesurées tout au long de l'expérimentation.

Matériels et Méthodes

Animaux

Le protocole de cette étude a été élaboré en accord avec les règles éthiques en vigueur et a été agréé par le comité d'éthique local (CEMEAA, CE17-10). Vingt-deux souris femelles de la lignée C57BL/6, âgées de 28 semaines et obtenues auprès des laboratoires Charles River (Lyon, France). Les souris ont été hébergées dans deux environnements différents **(Figure 1)**

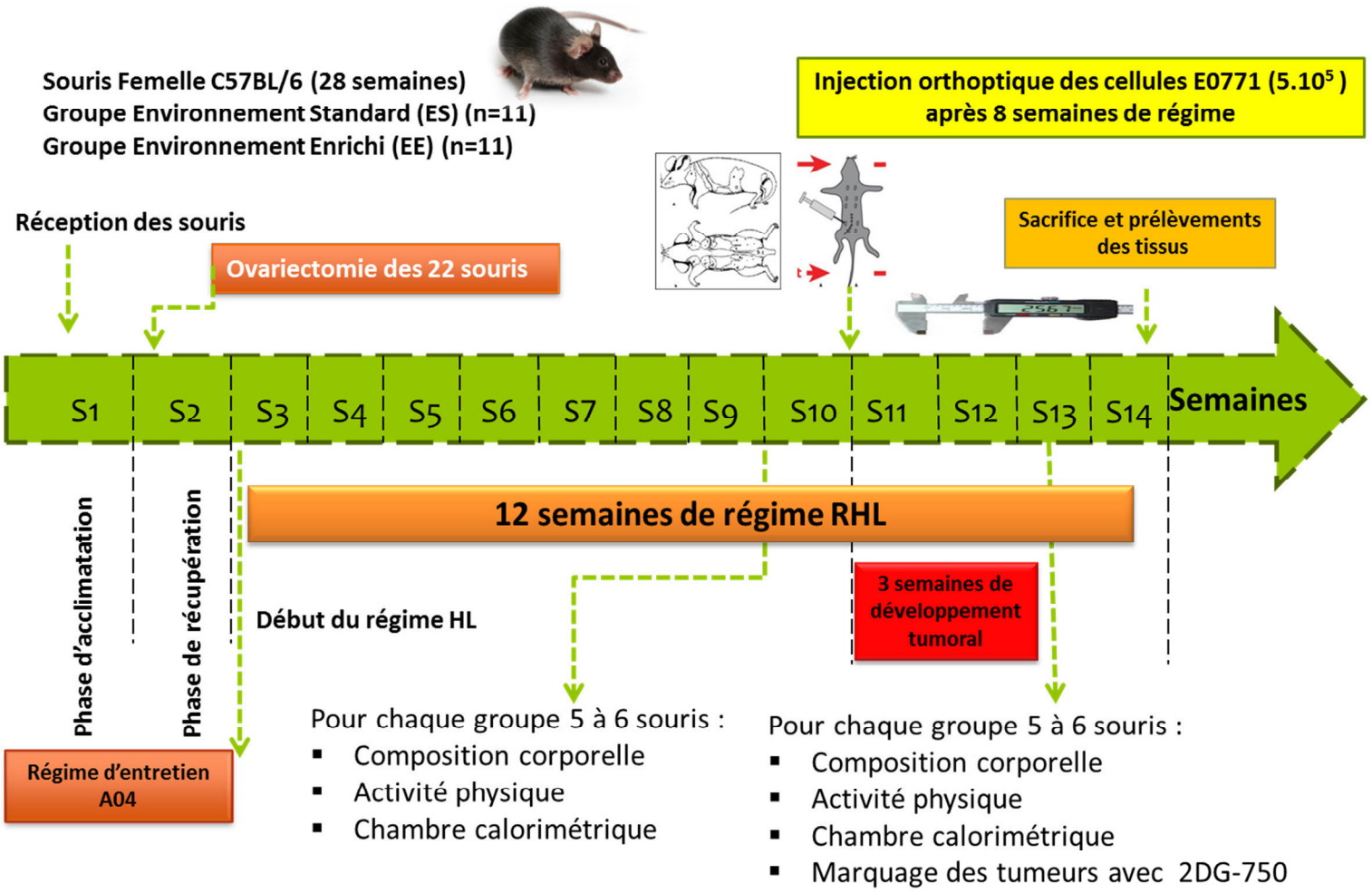


Figure 3: Schéma du protocole expérimental

pendant 12 semaines. Le premier environnement est un environnement standard (ES), qui correspond à une cage de dimension classique de laboratoire (25 X 20 X 15 cm). Dans ces cages, les souris étaient au nombre de 5. Le second environnement dit « enrichi » (EE) comporte une roue, des cachettes et des éléments permettant aux souris de grimper et de faire des nids (Sztainberg and Chen 2010). Ces éléments étaient de couleurs et de formes variables. Ils ont été déplacés une fois par semaine pour inciter les souris à explorer l'environnement. Les cages étaient de plus grande taille (60 X 38 X 20 cm) et accueillaient 5 souris.

Protocole expérimental

Des souris C57BL/6 femelle âgées de 28 semaines ont été mis en stabulation à température (22±1°C) et humidité constantes, maintenu dans un cycle inversé jour/nuit de 12h et ont eu accès à une nourriture standard et l'eau *ad libitum* pendant la semaine d'acclimatation. Les souris sont randomisées dans le groupe EE ou dans le groupe ES recevant un régime hyperlipidique (HL). A la suite de la randomisation, les souris ont été ovariectomisées avant l'initiation du régime HL. Le **tableau 1** liste la composition du régime HL. Après 8 semaines de régime, les souris ont été injectées avec 5.10^5 des cellules EO771 au niveau de la quatrième paire de la glande mammaire afin d'induire des tumeurs mammaires solide. Après 3 semaines d'implantation tumorale, les souris ont alors été sacrifiées. A la fin de la période expérimentale, les souris âgées avaient 42 semaines. L'ensemble de ce protocole expérimental est schématisé par la figure 2 **(Figure 2)**.

Un suivi du poids total des souris et de la prise alimentaire ont été relevés une fois par semaine pendant toute la durée de l'expérimentation. A la fin du protocole expérimental, les souris ont été pesées puis sacrifiées par ponction cardiaque après anesthésie avec de la kétamine/xylazine (ip, 100/10 mg/kg, Sigma-Aldrich). Les tumeurs et les organes ont été rapidement prélevés et pesés. Les échantillons ont été rapidement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation pour les analyses.

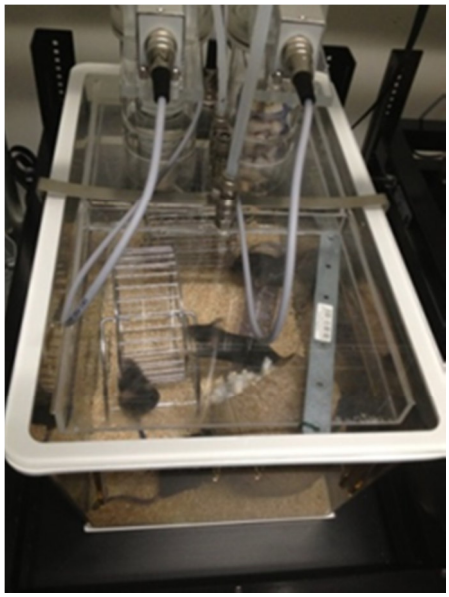
Durant l'expérimentation une étude des paramètres calorimétriques a été menée avant et après l'inoculation des cellules tumorales, pour finalité d'étudier la balance énergétique et l'activité physique des animaux. Afin de suivre la croissance tumorale et l'activité métabolique, une analyse des tumeurs par imagerie fonctionnelle a été réalisée sur deux stades post-injection des cellules EO771.

Composition corporelle

La composition corporelle des animaux a été réalisée par imagerie par résonance magnétique à l'aide d'un EchoMRI (Echo Medical Systems, Houston, TX) 7 semaines après la mise en régime et 14 jours après l'implantation des tumeurs. La masse maigre (MM) et la masse grasse (MG) sont exprimées en pourcentage de poids corporel.

Mesure des paramètres calorimétriques et de l'activité physique

L'activité physique et le métabolisme énergétique ont été mesurés avec un système de calorimétrie indirecte. Les souris ont été placées pendant 4 jours avec une phase d'acclimatation de 24h dans des cages de vie calorimétriques **(Figure 3)** avec un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture (cages TSE système LabMaster/PhenoMaster (Bad Homburg, Allemagne)) à réseaux de faisceaux lumineux infrarouges, deux fois au cours de



<u>Figure 4</u>: Cage calorimétrique TES système
Le LabMaster permet l'étude simultanée de 5 souris. Ce système assure les mesures suivantes : paramètres calorimétriques (RER, VCO_2/VO_2, température), prise de boisson, prise de nourriture, activité locomotrice verticale et horizontale (exploration, mouvements fins) et l'évolution du poids.

l'expérimentation, avant l'injection des cellules EO771 (semaine 51) et après l'injection (semaine 71). Les mouvements des animaux dans la cage ont été mesurés en utilisant un système en trois dimensions (xyz). Le logiciel TSE LabMaster enregistre en intervalle de 10 minutes les mouvements captés par la rupture des 32 faisceaux lumineux infrarouges qui couvrent chaque cage dans les plans xy et yz.

La consommation de dioxygène (VO_2) et la production de dioxyde de carbone (VCO_2) ont été mesurées. Les valeurs VO_2 et VCO_2 ont été normalisées par le logiciel au poids corporel en kilogrammes et sont rapportés en ml/h/kg *(Even and Nadkarni 2012; J.-Y. Kim et al.* 2007). Le quotient respiratoire (RQ) a été calculé suivant par le rapport VCO_2/VO_2. L'analyseur O_2 et de CO_2 ont été étalonnés avant chaque période de mesure. La température ambiante a été maintenue à 28°C pour atteindre la zone de thermo-neutralité de l'animal. La dépense énergétique (DE) a été calculée en utilisant l'équation de Weir (DE = 16,3 V02+ 4,57 VCO2) (Weir 1990) à partir des mesures des échanges gazeux calculées pour chaque cage, des mesures enregistrées toutes les 5 min.

Lignée cancéreuse EO771

La lignée cellulaire EO771 ER+ est une lignée issue d'un adénocarcinome mammaire spontanée de souris C57BL/6 (Bassukas and Maurer-Schultze 1990). Les cellules EO771 ont été maintenues en culture dans du milieu « Roswell Park Memorial Institute » (RPMI) 1640 complet (Biowest, Nuaille, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Biowest), 100 µg/mL de streptomycine (Sigma), 100 U/mL de pénicilline (Sigma), et 2 mM glutamine (Sigma). Elles ont été cultivées à 37°C en atmosphère contenant 5% de CO2 et saturée en humidité.

Avant injection, les cellules, à 80% de confluence, ont été détachées par action de la trypsine, puis filtrées pour prévenir les agrégats et mélangées avec du MatrigelTM (BD BioCoat). Elles ont été maintenues à 4°C afin d'éviter la polymérisation du MatrigelTM. Après 8 semaines passées en EE ou ES, les souris sont anesthésiées par voie intra-péritonéale avec une solution de kétamine + xylazine (1mg de chaque injecté pour 10g de poids corporel, Sigma). Puis, l'implantation de $5x10^5$ cellules cancéreuses contenues dans un volume de 100µL a été effectuée dans la quatrième glande mammaire du côté droit (injection orthotopique) **(Figure 4)**. Suite à l'injection, les souris ont été remises dans leurs environnements respectifs pour une durée de 3 semaines. La taille des tumeurs a été relevée avec un pied à coulisse à partir du sixième jour après la chirurgie, environ 3 fois par semaine et jusqu'au sacrifice des animaux. Le volume tumoral a été calculé selon la formule suivante : $V = 0.52\times \text{largeur}^2 \times \text{longueur}$ (Nachat-Kappes *et al.* 2012).

Imagerie fonctionnelle des tumeurs par fluorescence

Dans cette étude les souris ont été injectées par voie intraveineuse avec 70 µl à 10 nmol du 2-DG-750 (XenoLight RediJect, PerkinElmer Waltham, MA) après deux stades post-implantation des tumeurs. La 2-DG-750 est une sonde fluorescente pour le marquage *in vivo* des tumeurs, avec un pic d'excitation à 745 nm et un pic d'émission à 820 nm. L'imagerie des souris porteuses de tumeur a été effectuée avec un système d'acquisition composé d'une chambre noir étanche à la lumière et d'une caméra CCD refroidie à -90°C IVIS (instrument de spectre IVIS Lumina II, Caliper Life Sciences). 4 h après l'injection de la sonde, les souris

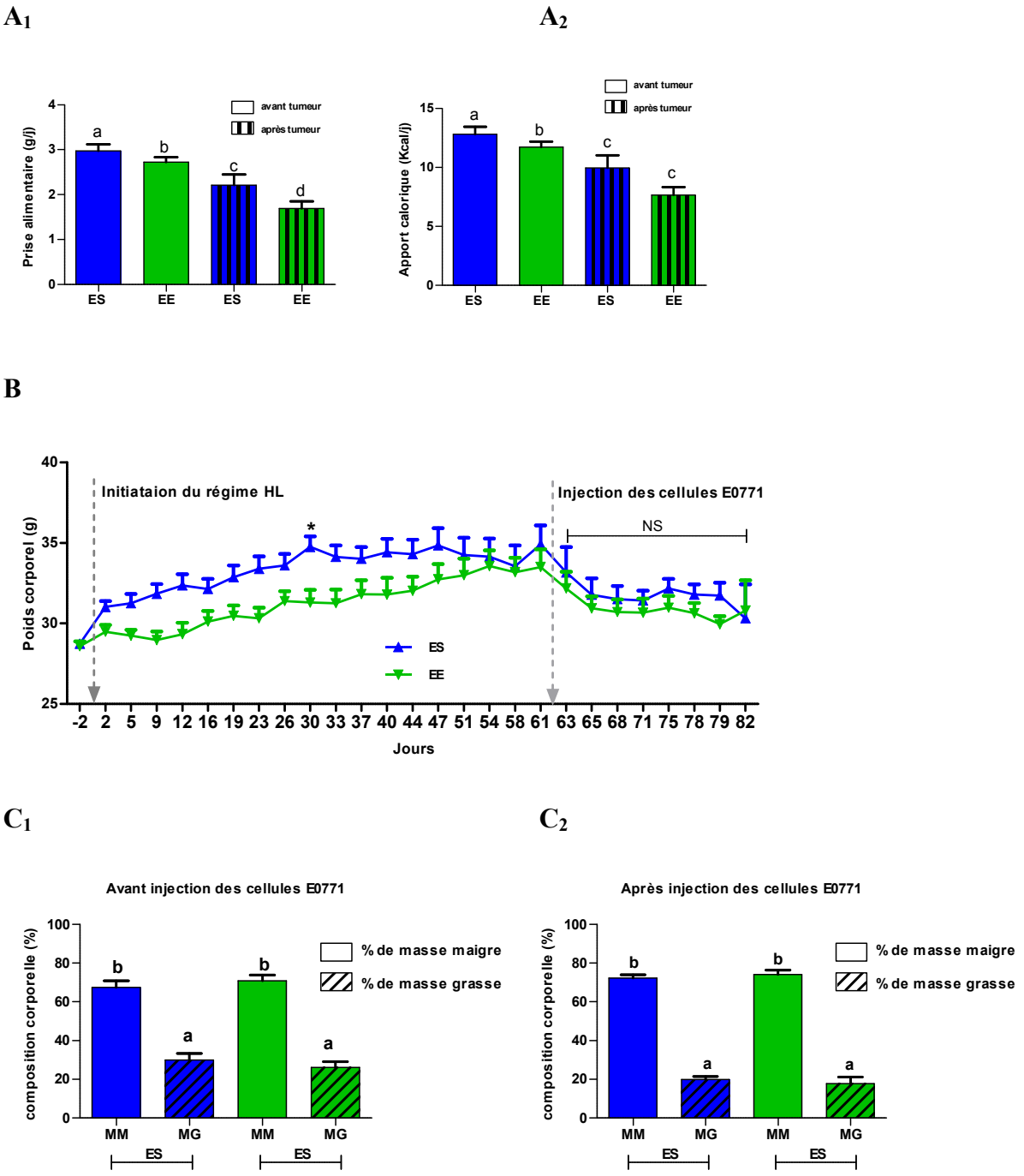


Figure 5 : La prise alimentaire et la composition corporelle des souris

Consommation alimentaire et l'apport calorique avant et après implantation des tumeurs (A), suivi du poids corporel (B). Composition corporelle des souris C57BL/6 avant l'injection des cellules EO771 à j51 (Semaine 7) (C_1) et après l'induction des tumeurs à j79 (Semaine 11) (C_2). Les données sont présentées sous la forme de moyenne +/- écart-type. La différence significative a été évaluée par un test de Mann & Whitney et un test ANOVA à 2 facteurs (environnement et tumeur), suivi par un post test Bonferroni. (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001). Les moyennes sans lettre commune sont significativement différentes (p<0,05) obtenu lors du test de Mann &Whitney entre le groupe EE et ES. NS (Non significatif) p > 0,05.

sous anesthésie gazeuse (isofulrane) ont été placées sur un lit à température contrôlée (37°C) à l'intérieur de la chambre noire. La région d'intérêt (ROI) a été établie manuellement autour de la zone de la tumeur, et la lumière émise (photons/sec) a été mesurée à l'aide d'un logiciel d'image (Caliper Life Sciences, Roissy, France). Les images obtenues ont été traitées et analysées avec le logiciel 4.2 Salon Image® (PerkinElmer).

Dosages plasmatiques

Pour l'analyse du plasma, le sang a été recueilli par ponction cardiaque dans des tubes héparinés. Les échantillons de plasma ont été séparés par centrifugation, aliquotés et stockés à -80°C jusqu'à l'analyse. Les concentrations plasmatiques d'acides gras libres (AGL), des enzymes hépatiques l'aminotransférase (ALT), la phosphatase alcaline (ALP), le cholestérol total, la glycémie, et les triglycérides totaux ont été mesurés avec un analyseur automatique (Cobas-Mira, plus, Roche Diagnostics, Meylan, France) par la plate-forme Anexplo (Genotoul, IFR BM-T, Toulouse, France).

Le dosage des adipokines (leptine, résistine) et de cytokines (MCP-1, IL-6, TNF-α, PAI-1) dans le plasma des souris a été effectué à l'aide du milliplex adipokine kit (Millipore, réf. MADPK-71K-07), selon les instructions du fabricant. La concentration sérique d'adiponectine a été évaluée avec le kit de Millipore, réf. MADPK-71 K-01. Ces adipocytokines ont été mesurés par luminex par la plate-forme Anexplo (Genotoul, IFR BM-T, Toulouse, France).

Le niveau d'œstradiol et du corticostérone dans le plasma a été déterminé en utilisant les kits suivant, œstradiol EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA) et corticosterone EIA kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA). Les plasmas de souris ont été dilués selon les instructions du fabricant. Après incubation de 60 min pour la plaque œstradiol et 120 min pour le corticostérone à température ambiante, tous les puits ont été lavés cinq fois et développées avec le réactif d'Ellman, Le substrat de l'enzyme pendant 60 à 90 min. La lecture au photomètre Multiscan FC (THERMO scientific) a été réalisée à une longueur d'onde de 450nm. La quantification dans le plasma d'isoprostane (8-isoPGF2α) a été obtenue par l'EIA kit de mesure de STAT-8-isoprostane (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). Les mesures ont été effectuées à 405 nm sur un lecteur de microplaques de spectrophotomètre.

Statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs mammaires

Préparation des broyats de tumeurs : Afin d'étudier le profil oxydatif des tumeurs, 100mg de tumeur a été broyé à l'ultra-turrax dans du tampon 100 mM Tris HCl pH 7,4 ; Mgcl2 1 mM EDTA 1 mM ; Tween 20 0,1 %.

- **Dosage du malondialdéhyde**

L'étude du statut oxydatif des tumeurs s'appuie sur le dosage des produits de dégradation secondaire des peroxydes lipidiques tel que le malondialdéhyde (MDA) qui sont plus stables. La quantification du MDA intracellulaire est obtenue par une méthode établie en 2001 par Steghens *et al.* (Steghens *et al.* 2001). La dérivation du MDA en milieu acide par le diaminonaphtalène (DAN) forme un composé diazepinium quantifiable par détection en UV. Les analyses de MDA sont effectuées sur un volume d'injection de 20 µL L'analyse HPLC est réalisée sur un système HPLC Ultimate 3000® (Dionex SA). La détection est réalisée à 310 nm. La concentration en MDA des lysats est déterminée par rapport à une gamme étalon

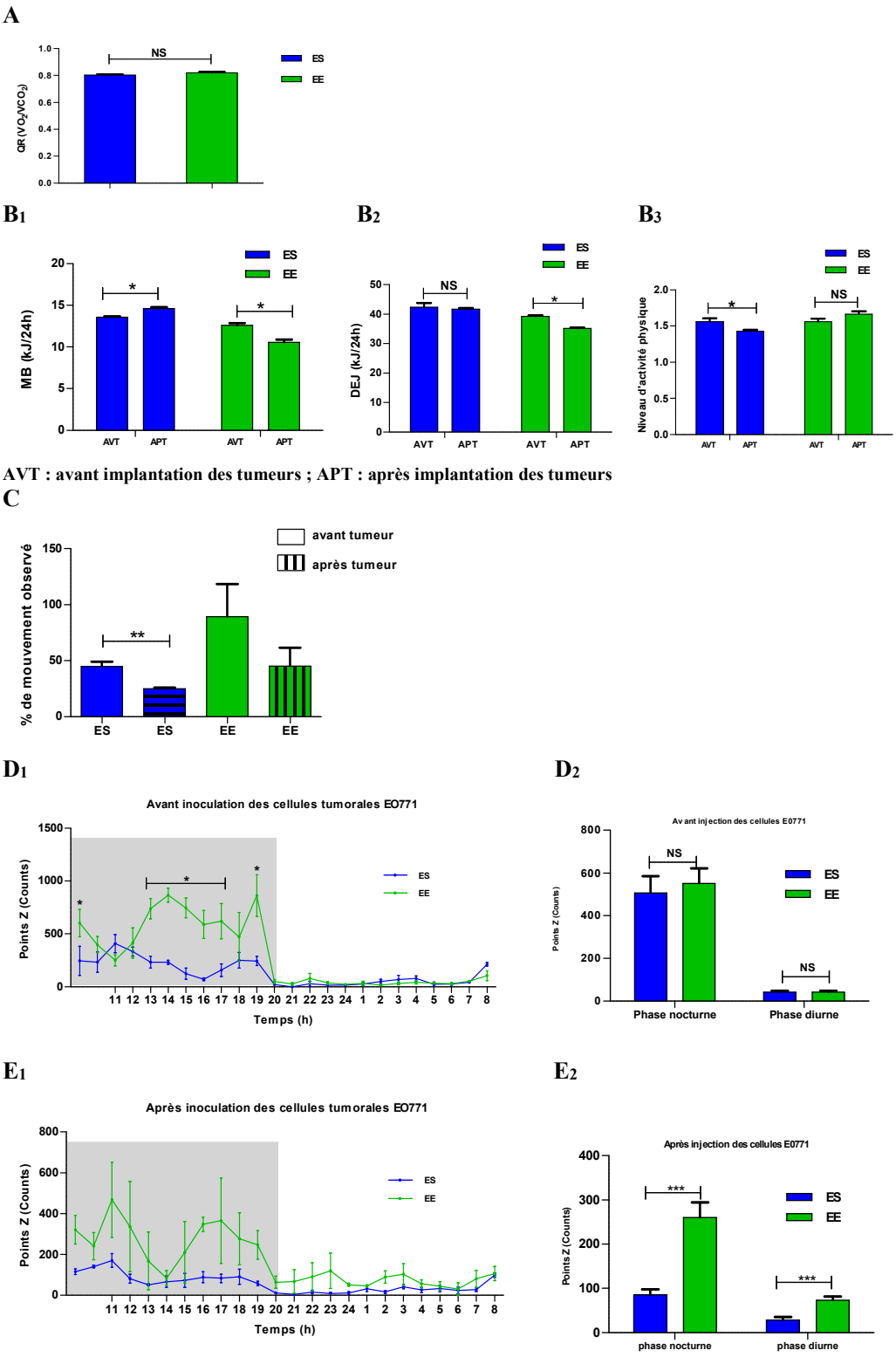


Figure 6: Paramètres calorimétrique et mesure de l'activité physique

Les paramètres de la balance énergétique et de l'activité physique ont été mesurés avant et après l'injection des cellules tumorales. Quotient respiratoire (QR) (A), métabolisme de base (MB) (B_1), dépense énergétique journalière (DEJ) (B_2) et le niveau d'activité physique (NAP) (B_3). Somme des mouvements observés dans les cages exprimés en pourcentage (C_1). Moyenne des points Z sur 24h avant (D_1) et après implantation des tumeurs (D_2). La zone ombrée représente la phase nocturne. Les données sont présentées sous la forme de moyenne +/- écart-type. La différence significative (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) a été évaluée par un test ANOVA à 2 facteurs (environnement et tumeur) suivi d'un test de Mann & Whitney. NS (Non Significatif) p > 0,05.

de 23,7 nM à 3040 nM de MDA réalisée à partir d'une solution mère de tétraméthoxypropane (TMP) à 6080 nM. Les concentrations de MDA obtenues (nmol/l) sont normalisées par rapport au taux de protéines des échantillons et rapportées en nmol/g de protéines totales.

- **Dosage des produits de peroxydation lipidique (HPLIP)**

La quantification des hydroperoxydes lipidiques (HPLIP) dans les broyats de tumeurs a été obtenue par la méthode décrite par Arab *et al*. (Arab and Steghens 2004). Les surnageant de tumeurs ont été traités par un tampon de réactif (40 mM H2SO4, l'acide formique 20 mM, 150 uM de D-gluconate de fer et 120 uM xylénol orange dans du glycerol) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). La courbe standard a été obtenue en utilisant une solution de tert-butyl-hydroperoxyde. Les mesures ont été effectuées à 570 nm sur un lecteur de microplaques de spectrophotomètre.

- **Dosage du glutathion total**

Les concentrations de glutathion total sont déterminées par une méthode établie en 2001 par Cereser *et al*. (Cereser *et al.* 2001b). La liaison de l'orthophtalaldéhyde (OPA) sur la fonction thiol d'une molécule de glutathion en milieu alcalin conduit à la formation d'un composé fluorescent détecté en UV. L'analyse HPLC est réalisée sur un système HPLC Summit (Dionex SA). La détection est réalisée en fluorescence par un détecteur fluorimétrique RF2000 (Dionex SA) après excitation à 340 nm et enregistrement des chromatogrammes à 420 nm obtenus par détection en UV. La concentration en GSH total des lysats est déterminée par rapport à une gamme étalon de 0,125 mM à 2 mM de GSH total.

- **Détermination des activités enzymatiques**

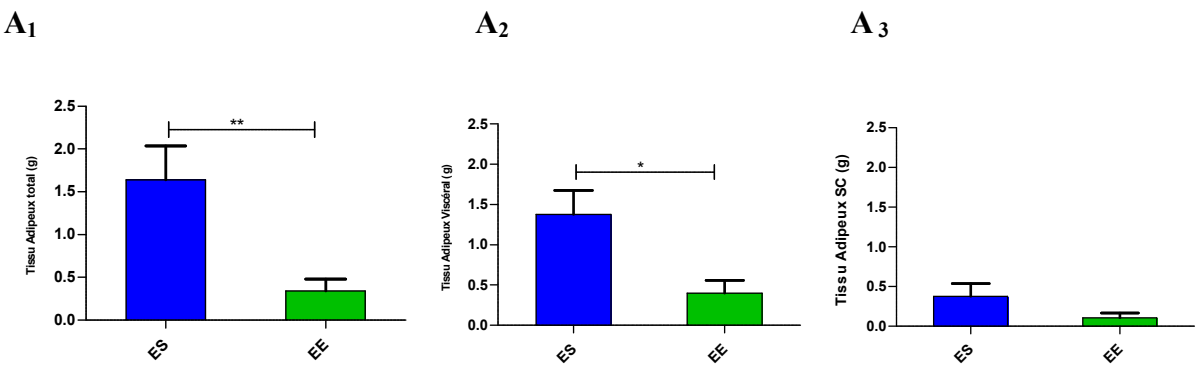
Les surnageants de broyat des tumeurs sont dilués au demi dans une solution de tampon Tris (0,9 %) avant d'effectuer, en double, les mesures des activités enzymatiques. Les mesures de densité optique (DO) ont été effectuées sur un lecteur de microplaques (Multiskan FC, Thermo Scientific).

  - **Activité enzymatique des glutathion S-transférases**

L'activité glutathion S-transférase (GST) est quantifiée en suivant la réaction de conjugaison du glutathion réduit (GSH) avec un substrat artificiel le 1-chloro 2,4 dinitrobenzène (CDNB). Cette réaction entraîne la formation d'un conjugué qui absorbe la lumière à 340 nm. La variation de DO mesurée est directement proportionnelle à la quantité de conjugué formé, elle-même liée à l'intensité de l'activité GST. L'analyse est réalisée à 37°C en bichromatisme à 340 nm et 630 nm, au cours d'une cinétique de 5 minutes. Une prise d'essai de 20 µl est mélangée à 160 µl du réactif R'1 (HEPES 50 mM, GSH 5 mM, pH 7,5). L'analyse est déclenchée par l'ajout de 20 µl de réactif R'2 (CDNB 1 mM). Un blanc réactif est réalisé et soustrait systématiquement. Le facteur de la réaction enzymatique est de 1042.

  - **Activité hème-oxygénase**

L'activité de l'hème-oxygénase est mesurée en suivant la dégradation de l'hème en biliverdine selon une méthode dérivée de celle décrite par Shih *et al*. (Shih and Yang 2010b). L'analyse est réalisée à 37°C en bichromatisme à 405 nm et 630 nm, au cours d'une cinétique de 5 minutes. La prise d'essai est de 20 µl mélangée à 150 µl de réactif R1 (Tris HCl 100 mM,



<u>Figure 7</u>: Répartition du tissu adipeux dans les deux groupes de souris

Tissu adipeux total (A_1), tissus adipeux viscéral (A_2), tissu adipeux sous-cutané (SC) (A_3). Les données sont présentées sous la forme de moyenne +/- écart-type. La différence significative (*p<0,05, **p<0,01) a été évaluée par un test de Mann & Whitney. NS (Non Significatif) p > 0,05.

EDTA 2mM, MgCl2 2mM, tween 20 0,5%, pH 7,4). L'analyse est déclenchée par l'ajout de 20 µl de réactif R'2 (NADPH 2mM, Hème (Fe II) 10 µM). Un blanc réactif est réalisé et soustrait systématiquement. Le facteur de la réaction enzymatique est de - 172. Les activités enzymatiques (UI/L) sont rapportées au taux de protéines des échantillons.

- **Activité enzymatique de COX-1 et COX-2**

Cyclooxygénase-1 (COX-1) et COX-2 ont été mesurées par un kit de mesure de l'activité COX de Cayman (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA). Les surnageant des broyats de tumeurs, ont été incubés selon les instructions du fabricant. Une mesure cinétique a été effectuée à 590 nm avec une incubation à 37°C, dans un lecteur de microplaques de spectrophotomètre. L'activité de COX-1 et COX-2, normalisée à la teneur en protéines des broyats de tumeurs.

Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été réalisé à partir des échantillons de tumeur et du plasma conservés à -80°C. Le broyage des tumeurs a été effectué à l'ultra-turrax dans du tampon *Radio-Immunoprecipitation Assay* (RIPA, Sigma réf. R0278) à 4°C, contenant des cocktails d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases, chacun dilué au 1/100 (Sigma, réf. P8340 et P5726 respectivement). Les extraits ont ensuite été centrifugés à 4°C pendant 15 minutes et à 15000g. Les surnageants ont été récupérés pour la quantification protéique.

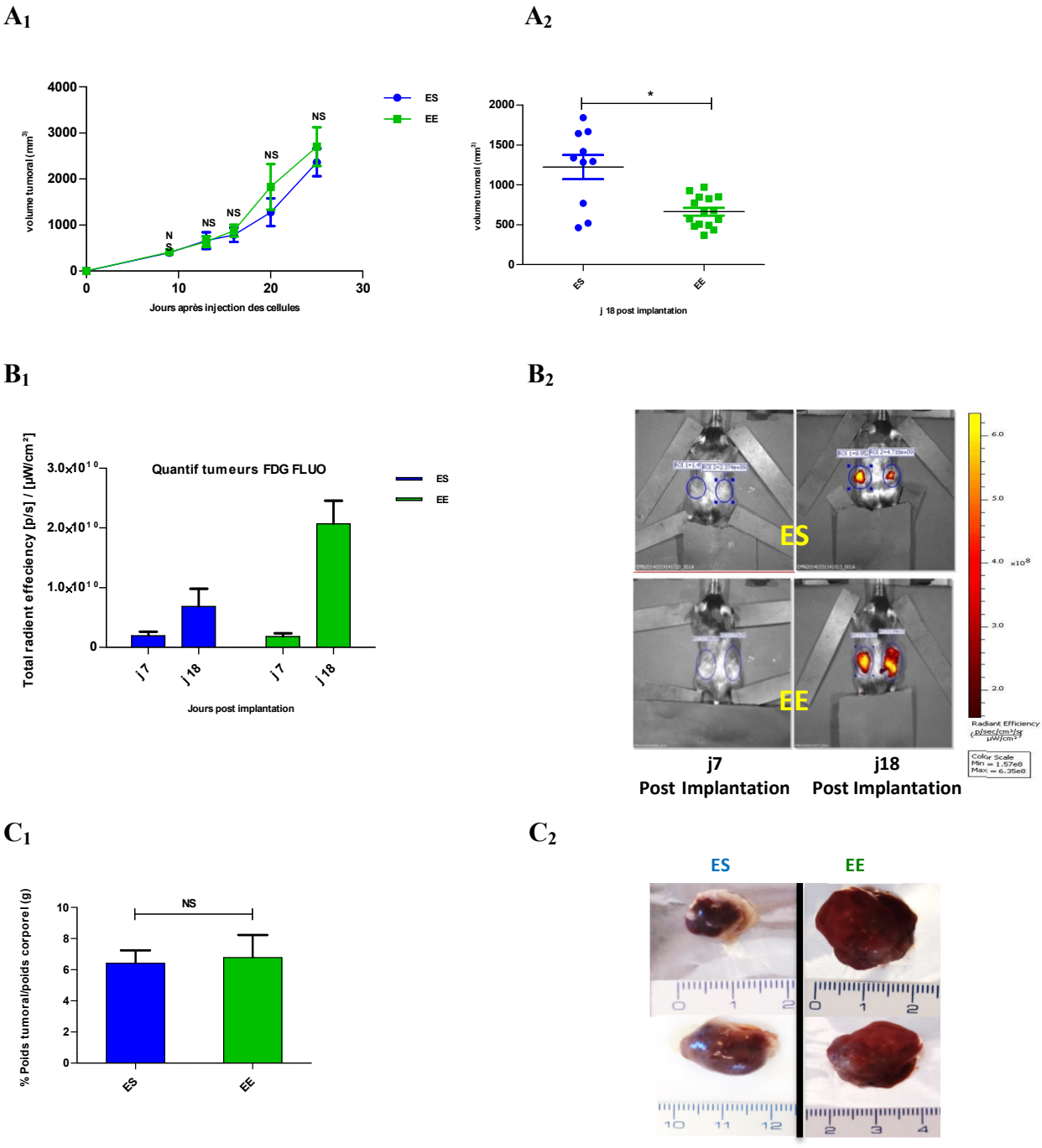
Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés par la moyenne ± écart-type. Une ANOVA à 2 voies a été utilisée pour étudier l'effet de l'environnement et de la tumeur et pour la comparaison de l'ensemble des groupes. Un test de Mann Whitney a été réalisé lorsque deux groupes étaient comparés. Pour chaque résultat, le test statistique effectué est indiqué dans la légende des figures. L'analyse statistique a été effectuée à l'aide du logiciel Prism Graph Pad (version 5.0). Les valeurs de $p< 0,05$ ont été considérées comme significatives.

Résultats

Paramètres corporelles et prise alimentaire

La consommation de régime était supérieure chez les souris hébergées dans l'ES comparée aux souris de l'EE. La prise alimentaire et l'apport calorique étaient différents entre les deux groupes tout au long du protocole (**Figure 5-A_1, A_2**). Le poids corporel moyen de l'ensemble des souris était similaire sauf pour j 30, l'EE a une tendance de limiter la prise de poids **(Figure 5-B)**. En revanche la composition corporelle n'était pas différente entre les 2 groupes **(Figure 5-C1, C2)** le pourcentage de masse grasse et masse maigre était assez similaire **(Figure 5-C1, C2)** pour les souris de l'ES et l'EE. Suite à l'inoculation des cellules tumorales, nous avons constaté une baisse de la prise alimentaire associée à une diminution de l'apport calorique et une modification de la composition corporelle au sein des deux groupes. Après l'injection des cellules EO771, les souris de l'ES et EE perdent de la masse grasse sans perte de la masse maigre **(Figure 5-A_1, A_2, B, C_1, C_2)**.



<u>Figure 8</u>: Volume et poids des tumeurs.
Evolution du volume des tumeurs chez les souris ES et EE durant les 3 semaines suivant l'injection des EO771 (A_1). Volume des tumeurs à j 18 post injection (A_2). Quantification de la fluorescence de tumeurs marquées au 2 DG-fluo (B_1). Imagerie des souris ES et EE (dans la chambre noir après 4h d'injection de la sonde fluo) (B_2). Poids des tumeurs lors du sacrifice des souris, 3 semaines après l'injection, rapportée au poids total de l'animal (C_1). Illustration de l'apparence des tumeurs après sacrifice chez les souris de l'environnement standard et enrichi (C_2). Les données sont présentées sous la forme de moyenne +/- écart-type. La différence significative (*p<0,05) a été évaluée par un test de Mann & Whitney et par un test ANOVA à 2 facteurs (environnement et tumeur). NS (Non Significatif) p > 0,05.

Effets de l'EE et de la tumeur sur la balance énergétique et l'activité physique

Les souris ont été placées par un groupe de 5 dans les cages calorimétriques avant (j51 depuis l'initiation du régime HL) et après implantation des tumeurs (j71) pour une période de quatre jours avec une phase d'acclimatation de 24h. Le $QR=VO_2/VCO_2$ permet d'estimer la part relative d'utilisation des substrats énergétiques. Les souris hébergées dans les cages de l'ES et l'EE ont un quotient respiratoire au repos de l'ordre de 0,8 prédictif d'un métabolisme plutôt lipidique **(Figure 6-A)**. Ceci est cohérent avec le type de régime hyperlipidique. Par la suite nous avons déterminé le métabolisme de base (MB) des animaux qui correspond à la dépense énergétique minimale (DE min) de la période de repos **(Figure 6-B_1)**. Les souris de l'EE présentent un MB plus bas que les souris dans l'environnement standard **(Figure 6-B_2)** avec une dépense énergétique journalière (DEJ) similaire (DE de l'ES = 42,34±2,94 KJ/24h ; DE de l'EE = 39,25±0,77 KJ/24h), les valeurs obtenues sont moyennées sur 24h et par souris. A partir du MB et de la DE min, nous avons déduit le niveau d'activité physique (NAP) (**Figure 6-B_3)** on se basant sur la formule suivante, DER = MB X NAP. Après l'inoculation des cellules tumorales dans la glande mammaire, les souris ES augmentent leur MB, alors que les souris dans l'EE diminuent leur MB avec une diminution de leur DEJ **(Figure 6-B_1, B_2)**. Nous avons déterminé l'activité physique totale des animaux par la mesure des déplacements horizontaux et des mouvements verticaux des souris dans les cages calorimétriques **(Figure 6-C_1, C_2)**. Nous avons constaté qu'après l'induction des tumeurs, les souris de l'environnement standard perdent plus de motricité que les souris de l'environnement enrichi par rapport à leur activité physique de base **(Figure 6-C_1, C_2)**. La perte d'activité physique totale est de 45 % pour l'ES et de 40 % pour l'EE. Cette perte touche essentiellement la phase nocturne **(Figure 6-D_1, D_2)**. Le groupe de souris de l'EE maintient le déplacement vertical (points Z) dans les cages de l'environnement enrichi alors que pour le groupe de l'environnement standard, nous avons observé une chute de mouvement 84 % **(Figure 6-F_1, F_2)**.

Effet de l'environnement enrichi sur la répartition corporelle du tissu adipeux

Au sacrifice, nous avons récupéré le tissu adipeux blanc des animaux, nous avons constaté que les souris dans l'ES avaient plus de gras que les souris de l'EE **(Figure 7-A_1)**, ce gras est essentiellement viscéral **(Figure 7-A_2)**. Pour le tissu adipeux sous cutané (SC), nous n'avons pas observé une différence de poids significative **(Figure 7-A_2)**.

Effet de l'environnement sur le développement de la tumeur

Le volume des tumeurs a été palpable à partir du 6ème jour après l'injection et puis relevé jusqu'au sacrifice final **(Figure 8-A_1)**. Il est significativement diminué (50%) chez les souris hébergées en EE par rapport aux souris de l'ES qu'à j18 post-injection des cellules EO771, puis devient non significatif du fait d'une variabilité interindividuelle importante. Le volume tumoral a été suivi également par imagerie fonctionnelle, en injectant une sonde fluorescente 2DG-750 par voie intraveineuse, pour les marquages des tumeurs *in vivo*. Une souris par groupe a été suivie après deux stades post-injection (j7 et j18) **(Figure 8-B_1, B_2)**. Il semble que les tumeurs des souris EE sont métaboliquement plus actives que les tumeurs des souris ES. Ceci traduit par une intensité de fluorescence plus importante des tumeurs EE **(Figure 8-B_1, B_2)**. L'imagerie fonctionnelle par fluorescence est une modalité d'imagerie qui pourrait présenter un intérêt notamment dans le cas des modèles animaux non bioluminescents afin de détecter les foyers tumoraux en utilisant le désoxyglucose marqué au

Tableau 2: Concentrations plasmatiques d'adipokines et de cytokines des souris EE et ES

	ES	EE	
Adiponectine (µg/ml)	8,4 ± 3,6	7,2 ± 3,6	P= 0,226
Leptine (ng/ml)	4,8 ± 6,2	1,9 ± 1,4	P= 0,450
Ratio Adiponectine/Leptine	45,4 ± 86,6	15,4 ± 25,3	P= 0,500
Resistine (ng/ml)	3,3 ± 3,57	4,7 ± 4,5	P= 0,331
TNF-α (pg/ml)	23,9 ± 12,6	23,6 ± 7,1	P= 0,465
IL-6 (pg/ml)	44,8 ± 85,8	11,7 ± 9,8	P= 0,365
MCP-1 (pg/ml)	658,4 ± 753,6	606,7 ± 462,4	P= 0,355
PAI-1 (ng/ml)	3781 ± 596	3499 ± 887	P= 0,242

Après injection des cellules cancéreuses EO771 (ES, EE), les souris ont été remises dans leurs environnements respectifs pendant 3 semaines, avant le sacrifice et le prélèvement du sang. Le dosage des adipokines a été effectué grâce à la technologie Luminex®. Pour chaque adipokine et cytokine, les données sont présentées sous la forme de moyenne ± écart-type. La différence significative (*p<0,05) entre les groupes a été déterminée a été évaluée par un test de Mann & Whitney. MCP-1 : Monocyte chimoattractant protein 1, PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor 1, TNF-α : Tumor necrosis factor alpha, IL-6 : Interleukine 6.

Tableau 3: Concentrations plasmatiques des paramètres métabolique des souris EE et ES

	ES	EE	
Triglycérides (mmol/L)	1,5 ± 1,2	2,1 ± 1,4	P= 0,227
Acides gras libre (mmol/L)	0,6 ± 0,0	0,5 ± 0,1	P= 0,221
Cholestérol (mmol/L)	2,1 ± 0,3	2,1 ± 0,3	P= 0,374
Glycémie (mmol/l)	13,0 ± 4,6	8,1 ± 3,3	P= 0,068
ALP (U/L)	19,1 ± 5,5	16,9 ± 9,5	P= 0,120
ALT (U/L)	12,6 ± 4,5	7,8 ± 3,1	P= 0,049*
Insulin (ng/ml)	231,8 ± 37,58	308 ± 40,1	P= 0,117
Oestradiol (pg/ml)	42,9 ± 11,8	50,3 ± 9,6	P= 0,210
Corticostérone (ng/ml)	137,1 ± 67,4	143,7 ± 86,9	P= 0,500
8-iso $PGF_2\alpha$ (pg/ml)	551,5 ± 112,2	569,1 ± 123,9	P= 0,465

ALP ALT ELISA : Enzyme-linked immunosorbant assay.

fluor 18 (^{18}F-FDG) (18F-fluorodésoxyglucose). Ce traceur est un analogue du 2-désoxyglucose qui, transporté à l'intérieur de la cellule par diffusion facilitée comme le glucose, est ensuite phosphorylé en 6 par l'hexokinase en fluoro-2-DG-6-phosphate. Celui-ci, n'étant ni métabolisé ni déphosphorylé, est bloqué dans la cellule et s'y accumule, permettant ainsi la visualisation du tissu tumoral par imagerie fonctionnelle (Gallagher *et al.* 1978). Ceci permet un suivi des maladies néoplasiques, de par le métabolisme glucidique des tumeurs qui est généralement plus important que celui des tissus sains (Maublant *et al.* 1999). Dans le cancer du sein, cette technique pourrait se révéler avantageuse dans la détection des métastases à distance. L'essor actuel en cancérologie de l'utilisation *in vivo*, du FDG en imagerie fonctionnelle marqué au fluor-18 réactualise la notion, établie depuis les travaux de Warburg (X. D. Xu *et al.* 2015) d'une hyperconsommation de glucose comme l'une des principales caractéristiques métaboliques des cellules cancéreuses. Cette caractéristique quasi constante suggère que les modifications du métabolisme glucidique, même sans être indispensables, reflètent des altérations sous-jacentes de la régulation cellulaire essentielles dans le processus de transformation.

Suite au sacrifice des animaux, le poids des tumeurs a également été mesuré, nous avons rapporté le poids de la tumeur par rapport au poids corporel exprimé en pourcentage (**Figure 8-C_1, C_2)**. Les tumeurs des souris ES et EE ne présentent pas un poids significativement différent. Les tumeurs obtenues, formées par les cellules EO771 se sont révélées très hémorragiques.

Effet de l'environnement sur les concentrations plasmatiques d'adipokines et de cytokines

Les dosages plasmatiques ont été réalisés sur les plasmas collectés lors du sacrifice. Les souris été alors âgées de 40 semaines, soit 21 jours après l'injection des cellules tumorales EO771, et un total de 12 semaines d'hébergement en ES ou EE.

Adiponectine : l'adiponectinémie à l'aide de la technologie Luminex **(Tableau 2)**. Les souris EE et ES ne présentent aucune différence significative de concentrations plasmatiques d'adiponectine.

Leptine : la concentration plasmatique de leptine a été dosée à l'aide de la technologie Luminex **(Tableau 2)**. Aucune différence significative n'est observée entre les souris ES et EE, même si il y a une tendance à la diminution de la leptinémie chez les souris EE.

Résistine : les souris ES et EE ne présentent aucune différence significative de concentration plasmatique de résistine **(Tableau 2)**. Elle n'est pas significativement plus élevée chez les souris ES que chez les souris EE.

Cytokines : des cytokines pro-inflammatoires ont pu être dosées simultanément à la leptine **(Tableau 2)**. Quelle que soit la cytokine, aucune différence significative n'est observée entre les souris ES et EE. Les souris EE présentent une tendance à la diminution de IL-6 en comparaison des souris ES.

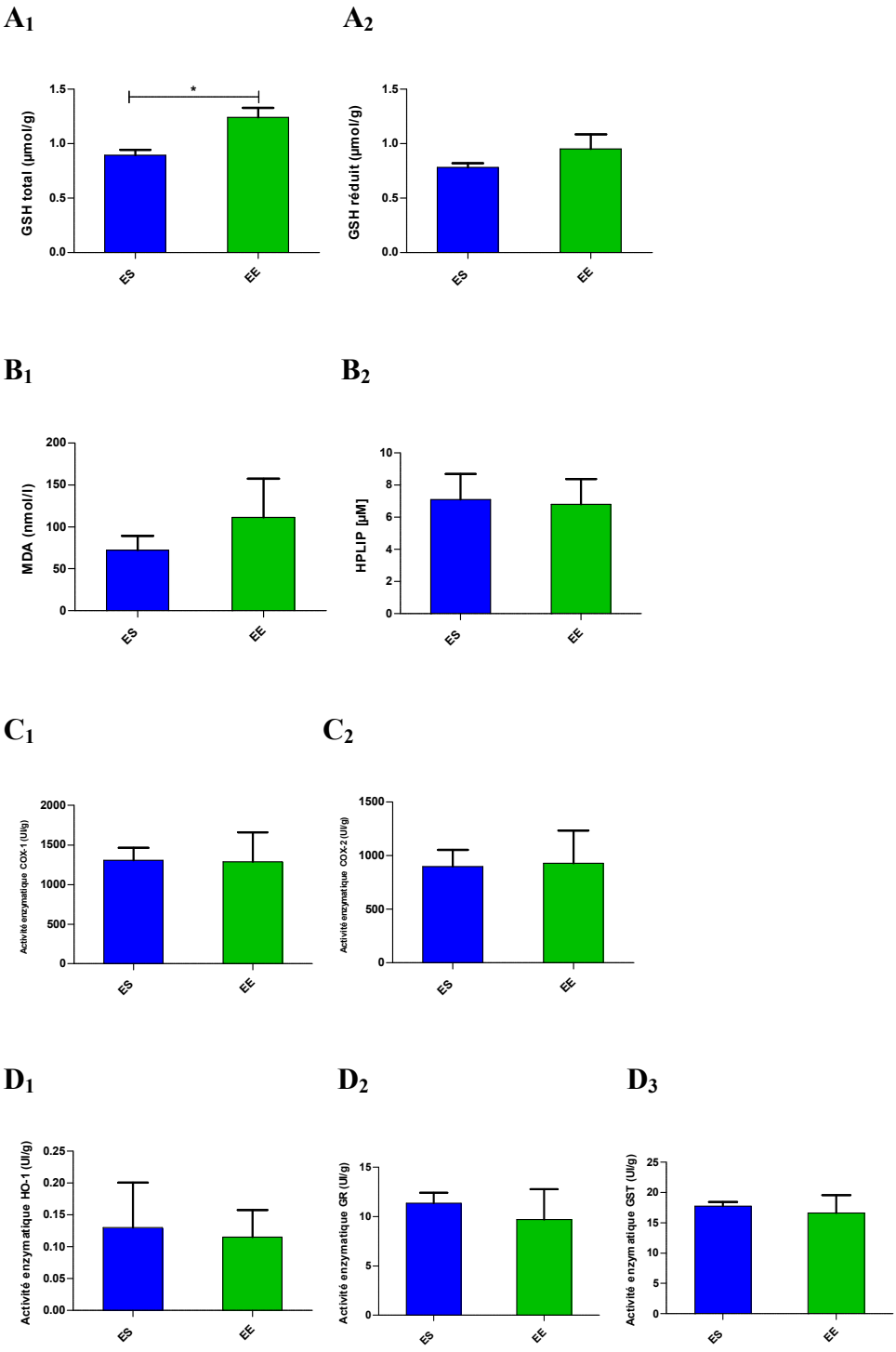


Figure 9: Statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs des souris ES et EE. Les dosages réalisé dans le surnageant des broyats de tumeurs.

Taux de glutathion total (A_1). Glutathion réduit (A_2). Taux de MDA (B_1). Taux des HPLIP (B_2). Activité catalytique de l'enzyme COX-1 (C_1), activité catalytique de l'enzyme COX-2 (C_2). Activité des enzymes anti-oxydantes HO-1, GR, et GST (D_1, D_2, D_3). Les données sont présentées sous la forme de moyenne +/- écart-type. La différence significative (*$p<0,05$) a été évaluée par un test de Mann & Whitney. NS (Non Significatif) $p > 0,05$.

Effet de l'environnement sur les concentrations plasmatiques des paramètres métaboliques

Les dosages plasmatiques ont été réalisés sur les plasmas collectés lors du sacrifice. Etant donné que les souris des deux groupes sont nourries avec un régime hyperlipidique, nous avons voulu déterminé le statut métabolique circulant et voir si l'environnement enrichi a des répercussions sur le profil général **(Tableau 3)** en modifiant les taux plasmatiques des acides gras libres, des triglycérides du cholestérol et de la glycémie et des enzymes hépatiques l'alanine aminotransférase (ALT) et la phosphatase alcaline (ALP).

Nous avons mesuré à l'aide d'un kit ELISA (Enzyme-linked immunosorbant assay) la concentration circulante d'œstradiol chez les deux groupes de souris ovariectomisées et de l'hormone corticostérone qui est un indicateur du stress lié au comportement anxieux ou à l'activité physique. Enfin nous avons déterminé le taux plasmatique de la molécule pro-inflammatoire d'isoprostane le 8-iso$PGF_2\alpha$. Aucune différence significative de concentrations plasmatiques pour ces paramètres significative n'est observée entre les souris ES et EE. Cependant, une diminution significative de de l'enzyme hépatique ALT est observée chez les souris EE.

Effet de l'environnement sur le statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs mammaires

Statut oxydatif. Le statut oxydatif des tumeurs a été caractérisé par le dosage du contenu du glutathion total et réduit **(Figure 9-A_1, A_2)** et par le suivi de l'activité catalytique des enzymes anti-oxydantes suivantes : l'hème-oxygénase (HO-1), la glutathion réductase (GR), la glutathion transférase (GST) **(Figure 9-B_1, B_2, B_3).** Les souris ES et EE ne présentent aucune différence significative pour l'activité des enzymes anti-oxydantes. Néanmoins les souris EE ont un taux de GSH total significativement plus élevé que les souris ES **(Figure 9-A_1)**.

Statut inflammatoire. Le statut inflammatoire des tumeurs a été étudié d'une part, par la quantification des produits de peroxydation lipidique tels que le malondialdéhyde (MDA) et les hyroperoxydes lipidiques(HPLIP) **(Figure 9-B_1, B_2)**. Et d'autre part, par le dosage de l'activité enzymatique de la cyclooxygénase (COX) étant induite par l'inflammation, elle constitue un excellent marqueur de l'état inflammatoire, nous avons mesuré l'activité de Cox-1 et Cox-2 **(Figure 9-C_1, C_2)**. Aucune différence significative entre les deux groupes.

Partie V :

Discussion, conclusion et perspectives

Discussion

Discussion

Plusieurs études ont évalué les effets de la leptine dans le cancer du sein (Barone *et al.* 2012b; Dubois, Jardé, Laetitia, *et al.* 2014; Nalabolu, Palasamudram, and Jamil 2014), mais peu ont mis l'accent sur l'état d'oxydation des cellules. Ainsi, l'objectif global de ma thèse était d'étudier l'impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales et du tissu mammaire. Dans un premier temps, nous avons évalué *in vitro* l'impact de la leptine dans la réponse pro/anti-oxydante et inflammatoire de cellules épithéliales mammaires. Dans un second temps, nous avons complété ces résultats par un modèle *in vivo* de développement tumoral chez la souris C57BL/6 associé à une intervention nutritionnelle (régime obésogène) en situation d'environnement enrichi.

Implication de la leptine dans la modulation du statut oxydatif et de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales mammaires : études in vitro

❖ Caractérisation en situation basale des cellules épithéliales mammaires

Nous avons sélectionné des lignées cellulaires humaines tumorales, qui se différencient notamment par leur capacité à exprimer les récepteurs aux œstrogènes (MCF-7) ou non (MDA-MB-231) et des cellules primaires non cancéreuses (HMEC). Conformément aux données de la littérature et des travaux antérieurs de l'équipe (Thierry Jardé et al. 2008a; Ray, Nkhata, and Cleary 2007), nous avons mis en évidence, l'expression d'Ob-R dans les cellules cancéreuses MCF-7 et MDA-MB-231. De plus, nous avons établi pour la première fois l'expression d'Ob-R dans les cellules saines HMEC. Ces résultats laissent envisager que les cellules épithéliales mammaires peuvent être sensibles à l'action de la leptine.

Avant de caractériser l'effet de la leptine sur le statut oxydatif et inflammatoire des cellules. Nous avons mis en évidence que les cellules MDA-MB-231 ont le niveau de production d'EROs le plus bas. Les MCF-7 possèdent un niveau d'EROs basale intermédiaire. Cependant les HMEC possèdent un niveau de production d'EROs légèrement supérieur à celui des lignées tumorales.

La réponse anti-oxydante a été caractérisée par la détermination des enzymes impliquées dans le métabolisme du glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), réduit le glutathion oxydé (GSSG) en glutathion réduit (GSH). L'enzyme gamma-glutamylcystéine (γ GCL) catalyse la première étape limitante de la synthèse du glutathion. La glutathion peroxydase (GPx1) catalyse la réduction des peroxydes lipidiques résultant de l'effet du stress oxydant sur les acides gras polyinsaturés et protège ainsi les membranes lipidiques contre les dommages oxydatifs (Afanas'ev 2007; Loschen *et al.* 1974). Les enzymes glutathion S-transférases (GST) constituent une importante ligne de défense. Elles sont impliquées dans la détoxification cellulaire en catalysant la conjugaison du GSH à des différents substrats lipophiles augmentant ainsi leur solubilité et leur élimination de la cellule (Matés, Pérez-Gómez, and Núñez de Castro 1999). Enfin, l'hème-oxygénase-1 (HO-1), un régulateur clé de l'homéostasie redox cellulaire (Was, Dulak, and Jozkowicz 2010b), est fortement induite pour la protection des cellules ou des tissus en réponse à diverses situations de stress cellulaire (Abraham and Kappas 2008; Balla *et al.* 1993; W.-Y. Lee *et al.* 2014).

L'existence d'un stress oxydant est objectivée par la détermination des produits de peroxydation lipidique dans les milieux de culture tels que les hydroperoxydes lipidiques (HPLIP) et le 8-isoPGF2α. En parallèle, nous avons déterminé l'expression génique et l'activité catalytique de la COX-2, enzyme clé dans la réponse inflammatoire (Kargi *et al.* 2013).

L'étude de la capacité anti-oxydante des trois modèles cellulaires nous a permis de constater que la défense anti-oxydante dépend de la lignée étudiée. En effet les cellules HMEC saines possèdent un taux basal de GSH et de thiols protéiques supérieur à celui des cellules tumorales. De plus le niveau basal des activités enzymatiques anti-oxydantes telles que la GST et la GPx1 est plus élevé chez les HMEC que chez les MCF-7 et MDA-MB-231. En parallèle, les cellules HMEC ont le niveau de production d'isoprostanes le plus bas et les cellules tumorales MCF-7, un niveau intermédiaire. Les MDA-MB-231 possèdent un niveau de production d'isoprostanes et d'expression de l'enzyme COX-2 le plus élevé favorisant l'inflammation et l'invasion cellulaire en lien avec le caractère invasif de cette lignée (Allison *et al.* 2015).

- **Impact de la leptine sur la réponse pro-oxydante**

Le lien entre la signalisation de la leptine et la production des ERO a été rapporté dans plusieurs tissus tels que l'endothélium (Bouloumie *et al.* 1999) et le tissu ovarien *(*Bilbao *et al.* 2015). Cette production d'ERO est une des voies de signalisation activée par Ob-R en présence de la leptine (Bourgeais, Gouilleux-Gruart, and Gouilleux 2013). Les effets de la leptine dans la cancérogenèse ont été évalués dans plusieurs études (Barone *et al.* 2012 ; Dubois, Jardé, Laetitia, *et al.* 2014; Nalabolu, Palasamudram, and Jamil 2014), mais peu d'entre elles se sont concentrées sur un effet direct dans la production des ERO intracellulaires (M. del M. Blanquer-Rosselló *et al.* 2015) notamment dans les cellules épithéliales mammaires saines et pathologiques. Les cellules ont été traitées avec deux doses différentes de leptine représentant les taux sanguins en situation normo-pondérale (10 ng/ml) et en situation d'obésité (100 ng/ml).

Dans nos modèles, quelle que soit la lignée cellulaire, la leptine induit une production d'EROs indépendante de la dose de leptine employée. Ceci peut être expliqué soit par une saturation du signal au niveau du récepteur Ob-R soit par le mécanisme d'internalisation du récepteur Ob-R après stimulation (Frühbeck 2006). Les cellules HMEC et MCF-7 présentent un profil similaire alors que les MDA-MB-231, montrent une plus grande production d'ERO totales en présence de leptine. Cette augmentation des ERO est liée à l'augmentation de production d'anions superoxydes cytosolique et non à celle des espèces réactives azotées ou des anions superoxydes mitochondriaux qui ne sont pas modifiés.

La famille des NADPH-oxydases (NOX) est l'un des plus puissants générateurs d'ERO dans la cellule (J.-M. Li and Shah 2003b) et principalement d'anion superoxyde cytosolique. Ces enzymes sont clairement impliquées dans de nombreuses situations pathologiques (Cave et al. 2006) en particulier dans la cancérogenèse (Antony *et al.* 2013). Jusqu'à présent, il y a peu de données concernant la famille des NOX et la production d'ERO dans les cellules épithéliales mammaires (Juhasz *et al.* 2009) malgré leur rôle important dans les voies de signalisation cellulaire (Jiang, Zhang, and Dusting 2011). Dans nos conditions, parmi les différents systèmes producteurs d'ERO testés, nous avons pu observer que seule l'enzyme

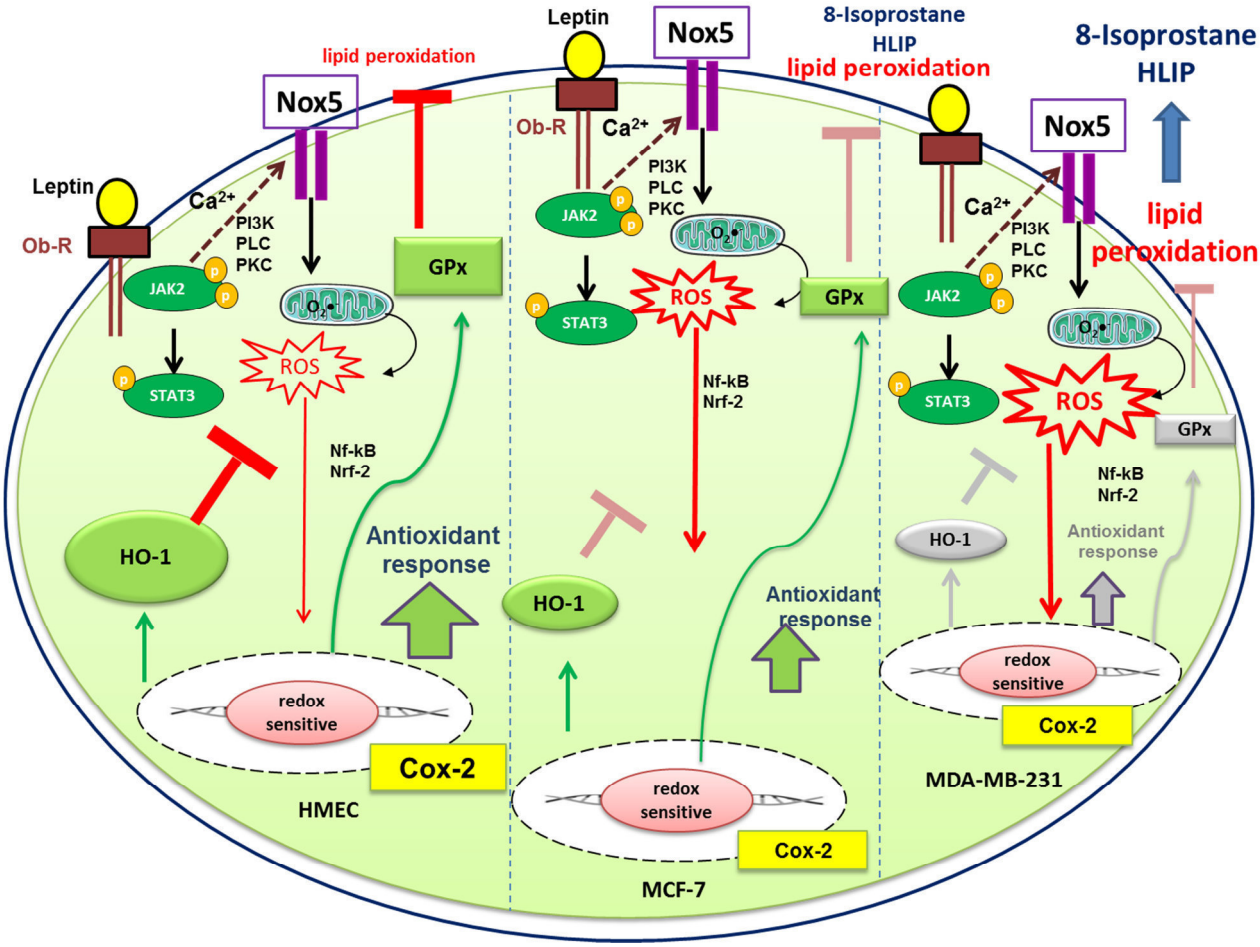


Figure 55 : Schéma récapitulatif de la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires par la leptine.

NOX-5 calcium-dépendante est exprimée dans nos modèles cellulaires. Ces résultats sont en accord avec le profil d'expression trouvé au niveau des cellules tumorales et des tumeurs mammaires où NOX-5 est une des principales isoformes exprimées de la famille NOX (Jiang, Zhang, and Dusting 2011; Juhasz *et al.* 2009). En revanche, d'autres données de la littérature montrent un rôle de NOX-4 au niveau mitochondrial chez les MCF-7 (Graham *et al.* 2010). Cependant, au cours des 24 heures d'expérimentation, l'expression génique de NOX-4 n'est observée dans aucune des trois lignées. Afin de confirmer l'implication de NOX-5 dans la production d'ERO, nous avons étudié d'une part l'effet de l'inhibition du flux calcique intracellulaire *via* un antagoniste des canaux calciques, le vérapamil, et d'autre part l'inhibition transitoire de l'expression génique NOX-5 par siRNA.

Les cellules épithéliales mammaires sont sensibles à l'action du vérapamil. En effet celui-ci diminue le flux calcique et la production d'anions superoxydes en situation basale dans les trois lignées cellulaires. En présence de leptine, l'inhibition de la vague calcique par le vérapamil s'accompagne d'une diminution de la production d'anions superoxydes cytosolique confirmant la régulation calcium-dépendante de la production d'ERO induite par la leptine (Y.-Z. Wang *et al.* 2011). De même, l'inhibition transitoire de NOX-5 par siRNA conduit à la diminution de la production des ERO cytosolique en présence de leptine.

Parallèlement, nous avons étudié l'impact de la leptine sur l'expression des protéines p-STAT3 et SOCS3. Nous avons constaté une surexpression de p-STAT3 avec une concentration mimant la situation d'obésité dans les trois modèles cellulaires, comme décrit dans d'autres types cellulaires (Piao *et al.* 2014). L'activation de p-STAT3 a conduit à une augmentation de l'expression de SOCS3 que dans les cellules HMEC et MCF-7.

Pris dans leur ensemble, ces résultats indiquent une participation des voies de signalisation calcium-dépendantes de la leptine comme décrit précédemment (S. S. Martin, Qasim, and Reilly 2008 ; Trachootham *et al.* 2008). De plus, ces expériences confirment le rôle de NOX-5 dans la production cytosolique des ERO induite par la leptine. Ceci nous permet de suggérer la cascade de signalisation suivante **(Figure 55)** : la leptine *via* son récepteur Ob-R active les voies de signalisation calcium-dépendantes qui peuvent induire par la suite l'activation de NOX-5 (F. Chen *et al.* 2014) et la production des ERO (Gupta *et al.* 2014b), ceci en parallèle de l'activation de JAK/STAT, voie de signalisation canonique de la leptine (Gao et al. 2009).

Cependant, dans les conditions basales, la production d'ERO chez les cellules saines HMEC semble être indépendante du flux calcique et de l'activité de l'enzyme NOX-5. L'absence d'autres systèmes producteurs d'ERO tels que les NOS, DUOX et les autres iso-enzymes de la famille NOX, nous laisse suggérer, comme indiqué précédemment (Graham *et al.* 2010), qu'une grande quantité d'ERO en condition basale provenant de la mitochondrie.

- **Impact de la leptine sur la réponse anti-oxydante et inflammatoire**

Une diminution des capacités anti-oxydantes de la cellule peut participer au stress oxydant (B. Halliwell 1999). Ce stress oxydant joue un rôle dans l'apoptose cellulaire (Finkel and Holbrook 2000) mais également dans l'initiation et la progression néoplasique (Grek and Tew 2010). Ainsi, en réponse à la stimulation de la production des ERO, nous avons suivi la modulation par la leptine de certains systèmes anti-oxydants dans les trois modèles cellulaires.

A dose physiologique, la leptine induit une réponse anti-oxydante dans les cellules HMEC. Celle-ci se caractérise par l'augmentation du contenu cellulaire en GSH, par l'activation des enzymes anti-oxydantes (GR, GPx1, GST et HO-1) et par l'oxydation transitoire des thiols protéiques, témoins de la réponse anti-oxydante (O'Leary et al. 2014). L'activation de GPx1 explique qu'aucune augmentation des concentrations d'HPLIP et de 8-isoPGF2α dans le milieu de culture n'est observée. Ainsi, les HMEC présentent une balance pro/anti-oxydante équilibrée puisque la leptine stimule la production d'ERO mais également les défenses anti-oxydantes. Ces résultats sont en accord avec des données observées dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes. Ainsi, suite à une augmentation de production d'ERO, il est observé une activation de HO-1, protéine de choc thermique sensible au stress cellulaire (Srisook, Kim, and Cha 2005), et des enzymes du glutathion associée à l'élévation de la production de GSH (Arab *et al.* 2006 ; Rossary *et al.* 2007). Dans les cellules cancéreuses MCF-7 la réponse anti-oxydante est caractérisée par une augmentation des thiols protéiques et de l'activité de HO-1. En revanche, il n'y a pas de modification de l'activité des autres enzymes anti-oxydantes ni du contenu cellulaire en GSH. Cette défense anti-oxydante partielle explique l'élévation des concentrations en HPLIP et en 8-isoPGF2α dans le milieu de culture. Ces résultats montrent que la leptine ne module pas le statut antioxydant des MCF-7 corroborant les observations antérieures (D. H. Kim et al. 2014; O'Leary *et al.* 2014) et induit un état de stress oxydant. Chez les MDA-MB-231, la leptine en concentration physiologique, n'induit aucune réponse anti-oxydante, ce qui se traduit par une large augmentation du 8-isoPGF2α dans le milieu de culture.

Avec la concentration mimant la situation d'obésité, la leptine semble induire une réponse anti-oxydante moins efficace, en comparaison avec la concentration physiologique, quelle que soit la lignée cellulaire. La défense anti-oxydante des cellules HMEC est moins stimulée puisqu'il y a une production plus faible de GSH, une moindre activation de HO-1 et GPx1 et un maintien de l'activité des enzymes GST et GR. Cependant l'absence d'élévation des marqueurs de peroxydation lipidique (HPLIP, 8-isoPGF2α) montre que cette défense est efficace.

Pour les MCF-7, la concentration de 100 ng/ml de leptine se traduit par un défaut d'activation de la réponse anti-oxydante avec toutefois une faible augmentation des HPLIP dans le milieu de culture. Les cellules MDA-MB-231 présentent un même profil de défense anti-oxydante quelle que soit la concentration de leptine se traduisant par une consommation transitoire des thiols protéiques associée à une diminution du glutathion sans induction de la GR ni des autres enzymes anti-oxydantes. Ainsi, à l'inverse des deux autres modèles cellulaires, les MDA-MB-231 présentent une production d'ERO sans induction de la réponse anti-oxydante ce qui majore le stress oxydant comme déjà observé en situation basale. Ces résultats sont en accord avec des travaux antérieurs reliant le caractère agressif de cette lignée cellulaire (Chacón and Costanzo 2010b; Mazhar, Ang, and Waxman 2006) à sa réponse anti-oxydante inefficace (Acharya et al. 2010).

Concernant la réponse inflammatoire évaluée par l'expression génique et l'activité enzymatique de la COX-2, quelles que soient la concentration de leptine utilisée et la lignée cellulaire considérée, son expression et son activité sont augmentées. Cependant, chez les HMEC l'activation de HO-1 et GPx1, décrites comme des facteurs limitants de l'activité de la COX-2 (Cao *et al.* 2010), laisse envisager une limitation des effets de COX-2. Chez les MCF-

7, la surexpression de COX-2 et l'augmentation de son activité catalytique sont plus fortes pour la leptine à 100 ng/ml. Ces résultats peuvent expliquer en partie les effets néfastes de l'obésité sur le statut oxydatif cellulaire (Esposito *et al.* 2006) et son impact sur la carcinogenèse (Panigrahy et al. 2010). De façon intéressante les cellules MDA-MB-231 présentent à l'état basal une surexpression de la COX-2 qui est majorée en présence de la leptine. Ceci peut contribuer au caractère invasif des MDA-MB-231, comme précédemment décrit par Liu *et al*. (B. Liu, Qu, and Tao 2010). La COX-2 est de ce fait considérée comme un marqueur d'agressivité (Boland *et al.* 2004) puisque les éicosanoïdes produits par les cellules cancéreuses leur permettent d'augmenter l'angiogenèse et la migration cellulaire et de détourner les défenses immunitaires (Panigrahy *et al.* 2010).

Ainsi, ces résultats indiquent que la leptine, en conditions physiopathologiques, affecte le statut anti-oxydant et active la réponse inflammatoire. Les cellules néoplasiques semblent dans l'incapacité de moduler la réponse anti-oxydante en présence de leptine et produisent un stress oxydant. Quant aux cellules saines, elles stimulent leur défense anti-oxydante (**Figure 55**). Ces observations sont en accord avec la littérature, qui confirme l'apparition d'un état de stress oxydant dans le cancer du sein en situation d'obésité (Vargas-Hernández *et al.* 2013). Pris dans leur ensemble, ces résultats apportent un nouvel éclairage sur l'impact de leptine sur la balance oxydative des cellules épithéliales mammaires selon leur statut néoplasique.

Impact d'un régime hyperlipidique et de l'environnement enrichi sur le développement tumoral mammaire : études in vivo

De façon complémentaire à notre étude *in vitro,* nous avons élaboré un modèle murin d'obésité induite par le régime afin d'étudier la carcinogenèse mammaire *in vivo* en situation d'obésité. Cette question s'inscrit dans la problématique de l'association établi entre obésité et le risque de développer un cancer du sein hormono-dépendant (exprimant les récepteurs aux œstrogènes (RE)) chez les femmes en surpoids ou obèses après la ménopause (Carpenter *et al.* 2003; G. K. Reeves et al. 2007).

De nombreux modèles d'obésité induite par un régime alimentaire enrichi en lipides et en glucides ont été décrits. Le régime hyperlipidique est un modèle de choix puisqu'il peut induire un excès de poids même en l'absence d'un excès calorique du fait de leur efficacité métabolique (Pellizzon *et al.* 2002). Cependant la teneur en lipides des régimes varie considérablement selon les études, de 20 à 60 % de l'apport énergétique totale. Généralement, l'utilisation de ce type de régime conduit au développement d'une obésité par accumulation de graisses viscérales (Park *et al.* 2001; Tang *et al.* 2014; Kayser, Goran, and Bouret 2015) associée à des perturbations métaboliques telles que l'augmentation des concentrations plasmatiques en glucose, insuline, leptine, triglycérides et cholestérol (Calle and Kaaks, 2004). Dans les modèles expérimentaux de carcinogenèse, une alimentation hyperlipidique induisant l'obésité module à la fois le développement tumoral ainsi que la réponse métabolique et hormonale (Hursting *et al.* 2012).

Ainsi notre étude *in vivo* évalue l'effet d'un régime hyperlipidique sur le développement d'une lignée cancéreuse mammaire murine syngénique chez des femelles C57BL/6 âgées. Pour cela deux régimes à façon ont été élaborés : un régime hyperlipidique (HL) et un régime normo-calorique (NC) ayant des teneurs similaires en acides gras polyinsaturés ω6 et ω3 (ratio ω6/ω3 = 6,2). Après 8 semaines de régime, des cellules tumorales mammaires

syngéniques EO771 ont été implantées au niveau de la quatrième paire de glandes mammaires.

- **Effets du régime hyperlipidique sur la réponse métabolique et la croissance des tumeurs mammaires**

Le micro-environnement joue un rôle fondamental dans le développement et la progression de la tumeur mammaire. En effet, il s'agit d'une glande constituée en majorité de tissu adipeux qui synthétise de nombreuses adipokines, telles que la leptine et l'adiponectine. La leptinémie, proportionnelle à la masse grasse est plus importante chez les sujets en surpoids ou obèses, alors que l'adiponectinémie, est inversement proportionnelle à la masse grasse (T Jardé *et al.* 2009). Ces deux adipokines dont les effets ont été clairement établis *in vitro* (Dubois, Jardé, Laetitia, *et al.* 2014; Thierry Jardé *et al.* 2008b; T Jardé *et al.* 2009) jouent des rôles antagonistes dans le développement de la tumeur. La leptine, pro-inflammatoire et pro-prolifération, favorise l'angiogenèse (Zhou, Guo, and Gonzalez-Perez 2011) alors que l'adiponectine, anti-inflammatoire et pro-apoptotique, est anti-angiogénique (Bråkenhielm *et al.* 2004), comme démontré sur de nombreuses lignées cancéreuses mammaires dont les cellules EO771 (Nachat-Kappes *et al.* 2012) et les cellules MCF-7 (T Jardé *et al.* 2009; Thierry Jardé *et al.* 2011). Ainsi, *in vitro* un rapport adiponectine/leptine abaissé semble favoriser le développement de tumeurs mammaires, alors qu'au contraire, une élévation de ce ratio serait protectrice (Margot P. Cleary *et al.* 2009). Outre les adipokines, de nombreux autres facteurs, particulièrement en situation d'obésité, favorisant le processus de la cancérogénèse mammaire, comme le statut inflammatoire. Subbaramaiah *et al*. ont en effet mis en évidence une réaction inflammatoire dans la glande mammaire saine chez des souris obèses soumises à un régime hyper-calorique, avec notamment une augmentation du TNF-α, de l'IL-1β et de la COX-2 (Subbaramaiah *et al.* 2011).

Dans notre étude, les souris nourries avec le régime HL présentent une prise calorique accrue (+25%) avec développement d'un surpoids ainsi qu'une masse grasse significativement augmentée (+87%) par rapport aux souris recevant le régime NC en accord avec la littérature (Begriche *et al.* 2008) (Gu *et al.* 2011; E. J. Kim *et al.* 2011). Les mesures de calorimétrie indirecte indiquent que les souris nourries avec le régime HL ont une activité physique spontanée moindre que celles nourries avec le régime NC. Ces résultats sont à rapprocher de l'étude de Rockett *et al*. qui ont montré qu'un régime riche en acide gras, notamment ω-3, diminue l'activité physique des souris mâles C57BL/6 (Rockett, Harris, and Raza Shaikh 2012). Après implantation des tumeurs, il est observé une perte d'activité diurne pour les deux groupes avec toutefois maintien des différences de masse grasse. Ces données montrent qu'un régime hyperlipidique stimule la prolifération tumorale mammaire malgré une diminution de la prise alimentaire (-18%) du fait d'un effet satiétogène sans induire de perte de poids et de masse grasse. Conformément aux donnés de la littérature, le poids et le volume tumoral sont augmentés sous régime HL (Gu *et al.* 2011; E. J. Kim *et al.* 2011).

Chez les souris âgées l'augmentation de l'adiposité induite par le régime HL s'accompagne d'une augmentation de l'inflammation objectivée par l'élévation plasmatique de l'IL-6 et de la résistine est observée, sans hyperinsulinémie ni hyperglycémie. Ces résultats sont en partie contradictoires avec des travaux antérieures montrant qu'un régime hyperlipidique/hyperglucidique induit une obésité sévère, une hyperglycémie avec une

hyperinsulinémie chez la souris C57BL/6 (Nakajima, Hira, and Hara 2015; Z.-Z. Zhao *et al.* 2015), chez le rat wistar (Man and He 2009) et chez le rat Sprague-Dawley (Levin *et al.* 1985). Notre étude montre que l'adiponectinémie est diminuée par le régime HL et/ou par le développement tumoral, alors que le taux plasmatique de leptine est augmenté. Ceci est associé à une augmentation de l'activité métabolique tumorale mesurée par imagerie fonctionnelle (fluo-désoxyglucose (FDG)) comme précédemment établi par Gu *et al*. avec le même modèle syngénique (Gu *et al.* 2011). En effet, dans nos conditions les souris femelles ovariectomisées et soumises à un régime hypercalorique ont développé des tumeurs deux fois plus volumineuses que les souris soumises à un régime normal.

En conclusion de ce modèle expérimental, nous avons pu montrer qu'un régime riche en lipides influence l'activité physique spontanée des animaux et induit un profil systémique plutôt pro-inflammatoire favorisant la croissance tumorale.

- **Effets de l'environnement enrichi sur la croissance des tumeurs mammaires**

A partir des souris ovariéctomisées afin de mimer la post-ménopause, hébergées en environnement enrichi (EE) ou en environnement standard (ES), nourries avec le régime hyperlipidique, nous avons étudié le développement des tumeurs mammaires, l'activité physique des animaux et la production des deux adipokines d'intérêt.

Nos travaux montrent que l'hébergement en EE tend à ralentir la prise de poids des souris C57BL/6 nourries par rapport aux souris plutôt sédentaires hébergées dans un ES. L'implantation des cellules tumorales EO771 dans la glande mammaire entraîne une perte de masse adipeuse dans les deux groupes d'animaux associée à une réduction de l'activité physique, toutefois limitée en environnement enrichi. Les conditions d'hébergement ne modifient pas les concentrations plasmatiques d'adiponectine, de leptine, de résistine ou des cytokines pro-inflammatoires. Ces résultats, obtenus chez des animaux âgés et ovariectomisés, divergent de ceux d'une étude antérieure de l'équipe réalisée chez des souris C57BL/6 jeunes non ovariectomisées soumises à un régime standard (Nachat-Kappes et al. 2012a). Ils sont toutefois cohérents avec les résultats obtenus dans un modèle de mélanome (B16F10) dans lequel aucun effet de l'EE sur la croissance tumorale est observé (Westwood, Darcy, and Kershaw 2013). D'autres hormones facteurs de croissance ou médiateurs pourraient être impliquées dans les effets inhibiteurs de l'EE dans la tumorigenèse. En effet, dans l'étude de Cao *et al*. (Cao *et al.* 2010), la concentration plasmatique d'insulin-like growth factor-1 (IGF-1), est diminuée et celle de corticostérone, hormone anti-inflammatoire, est augmentée par l'EE comparé à l'ES. Ceci est en accord avec les variations de corticostérone observées dans notre modèle. Ces résultats, nous amènent à suggérer que l'activité physique développée en EE n'est pas assez intense pour apporter des modifications physiologiques et hormonales chez ces souris âgées ovariectomisées. Cette hypothèse est corroborée par les données cliniques (Masala *et al.* 2014; McKenzie *et al.* 2014). En effet, l'activité physique a été décrite comme un moyen de prévenir l'apparition du cancer du sein (Na and Oliynyk 2011). Ces effets seraient notamment dus à une diminution de la leptinémie chez les sujets pratiquant une activité physique régulière, comme observé dans une étude épidémiologique chez des femmes ménopausées faisant en moyenne 4h d'exercice physique par semaine (Friedenreich *et al.* 2011).

Il est de plus en plus reconnu que les souris hébergées en ES du fait de leur sédentarité et d'un accès libre et permanent à la nourriture tendent à prendre du poids et présentent diverses pathologies associées (diabète, maladie cardiovasculaire et cancer) et une diminution de l'espérance de vie (B. Martin *et al.* 2010). Un apport alimentaire réduit ou proposé sur un temps limité, ainsi qu'une activité physique accrue contribueraient à limiter le risque de développer ces pathologies. Des travaux ont montré que des souris soumises à un régime hypercalorique sur un temps limité (8h par jour pendant la nuit), ne développent pas d'obésité, même si elles consomment autant de calories que si elles avaient un accès permanent à la nourriture (Hatori *et al.* 2012). De plus les souris hébergées en EE sont également résistantes à l'obésité induite par un régime hypercalorique (Cao *et al.* 2011). Toutes ces observations démontrent l'intérêt de l'utilisation de l'EE dans les animaleries afin de préserver le bien-être et l'état de santé des animaux. L'EE constitue également un excellent modèle d'étude de l'impact de l'activité physique spontanée mais aussi des interactions sociales sur le développement du cancer. Ces interactions, sources de bien-être social, semblent être des facteurs clés de la réduction du risque de mortalité, comme récemment démontré dans une approche clinique par Epplein *et al*. (Epplein *et al.* 2011).

En conclusion, l'EE stimule l'activité physique des animaux et permet son maintien après implantation des tumeurs. Néanmoins, nous avons constaté que cet environnement ne permet de retrouver le même effet inhibiteur de croissance tumorale observé chez des souris jeunes nourries avec un régime standard, ni de de contrebalancer les perturbations métaboliques induites par le régime hyperlipidique chez les souris âgées ovariectomisées.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Le cancer du sein est une pathologie multifactorielle. Ainsi, une meilleure connaissance des facteurs impliqués dans le risque de cancérogenèse est essentielle afin de pouvoir proposer de nouvelles pistes thérapeutiques et de prévention primaire. Il a été démontré que chez le sujet obèse, un état sub-inflammatoire associé à l'insulinorésistance favorise la formation de médiateurs pro-inflammatoires et de radicaux libres. Ainsi une alimentation hypercalorique induisant le surpoids voire l'obésité est positivement corrélée au risque de développer un cancer mammaire en lien avec une perturbation de l'homéostasie redox.

Ce travail de thèse avait deux objectifs principaux :

- l'étude de l'impact de la leptine dans la modulation du statut oxydatif et de la réponse inflammatoire des cellules épithéliales mammaires
- l'étude de l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur le développement tumoral dans le cadre de la cancérogenèse mammaire.

Pour cela, nous avons réalisé des études *in vitro* afin de caractériser les propriétés de la leptine sur la balance pro-anti-oxydante des cellules mammaires humaines saines et néoplasiques. Nous avons mis en évidence que les cellules épithéliales mammaires répondent au signal leptinique transmis par le récepteur Ob-R. Les trois lignées cellulaires répondent de manière différente à ce signal et ceci en fonction de leur statut néoplasique, du temps de traitement mais non de la dose de la leptine employée. Afin de préciser les mécanismes en jeu il serait intéressant d'évaluer la densité d'Ob-R par cytométrie en flux qui pourrait moduler la réactivité des cellules aussi que les voies de transduction associées à ce récepteur. Nos travaux ont montré que la leptine induit une production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) calcium-dépendante. Cette production, essentiellement cytosolique est NOX-5-dépendante, seul système producteur identifié dans nos modèles cellulaires et génère essentiellement des anions superpoxydes ($O_2^{\bullet -}$). Ce résultat a été validé par l'utilisation d'un inhibiteur des canaux calciques, le vérapamil, et par la transfection transitoire des cellules épithéliales avec des siRNA NOX-5. Dans la suite de ce travail, il serait intéressant de tester d'autres inhibiteurs pharmacologiques des canaux calciques et des enzymes NADPH calcium-dépendante telle que l'apocynine. Parallèlement à NOX-5, l'expression génique de la NOX-3 embryonnaire pourrait être recherchée puisqu'elle est décrite comme étant ré-exprimée dans certaines lignées tumorales.

Nous avons observé dans les conditions basales que la production d'ERO chez les cellules HMEC est indépendante du flux calcique et de l'activité NOX-5. Il serait donc intéressant d'identifier si la production d'ERO est d'origine mitochondriale par l'utilisation d'inhibiteurs du complexe I telle que la roténone.

Pour les cellules saines HMEC en présence de leptine une production d'ERO de manière non dose-dépendante est observée, alors que le versant anti-oxydant est fortement induit avec une concentration physiologique de leptine. Ce signal est perçu précocement et tend à renforcer la défense anti-oxydante par l'augmentation du contenu intracellulaire en GSH et par l'activation de l'expression de HO-1, protéine de choc thermique liée à la défense anti-oxydante. Dans un environnement pathologique similaire à l'obésité, une instabilité

apparaît, pouvant être un facteur induisant un déséquilibre du statut oxydatif chez les cellules saines conduisant à un stress oxydant. Quant aux cellules tumorales MCF-7 et MDA-MB-231, elles intègrent le signal induit par la leptine différemment. Ainsi, la défense anti-oxydante des cellules tumorales MCF-7 et MDA-MB-231 est beaucoup moins efficace que les cellules HMEC. Chez ces cellules, le signal semble conduire à l'utilisation du stress oxydant pour générer des isoprostanes (8isoPGF2α) et pour sur-exprimer l'enzyme pro-inflammatoire COX-2. Ces observations *in vitro* corrèlent avec les observations cliniques qui montrent un stress oxydant associé à la situation d'obésité. La leptine peut-être en partie responsable de ces phénomènes et jouer de ce fait un rôle dans les processus de carcinogenèse. Ainsi une concentration de leptine similaire à la situation d'obésité réduit les défenses anti-oxydantes de cellules néoplasiques favorisant la peroxydation lipidique et de ce fait la production de médiateurs de l'inflammation (HPLIP). Ceci peut expliquer en partie l'augmentation du risque de récidive de cancer mammaire observée en situation d'obésité.

Parallèlement à l'étude *in vitro*, nous avons évalué l'impact d'un régime hyperlipidique (HL) et de l'environnement enrichi (EE) qui stimule l'activité physique et l'interaction sociale sur le développement des tumeurs mammaires chez la souris C57BL/6 ovariectomisée mimant la ménopause. Nous avons observé que le régime HL induit un surpoids avec une stimulation de la prolifération tumorale mammaire associée à une perte d'activité locomotrice des animaux. De plus, nous avons constaté une augmentation des marqueurs de l'inflammation au niveau circulant des souris nourries avec le régime HL.

Nous avons observé aussi un effet marquant de l'EE sur l'activité physique des animaux mesuré en cages calorimétriques après l'implantation des tumeurs. L'EE préserve l'activité locomotrice de ces animaux par rapport à ceux hébergés dans un environnement classique. Néanmoins, l'environnement enrichi ne compense pas les effets délétères d'une alimentation riche en lipides sur la croissance tumorale observée chez les souris âgées. Il serait intéressant de reproduire ce modèle chez des souris jeunes nourries avec un régime obésogène et d'étudier par la suite l'impact de l'EE sur le développement des tumeurs mammaires.

Un complément de perspectives à ce travail s'attachera à analyser l'infiltration immunitaire au niveau du tissu mammaire tumoral, afin de voir si le régime HL et l'environnement enrichi modulent la réponse immunitaire. En effet le statut inflammatoire des animaux et des tumeurs sera complété par la mesure des cytokines anti-inflammatoires, et par le phénotypage des cellules immunitaires plasmatiques et spléniques afin de caractériser la réponse immunitaire globale. Au niveau des tumeurs, l'infiltration leucocytaire sera mise en évidence par immuno-histochimie, ainsi par la mesure *in situ* des prostaglandines et des isoprostanes et de la COX-2, productrice de prostaglandines et marqueur de l'agressivité tumorale. En parallèle, l'utilisation des biopuces permettra la mise en évidence des modifications transcriptomiques liées aux modifications du statut oxydatif. De plus, le statut métabolique des tumeurs sera caractérisé par une approche métabolomique. L'analyse transcriptomique et métabolomique permettra la mise en évidence de nouveaux marqueurs prédictives de tumorigenèse mammaire liée à l'obésité.

Ce travail pourrait aussi être complété par une approche *in vivo* au travers d'un modèle de souris C57BL/6 recevront des injections de leptine avec des concentrations mimant

l'obésité (100 ng/ml). Il serait envisageable de moduler la sécrétion de la leptine en injectant dans l'environnement tumoral des agents agonistes ou inhibiteurs de cette adipokine afin d'évaluer son implication locale dans la croissance tumorale.

Ce travail original contribue à une meilleure compréhension des interactions entre, les voies de signalisation induites par la leptine, la régulation du statut oxydant cellulaire et l'induction des signaux responsables de l'inflammation chronique à bas bruit observée en situation d'obésité. Ces travaux ouvrent des nouvelles perspectives d'investigation, qui devraient permettre de mieux comprendre les effets de la leptine dans le tissu mammaire et d'entrevoir de nouvelles stratégies de prise en charge.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abraham, Nader G., and Attallah Kappas. 2008. "Pharmacological and Clinical Aspects of Heme Oxygenase." *Pharmacological Reviews* 60 (1): 79–127. doi:10.1124/pr.107.07104.

Acconcia, Filippo, Pierangela Totta, Sumito Ogawa, Irene Cardillo, Satoshi Inoue, Stefano Leone, Anna Trentalance, Masami Muramatsu, and Maria Marino. 2005. "Survival versus Apoptotic 17β-Estradiol Effect: Role of ERα and ERβ Activated Non-Genomic Signaling." *Journal of Cellular Physiology* 203 (1): 193–201. doi:10.1002/jcp.20219.

Acharya, Asha, Ila Das, Des Chandhok, and Tapas Saha. 2010a. "Redox Regulation in Cancer." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 3 (1): 23–34.

Adler, V, Z Yin, K D Tew, and Z Ronai. 1999. "Role of Redox Potential and Reactive Oxygen Species in Stress Signaling." *Oncogene* 18 (45): 6104–11. doi:10.1038/sj.onc.1203128.

Afanas'ev, Igor B. 2007. "Signaling Functions of Free Radicals Superoxide & Nitric Oxide under Physiological & Pathological Conditions." *Molecular Biotechnology* 37 (1): 2–4.

Aguilar-Valles, Argel, Wataru Inoue, Christoph Rummel, and Giamal N. Luheshi. 2015. "Obesity, Adipokines and Neuroinflammation." *Neuropharmacology*, January. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.12.023.

Aguirre, Lina, Nicola Napoli, Debra Waters, Clifford Qualls, Dennis T. Villareal, and Reina Armamento-Villareal. 2014. "Increasing Adiposity Is Associated with Higher Adipokine Levels and Lower Bone Mineral Density in Obese Older Adults." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99 (9): 3290–97. doi:10.1210/jc.2013-3200.

Ahima, R. S., and J. S. Flier. 2000. "Leptin." *Annual Review of Physiology* 62: 413–37. doi:10.1146/annurev.physiol.62.1.413.

Aleffi, Sara, Ilaria Petrai, Cristiana Bertolani, Maurizio Parola, Sebastiano Colombatto, Erica Novo, Francesco Vizzutti, et al. 2005. "Upregulation of Proinflammatory and Proangiogenic Cytokines by Leptin in Human Hepatic Stellate Cells." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 42 (6): 1339–48. doi:10.1002/hep.20965.

Allison, Sarah E., Nenad Petrovic, Peter I. Mackenzie, and Michael Murray. 2015. "Pro-Migratory Actions of the Prostacyclin Receptor in Human Breast Cancer Cells That over-Express Cyclooxygenase-2." *Biochemical Pharmacology*, June. doi:10.1016/j.bcp.2015.06.002.

Alnajjar, Ahmed, Jared A. Butcher, and Bruce McCord. 2004. "Determination of Multiple Drugs of Abuse in Human Urine Using Capillary Electrophoresis with Fluorescence Detection." *Electrophoresis* 25 (10-11): 1592–1600. doi:10.1002/elps.200305847.

Ameri, Kurosh, Arman Jahangiri, Anthony M. Rajah, Kathryn V. Tormos, Ravi Nagarajan, Melike Pekmezci, Vien Nguyen, et al. 2015. "HIGD1A Regulates Oxygen Consumption, ROS Production, and AMPK Activity during Glucose Deprivation to Modulate Cell Survival and Tumor Growth." *Cell Reports*, February. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.020.

Andò, Sebastiano, and Stefania Catalano. 2012. "The Multifactorial Role of Leptin in Driving the Breast Cancer Microenvironment." *Nature Reviews. Endocrinology* 8 (5): 263–75. doi:10.1038/nrendo.2011.184.

Andrew, P. J., and B. Mayer. 1999. "Enzymatic Function of Nitric Oxide Synthases." *Cardiovascular Research* 43 (3): 521–31.

Andrews, Zane B., Zhong-Wu Liu, Nicholas Walllingford, Derek M. Erion, Erzsebet Borok, Jeffery M. Friedman, Matthias H. Tschöp, et al. 2008. "UCP2 Mediates Ghrelin's Action on NPY/AgRP Neurons by Lowering Free Radicals." *Nature* 454 (7206): 846–51. doi:10.1038/nature07181.

Angulo, Paul, Laura M. Alba, Lydia M. Petrovic, Leon A. Adams, Keith D. Lindor, and Michael D. Jensen. 2004. "Leptin, Insulin Resistance, and Liver Fibrosis in Human Nonalcoholic Fatty Liver Disease." *Journal of Hepatology* 41 (6): 943–49. doi:10.1016/j.jhep.2004.08.020.

Antony, Smitha, Yongzhong Wu, Stephen M. Hewitt, Miriam R. Anver, Donna Butcher, Guojian Jiang, Jennifer L. Meitzler, et al. 2013a. "Characterization of NADPH Oxidase 5 Expression in Human Tumors and Tumor Cell Lines with a Novel Mouse Monoclonal Antibody." *Free Radical Biology & Medicine* 65 (December): 497–508. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.005.

Antuna-Puente, B., B. Feve, S. Fellahi, and J.-P. Bastard. 2008. "Adipokines: The Missing Link between Insulin Resistance and Obesity." *Diabetes & Metabolism* 34 (1): 2–11. doi:10.1016/j.diabet.2007.09.004.

Anty, Rodolphe, and Maud Lemoine. 2011. "Liver Fibrogenesis and Metabolic Factors." *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, Recent advances in hepatology. Proceedings of the 1st European Young Hepatologist Workshop, 35, Supplement 1 (June): S10–20. doi:10.1016/S2210-7401(11)70003-1.

Aon, M. A., S. Cortassa, and B. O'Rourke. 2010. "Redox-Optimized ROS Balance: A Unifying Hypothesis." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1797 (6-7): 865–77. doi:10.1016/j.bbabio.2010.02.016.

Arab, Khelifa, Adrien Rossary, Françoise Flourié, Yves Tourneur, and Jean-Paul Steghens. 2006a. "Docosahexaenoic Acid Enhances the Antioxidant Response of Human Fibroblasts by Upregulating

Gamma-Glutamyl-Cysteinyl Ligase and Glutathione Reductase." *The British Journal of Nutrition* 95 (1): 18–26.

Arab, Khelifa, and Jean-Paul Steghens. 2004. "Plasma Lipid Hydroperoxides Measurement by an Automated Xylenol Orange Method." *Analytical Biochemistry* 325 (1): 158–63.

Arita, Yukio, Shinji Kihara, Noriyuki Ouchi, Masahiko Takahashi, Kazuhisa Maeda, Jun-ichiro Miyagawa, Kikuko Hotta, et al. 2012. "Paradoxical Decrease of an Adipose-Specific Protein, Adiponectin, in Obesity. 1999." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425 (3): 560–64. doi:10.1016/j.bbrc.2012.08.024.

Armstrong, K., A. Eisen, and B. Weber. 2000. "Assessing the Risk of Breast Cancer." *The New England Journal of Medicine* 342 (8): 564–71. doi:10.1056/NEJM200002243420807.

Arnér, E. S., and A. Holmgren. 2000. "Physiological Functions of Thioredoxin and Thioredoxin Reductase." *European Journal of Biochemistry / FEBS* 267 (20): 6102–9.

Arnold, Melina, Nirmala Pandeya, Graham Byrnes, Andrew G. Renehan, Gretchen A. Stevens, Majid Ezzati, Jacques Ferlay, et al. 2015. "Global Burden of Cancer Attributable to High Body-Mass Index in 2012: A Population-Based Study." *The Lancet. Oncology* 16 (1): 36–46. doi:10.1016/S1470-2045(14)71123-4.

Athyros, Vasilios G., Konstantinos Tziomalos, Asterios Karagiannis, Panagiotis Anagnostis, and Dimitri P. Mikhailidis. 2010. "Should Adipokines Be Considered in the Choice of the Treatment of Obesity-Related Health Problems?" *Current Drug Targets* 11 (1): 122–35.

Attoub, S., S. Levasseur, M. Buyse, H. Goïot, J. P. Laigneau, L. Moizo, F. Hervatin, Y. Le Marchand-Brustel, J. M. Lewin, and A. Bado. 1999. "Physiological Role of Cholecystokinin B/gastrin Receptor in Leptin Secretion." *Endocrinology* 140 (10): 4406–10. doi:10.1210/endo.140.10.7079.

Auwerx, Johan, and Bart Staels. 1998. "Leptin." *The Lancet* 351 (9104): 737–42. doi:10.1016/S0140-6736(97)06348-4.

Bacot, Sandrine, Nathalie Bernoud-Hubac, Naima Baddas, Bernard Chantegrel, Christian Deshayes, Alain Doutheau, Michel Lagarde, and Michel Guichardant. 2003. "Covalent Binding of Hydroxy-Alkenals 4-HDDE, 4-HHE, and 4-HNE to Ethanolamine Phospholipid Subclasses." *Journal of Lipid Research* 44 (5): 917–26. doi:10.1194/jlr.M200450-JLR200.

Badid, Naima, Fatima Zohra Baba Ahmed, Hafida Merzouk, Slimane Belbraouet, Nassima Mokhtari, Sid Ahmed Merzouk, Riad Benhabib, Djalloul Hamzaoui, and Michel Narce. 2010. "Oxidant/antioxidant Status, Lipids and Hormonal Profile in Overweight Women with Breast Cancer." *Pathology Oncology Research: POR* 16 (2): 159–67. doi:10.1007/s12253-009-9199-0.

Bado, André, Sandrine Levasseur, Samir Attoub, Stéphanie Kermorgant, Jean-Pierre Laigneau, Marie-Noëlle Bortoluzzi, Laurent Moizo, et al. 1998. "The Stomach Is a Source of Leptin." *Nature* 394 (6695): 790–93. doi:10.1038/29547.

Bakke, Jesse, and Fawaz G. Haj. 2014. "Protein-Tyrosine Phosphatase 1B Substrates and Metabolic Regulation." *Seminars in Cell & Developmental Biology*, September. doi:10.1016/j.semcdb.2014.09.020.

Balla, J., H. S. Jacob, G. Balla, K. Nath, J. W. Eaton, and G. M. Vercellotti. 1993. "Endothelial-Cell Heme Uptake from Heme Proteins: Induction of Sensitization and Desensitization to Oxidant Damage." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (20): 9285–89.

Bánfi, B., G. Molnár, A. Maturana, K. Steger, B. Hegedûs, N. Demaurex, and K. H. Krause. 2001. "A Ca(2+)-Activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph Nodes." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (40): 37594–601. doi:10.1074/jbc.M103034200.

Banks, W. A., A. J. Kastin, W. Huang, J. B. Jaspan, and L. M. Maness. 1996. "Leptin Enters the Brain by a Saturable System Independent of Insulin." *Peptides* 17 (2): 305–11.

Barber, M. D., D. C. McMillan, T. Preston, J. A. Ross, and K. C. Fearon. 2000. "Metabolic Response to Feeding in Weight-Losing Pancreatic Cancer Patients and Its Modulation by a Fish-Oil-Enriched Nutritional Supplement." *Clinical Science (London, England: 1979)* 98 (4): 389–99.

Barbier, M., C. Cherbut, A. C. Aubé, H. M. Blottière, and J. P. Galmiche. 1998. "Elevated Plasma Leptin Concentrations in Early Stages of Experimental Intestinal Inflammation in Rats." *Gut* 43 (6): 783–90.

Barone, Ines, Stefania Catalano, Luca Gelsomino, Stefania Marsico, Cinzia Giordano, Salvatore Panza, Daniela Bonofiglio, et al. 2012a. "Leptin Mediates Tumor-Stromal Interactions That Promote the Invasive Growth of Breast Cancer Cells." *Cancer Research* 72 (6): 1416–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2558.

Barrachina, M. D., V. Martínez, J. Y. Wei, and Y. Taché. 1997. "Leptin-Induced Decrease in Food Intake Is Not Associated with Changes in Gastric Emptying in Lean Mice." *The American Journal of Physiology* 272 (3 Pt 2): R1007–11.

Barrenetxe, J, A C Villaro, L Guembe, I Pascual, M Muñoz-Navas, A Barber, and M P Lostao. 2002. "Distribution of the Long Leptin Receptor Isoform in Brush Border, Basolateral Membrane, and Cytoplasm of Enterocytes." *Gut* 50 (6): 797–802.

Barr, V. A., K. Lane, and S. I. Taylor. 1999. “Subcellular Localization and Internalization of the Four Human Leptin Receptor Isoforms.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (30): 21416–24.

Baskin, D. G., J. F. Breininger, and M. W. Schwartz. 2000. “SOCS-3 Expression in Leptin-Sensitive Neurons of the Hypothalamus of Fed and Fasted Rats.” *Regulatory Peptides* 92 (1-3): 9–15.

Bassukas, I. D., and B. Maurer-Schultze. 1990. “Growth of Metastases of the Mouse Adenocarcinoma EO 771: An Allometric Relationship between Growth of the Primary Tumors and Their Metastases.” *Clinical & Experimental Metastasis* 8 (4): 329–43.

Bastos, André E. P., Silvia Scolari, Martin Stöckl, and Rodrigo F. M. de Almeida. 2012. “Applications of Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging to Lipid Domains in Vivo.” *Methods in Enzymology* 504: 57–81. doi:10.1016/B978-0-12-391857-4.00003-3.

Basu, Samar. 2007. “Novel Cyclooxygenase-Catalyzed Bioactive Prostaglandin F2alpha from Physiology to New Principles in Inflammation.” *Medicinal Research Reviews* 27 (4): 435–68. doi:10.1002/med.20098.

Basu, Samar, Rachida Nachat-Kappes, Florence Caldefie-Chézet, and Marie-Paule Vasson. 2013a. “Eicosanoids and Adipokines in Breast Cancer: From Molecular Mechanisms to Clinical Considerations.” *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (3): 323–60. doi:10.1089/ars.2011.4408.

Bates, Sarah H., Walter H. Stearns, Trevor A. Dundon, Markus Schubert, Annette W. K. Tso, Yongping Wang, Alexander S. Banks, et al. 2003. “STAT3 Signalling Is Required for Leptin Regulation of Energy Balance but Not Reproduction.” *Nature* 421 (6925): 856–59. doi:10.1038/nature01388.

Baumann, H., K. K. Morella, D. W. White, M. Dembski, P. S. Bailon, H. Kim, C. F. Lai, and L. A. Tartaglia. 1996. “The Full-Length Leptin Receptor Has Signaling Capabilities of Interleukin 6-Type Cytokine Receptors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8374–78.

Bedard, Karen, Vincent Jaquet, and Karl-Heinz Krause. 2012. “NOX5: From Basic Biology to Signaling and Disease.” *Free Radical Biology and Medicine* 52 (4): 725–34. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.023.

Begriche, Karima, Philippe Lettéron, Adjé Abbey-Toby, Nathalie Vadrot, Marie-Anne Robin, André Bado, Dominique Pessayre, and Bernard Fromenty. 2008a. “Partial Leptin Deficiency Favors Diet-Induced Obesity and Related Metabolic Disorders in Mice.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 294 (5): E939–51. doi:10.1152/ajpendo.00379.2007.

Benaroya-Milshtein, N., N. Hollander, A. Apter, T. Kukulansky, N. Raz, A. Wilf, I. Yaniv, and C.g. Pick. 2004. “Environmental Enrichment in Mice Decreases Anxiety, Attenuates Stress Responses and Enhances Natural Killer Cell Activity.” *European Journal of Neuroscience* 20 (5): 1341–47. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03587.x.

Bence, Kendra K., Mirela Delibegovic, Bingzhong Xue, Cem Z. Gorgun, Gokhan S. Hotamisligil, Benjamin G. Neel, and Barbara B. Kahn. 2006. “Neuronal PTP1B Regulates Body Weight, Adiposity and Leptin Action.” *Nature Medicine* 12 (8): 917–24. doi:10.1038/nm1435.

Benkirane, S., A. Nicolas, M. M. Galteau, and G. Siest. 1991. “Highly Sensitive Immuno-Assays for the Determination of Cotinine in Serum and Saliva. Comparison between RIA and an Avidin-Biotin ELISA.” *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry: Journal of the Forum of European Clinical Chemistry Societies* 29 (6): 405–10.

Bertolani, C., and F. Marra. 2010. “Role of Adipocytokines in Hepatic Fibrosis.” *Current Pharmaceutical Design* 16 (17): 1929–40.

Bhartia, Rohit, Everett C. Salas, William F. Hug, Ray D. Reid, Arthur L. Lane, Katrina J. Edwards, and Kenneth H. Nealson. 2010. “Label-Free Bacterial Imaging with Deep-UV-Laser-Induced Native Fluorescence.” *Applied and Environmental Microbiology* 76 (21): 7231–37. doi:10.1128/AEM.00943-10.

Bilbao, María Guillermina, María Paula Di Yorio, Rocío Alejandra Galarza, Cecilia Varone, and Alicia Graciela Faletti. 2015a. “REGULATION OF THE OVARIAN OXIDATIVE STATUS BY LEPTIN DURING THE OVULATORY PROCESS IN RATS.” *Reproduction (Cambridge, England)*, January. doi:10.1530/REP-14-0536.

Bilbao, María Guillermina, María Paula Di Yorio, Rocío Alejandra Galarza, Cecilia Laura Varone, and Alicia Graciela Faletti. 2015b. “Regulation of the Ovarian Oxidative Status by Leptin during the Ovulatory Process in Rats.” *Reproduction (Cambridge, England)* 149 (4): 357–66. doi:10.1530/REP-14-0536.

Bjørbaek, C., K. El-Haschimi, J. D. Frantz, and J. S. Flier. 1999. “The Role of SOCS-3 in Leptin Signaling and Leptin Resistance.” *The Journal of Biological Chemistry* 274 (42): 30059–65.

Bjørbaek, C., S. Uotani, B. da Silva, and J. S. Flier. 1997. “Divergent Signaling Capacities of the Long and Short Isoforms of the Leptin Receptor.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (51): 32686–95.

Blanquer-Rosselló, M[a] del Mar, Francisca M. Santandreu, Jordi Oliver, Pilar Roca, and Adamo Valle. 2015. “Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry*, March, n/a – n/a. doi:10.1002/jcb.25158.

Blanquer-Rosselló, M. Del Mar, Francisca M. Santandreu, Jordi Oliver, Pilar Roca, and Adamo Valle. 2015. "Leptin Modulates Mitochondrial Function, Dynamics and Biogenesis in MCF-7 Cells." *Journal of Cellular Biochemistry*, March. doi:10.1002/jcb.25158.

Boland, G. P., I. S. Butt, R. Prasad, W. F. Knox, and N. J. Bundred. 2004. "COX-2 Expression Is Associated with an Aggressive Phenotype in Ductal Carcinoma in Situ." *British Journal of Cancer* 90 (2): 423–29. doi:10.1038/sj.bjc.6601534.

Bolisetty, Subhashini, and Edgar A. Jaimes. 2013. "Mitochondria and Reactive Oxygen Species: Physiology and Pathophysiology." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 6306–44. doi:10.3390/ijms14036306.

Bonnefont-Rousselot, D., B. Raji, S. Walrand, M. Gardès-Albert, D. Jore, A. Legrand, J. Peynet, and M. P. Vasson. 2003. "An Intracellular Modulation of Free Radical Production Could Contribute to the Beneficial Effects of Metformin towards Oxidative Stress." *Metabolism* 52 (5): 586–89. doi:10.1053/meta.2003.50093.

Bonnin, Cécile, Myriam Matoga, Nicolas Garnier, Claude Debroche, Bruno de Vandière, and Pierre Chaminade. 2007. "224 Nm Deep-UV Laser for Native Fluorescence, a New Opportunity for Biomolecules Detection." *Journal of Chromatography. A* 1156 (1-2): 94–100. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.094.

Bortolotti, Murielle, Luc Tappy, and Philippe Schneiter. 2007. "Fish Oil Supplementation Does Not Alter Energy Efficiency in Healthy Males." *Clinical Nutrition (Edinburgh, Scotland)* 26 (2): 225–30. doi:10.1016/j.clnu.2006.11.006.

Bouloumie, A., T. Marumo, M. Lafontan, and R. Busse. 1999a. "Leptin Induces Oxidative Stress in Human Endothelial Cells." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13 (10): 1231–38.

Bouloumié, Anne, Takeshi Marumo, Max Lafontan, and Rudi Busse. 1999. "Leptin Induces Oxidative Stress in Human Endothelial Cells." *The FASEB Journal* 13 (10): 1231–38.

Bourgeais, Jérome, Valérie Gouilleux-Gruart, and Fabrice Gouilleux. 2013a. "Oxidative Metabolism in Cancer." *JAK-STAT* 2 (4). doi:10.4161/jkst.25764.

Bråkenhielm, Ebba, Niina Veitonmäki, Renhai Cao, Shinji Kihara, Yuji Matsuzawa, Boris Zhivotovsky, Tohru Funahashi, and Yihai Cao. 2004. "Adiponectin-Induced Antiangiogenesis and Antitumor Activity Involve Caspase-Mediated Endothelial Cell Apoptosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (8): 2476–81.

Brandes, Ralf P., and Jörg Kreuzer. 2005. "Vascular NADPH Oxidases: Molecular Mechanisms of Activation." *Cardiovascular Research* 65 (1): 16–27. doi:10.1016/j.cardiores.2004.08.007.

Brandt, Piet A. van den, Donna Spiegelman, Shiaw-Shyuan Yaun, Hans-Olov Adami, Lawrence Beeson, Aaron R. Folsom, Gary Fraser, et al. 2000. "Pooled Analysis of Prospective Cohort Studies on Height, Weight, and Breast Cancer Risk." *American Journal of Epidemiology* 152 (6): 514–27. doi:10.1093/aje/152.6.514.

Briancon, Nadege, David E. McNay, Eleftheria Maratos-Flier, and Jeffrey S. Flier. 2010. "Combined Neural Inactivation of Suppressor of Cytokine Signaling-3 and Protein-Tyrosine Phosphatase-1B Reveals Additive, Synergistic, and Factor-Specific Roles in the Regulation of Body Energy Balance." *Diabetes* 59 (12): 3074–84. doi:10.2337/db10-0481.

Brunner, L., H. P. Nick, F. Cumin, M. Chiesi, H. P. Baum, S. Whitebread, A. Stricker-Krongrad, and N. Levens. 1997. "Leptin Is a Physiologically Important Regulator of Food Intake." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 21 (12): 1152–60.

Burks, D. J., J. Font de Mora, M. Schubert, D. J. Withers, M. G. Myers, H. H. Towery, S. L. Altamuro, C. L. Flint, and M. F. White. 2000. "IRS-2 Pathways Integrate Female Reproduction and Energy Homeostasis." *Nature* 407 (6802): 377–82. doi:10.1038/35030105.

Burton, D. R. 1990. "Antibody: The Flexible Adaptor Molecule." *Trends in Biochemical Sciences* 15 (2): 64–69.

Busso, Nathalie, Alexander So, Véronique Chobaz-Péclat, Carole Morard, Eduardo Martinez-Soria, Dominique Talabot-Ayer, and Cem Gabay. 2002. "Leptin Signaling Deficiency Impairs Humoral and Cellular Immune Responses and Attenuates Experimental Arthritis." *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 168 (2): 875–82.

Butturini, Elena, Elena Darra, Giulia Chiavegato, Barbara Cellini, Flora Cozzolino, Maria Monti, Piero Pucci, Daniele Dell'Orco, and Sofia Mariotto. 2014. "S-Glutathionylation at Cys328 and Cys542 Impairs STAT3 Phosphorylation." *ACS Chemical Biology*, June. doi:10.1021/cb500407d.

Buyse, Marion, Iradj Sobhani, and André Bado. 2002. "Leptine, Obésité et Tractus Gastro-Intestinal." *Hépato-Gastro & Oncologie Digestive* 9 (4): 309–16.

Buyse, M., F. Berlioz, S. Guilmeau, A. Tsocas, T. Voisin, G. Péranzi, D. Merlin, et al. 2001. "PepT1-Mediated Epithelial Transport of Dipeptides and Cephalexin Is Enhanced by Luminal Leptin in the Small Intestine." *The Journal of Clinical Investigation* 108 (10): 1483–94. doi:10.1172/JCI13219.

Caldefie-Chézet, F., M. Damez, M. de Latour, G. Konska, F. Mishellani, C. Fusillier, M. Guerry, F. Penault-Llorca, J. Guillot, and M.-P. Vasson. 2005. "Leptin: A Proliferative Factor for Breast Cancer? Study on Human Ductal Carcinoma." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 334 (3): 737–41. doi:10.1016/j.bbrc.2005.06.077.

Caldefie-Chezet, F., A. Poulin, A. Tridon, B. Sion, and M. P. Vasson. 2001. "Leptin: A Potential Regulator of Polymorphonuclear Neutrophil Bactericidal Action?" *Journal of Leukocyte Biology* 69 (3): 414–18.

Calle, Eugenia E., Carmen Rodriguez, Kimberly Walker-Thurmond, and Michael J. Thun. 2003. "Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults." *The New England Journal of Medicine* 348 (17): 1625–38. doi:10.1056/NEJMoa021423.

Campfield, L. A., F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn. 1995. "Recombinant Mouse OB Protein: Evidence for a Peripheral Signal Linking Adiposity and Central Neural Networks." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5223): 546–49.

Cancello, Raffaella, Corneliu Henegar, Nathalie Viguerie, Soraya Taleb, Christine Poitou, Christine Rouault, Muriel Coupaye, et al. 2005. "Reduction of Macrophage Infiltration and Chemoattractant Gene Expression Changes in White Adipose Tissue of Morbidly Obese Subjects after Surgery-Induced Weight Loss." *Diabetes* 54 (8): 2277–86.

Cao, Lei, Eugene Y. Choi, Xianglan Liu, Adam Martin, Chuansong Wang, Xiaohua Xu, and Matthew J. During. 2011. "White to Brown Fat Phenotypic Switch Induced by Genetic and Environmental Activation of a Hypothalamic-Adipocyte Axis." *Cell Metabolism* 14 (3): 324–38. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.020.

Cao, Lei, Xianglan Liu, En-Ju D. Lin, Chuansong Wang, Eugene Y. Choi, Veronique Riban, Benjamin Lin, and Matthew J. During. 2010. "Environmental and Genetic Activation of a Brain-Adipocyte BDNF/leptin Axis Causes Cancer Remission and Inhibition." *Cell* 142 (1): 52–64. doi:10.1016/j.cell.2010.05.029.

Cardillo, S., P. Seshadri, and N. Iqbal. 2006. "The Effects of a Low-Carbohydrate versus Low-Fat Diet on Adipocytokines in Severely Obese Adults: Three-Year Follow-up of a Randomized Trial." *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 10 (3): 99–106.

Carpenter, Catherine L., Ronald K. Ross, Annlia Paganini-Hill, and Leslie Bernstein. 2003. "Effect of Family History, Obesity and Exercise on Breast Cancer Risk among Postmenopausal Women." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 106 (1): 96–102. doi:10.1002/ijc.11186.

Carro, E., R. M. Señarís, F. Mallo, and C. Diéguez. 1999. "Regulation of Hypothalamic Somatostatin and Growth Hormone Releasing Hormone mRNA Levels by Inhibin." *Brain Research. Molecular Brain Research* 66 (1-2): 191–94.

Carroll, Paul A., Laura Healy, Joanne Lysaght, Terry Boyle, John V. Reynolds, M. John Kennedy, Graham Pidgeon, and Elizabeth M. Connolly. 2011. "Influence of the Metabolic Syndrome on Leptin and Leptin Receptor in Breast Cancer." *Molecular Carcinogenesis* 50 (8): 643–51. doi:10.1002/mc.20764.

Catalano, Stefania, Stefania Marsico, Cinzia Giordano, Loredana Mauro, Pietro Rizza, Maria Luisa Panno, and Sebastiano Andò. 2003. "Leptin Enhances, via AP-1, Expression of Aromatase in the MCF-7 Cell Line." *Journal of Biological Chemistry* 278 (31): 28668–76. doi:10.1074/jbc.M301695200.

Catalano, Stefania, Loredana Mauro, Stefania Marsico, Cinzia Giordano, Pietro Rizza, Vittoria Rago, Daniela Montanaro, Marcello Maggiolini, Maria Luisa Panno, and Sebastiano Andó. 2004. "Leptin Induces, via ERK1/ERK2 Signal, Functional Activation of Estrogen Receptor Alpha in MCF-7 Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (19): 19908–15. doi:10.1074/jbc.M313191200.

Cava, Antonio La, and Giuseppe Matarese. 2004. "The Weight of Leptin in Immunity." *Nature Reviews Immunology* 4 (5): 371–79. doi:10.1038/nri1350.

Cave, Alison C, Alison C Brewer, Anilkumar Narayanapanicker, Robin Ray, David J Grieve, Simon Walker, and Ajay M Shah. 2006a. "NADPH Oxidases in Cardiovascular Health and Disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (5-6): 691–728. doi:10.1089/ars.2006.8.691.

Cave, Alison C., Alison C. Brewer, Anilkumar Narayanapanicker, Robin Ray, David J. Grieve, Simon Walker, and Ajay M. Shah. 2006b. "NADPH Oxidases in Cardiovascular Health and Disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 8 (5-6): 691–728. doi:10.1089/ars.2006.8.691.

Ceddia, R B. 2005. "Direct Metabolic Regulation in Skeletal Muscle and Fat Tissue by Leptin: Implications for Glucose and Fatty Acids Homeostasis." *International Journal of Obesity (2005)* 29 (10): 1175–83. doi:10.1038/sj.ijo.0803025.

Cereser, C, J Guichard, J Drai, E Bannier, I Garcia, S Boget, P Parvaz, and A Revol. 2001a. "Quantitation of Reduced and Total Glutathione at the Femtomole Level by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Application to Red Blood Cells and Cultured Fibroblasts." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 752 (1): 123–32.

Cereser, C., J. Guichard, J. Drai, E. Bannier, I. Garcia, S. Boget, P. Parvaz, and A. Revol. 2001b. "Quantitation of Reduced and Total Glutathione at the Femtomole Level by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection: Application to Red Blood Cells and Cultured Fibroblasts." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Sciences and Applications* 752 (1): 123–32.

Chacón, Reinaldo D, and María V Costanzo. 2010a. “Triple-Negative Breast Cancer.” *Breast Cancer Research: BCR* 12 Suppl 2: S3. doi:10.1186/bcr2574.

Chacón, Reinaldo D., and María V. Costanzo. 2010b. “Triple-Negative Breast Cancer.” *Breast Cancer Research: BCR* 12 Suppl 2: S3. doi:10.1186/bcr2574.

Chalasani, Naga, David W. Crabb, Oscar W. Cummings, Paul Y. Kwo, Ali Asghar, Prashant K. Pandya, and Robert V. Considine. 2003. “Does Leptin Play a Role in the Pathogenesis of Human Nonalcoholic Steatohepatitis?” *The American Journal of Gastroenterology* 98 (12): 2771–76. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.08767.x.

Chan, Elsa C., Fan Jiang, Hitesh M. Peshavariya, and Gregory J. Dusting. 2009. “Regulation of Cell Proliferation by NADPH Oxidase-Mediated Signaling: Potential Roles in Tissue Repair, Regenerative Medicine and Tissue Engineering.” *Pharmacology & Therapeutics* 122 (2): 97–108. doi:10.1016/j.pharmthera.2009.02.005.

Chapman, I. M., G. A. Wittert, and R. J. Norman. 1997. “Circulating Leptin Concentrations in Polycystic Ovary Syndrome: Relation to Anthropometric and Metabolic Parameters.” *Clinical Endocrinology* 46 (2): 175–81.

Chatterjee, Saurabh, Douglas Ganini, Erik J. Tokar, Ashutosh Kumar, Suvarthi Das, Jean Corbett, Maria B. Kadiiska, Michael P. Waalkes, Anna Mae Diehl, and Ronald P. Mason. 2013. “Leptin Is Key to Peroxynitrite-Mediated Oxidative Stress and Kupffer Cell Activation in Experimental Non-Alcoholic Steatohepatitis.” *Journal of Hepatology* 58 (4): 778–84. doi:10.1016/j.jhep.2012.11.035.

Chen, Da-Chung, Yueh-Fang Chung, Yao-Tsug Yeh, Hso-Chi Chaung, Fu-Chen Kuo, Ou-Yang Fu, Hue-Yong Chen, Ming-Feng Hou, and Shyng-Shou F. Yuan. 2006. “Serum Adiponectin and Leptin Levels in Taiwanese Breast Cancer Patients.” *Cancer Letters* 237 (1): 109–14. doi:10.1016/j.canlet.2005.05.047.

Chen, Feng, Yanfang Yu, Steven Haigh, John Johnson, Rudolf Lucas, David W. Stepp, and David J. R. Fulton. 2014a. “Regulation of NADPH Oxidase 5 by Protein Kinase C Isoforms.” *PloS One* 9 (2): e88405. doi:10.1371/journal.pone.0088405.

Cheng, G., Z. Cao, X. Xu, E. G. van Meir, and J. D. Lambeth. 2001. “Homologs of gp91phox: Cloning and Tissue Expression of Nox3, Nox4, and Nox5.” *Gene* 269 (1-2): 131–40.

Cheng, W H, Y S Ho, D A Ross, Y Han, G F Combs Jr, and X G Lei. 1997. “Overexpression of Cellular Glutathione Peroxidase Does Not Affect Expression of Plasma Glutathione Peroxidase or Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Mice Offered Diets Adequate or Deficient in Selenium.” *The Journal of Nutrition* 127 (5): 675–80.

Chen, Yahong, and Ruxiu Cai. 2003. “Study and Analytical Application of Inhibitory Effect of Captopril on Multienzyme Redox System.” *Talanta* 61 (6): 855–61. doi:10.1016/S0039-9140(03)00370-9.

Chitturi, Shivakumar, Geoffrey Farrell, Linda Frost, Adamandia Kriketos, Rita Lin, Caroline Fung, Christopher Liddle, Dev Samarasinghe, and Jacob George. 2002. “Serum Leptin in NASH Correlates with Hepatic Steatosis but Not Fibrosis: A Manifestation of Lipotoxicity?” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 36 (2): 403–9. doi:10.1053/jhep.2002.34738.

Chlebowski, Rowan T., Nananda Col, Eric P. Winer, Deborah E. Collyar, Steven R. Cummings, Victor G. Vogel, Harold J. Burstein, et al. 2002. “American Society of Clinical Oncology Technology Assessment of Pharmacologic Interventions for Breast Cancer Risk Reduction Including Tamoxifen, Raloxifene, and Aromatase Inhibition.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 20 (15): 3328–43.

Choi, Won Hee, Min Young Um, Jiyun Ahn, Chang Hwa Jung, and Tae Youl Ha. 2014. “Long-Term Intake of Rice Improves Insulin Sensitivity in Mice Fed a High-Fat Diet.” *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 30 (7-8): 920–27. doi:10.1016/j.nut.2013.12.021.

Chua, S. C., I. K. Koutras, L. Han, S. M. Liu, J. Kay, S. J. Young, W. K. Chung, and R. L. Leibel. 1997. “Fine Structure of the Murine Leptin Receptor Gene: Splice Site Suppression Is Required to Form Two Alternatively Spliced Transcripts.” *Genomics* 45 (2): 264–70. doi:10.1006/geno.1997.4962.

Chudek, Jerzy, and Andrzej Wiecek. 2006. “Adipose Tissue, Inflammation and Endothelial Dysfunction.” *Pharmacological Reports: PR* 58 Suppl: 81–88.

Chung, H., Y. S. Lee, R. Mayoral, D. Y. Oh, J. T. Siu, N. J. Webster, D. D. Sears, J. M. Olefsky, and L. G. Ellies. 2014. “Omega-3 Fatty Acids Reduce Obesity-Induced Tumor Progression Independent of GPR120 in a Mouse Model of Postmenopausal Breast Cancer.” *Oncogene*, September. doi:10.1038/onc.2014.283.

Cinti, S., R. D. Matteis, C. Picó, E. Ceresi, A. Obrador, C. Maffeis, J. Oliver, and A. Palou. 2000. “Secretory Granules of Endocrine and Chief Cells of Human Stomach Mucosa Contain Leptin.” *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 24 (6): 789–93.

Cioffi, J. A., A. W. Shafer, T. J. Zupancic, J. Smith-Gbur, A. Mikhail, D. Platika, and H. R. Snodgrass. 1996. "Novel B219/OB Receptor Isoforms: Possible Role of Leptin in Hematopoiesis and Reproduction." *Nature Medicine* 2 (5): 585–89.

Cirillo, Donatella, Anna Maria Rachiglio, Raffaele la Montagna, Antonio Giordano, and Nicola Normanno. 2008. "Leptin Signaling in Breast Cancer: An Overview." *Journal of Cellular Biochemistry* 105 (4): 956–64. doi:10.1002/jcb.21911.

Cleary, Margot P., Frederick C. Phillips, Susan C. Getzin, Tina L. Jacobson, Michelle K. Jacobson, Trace A. Christensen, Subhash C. Juneja, Joseph P. Grande, and Nita J. Maihle. 2003. "Genetically Obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) Female Mice Do Not Develop Mammary Tumors." *Breast Cancer Research and Treatment* 77 (3): 205–15.

Cleary, Margot P., Amitabha Ray, Olga P. Rogozina, Soner Dogan, and Michael E. Grossmann. 2009a. "Targeting the Adiponectin:leptin Ratio for Postmenopausal Breast Cancer Prevention." *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)* 1: 329–57.

Cleary, M. P., J. P. Grande, and N. J. Maihle. 2004. "Effect of High Fat Diet on Body Weight and Mammary Tumor Latency in MMTV-TGF-Alpha Mice." *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity* 28 (8): 956–62. doi:10.1038/sj.ijo.0802664.

Clément, Karine, Christian Vaisse, Najiba Lahlou, Sylvie Cabrol, Veronique Pelloux, Dominique Cassuto, Micheline Gourmelen, et al. 1998. "A Mutation in the Human Leptin Receptor Gene Causes Obesity and Pituitary Dysfunction." *Nature* 392 (6674): 398–401. doi:10.1038/32911.

Cohen, Steven L., Jeffrey L. Halaas, Jeffrey M. Friedman, Brian T. Chait, Larry Bennett, David Chang, Randy Hecht, and Frank Collins. 1996. "Human Leptin Characterization." *Nature* 382 (6592): 589–589. doi:10.1038/382589a0.

Coleman, D. L. 1978. "Obese and Diabetes: Two Mutant Genes Causing Diabetes-Obesity Syndromes in Mice." *Diabetologia* 14 (3): 141–48.

Coleman, D. L., and D. L. Burkart. 1977. "Plasma Corticosterone Concentrations in Diabetic (db) Mice." *Diabetologia* 13 (1): 25–26.

Coll, Anthony P., I. Sadaf Farooqi, and Stephen O'Rahilly. 2007. "The Hormonal Control of Food Intake." *Cell* 129 (2): 251–62. doi:10.1016/j.cell.2007.04.001.

Comhair, Suzy A. A., and Serpil C. Erzurum. 2002. "Antioxidant Responses to Oxidant-Mediated Lung Diseases." *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 283 (2): L246–55. doi:10.1152/ajplung.00491.2001.

Considine, R. V., and J. F. Caro. 1996. "Leptin in Humans: Current Progress and Future Directions." *Clinical Chemistry* 42 (6): 843–44.

Cornette, J. C., K. T. Kirton, W. P. Schneider, F. F. Sun, R. A. Johnson, and E. G. Nidy. 1975. "Preparation and Quantitation of Urinary Metabolites of Prostaglandin F2alpha by Radioimmunoassay." *Prostaglandins* 9 (2): 323–38.

Cowley, M. A., J. L. Smart, M. Rubinstein, M. G. Cerdán, S. Diano, T. L. Horvath, R. D. Cone, and M. J. Low. 2001. "Leptin Activates Anorexigenic POMC Neurons through a Neural Network in the Arcuate Nucleus." *Nature* 411 (6836): 480–84. doi:10.1038/35078085.

Croce, A. C., and G. Bottiroli. 2014. "Autofluorescence Spectroscopy and Imaging: A Tool for Biomedical Research and Diagnosis." *European Journal of Histochemistry: EJH* 58 (4): 2461. doi:10.4081/ejh.2014.2461.

Cui, R., M. Gao, S. Qu, and D. Liu. 2014. "Overexpression of Superoxide Dismutase 3 Gene Blocks High-Fat Diet-Induced Obesity, Fatty Liver and Insulin Resistance." *Gene Therapy* 21 (9): 840–48. doi:10.1038/gt.2014.64.

Cumin, F., H. P. Baum, and N. Levens. 1997. "Mechanism of Leptin Removal from the Circulation by the Kidney." *The Journal of Endocrinology* 155 (3): 577–85.

Curado, María Paula. 2011. "Breast Cancer in the World: Incidence and Mortality." *Salud Pública De México* 53 (5): 372–84.

Daff, S. 2003. "Calmodulin-Dependent Regulation of Mammalian Nitric Oxide Synthase." *Biochemical Society Transactions* 31 (Pt 3): 502–5. doi:10.1042/.

Daff, Simon. 2010. "NO Synthase: Structures and Mechanisms." *Nitric Oxide* 23 (1): 1–11. doi:10.1016/j.niox.2010.03.001.

Dailey, Christopher A., Nicolas Garnier, Stanislav S. Rubakhin, and Jonathan V. Sweedler. 2013. "Automated Method for Analysis of Tryptophan and Tyrosine Metabolites Using Capillary Electrophoresis with Native Fluorescence Detection." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (8): 2451–59. doi:10.1007/s00216-012-6685-0.

Darblade, B., C. Privat, D. Caillaud, J. Rami, and J. F. Arnal. 2000. "[Clinical and biological investigation of NO]." *Journal De La Société De Biologie* 194 (3-4): 151–57.

Dattaroy, Diptadip, Sahar Pourhoseini, Suvarthi Das, Firas Alhasson, Ratanesh Kumar Seth, Mitzi Nagarkatti, Gregory A. Michelotti, Anna Mae Diehl, and Saurabh Chatterjee. 2014. "Micro RNA 21 Inhibition of SMAD 7 Enhances Fibrogenesis via Leptin Mediated NADPH Oxidase in Experimental and Human Nonalcoholic Steatohepatitis." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, December, ajpgi.00346.2014. doi:10.1152/ajpgi.00346.2014.

De Boer, Jan Freark, Arne Dikkers, Angelika Jurdzinski, Johann von Felden, Matthias Gaestel, Udo Bavendiek, and Uwe J. F. Tietge. 2014. "Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase 2 Deficiency Reduces Insulin Sensitivity in High-Fat Diet-Fed Mice." *PloS One* 9 (9): e106300. doi:10.1371/journal.pone.0106300.

De Kort, Bregje J, Gerhardus J de Jong, and Govert W Somsen. 2013. "Native Fluorescence Detection of Biomolecular and Pharmaceutical Compounds in Capillary Electrophoresis: Detector Designs, Performance and Applications: A Review." *Analytica Chimica Acta* 766 (March): 13–33. doi:10.1016/j.aca.2012.12.006.

Delledonne, M, J Zeier, A Marocco, and C Lamb. 2001. "Signal Interactions between Nitric Oxide and Reactive Oxygen Intermediates in the Plant Hypersensitive Disease Resistance Response." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (23): 13454–59. doi:10.1073/pnas.231178298.

De Luis, D. A., R. Aller, O. Izaola, M. Gonzalez Sagrado, D. Bellioo, and R. Conde. 2007. "Effects of a Low-Fat versus a Low-Carbohydrate Diet on Adipocytokines in Obese Adults." *Hormone Research* 67 (6): 296–300. doi:10.1159/000099329.

Demchenko, A. P. 2012. "The Change of Cellular Membranes on Apoptosis: Fluorescence Detection." *Experimental Oncology* 34 (3): 263–68.

Desgorces, François Denis, Mounir Chennaoui, Danielle Gomez-Merino, Catherine Drogou, and Charles Yannick Guezennec. 2004. "Leptin Response to Acute Prolonged Exercise after Training in Rowers." *European Journal of Applied Physiology* 91 (5-6): 677–81. doi:10.1007/s00421-003-1030-0.

De Vos, P., A. M. Lefebvre, S. G. Miller, M. Guerre-Millo, K. Wong, R. Saladin, L. G. Hamann, B. Staels, M. R. Briggs, and J. Auwerx. 1996. "Thiazolidinediones Repress Ob Gene Expression in Rodents via Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma." *The Journal of Clinical Investigation* 98 (4): 1004–9. doi:10.1172/JCI118860.

Devos, R., Y. Guisez, J. Van der Heyden, D. W. White, M. Kalai, M. Fountoulakis, and G. Plaetinck. 1997. "Ligand-Independent Dimerization of the Extracellular Domain of the Leptin Receptor and Determination of the Stoichiometry of Leptin Binding." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (29): 18304–10.

De Waziers, I., P. H. Cugnenc, C. S. Yang, J. P. Leroux, and P. H. Beaune. 1990. "Cytochrome P 450 Isoenzymes, Epoxide Hydrolase and Glutathione Transferases in Rat and Human Hepatic and Extrahepatic Tissues." *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 253 (1): 387–94.

Dieudonne, Marie-Noelle, Florence Machinal-Quelin, Valérie Serazin-Leroy, Marie-Christine Leneveu, René Pecquery, and Yves Giudicelli. 2002. "Leptin Mediates a Proliferative Response in Human MCF7 Breast Cancer Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 293 (1): 622–28. doi:10.1016/S0006-291X(02)00205-X.

Directive 96/29/Euratom. 1996. *Journal Officiel*. Vol. n° L 159.

Dirlewanger, M., V. Di Vetta, V. Giusti, P. Schneiter, E. Jéquier, and L. Tappy. 1999. "Effect of Moderate Physical Activity on Plasma Leptin Concentration in Humans." *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology* 79 (4): 331–35.

Doucet, E., S. St-Pierre, N. Alméras, P. Mauriège, J. P. Després, D. Richard, C. Bouchard, A. Tremblay, and Quebec Family Study. 2000. "Fasting Insulin Levels Influence Plasma Leptin Levels Independently from the Contribution of Adiposity: Evidence from Both a Cross-Sectional and an Intervention Study." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (11): 4231–37. doi:10.1210/jcem.85.11.6980.

Duan, Xiao-Feng, Peng Tang, Qiang Li, and Zhen-Tao Yu. 2013. "Obesity, Adipokines and Hepatocellular Carcinoma." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 133 (8): 1776–83. doi:10.1002/ijc.28105.

Dubois, Virginie, Thierry Jardé, Laetitia Delort, Hermine Billard, Dominique Bernard-Gallon, Emmanuelle Berger, Alain Geloen, Marie-Paule Vasson, and Florence Caldefie-Chezet. 2014. "Leptin Induces a Proliferative Response in Breast Cancer Cells but Not in Normal Breast Cells." *Nutrition and Cancer* 66 (4): 645–55. doi:10.1080/01635581.2014.894104.

Dubois, Virginie, Thierry Jardé, Delort Laetitia, Hermine Billard, Dominique Bernard-Gallon, Emmanuelle Berger, Alain Geloen, Marie-Paule Vasson, and Florence Caldefie-Chezet. 2014. "Leptin Induces a Proliferative Response in Breast Cancer Cells but Not in Normal Breast Cells." *Nutrition and Cancer*, April, 1–11. doi:10.1080/01635581.2014.894104.

Dubuc, G. R., S. D. Phinney, J. S. Stern, and P. J. Havel. 1998. “Changes of Serum Leptin and Endocrine and Metabolic Parameters after 7 Days of Energy Restriction in Men and Women.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 47 (4): 429–34.

Duclos, M., J. B. Corcuff, A. Ruffie, P. Roger, and G. Manier. 1999. “Rapid Leptin Decrease in Immediate Post-Exercise Recovery.” *Clinical Endocrinology* 50 (3): 337–42.

Dudal, Sherri, Daniel Baltrukonis, Rebecca Crisino, M. Jaya Goyal, Alison Joyce, Karolina Osterlund, John Smeraglia, Yoshitaka Taniguchi, and Jihong Yang. 2014. “Assay Formats: Recommendation for Best Practices and Harmonization from the Global Bioanalysis Consortium Harmonization Team.” *The AAPS Journal* 16 (2): 194–205. doi:10.1208/s12248-013-9552-9.

Dudley, Ed. 2014. “MALDI Profiling and Applications in Medicine.” *Advances in Experimental Medicine and Biology* 806: 33–58. doi:10.1007/978-3-319-06068-2_2.

Dunn, Sarah L., Marie Björnholm, Sarah H. Bates, Zhibin Chen, Matthew Seifert, and Martin G. Myers. 2005. “Feedback Inhibition of Leptin receptor/Jak2 Signaling via Tyr1138 of the Leptin Receptor and Suppressor of Cytokine Signaling 3.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 19 (4): 925–38. doi:10.1210/me.2004-0353.

Dwiecki, Krzysztof, Grażyna Neunert, Małgorzata Nogala-Kałucka, and Krzysztof Polewski. 2015. “Fluorescence Quenching Studies on the Interaction of Catechin-Quinone with CdTe Quantum Dots. Mechanism Elucidation and Feasibility Studies.” *Spectrochimica Acta. Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 149 (May): 523–30. doi:10.1016/j.saa.2015.04.100.

Elmquist, J. K., C. F. Elias, and C. B. Saper. 1999. “From Lesions to Leptin: Hypothalamic Control of Food Intake and Body Weight.” *Neuron* 22 (2): 221–32.

Emilsson, V., Y. L. Liu, M. A. Cawthorne, N. M. Morton, and M. Davenport. 1997. “Expression of the Functional Leptin Receptor mRNA in Pancreatic Islets and Direct Inhibitory Action of Leptin on Insulin Secretion.” *Diabetes* 46 (2): 313–16.

Enerbäck, S., A. Jacobsson, E. M. Simpson, C. Guerra, H. Yamashita, M. E. Harper, and L. P. Kozak. 1997. “Mice Lacking Mitochondrial Uncoupling Protein Are Cold-Sensitive but Not Obese.” *Nature* 387 (6628): 90–94. doi:10.1038/387090a0.

Epplein, Meira, Ying Zheng, Wei Zheng, Zhi Chen, Kai Gu, David Penson, Wei Lu, and Xiao-Ou Shu. 2011. “Quality of Life after Breast Cancer Diagnosis and Survival.” *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29 (4): 406–12. doi:10.1200/JCO.2010.30.6951.

Eskra, J. D., L. Levine, and T. J. Carty. 1980. “Preparation of [3H]-12-L-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and Its Use in Radioimmunoassay.” *Prostaglandins and Medicine* 5 (3): 201–7.

Esposito, K, M Ciotola, B Schisano, L Misso, G Giannetti, A Ceriello, and D Giugliano. 2006a. “Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome.” *Journal of Endocrinological Investigation* 29 (9): 791–95.

Esposito, K., M. Ciotola, B. Schisano, L. Misso, G. Giannetti, A. Ceriello, and D. Giugliano. 2006b. “Oxidative Stress in the Metabolic Syndrome.” *Journal of Endocrinological Investigation* 29 (9): 791–95. doi:10.1007/BF03347372.

Essig, David A., Nathan L. Alderson, Michael A. Ferguson, William P. Bartoli, and J. Larry Durstine. 2000. “Delayed Effects of Exercise on the Plasma Leptin Concentration.” *Metabolism* 49 (3): 395–99. doi:10.1016/S0026-0495(00)90396-2.

Even, Patrick C., and Nachiket A. Nadkarni. 2012. “Indirect Calorimetry in Laboratory Mice and Rats: Principles, Practical Considerations, Interpretation and Perspectives.” *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303 (5): R459–76. doi:10.1152/ajpregu.00137.2012.

Faggioni, R., G. Fantuzzi, C. Gabay, A. Moser, C. A. Dinarello, K. R. Feingold, and C. Grunfeld. 1999. “Leptin Deficiency Enhances Sensitivity to Endotoxin-Induced Lethality.” *The American Journal of Physiology* 276 (1 Pt 2): R136–42.

Faggioni, R., K. R. Feingold, and C. Grunfeld. 2001. “Leptin Regulation of the Immune Response and the Immunodeficiency of Malnutrition.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (14): 2565–71. doi:10.1096/fj.01-0431rev.

Fain, John N., Atul K. Madan, M. Lloyd Hiler, Paramjeet Cheema, and Suleiman W. Bahouth. 2004. “Comparison of the Release of Adipokines by Adipose Tissue, Adipose Tissue Matrix, and Adipocytes from Visceral and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissues of Obese Humans.” *Endocrinology* 145 (5): 2273–82. doi:10.1210/en.2003-1336.

Fantuzzi, G., and R. Faggioni. 2000. “Leptin in the Regulation of Immunity, Inflammation, and Hematopoiesis.” *Journal of Leukocyte Biology* 68 (4): 437–46.

Fantuzzi, Giamila. 2005. “Adipose Tissue, Adipokines, and Inflammation.” *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 115 (5): 911–19; quiz 920. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.023.

Farges, Marie-Chantal, Bruno Lamas, Sinda Mahbouli, Ahmad Khalil, and Marie-Paule Vasson. 2015. "La Leptine : Un Modulateur de L'activité Des Cellules Natural Killer ?" *Nutrition Clinique et Métabolisme* 29 (1): 12–25. doi:10.1016/j.nupar.2014.10.002.

Farooqi, I. Sadaf, and Stephen O'Rahilly. 2009. "Leptin: A Pivotal Regulator of Human Energy Homeostasis." *The American Journal of Clinical Nutrition* 89 (3): 980S – 984S. doi:10.3945/ajcn.2008.26788C.

Fehmann, H. C., P. Berghöfer, D. Brandhorst, H. Brandhorst, B. Hering, R. G. Bretzel, and B. Göke. 1997. "Leptin Inhibition of Insulin Secretion from Isolated Human Islets." *Acta Diabetologica* 34 (4): 249–52.

Fei, H., H. J. Okano, C. Li, G. H. Lee, C. Zhao, R. Darnell, and J. M. Friedman. 1997. "Anatomic Localization of Alternatively Spliced Leptin Receptors (Ob-R) in Mouse Brain and Other Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (13): 7001–5.

Fei, Hong, Hirotaka J. Okano, Cai Li, Gwo-Hwa Lee, Connie Zhao, Robert Darnell, and Jeffrey M. Friedman. 1997. "Anatomic Localization of Alternatively Spliced Leptin Receptors (Ob-R) in Mouse Brain and Other Tissues." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (13): 7001–5.

Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. 1989. "Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules." *Science (New York, N.Y.)* 246 (4926): 64–71.

Ferlay, Jacques, Hai-Rim Shin, Freddie Bray, David Forman, Colin Mathers, and Donald Maxwell Parkin. 2010. "Estimates of Worldwide Burden of Cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 127 (12): 2893–2917. doi:10.1002/ijc.25516.

Fernández-Sánchez, Alba, Eduardo Madrigal-Santillán, Mirandeli Bautista, Jaime Esquivel-Soto, Angel Morales-González, Cesar Esquivel-Chirino, Irene Durante-Montiel, Graciela Sánchez-Rivera, Carmen Valadez-Vega, and José A Morales-González. 2011. "Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity." *International Journal of Molecular Sciences* 12 (5): 3117–32. doi:10.3390/ijms12053117.

Fili, Natalia, and Christopher P. Toseland. 2014. "Fluorescence and Labelling: How to Choose and What to Do." *EXS* 105: 1–24. doi:10.1007/978-3-0348-0856-9_1.

Finck, B. N., K. W. Kelley, R. Dantzer, and R. W. Johnson. 1998. "In Vivo and in Vitro Evidence for the Involvement of Tumor Necrosis Factor-Alpha in the Induction of Leptin by Lipopolysaccharide." *Endocrinology* 139 (5): 2278–83. doi:10.1210/endo.139.5.6012.

Finkel, T., and N. J. Holbrook. 2000. "Oxidants, Oxidative Stress and the Biology of Ageing." *Nature* 408 (6809): 239–47. doi:10.1038/35041687.

Fischmann, T. O., A. Hruza, X. D. Niu, J. D. Fossetta, C. A. Lunn, E. Dolphin, A. J. Prongay, et al. 1999. "Structural Characterization of Nitric Oxide Synthase Isoforms Reveals Striking Active-Site Conservation." *Nature Structural Biology* 6 (3): 233–42. doi:10.1038/6675.

Flier, J. S., M. Harris, and A. N. Hollenberg. 2000. "Leptin, Nutrition, and the Thyroid: The Why, the Wherefore, and the Wiring." *The Journal of Clinical Investigation* 105 (7): 859–61. doi:10.1172/JCI9725.

Flier, J. S., and E. Maratos-Flier. 1998. "Obesity and the Hypothalamus: Novel Peptides for New Pathways." *Cell* 92 (4): 437–40.

Flourie, F., K. Arab, A. Rossary, and J. -P. Steghens. 2006. "Effets de Différents Antioxydants Sur La Lipoperoxydation in Vitro Initiée Par Le Radical °OH." *Immuno-Analyse & Biologie Spécialisée* 21 (4): 229–33. doi:10.1016/j.immbio.2006.03.001.

Formoso, Gloria, Merilda Taraborrelli, Maria T. Guagnano, Monica D'Adamo, Natalia Di Pietro, Armando Tartaro, and Agostino Consoli. 2012. "Magnetic Resonance Imaging Determined Visceral Fat Reduction Associates with Enhanced IL-10 Plasma Levels in Calorie Restricted Obese Subjects." *PloS One* 7 (12): e52774. doi:10.1371/journal.pone.0052774.

Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Löllmann, B. B. Lowell, and J. S. Flier. 1995. "Leptin Levels Reflect Body Lipid Content in Mice: Evidence for Diet-Induced Resistance to Leptin Action." *Nature Medicine* 1 (12): 1311–14.

Friedenreich, Christine M., Heather K. Neilson, Christy G. Woolcott, Anne McTiernan, Qinggang Wang, Rachel Ballard-Barbash, Charlotte A. Jones, et al. 2011. "Changes in Insulin Resistance Indicators, IGFs, and Adipokines in a Year-Long Trial of Aerobic Exercise in Postmenopausal Women." *Endocrine-Related Cancer* 18 (3): 357–69. doi:10.1530/ERC-10-0303.

Friedman, Jeffrey. 2014. "20 Years of Leptin: Leptin at 20: An Overview." *The Journal of Endocrinology* 223 (1): T1–8. doi:10.1530/JOE-14-0405.

Friedman, Jeffrey M., and Christos S. Mantzoros. 2015. "20 Years of Leptin: From the Discovery of the Leptin Gene to Leptin in Our Therapeutic Armamentarium." *Metabolism: Clinical and Experimental* 64 (1): 1–4. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.023.

Frühbeck, Gema. 2006a. "Intracellular Signalling Pathways Activated by Leptin." *The Biochemical Journal* 393 (Pt 1): 7–20. doi:10.1042/BJ20051578.

Fuentes-Mattei, Enrique, Guermarie Velazquez-Torres, Liem Phan, Fanmao Zhang, Ping-Chieh Chou, Ji-Hyun Shin, Hyun Ho Choi, et al. 2014. "Effects of Obesity on Transcriptomic Changes and Cancer Hallmarks

in Estrogen Receptor–Positive Breast Cancer." *Journal of the National Cancer Institute* 106 (7): dju158. doi:10.1093/jnci/dju158.

Fujisaki, Kaoru, Hiroshi Fujimoto, Takafumi Sangai, Takeshi Nagashima, Masahiro Sakakibara, Nobumitsu Shiina, Masayuki Kuroda, Yasuyuki Aoyagi, and Masaru Miyazaki. 2015. "Cancer-Mediated Adipose Reversion Promotes Cancer Cell Migration via IL-6 and MCP-1." *Breast Cancer Research and Treatment* 150 (2): 255–63. doi:10.1007/s10549-015-3318-2.

Fujita, Y., M. Murakami, Y. Ogawa, H. Masuzaki, M. Tanaka, S. Ozaki, K. Nakao, and T. Mimori. 2002. "Leptin Inhibits Stress-Induced Apoptosis of T Lymphocytes." *Clinical and Experimental Immunology* 128 (1): 21–26.

Furberg, Anne-Sofie, Marit Bragelien Veierød, Tom Wilsgaard, Leslie Bernstein, and Inger Thune. 2004. "Serum High-Density Lipoprotein Cholesterol, Metabolic Profile, and Breast Cancer Risk." *Journal of the National Cancer Institute* 96 (15): 1152–60. doi:10.1093/jnci/djh216.

Gago-Dominguez, Manuela, and Jose Esteban Castelao. 2008. "Role of Lipid Peroxidation and Oxidative Stress in the Association between Thyroid Diseases and Breast Cancer." *Critical Reviews in Oncology/hematology* 68 (2): 107–14. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.007.

Gainsford, T., T. A. Willson, D. Metcalf, E. Handman, C. McFarlane, A. Ng, N. A. Nicola, W. S. Alexander, and D. J. Hilton. 1996. "Leptin Can Induce Proliferation, Differentiation, and Functional Activation of Hemopoietic Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (25): 14564–68.

Galic, Sandra, Jon S. Oakhill, and Gregory R. Steinberg. 2010. "Adipose Tissue as an Endocrine Organ." *Molecular and Cellular Endocrinology* 316 (2): 129–39. doi:10.1016/j.mce.2009.08.018.

Gallagher, B. M., J. S. Fowler, N. I. Gutterson, R. R. MacGregor, C. N. Wan, and A. P. Wolf. 1978. "Metabolic Trapping as a Principle of Oradiopharmaceutical Design: Some Factors Resposible for the Biodistribution of [18F] 2-Deoxy-2-Fluoro-D-Glucose." *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine* 19 (10): 1154–61.

Gamaley, I. A., and I. V. Klyubin. 1999. "Roles of Reactive Oxygen Species: Signaling and Regulation of Cellular Functions." *International Review of Cytology* 188: 203–55.

Gao, Jingchun, Jianxin Tian, Yunyi Lv, Fangxin Shi, Fandou Kong, Hong Shi, and Liyan Zhao. 2009a. "Leptin Induces Functional Activation of Cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT Pathways in Human Endometrial Cancer Cells." *Cancer Science* 100 (3): 389–95. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01053.x.

———. 2009b. "Leptin Induces Functional Activation of Cyclooxygenase-2 through JAK2/STAT3, MAPK/ERK, and PI3K/AKT Pathways in Human Endometrial Cancer Cells." *Cancer Science* 100 (3): 389–95. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.01053.x.

Garofalo, Cecilia, Mariusz Koda, Sandra Cascio, Mariola Sulkowska, Luiza Kanczuga-Koda, Jolanta Golaszewska, Antonio Russo, Stanislaw Sulkowski, and Eva Surmacz. 2006. "Increased Expression of Leptin and the Leptin Receptor as a Marker of Breast Cancer Progression: Possible Role of Obesity-Related Stimuli." *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (5): 1447–53. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1913.

Geffroy, Sandrine, Piet De Vos, Bart Staels, Bénédicte Duban, Johan Auwerx, and Bérengère de Martinville. 1995. "Localization of the Human OB Gene (OBS) to Chromosome 7q32 by Fluorescence in Situ Hybridization." *Genomics* 28 (3): 603–4. doi:10.1006/geno.1995.1201.

Geiszt, Miklós. 2006. "NADPH Oxidases: New Kids on the Block." *Cardiovascular Research* 71 (2): 289–99. doi:10.1016/j.cardiores.2006.05.004.

Ghezzi, P. 2005. "Oxidoreduction of Protein Thiols in Redox Regulation." *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 6): 1378–81. doi:10.1042/BST20051378.

Ghilardi, N., and R. C. Skoda. 1997. "The Leptin Receptor Activates Janus Kinase 2 and Signals for Proliferation in a Factor-Dependent Cell Line." *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (4): 393–99. doi:10.1210/mend.11.4.9907.

Ghosh, Nilanjan, Rituparna Ghosh, and Subhash C. Mandal. 2011. "Antioxidant Protection: A Promising Therapeutic Intervention in Neurodegenerative Disease." *Free Radical Research* 45 (8): 888–905. doi:10.3109/10715762.2011.574290.

Giamarchi, P, L Burel, L Stephan, Y Lijour, and A Le Bihan. 2002. "Laser-Induced Fluorescence with an OPO System. Part I. Optimisation of the Analytical System by Use of Experimental Design Methodology. Application to the Direct Quantification of Traces of Benzo[A]pyrene." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 374 (3): 490–97. doi:10.1007/s00216-002-1472-y.

Girotti, A W. 1998. "Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems." *Journal of Lipid Research* 39 (8): 1529–42.

Gletsu-Miller, Nana, Jason M Hansen, Dean P Jones, Young-Mi Go, William E Torres, Thomas R Ziegler, and Edward Lin. 2009. "Loss of Total and Visceral Adipose Tissue Mass Predicts Decreases in Oxidative

Stress after Weight-Loss Surgery." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 17 (3): 439–46. doi:10.1038/oby.2008.542.
Goldstone, A. P., J. G. Mercer, I. Gunn, K. M. Moar, C. M. Edwards, M. Rossi, J. K. Howard, et al. 1997. "Leptin Interacts with Glucagon-like Peptide-1 Neurons to Reduce Food Intake and Body Weight in Rodents." *FEBS Letters* 415 (2): 134–38.
Gong, Lijie, Fayi Yao, Kristin Hockman, Henry H. Heng, Gregory J. Morton, Kiyoshi Takeda, Shizuo Akira, Malcolm J. Low, Marcelo Rubinstein, and Robert G. MacKenzie. 2008. "Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Is Required in Hypothalamic Agouti-Related Protein/neuropeptide Y Neurons for Normal Energy Homeostasis." *Endocrinology* 149 (7): 3346–54. doi:10.1210/en.2007-0945.
Gonzalez, Carlos A., and Elio Riboli. 2010. "Diet and Cancer Prevention: Contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 46 (14): 2555–62. doi:10.1016/j.ejca.2010.07.025.
Gonzalez, Ruben R., Salandre Cherfils, Maria Escobar, Jin H. Yoo, Cecilia Carino, Aaron K. Styer, Brian T. Sullivan, et al. 2006. "Leptin Signaling Promotes the Growth of Mammary Tumors and Increases the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor Type Two (VEGF-R2)." *Journal of Biological Chemistry* 281 (36): 26320–28. doi:10.1074/jbc.M601991200.
Goodwin, Pamela J., Marguerite Ennis, I. George Fantus, Kathleen I. Pritchard, Maureen E. Trudeau, Jarley Koo, and Nicky Hood. 2005. "Is Leptin a Mediator of Adverse Prognostic Effects of Obesity in Breast Cancer?" *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (25): 6037–42. doi:10.1200/JCO.2005.02.048.
Gorska, Elzbieta, K. Popko, A. Stelmaszczyk-Emmel, O. Ciepiela, A. Kucharska, and M. Wasik. 2010. "Leptin Receptors." *European Journal of Medical Research* 15 Suppl 2 (November): 50–54.
Goujon, E., P. Parnet, S. Layé, C. Combe, and R. Dantzer. 1996. "Adrenalectomy Enhances pro-Inflammatory Cytokines Gene Expression, in the Spleen, Pituitary and Brain of Mice in Response to Lipopolysaccharide." *Brain Research. Molecular Brain Research* 36 (1): 53–62.
Graham, Kelly A, Mariola Kulawiec, Kjerstin M Owens, Xiurong Li, Mohamed Mokhtar Desouki, Dhyan Chandra, and Keshav K Singh. 2010a. "NADPH Oxidase 4 Is an Oncoprotein Localized to Mitochondria." *Cancer Biology & Therapy* 10 (3): 223–31.
Graham, Kelly A., Mariola Kulawiec, Kjerstin M. Owens, Xiurong Li, Mohamed Mokhtar Desouki, Dhyan Chandra, and Keshav K. Singh. 2010b. "NADPH Oxidase 4 Is an Oncoprotein Localized to Mitochondria." *Cancer Biology & Therapy* 10 (3): 223–31.
Granström, E., and H. Kindahl. 1978. "Radioimmunoassay of Prostaglandins and Thromboxanes." *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research* 5: 119–210.
Grasso, P., M. C. Leinung, S. P. Ingher, and D. W. Lee. 1997. "In Vivo Effects of Leptin-Related Synthetic Peptides on Body Weight and Food Intake in Female Ob/ob Mice: Localization of Leptin Activity to Domains between Amino Acid Residues 106-140." *Endocrinology* 138 (4): 1413–18. doi:10.1210/endo.138.4.5087.
Gréen, K., F. A. Kimball, B. A. Thornburgh, and A. J. WickremaSinha. 1980. "Quantitative Determination of 9-Deoxo-16, 16-Dimethyl-9-Methylene-PGE2 in Human Plasma by GC-MS, RIA and HPLC." *Prostaglandins* 20 (4): 767–80.
Gregor, Margaret F, and Gökhan S Hotamisligil. 2007a. "Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipocyte Stress: The Endoplasmic Reticulum and Metabolic Disease." *Journal of Lipid Research* 48 (9): 1905–14. doi:10.1194/jlr.R700007-JLR200.
Gregor, Margaret F., and Gökhan S. Hotamisligil. 2007b. "Thematic Review Series: Adipocyte Biology. Adipocyte Stress: The Endoplasmic Reticulum and Metabolic Disease." *Journal of Lipid Research* 48 (9): 1905–14. doi:10.1194/jlr.R700007-JLR200.
Grek, Christina L., and Kenneth D. Tew. 2010. "Redox Metabolism and Malignancy." *Current Opinion in Pharmacology* 10 (4): 362–68. doi:10.1016/j.coph.2010.05.003.
Griffioen, Kathleen J., and Mark P. Mattson. 2011. "Playtime Prevents Obesity by Brain-Mediated Fat Browning." *Cell Metabolism* 14 (3): 287–88. doi:10.1016/j.cmet.2011.08.002.
Grunfeld, C., M. Pang, J. K. Shigenaga, P. Jensen, R. Lallone, J. Friedman, and K. R. Feingold. 1996. "Serum Leptin Levels in the Acquired Immunodeficiency Syndrome." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (12): 4342–46. doi:10.1210/jcem.81.12.8954039.
Guilmeau, Sandra, Marion Buyse, Annick Tsocas, Jean Pierre Laigneau, and André Bado. 2003. "Duodenal Leptin Stimulates Cholecystokinin Secretion: Evidence of a Positive Leptin-Cholecystokinin Feedback Loop." *Diabetes* 52 (7): 1664–72.
Gu, Jian-Wei, Emily Young, Sharla G. Patterson, Kristina L. Makey, Jeremy Wells, Min Huang, Kevan B. Tucker, and Lucio Miele. 2011. "Postmenopausal Obesity Promotes Tumor Angiogenesis and Breast Cancer Progression in Mice." *Cancer Biology & Therapy* 11 (10): 910–17.

Guo, Shanchun, Mingli Liu, Guangdi Wang, Marta Torroella-Kouri, and Ruben R Gonzalez-Perez. 2012. "Oncogenic Role and Therapeutic Target of Leptin Signaling in Breast Cancer and Cancer Stem Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1825 (2): 207–22. doi:10.1016/j.bbcan.2012.01.002.

Gupta, Subash C., Ramesh Singh, Radhika Pochampally, Kounosuke Watabe, and Yin-Yuan Mo. 2014a. "Acidosis Promotes Invasiveness of Breast Cancer Cells through ROS-AKT-NF-κB Pathway." *Oncotarget* 5 (23): 12070–82.

Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, M. Maffei, S. L. Cohen, B. T. Chait, D. Rabinowitz, R. L. Lallone, S. K. Burley, and J. M. Friedman. 1995. "Weight-Reducing Effects of the Plasma Protein Encoded by the Obese Gene." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5223): 543–46.

Haleng, J., J. Pincemail, J. O. Defraigne, C. Charlier, and J. P. Chapelle. 2007. "[Oxidative stress]." *Revue Médicale De Liège* 62 (10): 628–38.

Halliwell, B. 1999. "Antioxidant Defence Mechanisms: From the Beginning to the End (of the Beginning)." *Free Radical Research* 31 (4): 261–72.

Halliwell, Barry. 2006. "Oxidative Stress and Neurodegeneration: Where Are We Now?" *Journal of Neurochemistry* 97 (6): 1634–58. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x.

Halliwell, B., K. Zhao, and M. Whiteman. 1999. "Nitric Oxide and Peroxynitrite. The Ugly, the Uglier and the Not so Good: A Personal View of Recent Controversies." *Free Radical Research* 31 (6): 651–69.

Hancke, K., D. Grubeck, N. Hauser, R. Kreienberg, and J. M. Weiss. 2010. "Adipocyte Fatty Acid-Binding Protein as a Novel Prognostic Factor in Obese Breast Cancer Patients." *Breast Cancer Research and Treatment* 119 (2): 367–367. doi:10.1007/s10549-009-0577-9.

Handy, Jeffrey A., Ping P. Fu, Pradeep Kumar, Jamie E. Mells, Shvetank Sharma, Neeraj K. Saxena, and Frank A. Anania. 2011. "Adiponectin Inhibits Leptin Signalling via Multiple Mechanisms to Exert Protective Effects against Hepatic Fibrosis." *The Biochemical Journal* 440 (3): 385–95. doi:10.1042/BJ20102148.

Han, Joan C., Qing-Rong Liu, MaryPat Jones, Rebecca L. Levinn, Carolyn M. Menzie, Kyra S. Jefferson-George, Diane C. Adler-Wailes, et al. 2008. "Brain-Derived Neurotrophic Factor and Obesity in the WAGR Syndrome." *The New England Journal of Medicine* 359 (9): 918–27. doi:10.1056/NEJMoa0801119.

Harris, M. L., H. J. Schiller, P. M. Reilly, M. Donowitz, M. B. Grisham, and G. B. Bulkley. 1992. "Free Radicals and Other Reactive Oxygen Metabolites in Inflammatory Bowel Disease: Cause, Consequence or Epiphenomenon?" *Pharmacology & Therapeutics* 53 (3): 375–408.

Harris, R. B. 2000. "Leptin--Much More than a Satiety Signal." *Annual Review of Nutrition* 20: 45–75. doi:10.1146/annurev.nutr.20.1.45.

Hatori, Megumi, Christopher Vollmers, Amir Zarrinpar, Luciano DiTacchio, Eric A. Bushong, Shubhroz Gill, Mathias Leblanc, et al. 2012. "Time-Restricted Feeding without Reducing Caloric Intake Prevents Metabolic Diseases in Mice Fed a High-Fat Diet." *Cell Metabolism* 15 (6): 848–60. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.019.

Havel, P. J., S. Kasim-Karakas, W. Mueller, P. R. Johnson, R. L. Gingerich, and J. S. Stern. 1996. "Relationship of Plasma Leptin to Plasma Insulin and Adiposity in Normal Weight and Overweight Women: Effects of Dietary Fat Content and Sustained Weight Loss." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 81 (12): 4406–13. doi:10.1210/jcem.81.12.8954050.

Hayes, J. D., and L. I. McLellan. 1999. "Glutathione and Glutathione-Dependent Enzymes Represent a Co-Ordinately Regulated Defence against Oxidative Stress." *Free Radical Research* 31 (4): 273–300.

Hayes, J. D., and R. C. Strange. 1995. "Potential Contribution of the Glutathione S-Transferase Supergene Family to Resistance to Oxidative Stress." *Free Radical Research* 22 (3): 193–207.

Hayes, John D., Jack U. Flanagan, and Ian R. Jowsey. 2005. "Glutathione Transferases." *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 45: 51–88. doi:10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095857.

Helmersson, Johanna, Bengt Vessby, Anders Larsson, and Samar Basu. 2004. "Association of Type 2 Diabetes with Cyclooxygenase-Mediated Inflammation and Oxidative Stress in an Elderly Population." *Circulation* 109 (14): 1729–34. doi:10.1161/01.CIR.0000124718.99562.91.

Hermes, Gretchen L., Bertha Delgado, Maria Tretiakova, Sonia A. Cavigelli, Thomas Krausz, Suzanne D. Conzen, and Martha K. McClintock. 2009. "Social Isolation Dysregulates Endocrine and Behavioral Stress While Increasing Malignant Burden of Spontaneous Mammary Tumors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (52): 22393–98. doi:10.1073/pnas.0910753106.

Hileman, Stanley M., Dominique D. Pierroz, Hiroaki Masuzaki, Christian Bjørbaek, Karim El-Haschimi, William A. Banks, and Jeffrey S. Flier. 2002. "Characterizaton of Short Isoforms of the Leptin Receptor in Rat Cerebral Microvessels and of Brain Uptake of Leptin in Mouse Models of Obesity." *Endocrinology* 143 (3): 775–83. doi:10.1210/endo.143.3.8669.

Himmelfarb, J, E McMonagle, and E McMenamin. 2000. "Plasma Protein Thiol Oxidation and Carbonyl Formation in Chronic Renal Failure." *Kidney International* 58 (6): 2571–78. doi:10.1046/j.1523-1755.2000.00443.x.

Hodges-Gallagher, Leslie, Cathleen D. Valentine, Suzy El Bader, and Peter J. Kushner. 2008. "Estrogen Receptor Beta Increases the Efficacy of Antiestrogens by Effects on Apoptosis and Cell Cycling in Breast Cancer Cells." *Breast Cancer Research and Treatment* 109 (2): 241–50. doi:10.1007/s10549-007-9640-6.

Hollenberg, A. N., V. S. Susulic, J. P. Madura, B. Zhang, D. E. Moller, P. Tontonoz, P. Sarraf, B. M. Spiegelman, and B. B. Lowell. 1997. "Functional Antagonism between CCAAT/Enhancer Binding Protein-Alpha and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma on the Leptin Promoter." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (8): 5283–90.

Holtom, G. R., B. D. Thrall, B. Y. Chin, H. S. Wiley, and S. D. Colson. 2001. "Achieving Molecular Selectivity in Imaging Using Multiphoton Raman Spectroscopy Techniques." *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 2 (11): 781–88.

Honda, Hajime, Kenichi Ikejima, Miyoko Hirose, Mutsuko Yoshikawa, Tie Lang, Nobuyuki Enomoto, Tsuneo Kitamura, Yoshiyuki Takei, and Nobuhiro Sato. 2002. "Leptin Is Required for Fibrogenic Responses Induced by Thioacetamide in the Murine Liver." *Hepatology (Baltimore, Md.)* 36 (1): 12–21. doi:10.1053/jhep.2002.33684.

Horgan, Angela M., and Philip J. S. Stork. 2003. "Examining the Mechanism of Erk Nuclear Translocation Using Green Fluorescent Protein." *Experimental Cell Research* 285 (2): 208–20.

Hotamisligil, G. S. 1999. "Mechanisms of TNF-Alpha-Induced Insulin Resistance." *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes: Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association* 107 (2): 119–25. doi:10.1055/s-0029-1212086.

Housa, D., J. Housová, Z. Vernerová, and M. Haluzík. 2006. "Adipocytokines and Cancer." *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 55 (3): 233–44.

Houseknecht, K. L., C. A. Bidwell, C. P. Portocarrero, and M. E. Spurlock. 1998. "Expression and cDNA Cloning of Porcine Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (PPARgamma)." *Gene* 225 (1-2): 89–96.

Houseknecht, K. L., and C. P. Portocarrero. 1998. "Leptin and Its Receptors: Regulators of Whole-Body Energy Homeostasis." *Domestic Animal Endocrinology* 15 (6): 457–75. doi:10.1016/S0739-7240(98)00035-6.

Howard, Jane K., Belinda J. Cave, Laura J. Oksanen, Iphigenia Tzameli, Christian Bjørbaek, and Jeffrey S. Flier. 2004. "Enhanced Leptin Sensitivity and Attenuation of Diet-Induced Obesity in Mice with Haploinsufficiency of Socs3." *Nature Medicine* 10 (7): 734–38. doi:10.1038/nm1072.

Howard, J. K., G. M. Lord, G. Matarese, S. Vendetti, M. A. Ghatei, M. A. Ritter, R. I. Lechler, and S. R. Bloom. 1999. "Leptin Protects Mice from Starvation-Induced Lymphoid Atrophy and Increases Thymic Cellularity in Ob/ob Mice." *The Journal of Clinical Investigation* 104 (8): 1051–59. doi:10.1172/JCI6762.

Howe, G. R., T. Hirohata, T. G. Hislop, J. M. Iscovich, J. M. Yuan, K. Katsouyanni, F. Lubin, E. Marubini, B. Modan, and T. Rohan. 1990. "Dietary Factors and Risk of Breast Cancer: Combined Analysis of 12 Case-Control Studies." *Journal of the National Cancer Institute* 82 (7): 561–69.

Huang, L., and C. Li. 2000. "Leptin: A Multifunctional Hormone." *Cell Research* 10 (2): 81–92. doi:10.1038/sj.cr.7290038.

Huang, X-F, X Xin, P McLennan, and L Storlien. 2004. "Role of Fat Amount and Type in Ameliorating Diet-Induced Obesity: Insights at the Level of Hypothalamic Arcuate Nucleus Leptin Receptor, Neuropeptide Y and pro-Opiomelanocortin mRNA Expression." *Diabetes, Obesity & Metabolism* 6 (1): 35–44.

Huebner, Lena, Stefan Engeli, Christiane D. Wrann, Lilia Goudeva, Tobias Laue, and Heike Kielstein. 2013. "Human NK Cell Subset Functions Are Differentially Affected by Adipokines." *PloS One* 8 (9): e75703. doi:10.1371/journal.pone.0075703.

Huhn, Carolin, Michael Pütz, Natalie Martin, Rainer Dahlenburg, and Ute Pyell. 2005. "Determination of Tryptamine Derivatives in Illicit Synthetic Drugs by Capillary Electrophoresis and Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence Detection." *Electrophoresis* 26 (12): 2391–2401. doi:10.1002/elps.200410313.

Hursting, Stephen D., John Digiovanni, Andrew J. Dannenberg, Maria Azrad, Derek Leroith, Wendy Demark-Wahnefried, Madhuri Kakarala, Angela Brodie, and Nathan A. Berger. 2012. "Obesity, Energy Balance, and Cancer: New Opportunities for Prevention." *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 5 (11): 1260–72. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-12-0140.

Ikejima, Kenichi, Yoshiyuki Takei, Hajime Honda, Miyoko Hirose, Mutsuko Yoshikawa, Yan-Jun Zhang, Tie Lang, et al. 2002. "Leptin Receptor-Mediated Signaling Regulates Hepatic Fibrogenesis and Remodeling of Extracellular Matrix in the Rat." *Gastroenterology* 122 (5): 1399–1410.

Imazato, Takahiro, Akina Shiokawa, Yuri Kurose, Yasuha Katou, Naoya Kishikawa, Kaname Ohyama, Marwa Fathy Bakr Ali, Yukitaka Ueki, Eisuke Maehata, and Naotaka Kuroda. 2014. "Determination of 4-Hydroxy-2-Nonenal in Serum by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence

Detection after Pre-Column Derivatization Using 4-(N,N-Dimethylaminosulfonyl)-7-Hydrazino-2, 1,3-Benzoxadiazole." *Biomedical Chromatography: BMC* 28 (6): 858–61. doi:10.1002/bmc.3166.

Inoue, Masayasu, Eisuke F. Sato, Manabu Nishikawa, Ah-Mee Park, Yukimi Kira, Isuke Imada, and Kozo Utsumi. 2003. "Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and Its Role in Aerobic Life." *Current Medicinal Chemistry* 10 (23): 2495–2505.

Irani, K., Y. Xia, J. L. Zweier, S. J. Sollott, C. J. Der, E. R. Fearon, M. Sundaresan, T. Finkel, and P. J. Goldschmidt-Clermont. 1997. "Mitogenic Signaling Mediated by Oxidants in Ras-Transformed Fibroblasts." *Science (New York, N.Y.)* 275 (5306): 1649–52.

Isse, Naohi, Yoshihiro Ogawa, Naohisa Tamura, Hiroaki Masuzaki, Kiyoshi Mori, Taku Okazaki, Noriko Satoh, et al. 1995. "Structural Organization and Chromosomal Assignment of the Human Obese Gene." *Journal of Biological Chemistry* 270 (46): 27728–33. doi:10.1074/jbc.270.46.27728.

Iyengar, Puneeth, and Philipp E. Scherer. 2003. "Adiponectin/Acrp30, an Adipocyte-Specific Secretory Factor: Physiological Relevance during Development." *Pediatric Diabetes* 4 (1): 32–37. doi:10.1034/j.1399-5448.2003.00029.x.

Jana, Debarshi, Diptendra Kumar Sarkar, Suvro Ganguly, Shilpi Saha, Gaurisankar Sa, Asim Kumar Manna, Abhirup Banerjee, and Syamsundar Mandal. 2014. "Role of Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Prognosis of Breast Cancer." *Indian Journal of Surgical Oncology* 5 (1): 59–65. doi:10.1007/s13193-014-0290-y.

Jardé, T, F Caldefie-Chézet, N Goncalves-Mendes, F Mishellany, C Buechler, F Penault-Llorca, and M P Vasson. 2009a. "Involvement of Adiponectin and Leptin in Breast Cancer: Clinical and in Vitro Studies." *Endocrine-Related Cancer* 16 (4): 1197–1210. doi:10.1677/ERC-09-0043.

Jardé, Thierry, Florence Caldefie-Chézet, Mireille Damez, Florence Mishellany, Frédérique Penault-Llorca, Jean Guillot, and Marie Vasson. 2008a. "Leptin and Leptin Receptor Involvement in Cancer Development: A Study on Human Primary Breast Carcinoma." *Oncology Reports*, April. doi:10.3892/or.19.4.905.

Jardé, Thierry, Florence Caldefie-Chézet, Mireille Damez, Florence Mishellany, Frédérique Penault-Llorca, Jean Guillot, and Marie Paule Vasson. 2008b. "Leptin and Leptin Receptor Involvement in Cancer Development: A Study on Human Primary Breast Carcinoma." *Oncology Reports* 19 (4): 905–11.

Jardé, Thierry, Stéphane Perrier, Marie-Paule Vasson, and Florence Caldefie-Chézet. 2011. "Molecular Mechanisms of Leptin and Adiponectin in Breast Cancer." *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* 47 (1): 33–43. doi:10.1016/j.ejca.2010.09.005.

Jeney, Viktória, József Balla, Akihiro Yachie, Zsuzsa Varga, Gregory M. Vercellotti, John W. Eaton, and György Balla. 2002. "Pro-Oxidant and Cytotoxic Effects of Circulating Heme." *Blood* 100 (3): 879–87.

Jiang, Fan, Yun Zhang, and Gregory J. Dusting. 2011a. "NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair." *Pharmacological Reviews* 63 (1): 218–42. doi:10.1124/pr.110.002980.

Jiang, Fan, Yun Zhang, and Gregory J Dusting. 2011b. "NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling: Roles in Cellular Stress Response, Stress Tolerance, and Tissue Repair." *Pharmacological Reviews* 63 (1): 218–42. doi:10.1124/pr.110.002980.

Jones, Peter J. H., Stephanie Jew, and Suhad AbuMweis. 2008. "The Effect of Dietary Oleic, Linoleic, and Linolenic Acids on Fat Oxidation and Energy Expenditure in Healthy Men." *Metabolism: Clinical and Experimental* 57 (9): 1198–1203. doi:10.1016/j.metabol.2008.04.012.

Jozan, S., J. C. Faye, J. F. Tournier, J. P. Tauber, J. F. David, and F. Bayard. 1985. "Interaction of Estradiol and High Density Lipoproteins on Proliferation of the Human Breast Cancer Cell Line MCF-7 Adapted to Grow in Serum Free Conditions." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 133 (1): 105–12.

Juhasz, Agnes, Yun Ge, Susan Markel, Alice Chiu, Linda Matsumoto, Josephus van Balgooy, Krishnendu Roy, and James H. Doroshow. 2009a. "Expression of NADPH Oxidase Homologues and Accessory Genes in Human Cancer Cell Lines, Tumours and Adjacent Normal Tissues." *Free Radical Research* 43 (6): 523–32. doi:10.1080/10715760902918683.

Julia, C., S. Czernichow, N. Charnaux, N. Ahluwalia, V. Andreeva, M. Touvier, P. Galan, and L. Fezeu. 2014. "Relationships between Adipokines, Biomarkers of Endothelial Function and Inflammation and Risk of Type 2 Diabetes." *Diabetes Research and Clinical Practice* 105 (2): 231–38. doi:10.1016/j.diabres.2014.05.001.

Kanamori, Takahiro, Muneki Isokawa, Takashi Funatsu, and Makoto Tsunoda. 2015. "Development of Analytical Method for Catechol Compounds in Mouse Urine Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Fluorescence Detection." *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 985 (March): 142–48. doi:10.1016/j.jchromb.2015.01.038.

Kappeler, Laurent, and Michael J. Meaney. 2010. "Enriching Stress Research." *Cell* 142 (1): 15–17. doi:10.1016/j.cell.2010.06.025.

Karamouzis, Ioannis, Michael Karamouzis, Ioannis S. Vrabas, Kosmas Christoulas, Nikitas Kyriazis, Eleftherios Giannoulis, and Konstantinos Mandroukas. 2002. "The Effects of Marathon Swimming on Serum Leptin and Plasma Neuropeptide Y Levels." *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* 40 (2): 132–36. doi:10.1515/CCLM.2002.023.

Kargi, A., M. Uysal, H. Bozcuk, H. S. Coskun, B. Savas, and M. Ozdogan. 2013a. "The Importance of COX-2 Expression as Prognostic Factor in Early Breast Cancer." *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 18 (3): 579–84.

Kayser, Brandon D., Michael I. Goran, and Sebastien G. Bouret. 2015. "Perinatal Overnutrition Exacerbates Adipose Tissue Inflammation Caused by High-Fat Feeding in C57BL/6J Mice." *PloS One* 10 (3): e0121954. doi:10.1371/journal.pone.0121954.

Keppler, D. 1999. "Export Pumps for Glutathione S-Conjugates." *Free Radical Biology & Medicine* 27 (9-10): 985–91.

Kershaw, Erin E., and Jeffrey S. Flier. 2004. "Adipose Tissue as an Endocrine Organ." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 89 (6): 2548–56. doi:10.1210/jc.2004-0395.

Key, T. J., P. N. Appleby, G. K. Reeves, A. Roddam, J. F. Dorgan, C. Longcope, F. Z. Stanczyk, et al. 2003. "Body Mass Index, Serum Sex Hormones, and Breast Cancer Risk in Postmenopausal Women." *Journal of the National Cancer Institute* 95 (16): 1218–26.

Kieffer, T. J., R. S. Heller, and J. F. Habener. 1996. "Leptin Receptors Expressed on Pancreatic Beta-Cells." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 224 (2): 522–27. doi:10.1006/bbrc.1996.1059.

Kim, D. H., N. Y. Song, E. H. Kim, H. K. Na, Y. Joe, H. T. Chung, and Y. J. Surh. 2014. "15-Deoxy-Δ12,14-Prostaglandin J_2 Induces p53 Expression through Nrf2-Mediated Upregulation of Heme Oxygenase-1 in Human Breast Cancer Cells." *Free Radical Research* 48 (9): 1018–27. doi:10.3109/10715762.2014.897343.

Kim, Do-Hee, Na-Young Song, Eun-Hee Kim, Hye-Kyung Na, Yeonsoo Joe, Hun-Taeg Chung, and Young-Joon Surh. 2014. "15-Deoxy-Δ(12,14)-Prostaglandin J2 Induces p53 Expression through Upregulation of Heme Oxygenase-1 in Human Breast Cancer (MCF-7) Cells." *Free Radical Research*, February. doi:10.3109/10715762.2014.897343.

Kim, Esther H. J., Walter C. Willett, Graham A. Colditz, Susan E. Hankinson, Meir J. Stampfer, David J. Hunter, Bernard Rosner, and Michelle D. Holmes. 2006. "Dietary Fat and Risk of Postmenopausal Breast Cancer in a 20-Year Follow-Up." *American Journal of Epidemiology* 164 (10): 990–97. doi:10.1093/aje/kwj309.

Kim, Eun Ji, Mi-Ran Choi, Heesook Park, Minhee Kim, Ji Eun Hong, Jae-Yong Lee, Hyang Sook Chun, Ki Won Lee, and Jung Han Yoon Park. 2011. "Dietary Fat Increases Solid Tumor Growth and Metastasis of 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells and Mortality in Obesity-Resistant BALB/c Mice." *Breast Cancer Research: BCR* 13 (4): R78. doi:10.1186/bcr2927.

Kim, Hee Sung. 2009. "Leptin and Leptin Receptor Expression in Breast Cancer." *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association* 41 (3): 155–63. doi:10.4143/crt.2009.41.3.155.

Kim, Hong Pyo, Danielle Morse, and Augustine M. K. Choi. 2006. "Heat-Shock Proteins: New Keys to the Development of Cytoprotective Therapies." *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 10 (5): 759–69. doi:10.1517/14728222.10.5.759.

Kim, Ja-Young, Esther van de Wall, Mathieu Laplante, Anthony Azzara, Maria E. Trujillo, Susanna M. Hofmann, Todd Schraw, et al. 2007. "Obesity-Associated Improvements in Metabolic Profile through Expansion of Adipose Tissue." *The Journal of Clinical Investigation* 117 (9): 2621–37. doi:10.1172/JCI31021.

King, Mary-Claire, Joan H. Marks, Jessica B. Mandell, and New York Breast Cancer Study Group. 2003. "Breast and Ovarian Cancer Risks due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2." *Science (New York, N.Y.)* 302 (5645): 643–46. doi:10.1126/science.1088759.

Klaunig, James E., Lisa M. Kamendulis, and Barbara A. Hocevar. 2010. "Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis." *Toxicologic Pathology* 38 (1): 96–109. doi:10.1177/0192623309356453.

Koch, C. E., C. Lowe, D. Pretz, J. Steger, L. M. Williams, and A. Tups. 2014. "High-Fat Diet Induces Leptin Resistance in Leptin-Deficient Mice." *Journal of Neuroendocrinology* 26 (2): 58–67. doi:10.1111/jne.12131.

Koide, Nobukiyo, Tomokazu Oyama, Yoh Miyashita, and Kouji Shirai. 2007. "Effects of Calorie-Restricted Low-Carbohydrate Diet on Glucose and Lipid Metabolism in Otsuka Long Evans Tokushima Fatty Rats." *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 14 (5): 253–60.

Kolios, George, Vassilis Valatas, and Stephen G. Ward. 2004. "Nitric Oxide in Inflammatory Bowel Disease: A Universal Messenger in an Unsolved Puzzle." *Immunology* 113 (4): 427–37. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01984.x.

Kortz, Linda, Juliane Dorow, and Uta Ceglarek. 2014. “Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry for the Analysis of Eicosanoids and Related Lipids in Human Biological Matrices: A Review.” *Journal of Chromatography B*, Analysis of Eicosanoids, Amino Acids, Organic Acids and microRNA, 964: 1–11. doi:10.1016/j.jchromb.2014.01.046.

Ko, T. P., M. K. Safo, F. N. Musayev, M. L. Di Salvo, C. Wang, S. H. Wu, and D. J. Abraham. 2000. “Structure of Human Erythrocyte Catalase.” *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 56 (Pt 2): 241–45.

Kowaltowski, Alicia J., Nadja C. de Souza-Pinto, Roger F. Castilho, and Anibal E. Vercesi. 2009. “Mitochondria and Reactive Oxygen Species.” *Free Radical Biology & Medicine* 47 (4): 333–43. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.004.

Kraemer, Robert R., Hongnan Chu, and V. Daniel Castracane. 2002. “Leptin and Exercise.” *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 227 (9): 701–8.

Krause, Karl-Heinz. 2004. “Tissue Distribution and Putative Physiological Function of NOX Family NADPH Oxidases.” *Japanese Journal of Infectious Diseases* 57 (5): S28–29.

Krishna, N. S., T. V. Getchell, and M. L. Getchell. 1994. “Differential Expression of Alpha, Mu, and Pi Classes of Glutathione S-Transferases in Chemosensory Mucosae of Rats during Development.” *Cell and Tissue Research* 275 (3): 435–50.

Kruve, Anneli, Riin Rebane, Karin Kipper, Maarja-Liisa Oldekop, Hanno Evard, Koit Herodes, Pekka Ravio, and Ivo Leito. 2015. “Tutorial Review on Validation of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods: Part II.” *Analytica Chimica Acta* 870 (April): 8–28. doi:10.1016/j.aca.2015.02.016.

Kucharska-Newton, Anna M., Wayne D. Rosamond, Pamela J. Mink, Anthony J. Alberg, Eyal Shahar, and Aaron R. Folsom. 2008. “HDL-Cholesterol and Incidence of Breast Cancer in the ARIC Cohort Study.” *Annals of Epidemiology* 18 (9): 671–77. doi:10.1016/j.annepidem.2008.06.006.

Kulkarni, R. N., Z. L. Wang, R. M. Wang, J. D. Hurley, D. M. Smith, M. A. Ghatei, D. J. Withers, J. V. Gardiner, C. J. Bailey, and S. R. Bloom. 1997. “Leptin Rapidly Suppresses Insulin Release from Insulinoma Cells, Rat and Human Islets And, in Vivo, in Mice.” *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11): 2729–36. doi:10.1172/JCI119818.

Kumar, Shiva PD Senthil, Minqian Shen, Elizabeth G. Spicer, Ashley J. Goudjo-Ako, Justin D. Stumph, Jing Zhang, and Haifei Shi. 2014. “Distinct Metabolic Effects Following Short-Term Exposure of Different High-Fat Diets in Male and Female Mice.” *Endocrine Journal* 61 (5): 457–70. doi:10.1507/endocrj.EJ13-0455.

Lago, Francisca, Carlos Dieguez, Juan Gómez-Reino, and Oreste Gualillo. 2007. “Adipokines as Emerging Mediators of Immune Response and Inflammation.” *Nature Clinical Practice. Rheumatology* 3 (12): 716–24. doi:10.1038/ncprheum0674.

Laharrague, P., D. Larrouy, A. M. Fontanilles, N. Truel, A. Campfield, R. Tenenbaum, J. Galitzky, J. X. Corberand, L. Pénicaud, and L. Casteilla. 1998. “High Expression of Leptin by Human Bone Marrow Adipocytes in Primary Culture.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (9): 747–52.

Lala, P. K., and C. Chakraborty. 2001. “Role of Nitric Oxide in Carcinogenesis and Tumour Progression.” *The Lancet. Oncology* 2 (3): 149–56. doi:10.1016/S1470-2045(00)00256-4.

Lamas, Bruno, Nicolas Goncalves-Mendes, Rachida Nachat-Kappes, Adrien Rossary, Florence Caldefie-Chezet, Marie-Paule Vasson, and Marie-Chantal Farges. 2013. “Leptin Modulates Dose-Dependently the Metabolic and Cytolytic Activities of NK-92 Cells.” *Journal of Cellular Physiology* 228 (6): 1202–9. doi:10.1002/jcp.24273.

Lambeth, J. David, Tsukasa Kawahara, and Becky Diebold. 2007. “Regulation of Nox and Duox Enzymatic Activity and Expression.” *Free Radical Biology and Medicine* 43 (3): 319–31. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.028.

Lammert, A., W. Kiess, A. Bottner, A. Glasow, and J. Kratzsch. 2001. “Soluble Leptin Receptor Represents the Main Leptin Binding Activity in Human Blood.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 283 (4): 982–88. doi:10.1006/bbrc.2001.4885.

Landman, Rita E., Jardena J. Puder, Ennian Xiao, Pamela U. Freda, Michel Ferin, and Sharon L. Wardlaw. 2003. “Endotoxin Stimulates Leptin in the Human and Nonhuman Primate.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 88 (3): 1285–91. doi:10.1210/jc.2002-021393.

Landt, M. 2000. “Leptin Binding and Binding Capacity in Serum.” *Clinical Chemistry* 46 (3): 379–84.

Lapainis, T, C Scanlan, S S Rubakhin, and J V Sweedler. 2007. “A Multichannel Native Fluorescence Detection System for Capillary Electrophoretic Analysis of Neurotransmitters in Single Neurons.” *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387 (1): 97–105. doi:10.1007/s00216-006-0775-9.

Leanza, Luigi, Elisa Venturini, Stephanie Kadow, Alexander Carpinteiro, Erich Gulbins, and Katrin Anne Becker. 2014. “Targeting a Mitochondrial Potassium Channel to Fight Cancer.” *Cell Calcium*, October. doi:10.1016/j.ceca.2014.09.006.

Leclercq, Isabelle A., Jacqueline Field, and Geoffrey C. Farrell. 2003. "Leptin-Specific Mechanisms for Impaired Liver Regeneration in Ob/ob Mice after Toxic Injury." *Gastroenterology* 124 (5): 1451–64.

Lee, Haeyong, Ryunhwa Kang, and Yoosik Yoon. 2010. "SH21B, an Anti-Obesity Herbal Composition, Inhibits Fat Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes and High Fat Diet-Induced Obese Mice through the Modulation of the Adipogenesis Pathway." *Journal of Ethnopharmacology* 127 (3): 709–17. doi:10.1016/j.jep.2009.12.002.

Lee, Jun-Seok, Yun Kyung Kim, Marc Vendrell, and Young-Tae Chang. 2009. "Diversity-Oriented Fluorescence Library Approach for the Discovery of Sensors and Probes." *Molecular bioSystems* 5 (5): 411–21. doi:10.1039/b821766c.

Lee, Wen-Ying, Yen-Chou Chen, Chwen-Ming Shih, Chun-Mao Lin, Chia-Hsiung Cheng, Ku-Chung Chen, and Cheng-Wei Lin. 2014a. "The Induction of Heme Oxygenase-1 Suppresses Heat Shock Protein 90 and the Proliferation of Human Breast Cancer Cells through Its Byproduct Carbon Monoxide." *Toxicology and Applied Pharmacology* 274 (1): 55–62. doi:10.1016/j.taap.2013.10.027.

Lemoine, Maud, Vlad Ratziu, Minji Kim, Mustapha Maachi, Dominique Wendum, François Paye, Jean Philippe Bastard, et al. 2009. "Serum Adipokine Levels Predictive of Liver Injury in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease." *Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver* 29 (9): 1431–38. doi:10.1111/j.1478-3231.2009.02022.x.

Lenaz, Giorgio, and Maria Luisa Genova. 2010. "Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject." *Antioxidants & Redox Signaling* 12 (8): 961–1008. doi:10.1089/ars.2009.2704.

Leroy, P., S. Dessolin, P. Villageois, B. C. Moon, J. M. Friedman, G. Ailhaud, and C. Dani. 1996. "Expression of Ob Gene in Adipose Cells. Regulation by Insulin." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (5): 2365–68.

Levin, B. E., M. Finnegan, J. Triscari, and A. C. Sullivan. 1985. "Brown Adipose and Metabolic Features of Chronic Diet-Induced Obesity." *The American Journal of Physiology* 248 (6 Pt 2): R717–23.

Levy, David E., and J. E. Darnell. 2002. "Stats: Transcriptional Control and Biological Impact." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3 (9): 651–62. doi:10.1038/nrm909.

Li, Huiying, and Thomas L. Poulos. 2005. "Structure-Function Studies on Nitric Oxide Synthases." *Journal of Inorganic Biochemistry* 99 (1): 293–305. doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.10.016.

Li, Jian-Mei, and Ajay M Shah. 2003a. "ROS Generation by Nonphagocytic NADPH Oxidase: Potential Relevance in Diabetic Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (8 Suppl 3): S221–26.

Li, Jian-Mei, and Ajay M. Shah. 2003b. "ROS Generation by Nonphagocytic NADPH Oxidase: Potential Relevance in Diabetic Nephropathy." *Journal of the American Society of Nephrology: JASN* 14 (8 Suppl 3): S221–26.

Li, Jian, Michael Stouffs, Lena Serrander, Botond Banfi, Esther Bettiol, Yves Charnay, Klaus Steger, Karl-Heinz Krause, and Marisa E Jaconi. 2006. "The NADPH Oxidase NOX4 Drives Cardiac Differentiation: Role in Regulating Cardiac Transcription Factors and MAP Kinase Activation." *Molecular Biology of the Cell* 17 (9): 3978–88. doi:10.1091/mbc.E05-06-0532.

Lillard, S. J., and E. S. Yeung. 1996. "Analysis of Single Erythrocytes by Injection-Based Capillary Isoelectric Focusing with Laser-Induced Native Fluorescence Detection." *Journal of Chromatography. B, Biomedical Applications* 687 (2): 363–69.

Liu, Bing, Liyan Qu, and Huimin Tao. 2010. "Cyclo-Oxygenase 2 up-Regulates the Effect of Multidrug Resistance." *Cell Biology International* 34 (1): 21–25. doi:10.1042/CBI20090129.

Liu, Y., P. Moënne-Loccoz, T. M. Loehr, and P. R. Ortiz de Montellano. 1997. "Heme Oxygenase-1, Intermediates in Verdoheme Formation and the Requirement for Reduction Equivalents." *The Journal of Biological Chemistry* 272 (11): 6909–17.

Llanos, Adana Am, Jessica L. Krok, Juan Peng, Michael L. Pennell, Susan Olivo-Marston, Mara Z. Vitolins, Cecilia R. Degraffinreid, and Electra D. Paskett. 2014. "Favorable Effects of Low-Fat and Low-Carbohydrate Dietary Patterns on Serum Leptin, but Not Adiponectin, among Overweight and Obese Premenopausal Women: A Randomized Trial." *SpringerPlus* 3: 175. doi:10.1186/2193-1801-3-175.

Lledías, F., P. Rangel, and W. Hansberg. 1998. "Oxidation of Catalase by Singlet Oxygen." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (17): 10630–37.

Loffreda, S., S. Q. Yang, H. Z. Lin, C. L. Karp, M. L. Brengman, D. J. Wang, A. S. Klein, et al. 1998. "Leptin Regulates Proinflammatory Immune Responses." *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 12 (1): 57–65.

Löf, M., S. Sandin, P. Lagiou, L. Hilakivi-Clarke, D. Trichopoulos, H.-O. Adami, and E. Weiderpass. 2007. "Dietary Fat and Breast Cancer Risk in the Swedish Women's Lifestyle and Health Cohort." *British Journal of Cancer* 97 (11): 1570–76. doi:10.1038/sj.bjc.6604033.

Loh, Kim, Atsushi Fukushima, Xinmei Zhang, Sandra Galic, Dana Briggs, Pablo J. Enriori, Stephanie Simonds, et al. 2011. "Elevated Hypothalamic TCPTP in Obesity Contributes to Cellular Leptin Resistance." *Cell Metabolism* 14 (5): 684–99. doi:10.1016/j.cmet.2011.09.011.

Löllmann, B., S. Grüninger, A. Stricker-Krongrad, and M. Chiesi. 1997. "Detection and Quantification of the Leptin Receptor Splice Variants Ob-Ra, B, And, E in Different Mouse Tissues." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238 (2): 648–52. doi:10.1006/bbrc.1997.7205.

Lord, G. M., G. Matarese, J. K. Howard, R. J. Baker, S. R. Bloom, and R. I. Lechler. 1998. "Leptin Modulates the T-Cell Immune Response and Reverses Starvation-Induced Immunosuppression." *Nature* 394 (6696): 897–901. doi:10.1038/29795.

Loscalzo, J., J. Freedman, A. Inbal, J. F. Keaney, A. D. Michelson, and J. A. Vita. 2000. "Nitric Oxide Insufficiency and Arterial Thrombosis." *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 111: 158–63.

Loschen, G, A Azzi, C Richter, and L Flohé. 1974. "Superoxide Radicals as Precursors of Mitochondrial Hydrogen Peroxide." *FEBS Letters* 42 (1): 68–72.

Lostao, M. P., E. Urdaneta, E. Martínez-Ansó, A. Barber, and J. A. Martínez. 1998. "Presence of Leptin Receptors in Rat Small Intestine and Leptin Effect on Sugar Absorption." *FEBS Letters* 423 (3): 302–6.

Lumb, Richard A, and Neil J Bulleid. 2002. "Is Protein Disulfide Isomerase a Redox-Dependent Molecular Chaperone?" *The EMBO Journal* 21 (24): 6763–70.

Lu, Xiaoqing, Jun Chen, R. Tedjo Sasmono, Eric D. Hsi, Kristopher A. Sarosiek, Tony Tiganis, and Izidore S. Lossos. 2007. "T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase, Distinctively Expressed in Activated-B-Cell-like Diffuse Large B-Cell Lymphomas, Is the Nuclear Phosphatase of STAT6." *Molecular and Cellular Biology* 27 (6): 2166–79. doi:10.1128/MCB.01234-06.

Lu, Yao, Qiong Xue, Markus R. Eisele, Endah S. Sulistijo, Kara Brower, Lin Han, El-Ad David Amir, Dana Pe'er, Kathryn Miller-Jensen, and Rong Fan. 2015. "Highly Multiplexed Profiling of Single-Cell Effector Functions Reveals Deep Functional Heterogeneity in Response to Pathogenic Ligands." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112 (7): E607–15. doi:10.1073/pnas.1416756112.

Macciò, A., C. Madeddu, and G. Mantovani. 2009. "Adipose Tissue as Target Organ in the Treatment of Hormone-Dependent Breast Cancer: New Therapeutic Perspectives." *Obesity Reviews: An Official Journal of the International Association for the Study of Obesity* 10 (6): 660–70. doi:10.1111/j.1467-789X.2009.00592.x.

Macciò, Antonio, and Clelia Madeddu. 2011. "Obesity, Inflammation, and Postmenopausal Breast Cancer: Therapeutic Implications." *TheScientificWorldJournal* 11: 2020–36. doi:10.1100/2011/806787.

Macciò, Antonio, Clelia Madeddu, Giulia Gramignano, Carlo Mulas, Carlo Floris, Daniela Massa, Giorgio Astara, Paola Chessa, and Giovanni Mantovani. 2010. "Correlation of Body Mass Index and Leptin with Tumor Size and Stage of Disease in Hormone-Dependent Postmenopausal Breast Cancer: Preliminary Results and Therapeutic Implications." *Journal of Molecular Medicine* 88 (7): 677–86. doi:10.1007/s00109-010-0611-8.

MacDougald, O. A., C. S. Hwang, H. Fan, and M. D. Lane. 1995. "Regulated Expression of the Obese Gene Product (leptin) in White Adipose Tissue and 3T3-L1 Adipocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (20): 9034–37.

Madej, T., M. S. Boguski, and S. H. Bryant. 1995. "Threading Analysis Suggests That the Obese Gene Product May Be a Helical Cytokine." *FEBS Letters* 373 (1): 13–18.

Mainardi, Marco, Gaia Scabia, Teresa Vottari, Ferruccio Santini, Aldo Pinchera, Lamberto Maffei, Tommaso Pizzorusso, and Margherita Maffei. 2010. "A Sensitive Period for Environmental Regulation of Eating Behavior and Leptin Sensitivity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (38): 16673–78. doi:10.1073/pnas.0911832107.

Manabe, Yasushi, Shuji Toda, Kohji Miyazaki, and Hajime Sugihara. 2003. "Mature Adipocytes, but Not Preadipocytes, Promote the Growth of Breast Carcinoma Cells in Collagen Gel Matrix Culture through Cancer-Stromal Cell Interactions." *The Journal of Pathology* 201 (2): 221–28. doi:10.1002/path.1430.

Man, Qingqing, and Li He. 2009. "[Effects of high-sugar and high-fat diet on growth and carbohydrate, lipid metabolism in Wistar rats]." *Wei Sheng Yan Jiu = Journal of Hygiene Research* 38 (6): 722–24.

Marashi, Vera, Angelika Barnekow, Edith Ossendorf, and Norbert Sachser. 2003. "Effects of Different Forms of Environmental Enrichment on Behavioral, Endocrinological, and Immunological Parameters in Male Mice." *Hormones and Behavior* 43 (2): 281–92.

Marcelin, Genevieve, Shun-Mei Liu, Xiaosong Li, Gary J. Schwartz, and Streamson Chua. 2012. "Genetic Control of ATGL-Mediated Lipolysis Modulates Adipose Triglyceride Stores in Leptin-Deficient Mice." *Journal of Lipid Research* 53 (5): 964–72. doi:10.1194/jlr.M022467.

Martin, Bronwen, Sunggoan Ji, Stuart Maudsley, and Mark P. Mattson. 2010. "'Control' Laboratory Rodents Are Metabolically Morbid: Why It Matters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (14): 6127–33. doi:10.1073/pnas.0912955107.

Martinez-Chacin, Raquel C., Megan Keniry, and Robert K. Dearth. 2014. "Analysis of High Fat Diet Induced Genes during Mammary Gland Development: Identifying Role Players in Poor Prognosis of Breast Cancer." *BMC Research Notes* 7 (1): 543. doi:10.1186/1756-0500-7-543.

Martínez-Martínez, Ernesto, Raquel Jurado-López, María Valero-Muñoz, María Visitación Bartolomé, Sandra Ballesteros, María Luaces, Ana María Briones, Natalia López-Andrés, María Miana, and Victoria Cachofeiro. 2014. "Leptin Induces Cardiac Fibrosis through Galectin-3, mTOR and Oxidative Stress: Potential Role in Obesity." *Journal of Hypertension* 32 (5): 1104–14; discussion 1114. doi:10.1097/HJH.0000000000000149.

Martinez-Outschoorn, Ubaldo E., Renee M. Balliet, Dayana B. Rivadeneira, Barbara Chiavarina, Stephanos Pavlides, Chenguang Wang, Diana Whitaker-Menezes, et al. 2010. "Oxidative Stress in Cancer Associated Fibroblasts Drives Tumor-Stroma Co-Evolution: A New Paradigm for Understanding Tumor Metabolism, the Field Effect and Genomic Instability in Cancer Cells." *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 9 (16): 3256–76. doi:10.4161/cc.9.16.12553.

Martinez-Outschoorn, Ubaldo, Federica Sotgia, and Michael P. Lisanti. 2014. "Tumor Microenvironment and Metabolic Synergy in Breast Cancers: Critical Importance of Mitochondrial Fuels and Function." *Seminars in Oncology* 41 (2): 195–216. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.03.002.

Martín-Romero, C, and V Sánchez-Margalet. 2001. "Human Leptin Activates PI3K and MAPK Pathways in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells: Possible Role of Sam68." *Cellular Immunology* 212 (2): 83–91. doi:10.1006/cimm.2001.1851.

Martin, Seth S., Atif Qasim, and Muredach P. Reilly. 2008a. "Leptin Resistance: A Possible Interface of Inflammation and Metabolism in Obesity-Related Cardiovascular Disease." *Journal of the American College of Cardiology* 52 (15): 1201–10. doi:10.1016/j.jacc.2008.05.060.

Martin-Venegas, Raquel, Olga Jáuregui, and Juan Jose Moreno. 2014. "Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Analysis of Eicosanoids and Related Compounds in Cell Models." *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 964 (August): 41–49. doi:10.1016/j.jchromb.2014.05.024.

Marttunen, M. B., S. Andersson, P. Hietanen, S. L. Karonen, H. A. Koistinen, V. A. Koivisto, A. Tiitinen, and O. Ylikorkala. 2000. "Antiestrogenic Tamoxifen and Toremifene Increase Serum Leptin Levels in Postmenopausal Breast Cancer Patients." *Maturitas* 35 (2): 175–79.

Maruna, P., R. Gürlich, R. Frasko, and M. Haluzík. 2001. "Serum Leptin Levels in Septic Men Correlate Well with C-Reactive Protein (CRP) and TNF-Alpha but Not with BMI." *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 50 (6): 589–94.

Masala, Giovanna, Melania Assedi, Saverio Caini, Ilaria Ermini, Daniela Occhini, Maria Castaldo, Benedetta Bendinelli, et al. 2014. "The DAMA Trial: A Diet and Physical Activity Intervention Trial to Reduce Mammographic Breast Density in Postmenopausal Women in Tuscany, Italy. Study Protocol and Baseline Characteristics." *Tumori* 100 (4): 377–85. doi:10.1700/1636.17890.

Matés, J M, C Pérez-Gómez, and I Núñez de Castro. 1999. "Antioxidant Enzymes and Human Diseases." *Clinical Biochemistry* 32 (8): 595–603.

Matés, J. M., and F. Sánchez-Jiménez. 1999. "Antioxidant Enzymes and Their Implications in Pathophysiologic Processes." *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 4 (March): D339–45.

Mathis, G. 1995. "Probing Molecular Interactions with Homogeneous Techniques Based on Rare Earth Cryptates and Fluorescence Energy Transfer." *Clinical Chemistry* 41 (9): 1391–97.

Matos, Pedro M., Henri G. Franquelim, Miguel A. R. B. Castanho, and Nuno C. Santos. 2010. "Quantitative Assessment of Peptide-Lipid Interactions. Ubiquitous Fluorescence Methodologies." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1798 (11): 1999–2012. doi:10.1016/j.bbamem.2010.07.012.

Mattioli, Benedetta, Luciana Giordani, Maria Giovanna Quaranta, and Marina Viora. 2009. "Leptin Exerts an Anti-Apoptotic Effect on Human Dendritic Cells via the PI3K-Akt Signaling Pathway." *FEBS Letters* 583 (7): 1102–6. doi:10.1016/j.febslet.2009.02.029.

Maublant, Jean, Jean-Philippe Vuillez, Jean-Noël Talbot, Jean Lumbrosco, Jean-Pierre Muratet, Jean-Yves Herry, and Jean-Claude Artus. 1999. "Tomographie Par Émission de Positons (TEP) et [F-18]-Fluorodésoxyglucose (FDG) En Cancérologie." *Bulletin Du Cancer* 85 (11): 935–50.

Mauro, Loredana, Stefania Catalano, Gianluca Bossi, Michele Pellegrino, Ines Barone, Sara Morales, Cinzia Giordano, Viviana Bartella, Ivan Casaburi, and Sebastiano Andò. 2007. "Evidences That Leptin up-Regulates E-Cadherin Expression in Breast Cancer: Effects on Tumor Growth and Progression." *Cancer Research* 67 (7): 3412–21. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2890.

Mazhar, D, R Ang, and J Waxman. 2006. "COX Inhibitors and Breast Cancer." *British Journal of Cancer* 94 (3): 346–50. doi:10.1038/sj.bjc.6602942.

McCullough, A. J., E. Bugianesi, G. Marchesini, and S. C. Kalhan. 1998. “Gender-Dependent Alterations in Serum Leptin in Alcoholic Cirrhosis.” *Gastroenterology* 115 (4): 947–53.

McKenzie, Fiona, Pietro Ferrari, Heinz Freisling, Veronique Chajès, Sabina Rinaldi, Jordi de Batlle, Christina C. Dahm, et al. 2014. “Healthy Lifestyle and Risk of Breast Cancer among Postmenopausal Women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Cohort Study.” *International Journal of Cancer*, November, n/a – n/a. doi:10.1002/ijc.29315.

Meitzler, Jennifer L., Smitha Antony, Yongzhong Wu, Agnes Juhasz, Han Liu, Guojian Jiang, Jiamo Lu, Krishnendu Roy, and James H. Doroshow. 2014. “NADPH Oxidases: A Perspective on Reactive Oxygen Species Production in Tumor Biology.” *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (17): 2873–89. doi:10.1089/ars.2013.5603.

Metz, S. A., M. G. Rice, and R. P. Robertson. 1979. “Applications and Limitations of Measurement of 15-keto,13,14-Dihydro Prostaglandin E2 in Human Blood by Radioimmunoassay.” *Prostaglandins* 17 (6): 839–61.

Mikhail, A. A., E. X. Beck, A. Shafer, B. Barut, J. S. Gbur, T. J. Zupancic, A. C. Schweitzer, et al. 1997. “Leptin Stimulates Fetal and Adult Erythroid and Myeloid Development.” *Blood* 89 (5): 1507–12.

Miller, S. G., P. De Vos, M. Guerre-Millo, K. Wong, T. Hermann, B. Staels, M. R. Briggs, and J. Auwerx. 1996. “The Adipocyte Specific Transcription Factor C/EBPalpha Modulates Human Ob Gene Expression.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (11): 5507–11.

Minneci, Peter C., Katherine J. Deans, Sruti Shiva, Huang Zhi, Steven M. Banks, Steven Kern, Charles Natanson, Steven B. Solomon, and Mark T. Gladwin. 2008. “Nitrite Reductase Activity of Hemoglobin as a Systemic Nitric Oxide Generator Mechanism to Detoxify Plasma Hemoglobin Produced during Hemolysis.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 295 (2): H743–54. doi:10.1152/ajpheart.00151.2008.

Minta, A, J P Kao, and R Y Tsien. 1989. “Fluorescent Indicators for Cytosolic Calcium Based on Rhodamine and Fluorescein Chromophores.” *The Journal of Biological Chemistry* 264 (14): 8171–78.

Miyoshi, Yasuo, Tohru Funahashi, Sachiyo Tanaka, Tetsuya Taguchi, Yasuhiro Tamaki, Iichiro Shimomura, and Shinzaburo Noguchi. 2006. “High Expression of Leptin Receptor mRNA in Breast Cancer Tissue Predicts Poor Prognosis for Patients with High, but Not Low, Serum Leptin Levels.” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 118 (6): 1414–19. doi:10.1002/ijc.21543.

Moghissi, K., M. R. Stringer, and Kate Dixon. 2008. “Fluorescence Photodiagnosis in Clinical Practice.” *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 5 (4): 235–37. doi:10.1016/j.pdpdt.2009.01.006.

Moharana, Kedar, Lennart Zabeau, Frank Peelman, Philippe Ringler, Henning Stahlberg, Jan Tavernier, and Savvas N. Savvides. 2014. “Structural and Mechanistic Paradigm of Leptin Receptor Activation Revealed by Complexes with Wild-Type and Antagonist Leptins.” *Structure (London, England: 1993)* 22 (6): 866–77. doi:10.1016/j.str.2014.04.012.

Monici, Monica. 2005. “Cell and Tissue Autofluorescence Research and Diagnostic Applications.” *Biotechnology Annual Review* 11: 227–56. doi:10.1016/S1387-2656(05)11007-2.

Montague, C. T., I. S. Farooqi, J. P. Whitehead, M. A. Soos, H. Rau, N. J. Wareham, C. P. Sewter, et al. 1997. “Congenital Leptin Deficiency Is Associated with Severe Early-Onset Obesity in Humans.” *Nature* 387 (6636): 903–8. doi:10.1038/43185.

Monteleone, P., F. Bortolotti, M. Fabrazzo, A. La Rocca, A. Fuschino, and M. Maj. 2000. “Plamsa Leptin Response to Acute Fasting and Refeeding in Untreated Women with Bulimia Nervosa.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 (7): 2499–2503. doi:10.1210/jcem.85.7.6673.

Montuschi, Paolo, Giuseppe Santini, Salvatore Valente, Chiara Mondino, Francesco Macagno, Paola Cattani, Gina Zini, and Nadia Mores. 2014. “Liquid Chromatography–mass Spectrometry Measurement of Leukotrienes in Asthma and Other Respiratory Diseases.” *Journal of Chromatography B*, Analysis of Eicosanoids, Amino Acids, Organic Acids and microRNA, 964: 12–25. doi:10.1016/j.jchromb.2014.02.059.

Moreno-Navarrete, José María, Francisco Ortega, Marta Serrano, Ester Guerra, Gerard Pardo, Francisco Tinahones, Wifredo Ricart, and José Manuel Fernández-Real. 2013. “Irisin Is Expressed and Produced by Human Muscle and Adipose Tissue in Association with Obesity and Insulin Resistance.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 98 (4): E769–78. doi:10.1210/jc.2012-2749.

Morris, David L., and Liangyou Rui. 2009. “Recent Advances in Understanding Leptin Signaling and Leptin Resistance.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297 (6): E1247–59. doi:10.1152/ajpendo.00274.2009.

Morrison, Christopher D., Gregory J. Morton, Kevin D. Niswender, Richard W. Gelling, and Michael W. Schwartz. 2005. “Leptin Inhibits Hypothalamic Npy and Agrp Gene Expression via a Mechanism That Requires Phosphatidylinositol 3-OH-Kinase Signaling.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 289 (6): E1051–57. doi:10.1152/ajpendo.00094.2005.

Morton, N. M., V. Emilsson, Y. L. Liu, and M. A. Cawthorne. 1998. “Leptin Action in Intestinal Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (40): 26194–201.

Münzberg, H., M. Björnholm, S. H. Bates, and M. G. Myers. 2005. “Leptin Receptor Action and Mechanisms of Leptin Resistance.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 62 (6): 642–52. doi:10.1007/s00018-004-4432-1.

Münzberg, Heike, and Christopher D. Morrison. 2015a. “Structure, Production and Signaling of Leptin.” *Metabolism*, Leptin in the 21st Century, 64 (1): 13–23. doi:10.1016/j.metabol.2014.09.010.

———. 2015b. “Structure, Production and Signaling of Leptin.” *Metabolism*, Leptin in the 21st Century, 64 (1): 13–23. doi:10.1016/j.metabol.2014.09.010.

Murata, Norio. 2009. “The Discovery of State Transitions in Photosynthesis 40 Years Ago.” *Photosynthesis Research* 99 (3): 155–60. doi:10.1007/s11120-008-9389-8.

Murphy, J. E., S. Zhou, K. Giese, L. T. Williams, J. A. Escobedo, and V. J. Dwarki. 1997. “Long-Term Correction of Obesity and Diabetes in Genetically Obese Mice by a Single Intramuscular Injection of Recombinant Adeno-Associated Virus Encoding Mouse Leptin.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25): 13921–26.

Muzzin, P., R. C. Eisensmith, K. C. Copeland, and S. L. Woo. 1997. “Hepatic Insulin Gene Expression as Treatment for Type 1 Diabetes Mellitus in Rats.” *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (6): 833–37. doi:10.1210/mend.11.6.0017.

Myers, Martin G., Michael A. Cowley, and Heike Münzberg. 2008. “Mechanisms of Leptin Action and Leptin Resistance.” *Annual Review of Physiology* 70: 537–56. doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100707.

Myers, Robert P., Djamila Messous, Thierry Poynard, and Francoise Imbert-Bismut. 2007. “Association between Leptin, Metabolic Factors and Liver Histology in Patients with Chronic Hepatitis C.” *Canadian Journal of Gastroenterology = Journal Canadien De Gastroenterologie* 21 (5): 289–94.

Nachat-Kappes, Rachida, Alexandre Pinel, Kristell Combe, Bruno Lamas, Marie-Chantal Farges, Adrien Rossary, Nicolas Goncalves-Mendes, Florence Caldefie-Chezet, Marie-Paule Vasson, and Samar Basu. 2012a. “Effects of Enriched Environment on COX-2, Leptin and Eicosanoids in a Mouse Model of Breast Cancer.” *PloS One* 7 (12): e51525. doi:10.1371/journal.pone.0051525.

Na, Hye-Kyung, and Sergiy Oliynyk. 2011. “Effects of Physical Activity on Cancer Prevention.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 1229 (July): 176–83. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06105.x.

Nakajima, Shingo, Tohru Hira, and Hiroshi Hara. 2015. “Postprandial Glucagon-like Peptide-1 Secretion Is Increased during the Progression of Glucose Intolerance and Obesity in High-Fat/high-Sucrose Diet-Fed Rats.” *The British Journal of Nutrition* 113 (9): 1477–88. doi:10.1017/S0007114515000550.

Nakao, T., M. Hino, T. Yamane, Y. Nishizawa, H. Morii, and N. Tatsumi. 1998. “Expression of the Leptin Receptor in Human Leukaemic Blast Cells.” *British Journal of Haematology* 102 (3): 740–45.

Nalabolu, Mohan Reddy, Kalyani Palasamudram, and Kaiser Jamil. 2014a. “Adiponectin and Leptin Molecular Actions and Clinical Significance in Breast Cancer.” *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 8 (1): 31–40.

Natarajan, Sathish Kumar, and Donald F Becker. 2012. “Role of Apoptosis-Inducing Factor, Proline Dehydrogenase, and NADPH Oxidase in Apoptosis and Oxidative Stress.” *Cell Health and Cytoskeleton* 2012 (4): 11–27. doi:10.2147/CHC.S4955.

Nave, Heike, Guenter Mueller, Britta Siegmund, Roland Jacobs, Thorsten Stroh, Ulrike Schueler, Matthias Hopfe, et al. 2008. “Resistance of Janus Kinase-2 Dependent Leptin Signaling in Natural Killer (NK) Cells: A Novel Mechanism of NK Cell Dysfunction in Diet-Induced Obesity.” *Endocrinology* 149 (7): 3370–78. doi:10.1210/en.2007-1516.

Naz, Shama, Délia Chaves Moreira dos Santos, Antonia García, and Coral Barbas. 2014. “Analytical Protocols Based on LC-MS, GC-MS and CE-MS for Nontargeted Metabolomics of Biological Tissues.” *Bioanalysis* 6 (12): 1657–77. doi:10.4155/bio.14.119.

Niwa, Yasuharu, Hiroaki Kanda, Yuko Shikauchi, Akio Saiura, Kenichi Matsubara, Tomoyuki Kitagawa, Junji Yamamoto, Takahiko Kubo, and Hirohide Yoshikawa. 2005. “Methylation Silencing of SOCS-3 Promotes Cell Growth and Migration by Enhancing JAK/STAT and FAK Signalings in Human Hepatocellular Carcinoma.” *Oncogene* 24 (42): 6406–17. doi:10.1038/sj.onc.1208788.

Nkhata, Katai J., Amitabha Ray, Todd F. Schuster, Michael E. Grossmann, and Margot P. Cleary. 2009. “Effects of Adiponectin and Leptin Co-Treatment on Human Breast Cancer Cell Growth.” *Oncology Reports* 21 (6): 1611–19.

Noland, R. C., J. T. Baker, S. R. Boudreau, R. W. Kobe, C. J. Tanner, R. C. Hickner, M. R. McCammon, and J. A. Houmard. 2001. “Effect of Intense Training on Plasma Leptin in Male and Female Swimmers.” *Medicine and Science in Sports and Exercise* 33 (2): 227–31.

Okumura, Mie, Mayumi Yamamoto, Hiroya Sakuma, Toshihiro Kojima, Takako Maruyama, Marjan Jamali, Denise R. Cooper, and Keigo Yasuda. 2002. “Leptin and High Glucose Stimulate Cell Proliferation in

MCF-7 Human Breast Cancer Cells: Reciprocal Involvement of PKC-Alpha and PPAR Expression." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1592 (2): 107–16.

O'Leary, Patrick C., Marta Terrile, Malgorzata Bajor, Pawel Gaj, Bryan T. Hennessy, Gordon B. Mills, Agnieszka Zagozdzon, et al. 2014. "Peroxiredoxin-1 Protects Estrogen Receptor A from Oxidative Stress-Induced Suppression and Is a Protein Biomarker of Favorable Prognosis in Breast Cancer." *Breast Cancer Research: BCR* 16 (4): R79. doi:10.1186/bcr3691.

O Leary, Patrick C., Marta Terrile, Malgorzata Bajor, Pawel Gaj, Bryan T. Hennessy, Gordon B. Mills, Agnieszka Zagozdzon, et al. 2014. "Peroxiredoxin-1 Protects Estrogen Receptor Alpha from Oxidative Stress-Induced Suppression and Is a Protein Biomarker of Favorable Prognosis in Breast Cancer." *Breast Cancer Research: BCR* 16 (4): R79. doi:10.1186/bcr3691.

Onyango, Arnold N, and Naomichi Baba. 2010. "New Hypotheses on the Pathways of Formation of Malondialdehyde and Isofurans." *Free Radical Biology & Medicine* 49 (10): 1594–1600. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.012.

Ortega, F. J., and J. M. Fernández-Real. 2013. "Inflammation in Adipose Tissue and Fatty Acid Anabolism: When Enough Is Enough!" *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme* 45 (13): 1009–19. doi:10.1055/s-0033-1358690.

Otero, Miguel, Rocío Lago, Francisca Lago, Felipe F. Casanueva, Carlos Dieguez, Juan Jesús Gómez-Reino, and Oreste Gualillo. 2005. "Leptin, from Fat to Inflammation: Old Questions and New Insights." *FEBS Letters* 579 (2): 295–301. doi:10.1016/j.febslet.2004.11.024.

Ozata, M., I. C. Ozdemir, and J. Licinio. 1999. "Human Leptin Deficiency Caused by a Missense Mutation: Multiple Endocrine Defects, Decreased Sympathetic Tone, and Immune System Dysfunction Indicate New Targets for Leptin Action, Greater Central than Peripheral Resistance to the Effects of Leptin, and Spontaneous Correction of Leptin-Mediated Defects." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (10): 3686–95. doi:10.1210/jcem.84.10.5999.

Ozet, A., F. Arpaci, M. I. Yilmaz, H. Ayta, B. Ozturk, S. Komurcu, A. A. Yavuz, Y. Tezcan, and C. Acikel. 2001. "Effects of Tamoxifen on the Serum Leptin Level in Patients with Breast Cancer." *Japanese Journal of Clinical Oncology* 31 (9): 424–27.

Pacher, Pál, Joseph S. Beckman, and Lucas Liaudet. 2007. "Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease." *Physiological Reviews* 87 (1): 315–424. doi:10.1152/physrev.00029.2006.

Palacios-González, Berenice, Felipe Vadillo-Ortega, Ernestina Polo-Oteyza, Teresa Sánchez, Monica Ancira-Moreno, Sandra Romero-Hidalgo, Noemi Meráz, and Barbara Antuna-Puente. 2015. "Irisin Levels before and after Physical Activity among School-Age Children with Different BMI: A Direct Relation with Leptin." *Obesity (Silver Spring, Md.)* 23 (4): 729–32. doi:10.1002/oby.21029.

Panigrahy, Dipak, Arja Kaipainen, Emily R. Greene, and Sui Huang. 2010. "Cytochrome P450-Derived Eicosanoids: The Neglected Pathway in Cancer." *Cancer Metastasis Reviews* 29 (4): 723–35. doi:10.1007/s10555-010-9264-x.

Pan, Sai Yi, and Marie DesMeules. 2009. "Energy Intake, Physical Activity, Energy Balance, and Cancer: Epidemiologic Evidence." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 472: 191–215. doi:10.1007/978-1-60327-492-0_8.

Park, S., Y. W. Kim, J. Y. Kim, E. C. Jang, K. O. Doh, and S. K. Lee. 2001. "Effect of High Fat Diet on Insulin Resistance: Dietary Fat versus Visceral Fat Mass." *Journal of Korean Medical Science* 16 (4): 386–90.

Pasman, W. J., M. S. Westerterp-Plantenga, and W. H. Saris. 1998. "The Effect of Exercise Training on Leptin Levels in Obese Males." *The American Journal of Physiology* 274 (2 Pt 1): E280–86.

Pelleymounter, M. A., M. J. Cullen, M. B. Baker, R. Hecht, D. Winters, T. Boone, and F. Collins. 1995. "Effects of the Obese Gene Product on Body Weight Regulation in Ob/ob Mice." *Science (New York, N.Y.)* 269 (5223): 540–43.

Pellizzon, Michael, Anne Buison, Frank Ordiz, Lardo Santa Ana, and K.-L. Catherine Jen. 2002. "Effects of Dietary Fatty Acids and Exercise on Body-Weight Regulation and Metabolism in Rats." *Obesity Research* 10 (9): 947–55. doi:10.1038/oby.2002.129.

Pénicaud, Luc, Sophie Meillon, and Laurent Brondel. 2012. "Leptin and the Central Control of Feeding Behavior." *Biochimie* 94 (10): 2069–74. doi:10.1016/j.biochi.2012.04.013.

Petridou, E., Y. Papadiamantis, C. Markopoulos, E. Spanos, N. Dessypris, and D. Trichopoulos. 2000. "Leptin and Insulin Growth Factor I in Relation to Breast Cancer (Greece)." *Cancer Causes & Control: CCC* 11 (5): 383–88.

Piao, Longzhen, Jisoo Park, Yuwen Li, Sanghee Shin, Soyeon Shin, Gyeyeong Kong, Robin Shrestha, et al. 2014. "SOCS3 and SOCS6 Are Required for the Risperidone-Mediated Inhibition of Insulin and Leptin Signaling in Neuroblastoma Cells." *International Journal of Molecular Medicine* 33 (5): 1364–70. doi:10.3892/ijmm.2014.1693.

Piche, T., F. Vandenbos, A. Abakar-Mahamat, G. Vanbiervliet, E. M. Barjoan, G. Calle, J. Giudicelli, et al. 2004. "The Severity of Liver Fibrosis Is Associated with High Leptin Levels in Chronic Hepatitis C." *Journal of Viral Hepatitis* 11 (1): 91–96.

Pinto, Shirly, Aaron G. Roseberry, Hongyan Liu, Sabrina Diano, Marya Shanabrough, Xiaoli Cai, Jeffrey M. Friedman, and Tamas L. Horvath. 2004. "Rapid Rewiring of Arcuate Nucleus Feeding Circuits by Leptin." *Science (New York, N.Y.)* 304 (5667): 110–15. doi:10.1126/science.1089459.

Polak, Jan, Eva Klimcakova, Cedric Moro, Nathalie Viguerie, Michel Berlan, Jindriska Hejnova, Blanka Richterova, Ivan Kraus, Dominique Langin, and Vladimir Stich. 2006. "Effect of Aerobic Training on Plasma Levels and Subcutaneous Abdominal Adipose Tissue Gene Expression of Adiponectin, Leptin, Interleukin 6, and Tumor Necrosis Factor Alpha in Obese Women." *Metabolism: Clinical and Experimental* 55 (10): 1375–81. doi:10.1016/j.metabol.2006.06.008.

Porter, Geoffrey A., Karen M. Inglis, Lori A. Wood, and Paul J. Veugelers. 2006. "Effect of Obesity on Presentation of Breast Cancer." *Annals of Surgical Oncology* 13 (3): 327–32. doi:10.1245/ASO.2006.03.049.

Pradelles, P., J. Grassi, and J. Maclouf. 1985. "Enzyme Immunoassays of Eicosanoids Using Acetylcholine Esterase as Label: An Alternative to Radioimmunoassay." *Analytical Chemistry* 57 (7): 1170–73.

Prawan, Auemduan, Joydeb K. Kundu, and Young-Joon Surh. 2005. "Molecular Basis of Heme Oxygenase-1 Induction: Implications for Chemoprevention and Chemoprotection." *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (11-12): 1688–1703. doi:10.1089/ars.2005.7.1688.

Prolo, P., M. L. Wong, and J. Licinio. 1998. "Leptin." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30 (12): 1285–90.

Pu, Yang, Laura A. Sordillo, Yuanlong Yang, and R. R. Alfano. 2014. "Key Native Fluorophores Analysis of Human Breast Cancer Tissues Using Gram-Schmidt Subspace Method." *Optics Letters* 39 (24): 6787–90.

Qin, Jianhua, Yingsing Fung, Derong Zhu, and Bingcheng Lin. 2004. "Native Fluorescence Detection of Flavin Derivatives by Microchip Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Intensified Charge-Coupled Device Detection." *Journal of Chromatography. A* 1027 (1-2): 223–29.

Queipo-Ortuño, María Isabel, Luisa María Seoane, Mora Murri, María Pardo, Juan Miguel Gomez-Zumaquero, Fernando Cardona, Felipe Casanueva, and Francisco J. Tinahones. 2013. "Gut Microbiota Composition in Male Rat Models under Different Nutritional Status and Physical Activity and Its Association with Serum Leptin and Ghrelin Levels." *PloS One* 8 (5): e65465. doi:10.1371/journal.pone.0065465.

Quintela, M., R. Señaris, M. L. Heiman, F. F. Casanueva, and C. Dieguez. 1997. "Leptin Inhibits in Vitro Hypothalamic Somatostatin Secretion and Somatostatin mRNA Levels." *Endocrinology* 138 (12): 5641–44. doi:10.1210/endo.138.12.5713.

Rämson, Raul, Jaak Jürimäe, Toivo Jürimäe, and Jarek Mäestu. 2008. "The Influence of Increased Training Volume on Cytokines and Ghrelin Concentration in College Level Male Rowers." *European Journal of Applied Physiology* 104 (5): 839–46. doi:10.1007/s00421-008-0839-y.

Rao Malla, Rama, Hari Raghu, and Jasti S Rao. 2010. "Regulation of NADPH Oxidase (Nox2) by Lipid Rafts in Breast Carcinoma Cells." *International Journal of Oncology* 37 (6): 1483–93.

Rasola, Andrea, and Paolo Bernardi. 2014. "The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Its Adaptive Responses in Tumor Cells." *Cell Calcium* 56 (6): 437–45. doi:10.1016/j.ceca.2014.10.003.

Ray, Amitabha, Katai J. Nkhata, and Margot P. Cleary. 2007. "Effects of Leptin on Human Breast Cancer Cell Lines in Relationship to Estrogen Receptor and HER2 Status." *International Journal of Oncology* 30 (6): 1499–1509.

Rayner, D. V., and P. Trayhurn. 2001. "Regulation of Leptin Production: Sympathetic Nervous System Interactions." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 79 (1): 8–20.

Reeves, Gillian K., Kirstin Pirie, Valerie Beral, Jane Green, Elizabeth Spencer, Diana Bull, and Million Women Study Collaboration. 2007a. "Cancer Incidence and Mortality in Relation to Body Mass Index in the Million Women Study: Cohort Study." *BMJ (Clinical Research Ed.)* 335 (7630): 1134. doi:10.1136/bmj.39367.495995.AE.

Reeves, P. G. 1997. "Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet." *The Journal of Nutrition* 127 (5 Suppl): 838S – 841S.

Reeves, P. G., F. H. Nielsen, and G. C. Fahey. 1993. "AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet." *The Journal of Nutrition* 123 (11): 1939–51.

Renehan, Andrew G., Darren L. Roberts, and Caroline Dive. 2008. "Obesity and Cancer: Pathophysiological and Biological Mechanisms." *Archives of Physiology and Biochemistry* 114 (1): 71–83. doi:10.1080/13813450801954303.

Ren, Wen Xiu, Jiyou Han, Soojin Uhm, Yu Jin Jang, Chulhun Kang, Jong-Hoon Kim, and Jong Seung Kim. 2015. "Recent Development of Biotin Conjugation in Biological Imaging, Sensing, and Target Delivery." *Chemical Communications (Cambridge, England)*, May. doi:10.1039/c5cc03075g.

Rockett, Benjamin Drew, Mitchel Harris, and Saame Raza Shaikh. 2012. "High Dose of an N-3 Polyunsaturated Fatty Acid Diet Lowers Activity of C57BL/6 Mice." *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 86 (3): 137–40. doi:10.1016/j.plefa.2011.12.001.

Rockett, Benjamin Drew, Muhammad Salameh, Kristen Carraway, Kaitlin Morrison, and Saame Raza Shaikh. 2010. "N-3 PUFA Improves Fatty Acid Composition, Prevents Palmitate-Induced Apoptosis, and Differentially Modifies B Cell Cytokine Secretion in Vitro and Ex Vivo." *Journal of Lipid Research* 51 (6): 1284–97. doi:10.1194/jlr.M000851.

Roessner, A., D. Kuester, P. Malfertheiner, and R. Schneider-Stock. 2008. "Oxidative Stress in Ulcerative Colitis-Associated Carcinogenesis." *Pathology - Research and Practice*, Special issue: Pathology of the Lower Gastrointestinal Tract - Research and Practice, 204 (7): 511–24. doi:10.1016/j.prp.2008.04.011.

Roger, P., M. E. Sahla, S. Mäkelä, J. A. Gustafsson, P. Baldet, and H. Rochefort. 2001. "Decreased Expression of Estrogen Receptor Beta Protein in Proliferative Preinvasive Mammary Tumors." *Cancer Research* 61 (6): 2537–41.

Ronti, Tiziana, Graziana Lupattelli, and Elmo Mannarino. 2006. "The Endocrine Function of Adipose Tissue: An Update." *Clinical Endocrinology* 64 (4): 355–65. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02474.x.

Rose, D. P., J. M. Connolly, and C. L. Meschter. 1991. "Effect of Dietary Fat on Human Breast Cancer Growth and Lung Metastasis in Nude Mice." *Journal of the National Cancer Institute* 83 (20): 1491–95.

Rosenbaum, M., and R. L. Leibel. 1999. "Clinical Review 107: Role of Gonadal Steroids in the Sexual Dimorphisms in Body Composition and Circulating Concentrations of Leptin." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (6): 1784–89. doi:10.1210/jcem.84.6.5787.

Rossary, A., K. Arab, J. Goudable, and J.-P. Steghens. 2007. "[Fatty acids regulate NOX activity]." *Annales De Biologie Clinique* 65 (1): 33–40.

Rotheneder, Martina, and Gerhard M. Kostner. 1989. "Effects of Low- and High-Density Lipoproteins on the Proliferation of Human Breast Cancer Cells In Vitro: Differences between Hormone-Dependent and Hormone-Independent Cell Lines." *International Journal of Cancer* 43 (5): 875–79. doi:10.1002/ijc.2910430523.

Ruhl, C. E., and J. E. Everhart. 2001. "Leptin Concentrations in the United States: Relations with Demographic and Anthropometric Measures." *The American Journal of Clinical Nutrition* 74 (3): 295–301.

Ru, Peng, Robert Steele, Eddy C. Hsueh, and Ratna B. Ray. 2011. "Anti-miR-203 Upregulates SOCS3 Expression in Breast Cancer Cells and Enhances Cisplatin Chemosensitivity." *Genes & Cancer* 2 (7): 720–27. doi:10.1177/1947601911425832.

Ryter, Stefan W., Jawed Alam, and Augustine M. K. Choi. 2006. "Heme Oxygenase-1/carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications." *Physiological Reviews* 86 (2): 583–650. doi:10.1152/physrev.00011.2005.

Sáinz, Neira, Jaione Barrenetxe, María J. Moreno-Aliaga, and José Alfredo Martínez. 2015. "Leptin Resistance and Diet-Induced Obesity: Central and Peripheral Actions of Leptin." *Metabolism*, Leptin in the 21st Century, 64 (1): 35–46. doi:10.1016/j.metabol.2014.10.015.

Sánchez-Margalet, V., C. Martín-Romero, J. Santos-Alvarez, R. Goberna, S. Najib, and C. Gonzalez-Yanes. 2003. "Role of Leptin as an Immunomodulator of Blood Mononuclear Cells: Mechanisms of Action." *Clinical and Experimental Immunology* 133 (1): 11–19.

Santillán-Benítez, Jonnathan Guadalupe, Hugo Mendieta-Zerón, Leobardo Manuel Gómez-Oliván, Angel Ordóñez Quiroz, Juan Jueventino Torres-Juárez, and Juan Manuel González-Bañales. 2014. "JAK2, STAT3 and SOCS3 Gene Expression in Women with and without Breast Cancer." *Gene* 547 (1): 70–76. doi:10.1016/j.gene.2014.06.025.

Santos-Alvarez, J., R. Goberna, and V. Sánchez-Margalet. 1999. "Human Leptin Stimulates Proliferation and Activation of Human Circulating Monocytes." *Cellular Immunology* 194 (1): 6–11. doi:10.1006/cimm.1999.1490.

Sardina, José L., Guillermo López-Ruano, Beatriz Sánchez-Sánchez, Marcial Llanillo, and Angel Hernández-Hernández. 2012. "Reactive Oxygen Species: Are They Important for Haematopoiesis?" *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 81 (3): 257–74. doi:10.1016/j.critrevonc.2011.03.005.

Sauer, H., M. Wartenberg, and J. Hescheler. 2001. "Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers during Cell Growth and Differentiation." *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 11 (4): 173–86. doi:47804.

Sauter, E. R., C. Garofalo, J. Hewett, J. E. Hewett, C. Morelli, and E. Surmacz. 2004. "Leptin Expression in Breast Nipple Aspirate Fluid (NAF) and Serum Is Influenced by Body Mass Index (BMI) but Not by the Presence of Breast Cancer." *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme* 36 (5): 336–40. doi:10.1055/s-2004-814490.

Saxena, Neeraj K., and Frank A. Anania. 2015. “Adipocytokines and Hepatic Fibrosis.” *Trends in Endocrinology & Metabolism* 26 (3): 153–61. doi:10.1016/j.tem.2015.01.002.

Saxena, Neeraj K., Mark A. Titus, Xiaokun Ding, Jeffrey Floyd, Shanthi Srinivasan, Shanthi V. Sitaraman, and Frank A. Anania. 2004. “Leptin as a Novel Profibrogenic Cytokine in Hepatic Stellate Cells: Mitogenesis and Inhibition of Apoptosis Mediated by Extracellular Regulated Kinase (Erk) and Akt Phosphorylation.” *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (13): 1612–14. doi:10.1096/fj.04-1847fje.

Saxena, Neeraj K., Paula M. Vertino, Frank A. Anania, and Dipali Sharma. 2007. “Leptin-Induced Growth Stimulation of Breast Cancer Cells Involves Recruitment of Histone Acetyltransferases and Mediator Complex to CYCLIN D1 Promoter via Activation of Stat3.” *The Journal of Biological Chemistry* 282 (18): 13316–25. doi:10.1074/jbc.M609798200.

Schopfer, Mark P., Jun Wang, and Kenneth D. Karlin. 2010. “Bioinspired Heme, Heme/nonheme Diiron, Heme/copper, and Inorganic NOx Chemistry: *NO((g)) Oxidation, Peroxynitrite-Metal Chemistry, and *NO((g)) Reductive Coupling.” *Inorganic Chemistry* 49 (14): 6267–82. doi:10.1021/ic100033y.

Schulze, Philipp, Martin Ludwig, Frank Kohler, and Detlev Belder. 2005. “Deep UV Laser-Induced Fluorescence Detection of Unlabeled Drugs and Proteins in Microchip Electrophoresis.” *Analytical Chemistry* 77 (5): 1325–29. doi:10.1021/ac048596m.

Schüttpelz, Mark, Christian Müller, Hannes Neuweiler, and Markus Sauer. 2006. “UV Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy: A Label-Free Method for Detection and Quantification of Protein Interactions.” *Analytical Chemistry* 78 (3): 663–69. doi:10.1021/ac051938j.

Schwartz, M. W., R. J. Seeley, L. A. Campfield, P. Burn, and D. G. Baskin. 1996. “Identification of Targets of Leptin Action in Rat Hypothalamus.” *The Journal of Clinical Investigation* 98 (5): 1101–6. doi:10.1172/JCI118891.

Schwartz, M. W., S. C. Woods, D. Porte, R. J. Seeley, and D. G. Baskin. 2000. “Central Nervous System Control of Food Intake.” *Nature* 404 (6778): 661–71. doi:10.1038/35007534.

Schwedhelm, Edzard, and Rainer H. Böger. 2003. “Application of Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Analysis of Isoprostanes: Their Role in Cardiovascular Disease.” *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: CCLM / FESCC* 41 (12): 1552–61. doi:10.1515/CCLM.2003.238.

Sennello, Joseph A., Raja Fayad, Maria Pini, Melissa E. Gove, and Giamila Fantuzzi. 2006. “Transplantation of Wild-Type White Adipose Tissue Normalizes Metabolic, Immune and Inflammatory Alterations in Leptin-Deficient Ob/ob Mice.” *Cytokine* 36 (5-6): 261–66. doi:10.1016/j.cyto.2007.02.001.

Sezgin Alikanoglu, Arsenal, Mustafa Yildirim, Dinc Suren, Mustafa Yildiz, Vildan Kaya, Utku Donem Dilli, and Cem Sezer. 2014. “Expression of Cyclooxygenase-2 and Bcl-2 in Breast Cancer and Their Relationship with Triple-Negative Disease.” *Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology* 19 (2): 430–34.

Shaul, Merav E., Grace Bennett, Katherine J. Strissel, Andrew S. Greenberg, and Martin S. Obin. 2010. “Dynamic, M2-like Remodeling Phenotypes of CD11c+ Adipose Tissue Macrophages during High-Fat Diet--Induced Obesity in Mice.” *Diabetes* 59 (5): 1171–81. doi:10.2337/db09-1402.

Shibahara, Shigeki, Masaharu Nakayama, Tomomi Kitamuro, Reiko Udono-Fujimori, and Kazuhiro Takahashi. 2003. “Repression of Heme Oxygenase-1 Expression as a Defense Strategy in Humans.” *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)* 228 (5): 472–73.

Shih, Ruey-Horng, and Chuen-Mao Yang. 2010a. “Induction of Heme Oxygenase-1 Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Cyclooxygenase-2 Expression in Mouse Brain Endothelial Cells.” *Journal of Neuroinflammation* 7: 86. doi:10.1186/1742-2094-7-86.

Shimabukuro, M., M. Y. Wang, Y. T. Zhou, C. B. Newgard, and R. H. Unger. 1998. “Protection against Lipoapoptosis of Beta Cells through Leptin-Dependent Maintenance of Bcl-2 Expression.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (16): 9558–61.

Shin, Hye-Jin, Jaewon Oh, Seok Min Kang, Jong Ho Lee, Min-Jeong Shin, Ki-Chul Hwang, Yangsoo Jang, and Ji Hyung Chung. 2005. “Leptin Induces Hypertrophy via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Rat Vascular Smooth Muscle Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 329 (1): 18–24. doi:10.1016/j.bbrc.2004.12.195.

Shirshin, Evgeny, Olga Cherkasova, Tatiana Tikhonova, Elena Berlovskaya, Alexander Priezzhev, and Victor Fadeev. 2015. “Native Fluorescence Spectroscopy of Blood Plasma of Rats with Experimental Diabetes: Identifying Fingerprints of Glucose-Related Metabolic Pathways.” *Journal of Biomedical Optics* 20 (5): 51033. doi:10.1117/1.JBO.20.5.051033.

Siegmund, Britta, Hans Anton Lehr, and Giamila Fantuzzi. 2002. “Leptin: A Pivotal Mediator of Intestinal Inflammation in Mice.” *Gastroenterology* 122 (7): 2011–25.

Sierra-Honigmann, M. R., A. K. Nath, C. Murakami, G. García-Cardeña, A. Papapetropoulos, W. C. Sessa, L. A. Madge, et al. 1998. “Biological Action of Leptin as an Angiogenic Factor.” *Science (New York, N.Y.)* 281 (5383): 1683–86.

Sies, H. 1999. “Glutathione and Its Role in Cellular Functions.” *Free Radical Biology & Medicine* 27 (9-10): 916–21.

Silha, Josef V., Michal Krsek, Jan V. Skrha, Petr Sucharda, B. L. G. Nyomba, and Liam J. Murphy. 2003. “Plasma Resistin, Adiponectin and Leptin Levels in Lean and Obese Subjects: Correlations with Insulin Resistance.” *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* 149 (4): 331–35.

Siméon, N., R. Myers, C. Bayle, M. Nertz, J. K. Stewart, and F. Couderc. 2001. “Some Applications of near-Ultraviolet Laser-Induced Fluorescence Detection in Nanomolar- and Subnanomolar-Range High-Performance Liquid Chromatography or Micro-High-Performance Liquid Chromatography.” *Journal of Chromatography. A* 913 (1-2): 253–59.

Simoncic, Paul D., Annie Bourdeau, Ailsa Lee-Loy, Larry R. Rohrschneider, Michel L. Tremblay, E. Richard Stanley, and C. Jane McGlade. 2006. “T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase (Tcptp) Is a Negative Regulator of Colony-Stimulating Factor 1 Signaling and Macrophage Differentiation.” *Molecular and Cellular Biology* 26 (11): 4149–60. doi:10.1128/MCB.01932-05.

Singer, Georg, and D. Neil Granger. 2007. “Inflammatory Responses Underlying the Microvascular Dysfunction Associated with Obesity and Insulin Resistance.” *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 14 (4-5): 375–87. doi:10.1080/10739680701283158.

Sinha, M. K., I. Opentanova, J. P. Ohannesian, J. W. Kolaczynski, M. L. Heiman, J. Hale, G. W. Becker, R. R. Bowsher, T. W. Stephens, and J. F. Caro. 1996. “Evidence of Free and Bound Leptin in Human Circulation. Studies in Lean and Obese Subjects and during Short-Term Fasting.” *The Journal of Clinical Investigation* 98 (6): 1277–82. doi:10.1172/JCI118913.

Smedh, U., M. L. Håkansson, B. Meister, and K. Uvnäs-Moberg. 1998. “Leptin Injected into the Fourth Ventricle Inhibits Gastric Emptying.” *Neuroreport* 9 (2): 297–301.

Sobhani, I., A. Bado, C. Vissuzaine, M. Buyse, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, S. Attoub, et al. 2000. “Leptin Secretion and Leptin Receptor in the Human Stomach.” *Gut* 47 (2): 178–83.

Spanswick, D., M. A. Smith, V. E. Groppi, S. D. Logan, and M. L. Ashford. 1997. “Leptin Inhibits Hypothalamic Neurons by Activation of ATP-Sensitive Potassium Channels.” *Nature* 390 (6659): 521–25. doi:10.1038/37379.

Spickett, Corinne M., and Andrew R. Pitt. 2012. “Protein Oxidation: Role in Signalling and Detection by Mass Spectrometry.” *Amino Acids* 42 (1): 5–21. doi:10.1007/s00726-010-0585-4.

Spickett, Corinne M, Ingrid Wiswedel, Werner Siems, Kamelija Zarkovic, and Neven Zarkovic. 2010. “Advances in Methods for the Determination of Biologically Relevant Lipid Peroxidation Products.” *Free Radical Research* 44 (10): 1172–1202. doi:10.3109/10715762.2010.498476.

Srisook, Klaokwan, Chaekyun Kim, and Young-Nam Cha. 2005. “Molecular Mechanisms Involved in Enhancing HO-1 Expression: De-Repression by Heme and Activation by Nrf2, the ‘One-Two’ Punch.” *Antioxidants & Redox Signaling* 7 (11-12): 1674–87. doi:10.1089/ars.2005.7.1674.

Stan, S., E. Levy, M. Bendayan, M. Zoltowska, M. Lambert, J. Michaud, C. Asselin, and E. E. Delvin. 2001. “Effect of Human Recombinant Leptin on Lipid Handling by Fully Differentiated Caco-2 Cells.” *FEBS Letters* 508 (1): 80–84.

Starkov, Anatoly A. 2006. “Protein-Mediated Energy-Dissipating Pathways in Mitochondria.” *Chemico-Biological Interactions* 161 (1): 57–68. doi:10.1016/j.cbi.2006.02.009.

Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, et al. 1997. “A Family of Cytokine-Inducible Inhibitors of Signalling.” *Nature* 387 (6636): 917–21. doi:10.1038/43206.

Stattin, Pär, Stefan Söderberg, Carine Biessy, Per Lenner, Göran Hallmans, Rudolf Kaaks, and Tommy Olsson. 2004. “Plasma Leptin and Breast Cancer Risk: A Prospective Study in Northern Sweden.” *Breast Cancer Research and Treatment* 86 (3): 191–96. doi:10.1023/B:BREA.0000036782.11945.d7.

Steghens, J. P., A. L. van Kappel, I. Denis, and C. Collombel. 2001. “Diaminonaphtalene, a New Highly Specific Reagent for HPLC-UV Measurement of Total and Free Malondialdehyde in Human Plasma or Serum.” *Free Radical Biology & Medicine* 31 (2): 242–49.

Stenberg, V. I., M. G. Bouley, B. M. Katz, K. J. Lee, and S. S. Parmar. 1990. “Negative Endocrine Control System for Inflammation in Rats.” *Agents and Actions* 29 (3-4): 189–95.

Stentz, Frankie B., Guillermo E. Umpierrez, Ruben Cuervo, and Abbas E. Kitabchi. 2004. “Proinflammatory Cytokines, Markers of Cardiovascular Risks, Oxidative Stress, and Lipid Peroxidation in Patients with Hyperglycemic Crises.” *Diabetes* 53 (8): 2079–86.

Stephenson, Gina Day, and David P. Rose. 2003. “Breast Cancer and Obesity: An Update.” *Nutrition and Cancer* 45 (1): 1–16. doi:10.1207/S15327914NC4501_1.

Stephens, T. W., M. Basinski, P. K. Bristow, J. M. Bue-Valleskey, S. G. Burgett, L. Craft, J. Hale, J. Hoffmann, H. M. Hsiung, and A. Kriauciunas. 1995. “The Role of Neuropeptide Y in the Antiobesity Action of the Obese Gene Product.” *Nature* 377 (6549): 530–32. doi:10.1038/377530a0.

Strobel, A., T. Issad, L. Camoin, M. Ozata, and A. D. Strosberg. 1998. “A Leptin Missense Mutation Associated with Hypogonadism and Morbid Obesity.” *Nature Genetics* 18 (3): 213–15. doi:10.1038/ng0398-213.

Subbaramaiah, Kotha, Louise R. Howe, Priya Bhardwaj, Baoheng Du, Claudia Gravaghi, Rhonda K. Yantiss, Xi Kathy Zhou, et al. 2011. “Obesity Is Associated with Inflammation and Elevated Aromatase Expression in the Mouse Mammary Gland.” *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)* 4 (3): 329–46. doi:10.1158/1940-6207.CAPR-10-0381.

Sumimoto, Hideki, Kei Miyano, and Ryu Takeya. 2005. “Molecular Composition and Regulation of the Nox Family NAD(P)H Oxidases.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Celebrating 50 Years of Oxygenases, 338 (1): 677–86. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.210.

Sun, Yu, Liqun Huang, Gerardo G Mackenzie, and Basil Rigas. 2011. “Oxidative Stress Mediates through Apoptosis the Anticancer Effect of Phospho-Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs: Implications for the Role of Oxidative Stress in the Action of Anticancer Agents.” *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 338 (3): 775–83. doi:10.1124/jpet.111.183533.

Suteerojntrakool, Orapa, Sompol Sanguanrungsirikul, Suchada Sritippayawan, Watsamon Jantarabenjakul, Pathama Sirimongkol, and Sirinuch Chomtho. 2015. “Effect of a Low-Carbohydrate Diet on Respiratory Quotient of Infants with Chronic Lung Disease.” *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet Thangphaet* 98 Suppl 1 (January): S21–28.

Szabo, Ildiko, and Mario Zoratti. 2014. “Mitochondrial Channels: Ion Fluxes and More.” *Physiological Reviews* 94 (2): 519–608. doi:10.1152/physrev.00021.2013.

Sztainberg, Yehezkel, and Alon Chen. 2010. “An Environmental Enrichment Model for Mice.” *Nature Protocols* 5 (9): 1535–39. doi:10.1038/nprot.2010.114.

Tadokoro, Susumu, Shinji Ide, Reiko Tokuyama, Hirochika Umeki, Seiko Tatehara, Shiki Kataoka, and Kazuhito Satomura. 2015. “Leptin Promotes Wound Healing in the Skin.” *PloS One* 10 (3): e0121242. doi:10.1371/journal.pone.0121242.

Takahashi, Kanji A., and Roger D. Cone. 2005. “Fasting Induces a Large, Leptin-Dependent Increase in the Intrinsic Action Potential Frequency of Orexigenic Arcuate Nucleus Neuropeptide Y/Agouti-Related Protein Neurons.” *Endocrinology* 146 (3): 1043–47. doi:10.1210/en.2004-1397.

Takahashi, Y., Y. Okimura, I. Mizuno, K. Iida, T. Takahashi, H. Kaji, H. Abe, and K. Chihara. 1997. “Leptin Induces Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent Proliferation of C3H10T1/2 Cells.” *The Journal of Biological Chemistry* 272 (20): 12897–900.

Takeda, K., T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, and S. Akira. 1998. “Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 161 (9): 4652–60.

Takeshita, N., T. Yoshino, and S. Mutoh. 2000. “Possible Involvement of Corticosterone in Bone Loss of Genetically Diabetic Db/db Mice.” *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme* 32 (4): 147–51. doi:10.1055/s-2007-978610.

Tanabe, K., S. Okuya, Y. Tanizawa, A. Matsutani, and Y. Oka. 1997. “Leptin Induces Proliferation of Pancreatic Beta Cell Line MIN6 through Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 241 (3): 765–68. doi:10.1006/bbrc.1997.7894.

Tanaka, Miyako, Takayoshi Suganami, Satoshi Sugita, Yuri Shimoda, Masato Kasahara, Seiichiro Aoe, Motohiro Takeya, Shu Takeda, Yasutomi Kamei, and Yoshihiro Ogawa. 2010. “Role of Central Leptin Signaling in Renal Macrophage Infiltration.” *Endocrine Journal* 57 (1): 61–72.

Tang, Li-Li, Xiao-Han Tang, Xia Li, Hai-Bo Yu, Zhi-Guo Xie, Xin-Yuan Liu, and Zhi-Guang Zhou. 2014. “Effect of High-Fat or High-Glucose Diet on Obesity and Visceral Adipose Tissue in Mice.” *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. Acta Academiae Medicinae Sinicae* 36 (6): 614–19. doi:10.3881/j.issn.1000-503X.2014.06.010.

Tartaglia, L. A., M. Dembski, X. Weng, N. Deng, J. Culpepper, R. Devos, G. J. Richards, et al. 1995. “Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R.” *Cell* 83 (7): 1263–71.

Tehan, Lauren, Kekoa Taparra, and Shelley Phelan. 2013. “Peroxiredoxin Overexpression in MCF-7 Breast Cancer Cells and Regulation by Cell Proliferation and Oxidative Stress.” *Cancer Investigation* 31 (6): 374–84. doi:10.3109/07357907.2013.802798.

Thannickal, V. J., and B. L. Fanburg. 2000. “Reactive Oxygen Species in Cell Signaling.” *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 279 (6): L1005–28.

Tilg, Herbert, and Alexander R. Moschen. 2006. “Adipocytokines: Mediators Linking Adipose Tissue, Inflammation and Immunity.” *Nature Reviews. Immunology* 6 (10): 772–83. doi:10.1038/nri1937.

Timmons, James A., Keith Baar, Peter K. Davidsen, and Philip J. Atherton. 2012. “Is Irisin a Human Exercise Gene?” *Nature* 488 (7413): E9–10; discussion E10–11. doi:10.1038/nature11364.

Timperman, A T, K E Oldenburg, and J V Sweedler. 1995. “Native Fluorescence Detection and Spectral Differentiation of Peptides Containing Tryptophan and Tyrosine in Capillary Electrophoresis.” *Analytical Chemistry* 67 (19): 3421–26.

Tiryaki-Sonmez, G., S. Ozen, G. Bugdayci, U. Karli, G. Ozen, S. Cogalgil, B. Schoenfeld, K. Sozbir, and K. Aydin. 2013. “Effect of Exercise on Appetite-Regulating Hormones in Overweight Women.” *Biology of Sport* 30 (2): 75–80. doi:10.5604/20831862.1044220.

Torpy, D. J., S. R. Bornstein, and G. P. Chrousos. 1998. “Leptin and Interleukin-6 in Sepsis.” *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Métabolisme* 30 (12): 726–29. doi:10.1055/s-2007-978967.

Trachootham, Dunyaporn, Weiqin Lu, Marcia A. Ogasawara, Nilsa Rivera-Del Valle, and Peng Huang. 2008. “Redox Regulation of Cell Survival.” *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (8): 1343–74. doi:10.1089/ars.2007.1957.

Tran, Ly, Jos H. Beijnen, and Alwin D. R. Huitema. 2009. “The Preparation of Radiolabeled Monoclonal Antibodies for Human Use.” *Human Antibodies* 18 (4): 145–56. doi:10.3233/HAB-2009-0211.

Trouillet, Florence. 2010. “Le Spectromètre de Masse — Acces.” Page. 01. http://acces.ens-lyon.fr/acces/terre/limites/Temps/datation-isotopique/comprendre/le-spectrometre-de-masse.

Tschugguel, W., C. Schneeberger, G. Unfried, K. Czerwenka, W. Weninger, M. Mildner, D. M. Gruber, M. O. Sator, T. Waldhör, and J. C. Huber. 1999. “Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Human Breast Cancer Depends on Tumor Grade.” *Breast Cancer Research and Treatment* 56 (2): 145–51.

Tseng, Hua-Ming, Yin Li, and David A. Barrett. 2010. “Bioanalytical Applications of Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Native Fluorescence Detection.” *Bioanalysis* 2 (9): 1641–53. doi:10.4155/bio.10.72.

Tsikas, Dimitrios, and Alexander A. Zoerner. 2014. “Analysis of Eicosanoids by LC-MS/MS and GC-MS/MS: A Historical Retrospect and a Discussion.” *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 964 (August): 79–88. doi:10.1016/j.jchromb.2014.03.017.

Tsiotra, P. C., V. Pappa, S. A. Raptis, and C. Tsigos. 2000. “Expression of the Long and Short Leptin Receptor Isoforms in Peripheral Blood Mononuclear Cells: Implications for Leptin’s Actions.” *Metabolism: Clinical and Experimental* 49 (12): 1537–41. doi:10.1053/meta.2000.18519.

Tsochatzis, Emmanuel A., Spilios Manolakopoulos, George V. Papatheodoridis, and Athanasios J. Archimandritis. 2009. “Insulin Resistance and Metabolic Syndrome in Chronic Liver Diseases: Old Entities with New Implications.” *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 44 (1): 6–14. doi:10.1080/00365520802273058.

Tuominen, J. A., P. Ebeling, M. L. Heiman, T. Stephens, and V. A. Koivisto. 1997. “Leptin and Thermogenesis in Humans.” *Acta Physiologica Scandinavica* 160 (1): 83–87. doi:10.1046/j.1365-201X.1997.00102.x.

Tuominen, J. A., J. E. Peltonen, and V. A. Koivisto. 1997. “Blood Flow, Lipid Oxidation, and Muscle Glycogen Synthesis after Glycogen Depletion by Strenuous Exercise.” *Medicine and Science in Sports and Exercise* 29 (7): 874–81.

Turrens, J. F. 1997. “Superoxide Production by the Mitochondrial Respiratory Chain.” *Bioscience Reports* 17 (1): 3–8.

Ursini, F., M. Maiorino, R. Brigelius-Flohé, K. D. Aumann, A. Roveri, D. Schomburg, and L. Flohé. 1995. “Diversity of Glutathione Peroxidases.” *Methods in Enzymology* 252: 38–53.

Ustundag, Bilal, Serdal Gungor, A. Denizmen Aygün, Mehmet Turgut, and Erdal Yilmaz. 2007. “Oxidative Status and Serum Leptin Levels in Obese Prepubertal Children.” *Cell Biochemistry and Function* 25 (5): 479–83. doi:10.1002/cbf.1334.

Uzaşçı, Sesil, and F. Bedia Erim. 2014. “Enhancement of Native Fluorescence Intensity of Berberine by (2-Hydroxypropyl)-B-Cyclodextrin in Capillary Electrophoresis Coupled by Laser-Induced Fluorescence Detection: Application to Quality Control of Medicinal Plants.” *Journal of Chromatography. A* 1338 (April): 184–87. doi:10.1016/j.chroma.2014.02.068.

Valko, M, C J Rhodes, J Moncol, M Izakovic, and M Mazur. 2006. “Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer.” *Chemico-Biological Interactions* 160 (1): 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.

Valko, Vojtech, Maria Fickova, Eliska Pravdova, Milan Nagy, Daniel Grancai, and Szilvia Czigle. 2006. “Cytotoxicity of Water Extracts from Leaves and Branches of Philadelphus Coronarius L.” *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia* 150 (1): 71–73.

Van Heek, M., D. S. Compton, C. F. France, R. P. Tedesco, A. B. Fawzi, M. P. Graziano, E. J. Sybertz, C. D. Strader, and H. R. Davis. 1997. “Diet-Induced Obese Mice Develop Peripheral, but Not Central, Resistance to Leptin.” *The Journal of Clinical Investigation* 99 (3): 385–90. doi:10.1172/JCI119171.

Vargas-Hernández, Víctor Manuel, Vm Vargas-Aguilar, Mario Adanm Moreno-Eutimio, Gustavo Acosta-Altamirano, and Jm Tovar-Rodriguez. 2013a. “Metabolic Syndrome in Breast Cancer.” *Gland Surgery* 2 (2): 80–90. doi:10.3978/j.issn.2227-684X.2013.04.02.

Vargas-Hernández, Víctor Manuel, V. M. Vargas-Aguilar, Mario Adanm Moreno-Eutimio, Gustavo Acosta-Altamirano, and J. M. Tovar-Rodriguez. 2013b. "Metabolic Syndrome in Breast Cancer." *Gland Surgery* 2 (2): 80–90.

Verkooijen, Helena M., Christine Bouchardy, Vincent Vinh-Hung, Elisabetta Rapiti, and Mikael Hartman. 2009. "The Incidence of Breast Cancer and Changes in the Use of Hormone Replacement Therapy: A Review of the Evidence." *Maturitas* 64 (2): 80–85. doi:10.1016/j.maturitas.2009.07.015.

Verrastro, Ivan, Sabah Pasha, Karina Tveen Jensen, Andrew R. Pitt, and Corinne M. Spickett. 2015. "Mass Spectrometry-Based Methods for Identifying Oxidized Proteins in Disease: Advances and Challenges." *Biomolecules* 5 (2): 378–411. doi:10.3390/biom5020378.

Vertuani, Silvia, Angela Angusti, and Stefano Manfredini. 2004. "The Antioxidants and pro-Antioxidants Network: An Overview." *Current Pharmaceutical Design* 10 (14): 1677–94.

Vigor, Claire, Justine Bertrand-Michel, Edith Pinot, Camille Oger, Joseph Vercauteren, Pauline Le Faouder, Jean-Marie Galano, Jetty Chung-Yung Lee, and Thierry Durand. 2014. "Non-Enzymatic Lipid Oxidation Products in Biological Systems: Assessment of the Metabolites from Polyunsaturated Fatty Acids." *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 964 (August): 65–78. doi:10.1016/j.jchromb.2014.04.042.

Viguerie, N., H. Vidal, P. Arner, C. Holst, C. Verdich, S. Avizou, A. Astrup, et al. 2005. "Adipose Tissue Gene Expression in Obese Subjects during Low-Fat and High-Fat Hypocaloric Diets." *Diabetologia* 48 (1): 123–31. doi:10.1007/s00125-004-1618-x.

Vona-Davis, Linda, and David P. Rose. 2013. "The Obesity-Inflammation-Eicosanoid Axis in Breast Cancer." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 18 (3-4): 291–307. doi:10.1007/s10911-013-9299-z.

Wadden, T. A., R. V. Considine, G. D. Foster, D. A. Anderson, D. B. Sarwer, and J. S. Caro. 1998. "Short- and Long-Term Changes in Serum Leptin Dieting Obese Women: Effects of Caloric Restriction and Weight Loss." *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 83 (1): 214–18. doi:10.1210/jcem.83.1.4494.

Walley, Andrew J., Julian E. Asher, and Philippe Froguel. 2009. "The Genetic Contribution to Non-Syndromic Human Obesity." *Nature Reviews. Genetics* 10 (7): 431–42. doi:10.1038/nrg2594.

Wang, Dingzhi, and Raymond N. Dubois. 2010. "Eicosanoids and Cancer." *Nature Reviews. Cancer* 10 (3): 181–93. doi:10.1038/nrc2809.

Wang, Hsing-Wen, Yau-Huei Wei, and Han-Wen Guo. 2009. "Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NADH) Fluorescence for the Detection of Cell Death." *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* 9 (9): 1012–17.

Wang, M. Y., Y. T. Zhou, C. B. Newgard, and R. H. Unger. 1996. "A Novel Leptin Receptor Isoform in Rat." *FEBS Letters* 392 (2): 87–90.

Wang, S.-N., Y.-T. Yeh, S.-F. Yang, C.-Y. Chai, and K.-T. Lee. 2006. "Potential Role of Leptin Expression in Hepatocellular Carcinoma." *Journal of Clinical Pathology* 59 (9): 930–34. doi:10.1136/jcp.2005.035477.

Wang, Yi-Zhen, Yan-Na Huang, Kai-Yue Sun, Jian-Hua Qi, and Lan Xiang. 2011. "Leptin Gene Transfer Regulates Fibromuscular Development and Lipid Deposition in Muscles via SIRT1, FOXO3a and PGC-1α in Mice in Vivo." *International Journal of Molecular Medicine* 28 (4): 617–23. doi:10.3892/ijmm.2011.711.

Was, Halina, Jozef Dulak, and Alicja Jozkowicz. 2010a. "Heme Oxygenase-1 in Tumor Biology and Therapy." *Current Drug Targets* 11 (12): 1551–70.

Weber, Anette, Ulrich R. Hengge, Walter Bardenheuer, Iris Tischoff, Florian Sommerer, Annett Markwarth, Andreas Dietz, Christian Wittekind, and Andrea Tannapfel. 2005. "SOCS-3 Is Frequently Methylated in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Its Precursor Lesions and Causes Growth Inhibition." *Oncogene* 24 (44): 6699–6708. doi:10.1038/sj.onc.1208818.

Weigle, David S., Patricia A. Breen, Colleen C. Matthys, Holly S. Callahan, Kaatje E. Meeuws, Verna R. Burden, and Jonathan Q. Purnell. 2005. "A High-Protein Diet Induces Sustained Reductions in Appetite, Ad Libitum Caloric Intake, and Body Weight despite Compensatory Changes in Diurnal Plasma Leptin and Ghrelin Concentrations." *The American Journal of Clinical Nutrition* 82 (1): 41–48.

Weir, J. B. 1990. "New Methods for Calculating Metabolic Rate with Special Reference to Protein Metabolism. 1949." *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)* 6 (3): 213–21.

Wellen, Kathryn E., and Gökhan S. Hotamisligil. 2005. "Inflammation, Stress, and Diabetes." *The Journal of Clinical Investigation* 115 (5): 1111–19. doi:10.1172/JCI25102.

Westwood, Jennifer A, Phillip K Darcy, and Michael H Kershaw. 2013. "Environmental Enrichment Does Not Impact on Tumor Growth in Mice." *F1000Research*, June. doi:10.12688/f1000research.2-140.v1.

Wood, L. G., P. G. Gibson, and M. L. Garg. 2003. "Biomarkers of Lipid Peroxidation, Airway Inflammation and Asthma." *The European Respiratory Journal* 21 (1): 177–86.

Woods, Amina S., and Shelley N. Jackson. 2006. “Brain Tissue Lipidomics: Direct Probing Using Matrix-Assisted Laser Desorption/ionization Mass Spectrometry.” *The AAPS Journal* 8 (2): E391–95. doi:10.1208/aapsj080244.

Wrann, Christiane D., Tobias Laue, Lena Hübner, Susanne Kuhlmann, Roland Jacobs, Lilia Goudeva, and Heike Nave. 2012. “Short-Term and Long-Term Leptin Exposure Differentially Affect Human Natural Killer Cell Immune Functions.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 302 (1): E108–16. doi:10.1152/ajpendo.00057.2011.

Xia, Chang, Qiao Meng, Ling-Zhi Liu, Yongyut Rojanasakul, Xin-Ru Wang, and Bing-Hua Jiang. 2007. “Reactive Oxygen Species Regulate Angiogenesis and Tumor Growth through Vascular Endothelial Growth Factor.” *Cancer Research* 67 (22): 10823–30. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0783.

Xu, Haoxing, Enrico Martinoia, and Ildiko Szabo. 2015. “Organellar Channels and Transporters.” *Cell Calcium*, March. doi:10.1016/j.ceca.2015.02.006.

Xu, Pingping, Weiping Ye, Saiyi Zhong, Hong Li, Eric Feng, Shu-Hong Lin, Chieh-Ti Kuo, Jie-Yu Liu, and Young C. Lin. 2010. “Leptin and Zeranol up-Regulate Cyclin D1 Expression in Primary Cultured Normal Human Breast Pre-Adipocytes.” *Molecular Medicine Reports* 3 (6): 983–90. doi:10.3892/mmr.2010.370.

Xu, Xiao Dong, Shi Xiu Shao, Hai Ping Jiang, Yan Wei Cao, Yong Hua Wang, Xue Cheng Yang, You Lin Wang, Xin Sheng Wang, and Hai Tao Niu. 2015. “Warburg Effect or Reverse Warburg Effect? A Review of Cancer Metabolism.” *Oncology Research and Treatment* 38 (3): 117–22. doi:10.1159/000375435.

Yang, Guang, Leylla Badeanlou, Jacek Bielawski, Amanda J. Roberts, Yusuf A. Hannun, and Fahumiya Samad. 2009. “Central Role of Ceramide Biosynthesis in Body Weight Regulation, Energy Metabolism, and the Metabolic Syndrome.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 297 (1): E211–24. doi:10.1152/ajpendo.91014.2008.

Yang, Meng-Jie, Fang Wang, Jiang-Hua Wang, Wen-Ning Wu, Zhuang-Li Hu, Jin Cheng, Dan-Fang Yu, et al. 2010. “PI3K Integrates the Effects of Insulin and Leptin on Large-Conductance Ca2+-Activated K+ Channels in Neuropeptide Y Neurons of the Hypothalamic Arcuate Nucleus.” *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298 (2): E193–201. doi:10.1152/ajpendo.00155.2009.

Yang, Ying-Ying, Yi-Tsau Huang, Tung-Hu Tsai, Ming-Chih Hou, Fa-Yauh Lee, Shou-Dong Lee, and Han-Chieh Lin. 2012. “Kupffer Cell Depletion Attenuates Leptin-Mediated Methoxamine-Stimulated Portal Perfusion Pressure and Thromboxane A2 Release in a Rodent Model of NASH-Cirrhosis.” *Clinical Science (London, England: 1979)* 123 (12): 669–80. doi:10.1042/CS20110572.

Yang, Ying-Ying, Tung-Hu Tsai, Yi-Tsau Huang, Tzung-Yan Lee, Che-Chang Chan, Kuei-Chuan Lee, and Han-Chieh Lin. 2012. “Hepatic Endothelin-1 and Endocannabinoids-Dependent Effects of Hyperleptinemia in Nonalcoholic Steatohepatitis-Cirrhotic Rats.” *Hepatology (Baltimore, Md.)* 55 (5): 1540–50. doi:10.1002/hep.25534.

Yin, Na, Dan Wang, Hua Zhang, Xia Yi, Xiaojing Sun, Bin Shi, Huijian Wu, Ge Wu, Xinjuan Wang, and Yongfeng Shang. 2004. “Molecular Mechanisms Involved in the Growth Stimulation of Breast Cancer Cells by Leptin.” *Cancer Research* 64 (16): 5870–75. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-0655.

Yuan, Guoxiang, Jayasri Nanduri, Shakil Khan, Gregg L Semenza, and Nanduri R Prabhakar. 2008. “Induction of HIF-1alpha Expression by Intermittent Hypoxia: Involvement of NADPH Oxidase, Ca2+ Signaling, Prolyl Hydroxylases, and mTOR.” *Journal of Cellular Physiology* 217 (3): 674–85. doi:10.1002/jcp.21537.

Zaccaria, Marco, Andrea Ermolao, Giulio Roi, Piera Englaro, Giovanna Tegon, and Maurizio Varnier. 2002. “Leptin Reduction after Endurance Races Differing in Duration and Energy Expenditure.” *European Journal of Applied Physiology* 87 (2): 108–11. doi:10.1007/s00421-002-0606-4.

Zangar, Richard C., Dmitri R. Davydov, and Seema Verma. 2004. “Mechanisms That Regulate Production of Reactive Oxygen Species by Cytochrome P450.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 199 (3): 316–31. doi:10.1016/j.taap.2004.01.018.

Zarkesh-Esfahani, H., G. Pockley, R. A. Metcalfe, M. Bidlingmaier, Z. Wu, A. Ajami, A. P. Weetman, C. J. Strasburger, and R. J. Ross. 2001. “High-Dose Leptin Activates Human Leukocytes via Receptor Expression on Monocytes.” *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 167 (8): 4593–99.

Zekry, Dina, Terry Kay Epperson, and Karl-Heinz Krause. 2003. “A Role for NOX NADPH Oxidases in Alzheimer’s Disease and Other Types of Dementia?” *IUBMB Life* 55 (6): 307–13. doi:10.1080/1521654031000153049.

Zhang, B., M. P. Graziano, T. W. Doebber, M. D. Leibowitz, S. White-Carrington, D. M. Szalkowski, P. J. Hey, et al. 1996. “Down-Regulation of the Expression of the Obese Gene by an Antidiabetic Thiazolidinedione in Zucker Diabetic Fatty Rats and Db/db Mice.” *The Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9455–59.

Zhang, David X., and David D. Gutterman. 2007. “Mitochondrial Reactive Oxygen Species-Mediated Signaling in Endothelial Cells.” *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292 (5): H2023–31. doi:10.1152/ajpheart.01283.2006.

Zhang, X., and J. V. Sweedler. 2001. “Ultraviolet Native Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis Using a Metal Vapor NeCu Laser.” *Analytical Chemistry* 73 (22): 5620–24.

Zhang, Yiying, Martin Olbort, Knut Schwarzer, Barbara Nuesslein-Hildesheim, Margery Nicolson, Ellen Murphy, Timothy J. Kowalski, Ingrid Schmidt, and Rudolph L. Leibel. 1997. “The Leptin Receptor Mediates Apparent Autocrine Regulation of Leptin Gene Expression.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 240 (2): 492–95. doi:10.1006/bbrc.1997.7622.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman. 1994. “Positional Cloning of the Mouse Obese Gene and Its Human Homologue.” *Nature* 372 (6505): 425–32. doi:10.1038/372425a0.

Zhao, Yueran, Rui Sun, Li You, Chunyi Gao, and Zhigang Tian. 2003. “Expression of Leptin Receptors and Response to Leptin Stimulation of Human Natural Killer Cell Lines.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 300 (2): 247–52.

Zhao, Zhan-Zhao, Lei-Lei Xin, Ji-Han Xia, Shu-Lin Yang, Yao-Xing Chen, and Kui Li. 2015. “Long-Term High-Fat High-Sucrose Diet Promotes Enlarged Islets and B-Cell Damage by Oxidative Stress in Bama Minipigs.” *Pancreas*, April. doi:10.1097/MPA.0000000000000349.

Zheng, Donghai, Margaret H. Wooter, Qian Zhou, and G. Lynis Dohm. 1996. “The Effect of Exercise on Ob Gene Expression.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 225 (3): 747–50. doi:10.1006/bbrc.1996.1245.

Zheng, Qiao, Sarah M. Dunlap, Jinling Zhu, Erinn Downs-Kelly, Jeremy Rich, Stephen D. Hursting, Nathan A. Berger, and Ofer Reizes. 2011. “Leptin Deficiency Suppresses MMTV-Wnt-1 Mammary Tumor Growth in Obese Mice and Abrogates Tumor Initiating Cell Survival.” *Endocrine-Related Cancer* 18 (4): 491–503. doi:10.1530/ERC-11-0102.

Zhou, W, S Guo, and R R Gonzalez-Perez. 2011. “Leptin pro-Angiogenic Signature in Breast Cancer Is Linked to IL-1 Signalling.” *British Journal of Cancer* 104 (1): 128–37. doi:10.1038/sj.bjc.6606013.

Zia, P., M. Golub, and R. Horton. 1975. “A Radioimmunoassay for Prostaglandin A1 in Human Peripheral Blood.” *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 41 (2): 245–52. doi:10.1210/jcem-41-2-245.

Zimmermann, M. 1983. “Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals.” *Pain* 16 (2): 109–10.

Zipfel, Warren R., Rebecca M. Williams, Richard Christie, Alexander Yu Nikitin, Bradley T. Hyman, and Watt W. Webb. 2003. “Live Tissue Intrinsic Emission Microscopy Using Multiphoton-Excited Native Fluorescence and Second Harmonic Generation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (12): 7075–80. doi:10.1073/pnas.0832308100.

Annexe

Disponible en ligne sur
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

NUTRITION CLINIQUE et MÉTABOLISME

Nutrition clinique et métabolisme 29 (2015) 12–25

Revue générale

La leptine : un modulateur de l'activité des cellules Natural Killer ?

Leptin: A potent regulator of natural killer cell activity?

Marie-Chantal Farges [a,b,*], Bruno Lamas [a,b], Sinda Mahbouli [a,b], Ahmad Khalil [a,b], Marie-Paule Vasson [a,b,c,d]

[a] *Clermont université, université d'Auvergne, BP 10448, 63000 Clermont-Ferrand, France*
[b] *Inra, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, 63009 Clermont-Ferrand, France*
[c] *Service de nutrition, centre Jean-Perrin, 63000 Clermont-Ferrand, France*
[d] *Service de nutrition, CHU de Clermont-Ferrand, 63000 Clermont-Ferrand, France*

Reçu le 2 août 2014 ; reçu sous la forme révisée le 8 septembre 2014 ; accepté le 2 octobre 2014
Disponible sur Internet le 8 janvier 2015

Résumé

Les cellules Natural Killer (NK) sont non seulement des effecteurs cytotoxiques de la réponse immune innée dirigée contre les cellules tumorales ou infectées mais aussi d'importants immunorégulateurs. Leur activation résulte d'une balance entre signaux inhibiteurs ou activateurs issus de multiples récepteurs. La leptine, produit par les adipocytes, est un facteur métabolique majeur qui module le système immunitaire. L'hyperleptinémie est un facteur de risque de dysimmunité et de cancer en lien, notamment, avec une moindre vigilance anti-tumorale. Cette revue fait la synthèse de la littérature traitant de l'impact de la leptine sur les cellules NK. In vitro, la leptine, en concentration similaire à celle retrouvée en situation d'obésité, stimule non seulement l'activité métabolique mais aussi l'activité lytique des cellules NK. À l'inverse, in vivo, l'hyperleptinémie associée à un régime hypercalorique ou une obésité constitutive, n'est pas corrélée à la cytotoxicité des cellules NK ce qui laisse supposer l'émergence d'une leptinorésistance.
© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Cellules NK ; Leptine ; Régulation ; Cytotoxicité ; Cytokines

Abstract

Natural Killer (NK) cells are not just cytotoxic effectors of the innate immune response against tumors and infections but also important immunoregulators. They are activated by an intricate balance between signals provided by their inhibitory and activating receptors. Leptin, one major metabolic factor produced by adipocytes, appears to be strongly involved in obesity-induced dysimmunity and carcinogenesis. This paper reviews the studies investigating the effect of leptin on NK cells. Leptin, at level similar to that found in obesity, stimulate, *in vitro*, both the NK cell metabolic and lytic activities. In contrast, no significant association was observed, *in vivo*, between serum leptin and NK cytotoxicity whatever the model, diet-induced or constitutive obesity. These findings may be related to leptin resistance.
© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: NK cells; Leptin; Regulation; Cytotoxicity; Cytokines

1. Introduction

De nombreuses études épidémiologiques montrent que l'obésité est un facteur de risque de cancer notamment hormono-dépendant [1]. Outre les altérations métaboliques et hormonales le plus souvent associées (insulinorésistance, surexpression et/ou une fonctionnalité accrue du récepteur de l'Insuline-Like

* Auteur correspondant.
Adresses e-mail : m-chantal.farges@udamail.fr (M.-C. Farges), lamasbruno@hotmail.fr (B. Lamas), sinda.mahbouli@udamail.fr (S. Mahbouli), ahmad.khalil@udamail.fr (A. Khalil), m-paule.vasson@udamail.fr (M.-P. Vasson).

http://dx.doi.org/10.1016/j.nupar.2014.10.002
0985-0562/© 2014 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Growth Factor 1 [IGF-1]), ce risque tumoral élevé en situation d'excès pondéral [2,3] pourrait résulter d'altérations des défenses immunitaires [4–6]. En effet, que ce soit chez l'homme ou chez l'animal, l'excès de masse grasse est corrélé à une dysimmunité touchant aussi bien le système immunitaire inné qu'adaptatif [4]. Les facteurs nutritionnels et métaboliques impliqués dans ce dysfonctionnement immunitaire sont multiples et englobent notamment les adipokines sécrétées par le tissu adipeux [7]. En effet, les teneurs sériques de leptine mais aussi celles de la résistine et de la visfatine, trois adipokines produites par le tissu adipeux, sont positivement corrélées à l'indice de masse corporelle [8,9]. À l'inverse, celle de l'adiponectine, autre adipokine majeure, significativement réduite, est corrélée négativement à la masse grasse [10]. La leptine, de par ses effets pro-inflammatoires, anti-apoptotiques, pro-angiogéniques, joue un rôle central dans la cancérogenèse mammaire [11]. Elle apparaît comme un facteur clé du dialogue intercellulaire entre adipocytes, cellules épithéliales, fibroblastes et cellules immunitaires. Outre des effets sur les cellules épithéliales saines et néoplasiques, la leptine module également les cellules du système immunitaire inné et adaptatif [12]. Les cellules Natural Killer (NK) acteurs de l'immunité innée ont un rôle clé dans la vigilance contre les pathogènes. Elles éliminent les cellules infectées par un virus, les cellules tumorales et les cellules allogéniques ou produisent des cytokines permettant le recrutement et l'activation des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes [13–15]. À ce titre les cellules NK occupent une position clé à l'interface entre immunité innée et immunité adaptative. La leptine régule les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, les polynucléaires neutrophiles. Peu de travaux se sont focalisés sur les cellules NK. Ainsi, après avoir rappelé les principales caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK, cette revue fait le point sur les effets de la leptine sur les cellules NK.

2. Origine et phénotype des cellules NK

La protection de l'hôte contre les pathogènes (virus, bactéries) résulte d'interactions étroites entre les acteurs et les effecteurs de l'immunité innée et ceux de l'immunité adaptative ou spécifique. Les cellules NK représentent environ 10 à 15 % des lymphocytes circulants et 0,4 à 5 % des cellules immunes des organes lymphoïdes secondaires. In vivo, les cellules NK ont une durée de vie limitée (temps de demie vie : 7 à 10 jours) et assurent la protection de l'organisme vis-à-vis des pathogènes et des cellules transformées [16].

Les cellules NK sont des cellules lymphoïdes dérivées de cellules souches hématopoïétiques et partagent à ce titre un progéniteur initial commun avec les lymphocytes T (LT). Ces progéniteurs sont capables de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (rate, amygdales, ganglions périphériques, muqueuses digestives). Chaque stade de différenciation à savoir l'engagement vers la lignée NK, la maturation fonctionnelle et l'acquisition de récepteurs, est caractérisé par l'expression de marqueurs phénotypiques spécifiques [17].

Au niveau circulant, les cellules NK se distinguent par l'expression membranaire de l'antigène cluster de différenciation (CD) 56 et par l'absence de CD3 et des sous-unités αβ et γδ du T Cell Receptor (TCR) [18,19]. Deux grands groupes, $CD56^{dim}$ et $CD56^{bright}$ différenciés selon l'intensité de l'expression membranaire du CD56 en immunofluorescence, sont classiquement décrits (Tableau 1) [20,21]. Une autre molécule de surface est également utilisée pour classer les cellules NK, il s'agit du récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des immunoglobulines de type G (IgG) : le CD16. Au même titre que le CD56, le CD16 n'est pas spécifique aux cellules NK.

Les cellules $CD56^{dim}CD16^{+}$ représentent 90 à 95 % des cellules NK du sang périphérique alors que la sous-population $CD56^{bright}CD16^{-/low}$ est minoritaire (de 5 à 10 %) et se retrouve principalement dans les organes lymphoïdes secondaires.

L'expression différentielle des récepteurs aux chimiokines (chimiokines de la famille C-C de type 7 [CCR7], de la famille CXC de type 3 [CXCR3]...) et aux molécules d'adhésion (CD62L, CD2, CD11c, CD44, CD49e) oriente la localisation tissulaire des deux sous-populations de cellules NK. Juelke et al. [22] ont récemment décrit que les cellules $CD56^{dim}$ n'expriment pas le récepteur à la chimiokine CCR7, perdent progressivement au cours de leur différenciation l'expression de la sélectine CD62L digestives et migrent vers les sites périphériques d'inflammation aiguë. Parallèlement, Walzer et Vivier [23] rapportent que les cellules NK $CD56^{bright}$ expriment les récepteurs aux chimiokines CCR7, CXR3 et aux molécules d'adhésion et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces deux sous-populations diffèrent également sur le plan fonctionnel.

3. Fonctions des cellules NK

Si les cellules NK et T ont des particularités communes en termes d'expression de marqueurs membranaires et de voies de la cytolyse, elles se différencient des LT cytotoxiques sous différents aspects. Les cellules NK sont des lymphocytes capables de lyser les cellules tumorales ou infectées par un virus en l'absence d'immunisation spécifique préalable tout en respectant les cellules saines grâce à un mécanisme de reconnaissance complexe mettant en jeu différents récepteurs. À ce titre elles sont appelées « cellules tueuses naturelles ». Alors qu'une activation initiale stimule l'activité des LT cytotoxiques, l'activité des cellules NK reste inchangée en cas de deuxième stimulation antigénique. Ainsi, la réponse des cellules NK ne génère pas de mémoire immunitaire. De plus, la mise en place des fonctions des cellules NK est rapide car contrairement à celle des LT cytotoxiques, elle ne nécessite pas de phases de prolifération et de différenciation.

La lyse des cellules transformées met en jeu deux grands mécanismes : la cytotoxicité dépendante des anticorps (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity ou ADCC) et la cytotoxicité dite naturelle. L'interaction cellule NK-cible s'accompagne de la formation d'une structure complexe dénommée synapse immunologique. C'est à ce niveau que le contenu des granules lytiques est déversé par un mécanisme d'exocytose dépendant du calcium : la dégranulation. Une seconde grande fonction des cellules NK, une fois activées, consiste en la production rapide de cytokines et de chimiokines.

Tableau 1
Caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK humaines.

	$CD56^{dim}$	$CD56^{bright}$
%	90–95	5–10
CD56	+	++
CD16	++	±
Récepteurs activateurs et inhibiteurs		
KIR	++	±
CD94	±	++
NKG2A	±	+
ILT-2	+	–
Récepteurs aux cytokines et aux chimiokines		
IL-2Rαβγ	–	+
IL-2Rβγ	+	+
c-kit	–	+
IL-1RAcP	+	+
IL-RI	±	+
IL-18R	±	+
CCR7	–	++
CXCR3	±	+
CXCR1	++	–
CX_3CR1	++	–
Molécules d'adhésion		
CD2	+	++
CD62L	±	++
PSGL-1	+	–
LFA-1	++	+
CD44	+	++
CD49	+	++
Activités		
	Cytotoxique +++	Cytotoxique +
	Sécrétoire +	Sécrétoire +++
Modes d'induction de la cytotoxicité		
	ADCC +++	ADCC +
	LAK +++	LAK +++
	Naturelle +++	Naturelle +
Facteurs sécrétés		
	IFNγ +	IFNγ+++
	GM-CSF +	TNF-α et β+±
	IL-10 +	GM-CSF++
		IL-10 +
Acteurs de la cytotoxicité		
TRAIL	+	+++
Granzyme A	+	+

+ : forte densité d'expression ; – : faible densité d'expression ; ± : densité d'expression variable ; ADDC : Antibody Dependent Cytotoxicity, cytotoxicité dépendante des anticorps ; CD : Cluster of Differenciation, cluster de différenciation ; CCR7 : Chemokine Cell Receptor 7, récepteur de type 7 aux chimiokines ; CXCR 1 and 3 : CX-Chemokine Receptors 1 and 3, récepteurs CX de type 1 et 3 aux chimiokines ; GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, facteur de croissance hématopoïétique ; IFNγ : Interferon γ ; IL-1 : interleukine 1 ; IL-1RApC : IL-1 Receptor Accessory Protein, protéine accessoire du récepteur à l'IL-1 ; ILT-2 : Ig-Like Transcript 2, Transcript 2 Ig-like ; KIR : Killer Ig-like Receptor, récepteur inhibiteur ; LFA-1 : Leukocyte Function-Associated Antigen 1, intégrine LFA-1 ; IL-10 : Interleukin 10, interleukine 10 ; PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1, sélectine-P ligand 1 ; LAK : Lymphokines Activated Killer cells, cellules tueuses activées par les lymphokines ; TNF-α and β : Tumor Necrosis Factor α et β, facteur nécrosant les tumeurs de type α et β ; TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, ligand inducteur de l'apoptose apparenté au TNF. Tableau adapté d'après [20,21,77].

De par leur activité cytotoxique et sécrétoire, les cellules NK exercent un rôle régulateur sur la fonctionnalité, la maturation et l'élimination de diverses cellules du système immunitaire inné et adaptatif (cellules dendritiques, macrophages, polynucléaires, LT) [14]. À ce titre, elles occupent donc une position clé à l'interface entre immunité innée et adaptative.

3.1. Reconnaissance des cellules cibles

Contrairement aux LT cytotoxiques, les cellules NK n'expriment ni le TCR, ni le CD3. De plus, la reconnaissance des cellules cibles n'est pas restreinte au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Ainsi, les cellules NK ont une activité lytique comparable vis-à-vis de cellules tumorales syngéniques et allogéniques.

Les cellules NK reconnaissent grâce à des récepteurs inhibiteurs le soi manquant (perte du CMH de classe I) ou le soi modifié exprimé à la surface d'une grande variété de cellules transformées par un virus ou des cellules cancéreuses et grâce à des récepteurs activateurs des marqueurs de « détresse » exprimés par les cellules infectées par un virus ou par les cellules tumorales.

L'activation des cellules NK dépend d'une balance intrinsèque entre les signaux activateurs et inhibiteurs provenant de différents récepteurs exprimés à leur surface [24,25]. Ainsi, la cellule NK exercera ou non ses fonctions de cytotoxicité et/ou de sécrétion de cytokines vis-à-vis de la cellule cible.

L'ensemble de ces récepteurs regroupés sous le terme des Natural Killer Cell Receptors (NKR) constituent le répertoire de reconnaissance des cellules NK [26]. Sur la base de leurs caractéristiques structurales, ils sont répartis en trois grandes familles dont chacune comprend des isoformes activatrices et inhibitrices [20] :

- la superfamille des immunoglobulines (Killer cell Immunoglobulin-like Receptors [KIR]) ;
- la superfamille des lectines de type C (CD94 couplé aux récepteurs NKG2) ;
- les Natural Cytotoxicity Receptors (NCR).

Les récepteurs KIR de types activateurs (KIR3DS, KIR2DS...) ou inhibiteurs (KIR2DL, HIR3DL...), codés par plusieurs gènes d'une même famille, reconnaissent sur les cellules cibles les allotypes des molécules du CMH de classe I (Human Leukocyte Antigen [HLA]-A, HLA-B, HLA-C) qui stimulent ou inhibent l'action cytolytique de la cellule NK. Parmi les nombreux récepteurs activateurs non spécifiques du CMH de classe I, se distingue le CD16, récepteur pour le fragment Fc des IgG (FcγRIIIA) impliqué dans la cytotoxicité dépendante des anticorps (ADCC), grâce à laquelle les cellules NK peuvent détecter et éliminer les cellules cibles recouvertes d'anticorps. Son expression varie selon la sous-population de cellules NK : les $CD56^{dim}$ sont majoritairement $CD16^{+}$ alors que les $CD56^{bright}$ sont $CD16^{-}$ [20].

Les récepteurs de la superfamille des lectines C sont des hétérodimères CD94/NKG2. Les complexes CD94/NKG2A et CD94/NKG2B sont dits activateurs alors que les complexes

CD94/NKG2C, CD94/NKG2E sont inhibiteurs de l'action cytolytique des cellules NK. Le récepteur activateur NKG2D, contrairement aux autres membres de sa famille, s'exprime sous forme d'homodimère et fixe des ligands proches des molécules du CMH de classe I à savoir les protéines MIC A et B (CMH I Chain Related A and B) et les protéines Retinoic Acid Early Transcript (RAET) 1I/1H/1E/1N/1G.

Dans la famille des NCR, les récepteurs activateurs tels que NKp30, NKp44, NKp46 et NKp80 sont susceptibles de reconnaître des ligands encore mal connus exprimés sur les cellules transformées au cours d'un stress viral ou cancéreux.

En situation physiologique, les récepteurs inhibiteurs des cellules NK reconnaissent des marqueurs du soi, le CMH de classe I, exprimés sur les cellules saines, ainsi l'activité des cellules NK est inhibée. Ce mécanisme garantit la préservation les cellules normales de l'activité lytique des cellules NK. Une baisse d'expression des molécules du CMH de classe I, observée lors d'une infection virale, d'une transformation tumorale ou d'une allogreffe, est perçue comme une modification de l'équilibre des signaux inhibiteurs/activateurs et conduit à la stimulation des fonctions cytolytiques et sécrétoires des cellules NK [27]. Outre l'expression des molécules de CMH de classe I, les cellules NK reconnaissent l'expression, à la surface des cellules cibles, de ligands à ses récepteurs activateurs. Même en présence d'une expression normale des molécules du CMH de classe I, l'apparition ou la surexpression de ces ligands perturbe l'équilibre des signaux activateurs/inhibiteurs et conduit à l'activation des cellules NK.

L'expression des récepteurs activateurs et inhibiteurs diffère selon les deux sous-populations de cellules NK : les cellules $CD56^{dim}$ expriment fortement les KIR et pas ou peu le complexe inhibiteur CD94/NKG2A (KIR^+ et $CD94/NKG2A^-$), alors que les cellules $CD56^{bright}$ expriment faiblement les KIR et fortement les CD94/NKG2A (KIR^- et $CD94/NKG2A^+$) (Tableau 1).

Les mécanismes d'activation/inhibition mettent en jeu des motifs intra-cytoplasmiques particuliers [28]. En effet, les récepteurs activateurs intra-membranaires sont associés à une molécule adaptatrice qui porte un motif Immunoreceptor Tyrosine based Activation Motif (ITAM) dans son domaine intracytoplasmique. Lorsque le récepteur reconnaît son ligand spécifique sur la cellule cible, le motif ITAM est phosphorylé, ce qui déclenche une activation en cascade de phosphorylases kinases intracellulaires aboutissant à l'activité cytotoxique. Les récepteurs inhibiteurs portent un motif Immunoreceptor Tyrosine based Inhibitory Motif (ITIM) dans leur domaine intracytoplasmique, dont la phosphorylation conduit à l'activation de phosphatases intracellulaires qui transmettent des signaux inhibiteurs et empêchent la cytotoxicité [28].

L'expression des récepteurs, leur activation par fixation de ligands et la transduction de signaux activateurs ou inhibiteurs, permettent aux cellules NK de distinguer une cellule cible à détruire d'une cellule saine à préserver [13,15,19]. Toutefois, il est à noter qu'un manque de signal inhibiteur n'est pas suffisant en soi pour déclencher une activation des cellules NK, un signal activateur conséquent est alors nécessaire. Ceci permet donc d'expliquer pourquoi des cellules ayant une forte quantité de molécules de CMH de classe I exprimées à leur surface peuvent être la cible des cellules NK.

3.2. Cytotoxicité des cellules NK

Quel que soit le type de cytotoxicité dépendante des anticorps ou naturelle, la lyse des cellules tumorales ou infectées nécessite l'établissement d'une synapse immunologique entre les deux cellules afin de permettre la reconnaissance de la cible, la polarisation de la cellule NK puis la dégranulation aboutissant à l'élimination de la cellule cible [29,30]. Les techniques d'imagerie à haute résolution ont mis en évidence trois phases dans la mise en place de la synapse immunologique :

- une phase d'initiation au cours de laquelle la cellule NK rencontre sa cible et s'y fixe via des facteurs d'adhésion ;
- une phase effectrice de réorganisation du cytosquelette de la cellule NK aboutissant à la concentration des récepteurs activateurs et l'exclusion des récepteurs inhibiteurs et à la polarisation des granules lytiques et leur fusion avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu [31]. Cette phase de dégranulation est classiquement évaluée par l'externalisation du marqueur CD107a, exprimé à la surface des granules cytotoxiques et associé aux granules d'exocytose [32] ;
- une phase terminale qui correspond à la dissociation des deux cellules résultant d'une diminution de l'expression des récepteurs et autres molécules d'adhésion sur la cellule NK et de la mort cellulaire de la cellule cible.

3.2.1. Les granules lytiques et leurs modes d'action

Au cours de la dégranulation, il y a libération des granules lytiques, à savoir des protéases, au sein de la synapse immunologique. Constitutivement présents dans les cellules NK, ils contiennent différentes biomolécules dont la finalité est d'induire l'apoptose de la cellule à éliminer [33]. Parmi eux, la perforine, dont la structure cristallographique a récemment été décrite [34], forme des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible facilitant ainsi le passage des granzymes [35]. Les granzymes A et B, protéines solubles appartenant à la famille des sérines protéases [36] sont les plus abondantes, que ce soit chez l'homme ou chez le rongeur. La granulysine, molécule lytique antimicrobienne, est également présente. Les granzymes induisent l'apoptose indépendamment des caspases selon un processus relativement lent (Fig. 1). À l'inverse, la granulysine entraîne l'apoptose des cellules cibles par activation soit directe des caspases 3 et 7 soit indirecte via les molécules Bid, le cytochrome *c* et la caspase 9 [37]. Enfin, la granulysine participe également à l'apoptose des cellules cibles par deux mécanismes, en activant la caspase 3 et en induisant des dommages au niveau des membranes mitochondriales des cellules cibles [38–40]. Le sous-type de cellules NK décrit comme effecteur cytotoxique majoritaire correspond aux cellules $CD3^-CD56^{dim}$ bien que l'on puisse observer une activité cytotoxique des cellules $CD3^-CD56^{bright}$ après stimulation in vitro.

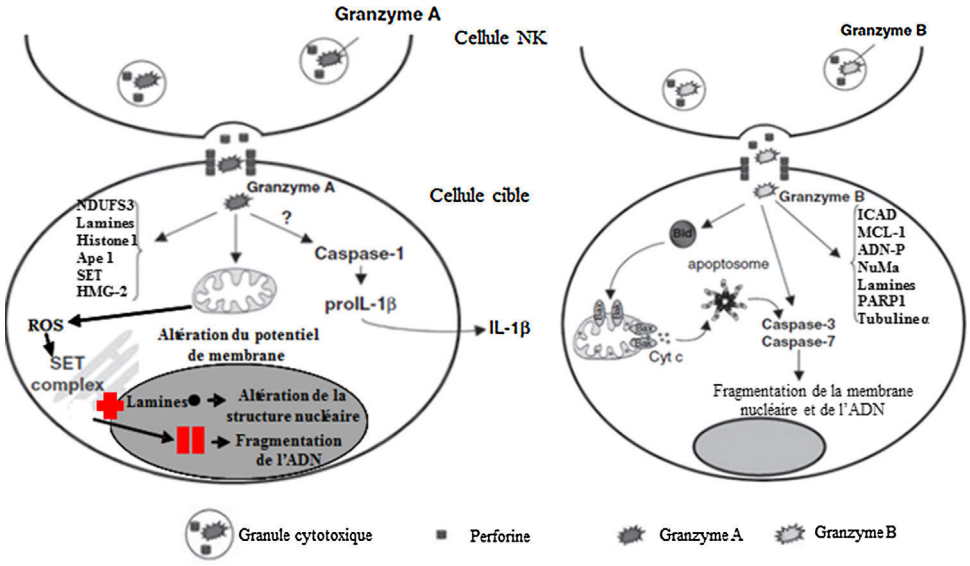


Fig. 1. Activité cytotoxique par induction de la mort cellulaire via les granzymes A et B. Les protéines regroupées au sein d'une parenthèse sont des substrats aux granzymes. HMG-2 : High-Mobility Group box 2 ; protéine fixant l'ADN ; ICAD : inhibitor of CAD, inhibiteur de CAD ; MCL-1 : Myeloid Cell Leukemia 1 ; protéine anti-apoptotique, NUDFS3 : sous-unité du complexe 1 de la chaîne respiratoire ; NuMa : Nuclear Mitotic Apparatus protein, protéine majeure de la matrice nucléaire ; PARP-1 : Poly [ADP-ribose] polymerase-1 ; ROS : Reactive Oxygen Species, espèces réactives de l'oxygène.
Figure adaptée selon [36].

3.2.2. *La voie des récepteurs de mort*

Si les granules lytiques sont les acteurs majeurs de la cytotoxicité des cellules NK, ces dernières peuvent aussi provoquer la mort cellulaire via l'activation à la surface des cellules cibles des récepteurs de mort mettant en jeu les voies Fas-Ligand (Fas/Fas-L) [41] et TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL-R/TRAIL) [42] (Fig. 2). L'expression des ligands Fas-L et TRAIL à la surface des cellules NK est constitutive [43,44] et stimulée après activation par l'INF-γ et l'IL-15 [45]. Après fixation des ligands des cellules NK sur leurs récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles, la cascade d'évènements qui en découle met en jeu les mêmes acteurs que ceux induits par le granzyme B à savoir les caspases 3, 7 et 9 et la molécule Bid. Ces mécanismes alternatifs sont moins impliqués dans la lyse des cellules anormales in vivo mais se révèlent majeurs dans l'élimination des cellules lymphoïdes auto-réactives et dans le maintien de l'homéostasie. Par ce processus, les cellules NK éliminent des cellules dendritiques immatures, des LT et des macrophages sur-activés [14]. Après activation du récepteur NKp46, elles lysent les neutrophiles trop inflammatoires, via la voie Fas dépendante afin de contrôler l'intensité de la réponse inflammatoire [46].

3.3. *Prolifération des cellules NK*

De même que pour les fonctions de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines, les deux sous-types de cellules NK CD56 se distinguent par leur capacité de prolifération. Les cellules $CD56^{bright}$ peuvent se multiplier en réponse à une stimulation avec de faibles doses d'IL-2, de l'ordre du picomolaire (pM), les cellules $CD56^{dim}$ prolifèrent peu, même en présence de fortes concentrations d'IL-2 (nM). Une telle différence provient du fait que les cellules $CD56^{bright}$ expriment de façon constitutive le récepteur de haute affinité à l'IL-2, IL-2Rαβγ, leur permettant de proliférer dix fois plus que les cellules $CD56^{dim}$ qui ne possèdent que le récepteur d'affinité intermédiaire, IL-2Rαβ [47] (Tableau 1).

L'IL-15 à forte dose (nM) peut aussi induire la prolifération, in vitro, des cellules NK $CD56^{bright}$ via le récepteur IL-2/IL-15Rβγ [48]. L'action proliférative de l'IL-2 et l'IL-15 peut être renforcée par l'ajout d'autres cytokines telles que l'IL-10 [49] ou l'IL-1 et le TNF-α [50].

3.4. *Production de chimiokines et de cytokines*

Sous l'action de différents facteurs stimulants du micro-environnement cellulaire, par le biais des récepteurs de type « Toll Like » (TLR) TLR ou des récepteurs aux monokines (IL-2 ou IL-15), les cellules NK ont la capacité de produire rapidement et de sécréter des chimiokines et des cytokines. Les chimiokines sont des peptides dont le rôle est d'induire la migration des leucocytes de concert avec les sélectines et les intégrines. Quant aux cytokines, elles sont impliquées à la fois dans le développement et la régulation des réponses immunitaires.

In vitro, les cellules NK humaines, issues du sang périphérique, non stimulées produisent spontanément les chimiokines CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES) et CCL22 [51]. Après activation, in vitro, par des cytokines (IL-12, IL-15 et IL-18) ou des intégrines, les cellules NK humaines synthétisent et sécrètent d'autres chimiokines telles que CCL1 [52], CCL4 [53] et CXCL8 [54]. Chez la souris, les cellules NK activées produisent RANTES, XCL1, CCL3 (MIP-1α), CCL4 et CCL5 [55,56]. De par cette production de chimiokines, les cellules NK participent au recrutement d'autres types cellulaires tels que les lymphocytes T $CD4^+$ et T $CD8^+$, mais aussi au recrutement d'autres cellules NK [57]. Ainsi, grâce à la production

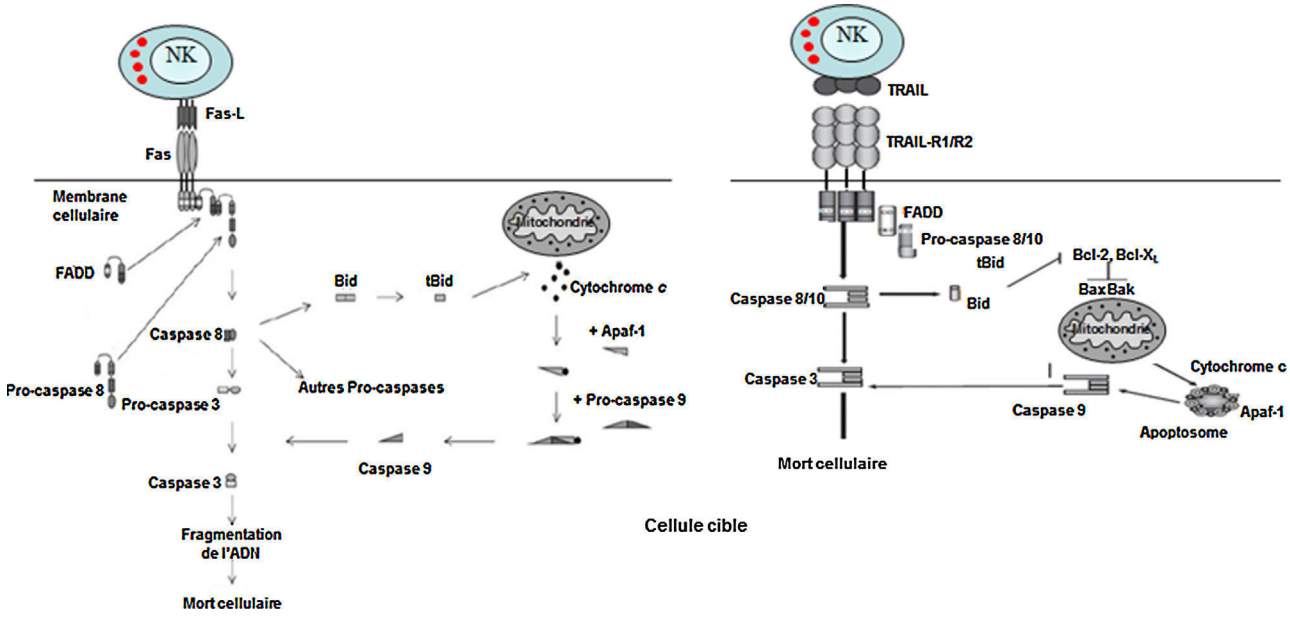


Fig. 2. Voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par les récepteurs de mort FAS et TRAIL. Dans la signalisation extrinsèque de l'apoptose, l'oligomérisation des récepteurs de la superfamille des récepteurs au TNF (FAS et Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis, Receptor (TRAILR1/R2), deux récepteurs de mort), suite à la fixation de leurs ligands (FAS-L et TRAIL), conduit à l'activation de la caspase 8 après son recrutement dans un complexe multiprotéique appelé Death-Inducing Signaling Complex (DISC) par l'intermédiaire de protéines adaptatrices, telle que la protéine Fas-Associated Death Domain (FADD), qui se fixent au domaine Death Effector Domain (DED) de la procaspase 8. La caspase 8 activée clive et active à son tour la caspase 3. Dans la signalisation intrinsèque, l'apoptose résulte de perturbations mitochondriales conduisant au relargage de protéines telles que le cytochrome *c* (cyt *c*), dans le cytoplasme. Ce relargage est régulé en partie par une balance entre les membres de la famille Bcl-2 : les membres anti-apoptotiques, tels que Bcl-2-Bcl-xL, l'inhibent, alors que les membres pro-apoptotiques (tels que Bax, Bad et tBid) le stimulent. Une fois libéré, le cyt *c* interagit avec la protéine Apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) et la procaspase 9. Ils forment ainsi un complexe multiprotéique, l'apoptosome, à l'origine du clivage de la procaspase 9, et donc de son activation. La caspase 9 va ensuite activer la caspase effectrice 3 qui va être responsable du clivage spécifique de nombreux substrats cellulaires conduisant aux modifications morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose. Dans certaines cellules, un membre de la famille Bcl-2, Bid, permet de faire le lien entre les deux voies : un fragment de la protéine Bid (tBid), issu du clivage par la caspase 8, est transféré du cytoplasme à la mitochondrie, et entraîne l'ouverture des pores mitochondriaux facilitant ainsi le relargage du cyt *c*.
Figure adaptée selon [41,42].

de chimiokines, les cellules NK participent à l'établissement et l'amplification de la réponse immune.

La sous-population CD56^{bright} stimulée est la principale source de cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives dont l'IFN-γ, produit en quantité importante, l'IL-10, le TNF-β et le Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) bien que les cellules CD56^{dim} puissent en produire mais en quantité réduite [20,21]. L'IFN-γ a de multiples effets sur nombre de cellules immunocompétentes : il influence aussi bien la réponse immunitaire innée en activant la phagocytose des macrophages et la maturation des cellules dendritiques pro-inflammatoires, que la réponse immunitaire adaptative en stimulant la polarisation de la réponse des LT CD4$^+$ vers un profil Th1 [58]. Il induit notamment l'expression des molécules du CMH de classe 1 et 2 à la surface des cellules présentatrices d'antigènes [58].

Le GM-CSF, produit également par d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les LT, les cellules endothéliales [59,60], influence la maturation des cellules dendritiques tolérogènes et peut donc indirectement avoir une répercussion sur la formation des LT régulateurs (LT reg). Ce facteur de croissance est également essentiel aux polynucléaires neutrophiles [61] et est capable de stimuler indirectement l'activité cytotoxique des cellules NK [62,63].

4. Impact de la leptine sur les cellules NK

Outre de multiples effets dans le métabolisme énergétique et la prise alimentaire [64,65], la leptine module les capacités métaboliques et fonctionnelles des cellules du système immunitaire (Fig. 3) [66,67].

En situation d'obésité, l'hyperleptinémie chronique associée participe au risque accru de développer un cancer [2,3] et contribue à la mise en place d'une dysimmunité [4,5]. Dans ce contexte plusieurs acteurs du système immunitaire sont altérés : le nombre des CD8 est réduit, celui des CD4 est soit augmenté soit diminué selon les auteurs [68]. La capacité proliférative des LT et des LB en réponse à une stimulation est réduite [69]. Les capacités fonctionnelles des cellules NK sont également altérées et l'incidence élevée de cancer en situation d'obésité pourrait être liée, en partie, à une moindre vigilance anti-tumorale.

4.1. Effet de la leptine sur l'expression d'Ob-R par les cellules NK

Les récepteurs de la leptine (Ob-R) ont été caractérisés au niveau des cellules immunitaires telles que les monocytes [70], les polynucléaires neutrophiles [71], les cellules dendritiques

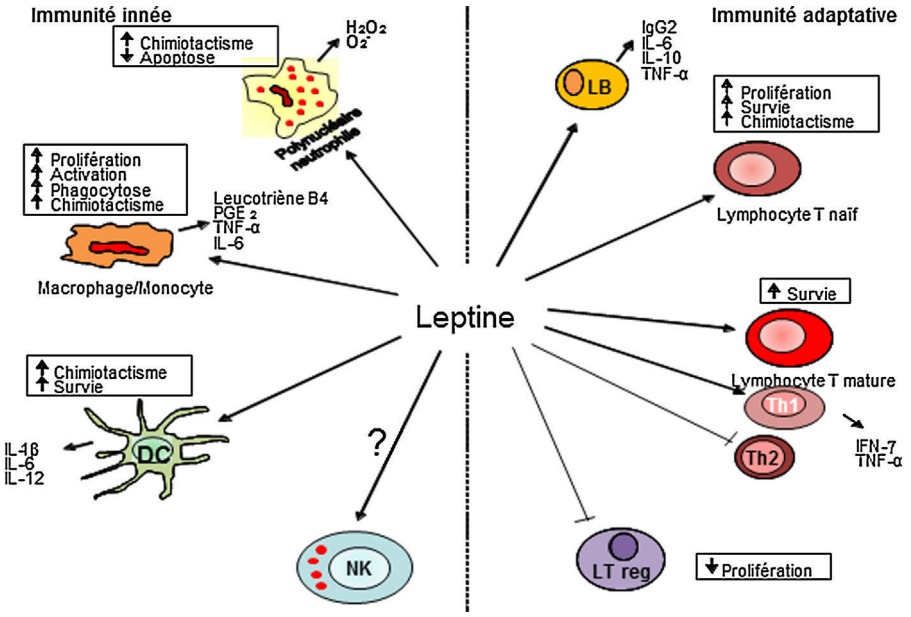


Fig. 3. Effet de la leptine sur la réponse immune innée et adaptative. DC : dendritic cell, cellule dendritique ; IFN : interféron ; Ig : immunoglobuline ; IL : interleukine ; LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; LT reg : lymphocyte T regulateur ; M1 : macrophage de phénotype 1 ; M2 : macrophage de phénotype 2 ; MDSC : Myeloïd Derived Supressor Cell, cellule suppresseur dérivée des myéloïdes ; NK : cellule Natural Killer ; PGE2 : pprostanglandine E2 ; TNF : Tumor Necrosis Factor, facteur nécrosant les tumeurs.
Figure adaptée d'après [12].

[72], les LB et LT [73,74] mais également les cellules NK [75]. Les cellules NK humaines expriment Ob-R [75,76] et ce quelle que soit la sous-population [77]. Une plus forte densité d'Ob-R à la surface des NK est observée chez les individus en surpoids et obèses (indice de masse corporelle [IMC] $\geq 25\ kg/m^2$) comparativement aux individus normo-pondéraux (IMC $< 25\ kg/m^2$) [77]. Les cellules NK murines, qu'elles soient quiescentes ou activées [78,79], expriment également des récepteurs à la leptine. Chez le rat, le récepteur à la leptine est retrouvé à la surface des cellules NK quel que soit l'état nutritionnel (maigre ou obèse) avec, toutefois, un taux d'ARNm codant pour le gène Ob plus élevé en situation d'obésité [80].

Les lignées humaines de cellules NK YT [75] et NK-92 [75,81] expriment la forme courte et longue du récepteur Ob-R dont l'expression n'est pas modifiée en présence de leptine [81].

La divergence des résultats acquis in vitro et in vivo s'explique par la mise en place in vivo, en réponse à une obésité constitutive ou à un régime hypercalorique, d'une résistance à la leptine ayant pour conséquence une hyperleptinémie. Cette perte d'efficacité de la leptine sur les cellules NK relève non pas d'un défaut d'expression génique et protéique du récepteur Ob-R mais d'une altération post-récepteur de la transduction du signal leptinique [80].

4.2. Voies de transduction mises en jeu par la leptine dans les cellules NK

Les effets de la leptine sur les cellules NK mettent en jeu la voie intracellulaire Janus Tyrosine Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK/STAT) (Fig. 4). In vitro, l'action stimulante de la leptine sur la cytotoxicité et la prolifération des cellules YT passerait en partie par l'activation de STAT3 [75]. Suite à la fixation de la leptine sur le récepteur Ob-R, JAK2 est activée, par autophosphorylation au niveau de résidus de tyrosine du motif 1 et par phosphorylation d'autres tyrosines qui serviront de point d'ancrage aux facteurs de transcription contenant un domaine SH2 [82–84]. L'autophosphorylation de JAK 2 peut conduire à l'activation de la voie Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (PI-3K)/Akt. Akt régule un certain nombre de cibles dont Forkhead boX protein O1 (FOXO1) et NKγB. Les résidus Tyr1077 et Tyr1138 fixent STAT5 alors que seul le résidu Tyr1138 recrute STAT1 et STAT3. Ainsi, le facteur de transcription STAT3 activé forme un hétérodimère et transloque dans le noyau où il se lie à des séquences spécifiques d'ADN et active l'expression d'une série de gènes-cibles tels que *c-fos*, *c-jun*, *egr-1*, protéine activateur 1 (AP-1, Activating Protein-1) et du suppresseur de cytokine de signalisation 3 (SOCS3 : Supressor of Cytokine Signalling 3). Cette dernière régule négativement le signal de transduction de la leptine en se fixant sur les résidus phosphorylés de tyrosine sur la partie intracellulaire du récepteur, inhibant ainsi la fixation des protéines STAT et SHP-2. SHP-2 par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice GRB2 active les voies des MAP (Mitogen Activated Protein) kinases mettant en jeu ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) 1/2, p38 MAPK et P42/44 MAPK et induit l'expression de chimiokines et de cytokines dans les cellules immunitaires.

Les mécanismes d'échappement des cellules NK à l'action de la leptine, en situation d'hyperleptinémie in vivo ou ex vivo, ne passent pas par une régulation de l'expression d'Ob-R [75,81]

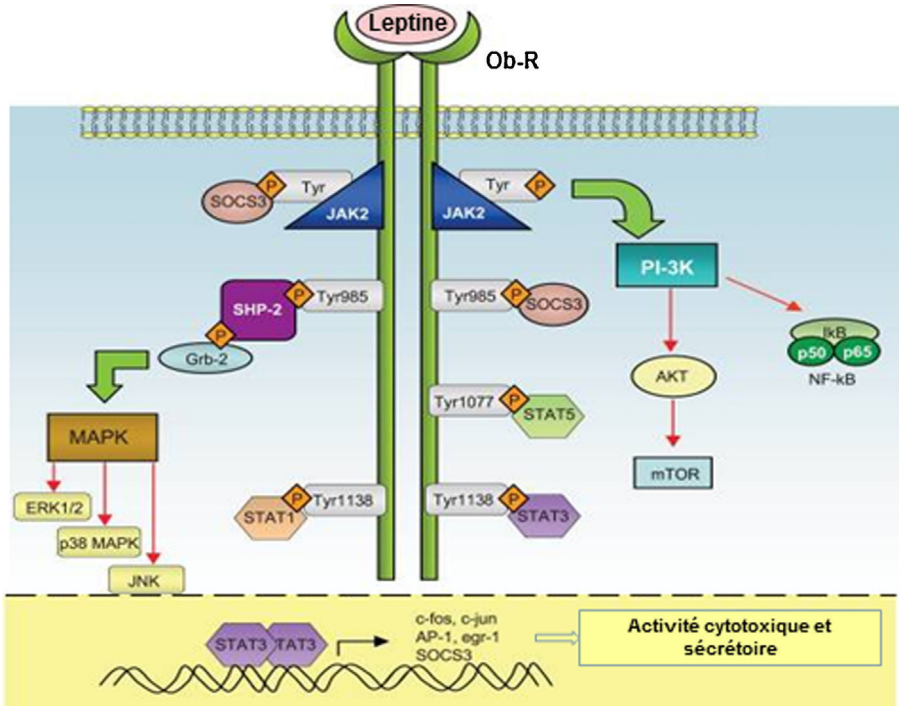


Fig. 4. Induction de la voie JAK/STAT par la leptine au sein des cellules NK. La liaison de la leptine à son récepteur entraîne l'activation de JAK2, qui induit alors l'activation complète d'Ob-R en phosphorylant les résidus tyrosine 985, 1077, et 1138. Y1077 permet le recrutement et l'activation de STAT5 et Y1138 le recrutement et l'activation de STAT1 ; STAT3 et STAT5. Les protéines STAT activées s'homodimérisent et subissent une translocation nucléaire où elles stimulent la transcription de leurs gènes-cibles. La voie JAK/STAT est la principale voie activée en réponse à la leptine dans la cellule NK. AKT : protéine kinase AKT ; Blc-2 : B cell lymphoma protein 2, protéine anti-apoptotique Bcl2 ; Bcl-x : BCL2-like, protéine 2 apparentée à Bcl-2 ; Bid : BH3 interacting domain death agonist ; ERK 2 : Extracellular Signal-Regulated Kinases 2, kinases régulatrices de la transduction du signal extracellulaire ; GRB2 : Growth Factor Receptor-Bound protein 2, récepteur de facteur de croissance liant la protéine 2 ; Grb2 : protéine Grb2 ; IκB : Inhibitory κ B, protéine inhibitrice κ B ; JAK/STAT : Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription ; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin, cible de la rapamycine ; NF κB : Nuclear Factor κ B, facteur nucléaire κ B ; P38 MAPK and MAPK : P38 Mitogen Activating Protein Kinases, protéines kinases (P38) activées par des agents mitogènes ; PI-3K : Phosphatidyl Inositol 3-OH Kinase, phosphatidyl inositol-3 phosphate ; SHP-2 : SH-2 domain-containing Phosphatase-2, phosphatase 2 ayant un domaine SH-2 ; SOCS3 : Suppressor of Cytokine Signalling 3, protéine suppressive du signal cytokinique 3.
Adaptée d'après [84].

mais relèvent de la surexpression de SOCS3, protéine qui inhibe la phosphorylation de la tyrosine du récepteur Ob-R, ce qui représente un rétrocontrôle puissant sur la cellule [80]. Restaurer la sensibilité des cellules NK à la leptine en limitant ou inhibant SOCS3, un régulateur négatif de la transduction du signal leptinique, soit par des ARN interférents soit par des antagonistes pharmacologiques, pourrait être une nouvelle cible pour améliorer la vigilance anti-tumorale en situation d'obésité.

4.3. Effet de la leptine sur la prolifération et le métabolisme énergétique des cellules NK

La leptine module la prolifération des cellules NK de façon variable selon la lignée cellulaire étudiée [75]. En effet, elle intensifie la prolifération cellulaire de la lignée YT, lignée indépendante de l'IL-2 et cet effet stimulateur passerait en partie par l'activation de STAT3. Pour la lignée NK-92, la prolifération médiée par la leptine passerait par une surexpression de l'ARNm codant pour le récepteur de haute affinité à l'IL-2.

À ce jour le métabolisme énergétique des cellules NK a été peu étudié ; toutefois, il a été démontré que l'implication des voies énergétiques diffère selon l'état quiescent ou activé des cellules immunitaires. Par exemple, les LT activés se caractérisent par un fort anabolisme coûteux en énergie [85]. En effet, en présence d'antigène, de co-stimulation et/ou de facteurs de croissance, les LT tirent leur énergie de la glycolyse pour soutenir la prolifération alors que les acides gras et les acides aminés sont utilisés pour la néosynthèse des macromolécules constitutives et sécrétoires. À l'inverse, les LT quiescents (naïfs et mémoires) adoptent un métabolisme de type catabolique au cours duquel le glucose, les acides aminés et les acides gras sont utilisés en tant que substrats du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Les facteurs de croissance, qui stimulent l'expression des transporteurs de ces substrats énergétiques, sont nécessaires et indispensables à la survie des cellules.

La leptine, en concentration physiologique, participe à la régulation du métabolisme énergétique et de la prise alimentaire et exerce de multiples actions à la fois aux niveaux cellulaire et moléculaire. Elle est essentielle aux LT activés pour stimuler la captation et la dégradation du glucose [86]. Cet effet passe par l'activation de la voie mammalian Target of rapamycin (mTor) qui régule le métabolisme et les fonctions des LT activés [87]. À ce jour, peu de données concernent les effets de la leptine sur le métabolisme énergétique des cellules NK. In vitro, indépendamment d'un effet sur l'expression d'Ob-R, la leptine stimule de façon dose-dépendante l'activité métabolique des cellules

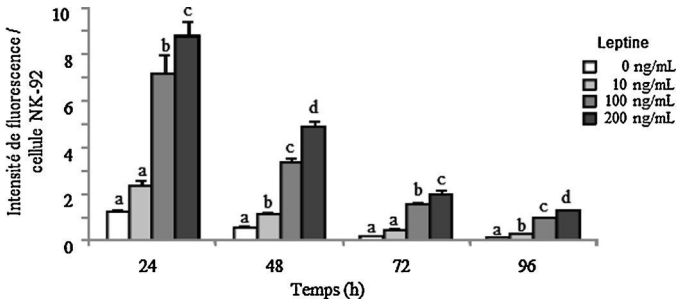


Fig. 5. Effets de la leptine sur l'activité métabolique des cellules NK-92. Les cellules NK-92 ont été cultivées en présence de leptine en concentration physiologique (10 ng/mL), d'obésité (100 ng/mL) ou pharmacologique (200 ng/mL). Moyenne ± ESM, $n = 9$, Anova à un facteur suivie d'un test de PSLF Fisher, $a \neq b \neq c \neq d$, $p < 0{,}05$.
D'après [81].

NK-92 non activées [81] (Fig. 5), reflet de la production mitochondriale d'ATP. Lors du contact entre une cellule NK et une cellule cible, les mitochondries migrent vers le site d'interaction et produisent l'énergie nécessaire pour la destruction de la cellule cible [88]. Cette réorganisation mitochondriale des cellules NK au sein de la synapse immunologique serait en partie dépendante des récepteurs activateurs tel que NKG2D. Ainsi, les effets de la leptine sur la fonctionnalité des cellules NK pourraient également passer par une stimulation de la production mitochondriale d'ATP.

4.4. Effet de la leptine sur l'activité cytotoxique des cellules NK

Dans cette partie sont exposées les différentes approches qui ont permis d'établir le rôle modulateur de la leptine sur la fonction lytique des cellules NK. L'importance de la leptine a tout d'abord été révélée par l'utilisation de modèles animaux génétiquement modifiées. Par la suite des approches in vitro et ex vivo ont permis d'appréhender les mécanismes d'actions de la leptine sur les effecteurs de la cytotoxicité des cellules NK. Enfin, les études animales et cliniques associés à des situations d'hyperleptinémie chronique permettront d'analyser les voies d'échappements à l'action de la leptine.

L'activité cytotoxique des cellules NK spléniques est réduite chez les souris déficientes pour le gène de la leptine (souris *ob/ob*) [89,90], ou celui de son récepteur, (souris *db/db*) [91]. Les souris *db/db* présentent un faible nombre de cellules NK dans les tissus (foie, rate, poumons) et le sang et une moindre expression du marqueur d'activation CD69 à la surface de ces cellules NK [91]. Que ce soit à l'état basal ou stimulé via le polyinosine cytidine (polyI :C) ou l'IL-15, l'activité cytotoxique ex vivo des splénocytes issus des souris *db/db* est réduite comparativement à celle des souris sauvages. Si l'ajout de leptine recombinante en concentration physiologique (10 nM) et sur une courte période (4 h) stimule la fonction lytique des splénocytes de souris sauvages, quel que soit l'état basal ou stimulé, en revanche il reste sans effet sur les splénocytes issus de souris *db/db* [91]. L'ensemble de ces données indique que la leptine est nécessaire à la prolifération, à l'activation et à la cytotoxicité des cellules NK.

L'incubation de cellules NK humaines, isolées à partir de sang de volontaires sains, en présence de doses croissantes de leptine (1, 10 et 100 nM) sur une courte période (20 min), révèle une stimulation non dose-dépendante de l'activité lytique des cellules NK vis-à-vis des cellules cibles K562 [76]. Cette activation de la cytotoxicité est objectivée par la formation de complexes « cellules NK/cellules K562 » et par la surexpression par les cellules NK du marqueur d'activation CD69 et du ligand au récepteur de mort TRAIL. À l'inverse, l'incubation ex vivo sur une longue période (> à 4 jours) de cellules NK humaines en présence de leptine (50 nM) réduit l'activité lytique des cellules NK [76]. Ces données pourraient s'expliquer par la mise en place d'une leptinorésistance, comme observée chez le sujet obèse [92].

La leptine module différemment la fonction cytotoxique des cellules NK selon la cible cellulaire utilisée [81]. À une concentration similaire à celle observée en situation d'obésité, la leptine stimule l'activité cytolytique des cellules NK-92 vis-à-vis des cellules cibles MDA-MB-231 et K562 et réduit leur activité vis-à-vis des cellules MCF-7 (Fig. 6). Afin de comprendre ces variations d'activité cytotoxique selon les cellules transformées cibles, les effecteurs de la cytotoxicité (granules lytiques, ligands aux récepteurs de mort) des cellules NK modulés par la leptine ont été recherchés. Selon les approches in vitro ou ex vivo, des divergences apparaissent : la leptine, en présence des cellules YT, stimule l'expression génique de la perforine et de l'IL-2 [75] alors qu'en présence de cellules NK humaines, elle accroît l'activité lytique en surexprimant TRAIL [76]. En accord avec cette dernière étude, il a été démontré que la leptine, à forte concentration, stimule l'expression protéique de TRAIL et inhibe celle de la perforine dans les cellules NK-92, sans affecter l'expression du granzyme B et de Fas-L (Fig. 7) [81].

Les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231 sont sensibles à l'apoptose induite par TRAIL [93,94] et résistantes à celle provoquée par Fas-L [95,96]. Ainsi, l'augmentation d'expression de TRAIL en réponse à la leptine pourrait être un des mécanismes impliqués dans la stimulation de la cytotoxicité des cellules NK-92 vis-à-vis de ces cellules tumorales [81]. À l'inverse, les cellules MCF-7 résistent à l'apoptose induite par Fas-L et TRAIL [93,94]. Cela suggère que parmi les effecteurs de la cytotoxicité des cellules NK-92, seuls la perforine et les granzymes sont susceptibles d'induire la lyse des cellules MCF-7. La réduction de l'expression de la perforine en présence de fortes concentrations de leptine pourrait expliquer la moindre cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules MCF-7 [81] (Fig. 7).

Les cellules K562, comme les cellules MCF-7, sont résistantes à l'apoptose médiée par Fas-L et TRAIL [97,98]. Cependant la cytotoxicité des cellules NK-92 vis-à-vis de ces cellules est accrue par de fortes concentrations de leptine en dépit d'une sous-expression de la perforine [81]. Ceci suggère que la leptine doit également agir sur d'autres acteurs impliqués dans l'activation et la cytotoxicité des cellules NK, tels que les récepteurs activateurs NKp30, NKp46 et NKG2D. En effet, les cellules K562 sont davantage sensibles à la cytotoxicité des

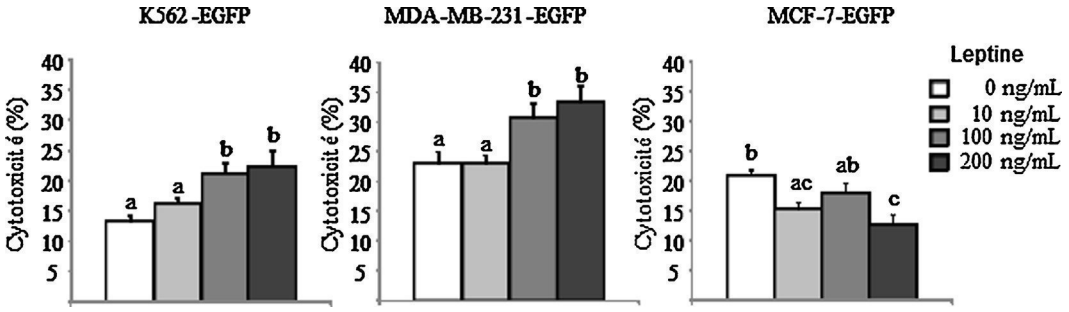


Fig. 6. Effets de la leptine sur l'activité cytotoxique des cellules NK-92 vis-à-vis de différentes cibles. Les cellules NK-92 préalablement cultivées en présence de leptine en concentration physiologique (10 ng/mL), en situation d'obésité (100 ng/mL) ou pharmacologique (200 ng/mL) ont été mises en présence de différentes cellules cibles (K562 : cellules érythroleucémiques humaines, MDA-MB 231 et MCF-7 : cellules cancéreuses mammaires respectivement invasives et estrogéno-indépendantes et non-invasives et estrogéno-dépendantes). Moyenne ± ESM, $n = 9$, Anova à un facteur suivie d'un test de PSLF Fisher, a ≠ b ≠ c, $p < 0{,}05$.
D'après [81].

cellules NK médiée par NKp30 et NKp46 que les cellules MCF-7 [99].

Les études in vitro ont des limites car elles ne reflètent pas une imprégnation leptinique au long cours comme observée en situation d'obésité [100,101]. Si dans ce contexte, une leptinorésistance est observée au niveau du système nerveux central [102,103], l'hypothèse selon laquelle les cellules immunitaires pourraient également échapper à l'action de la leptine a été émise pour expliquer la dysimmunité [5]. Plusieurs études réalisées notamment sur des cellules NK isolées viennent étayer cette assertion. En effet, les cellules NK de volontaires sains cultivées ex vivo en présence de fortes concentrations de leptine

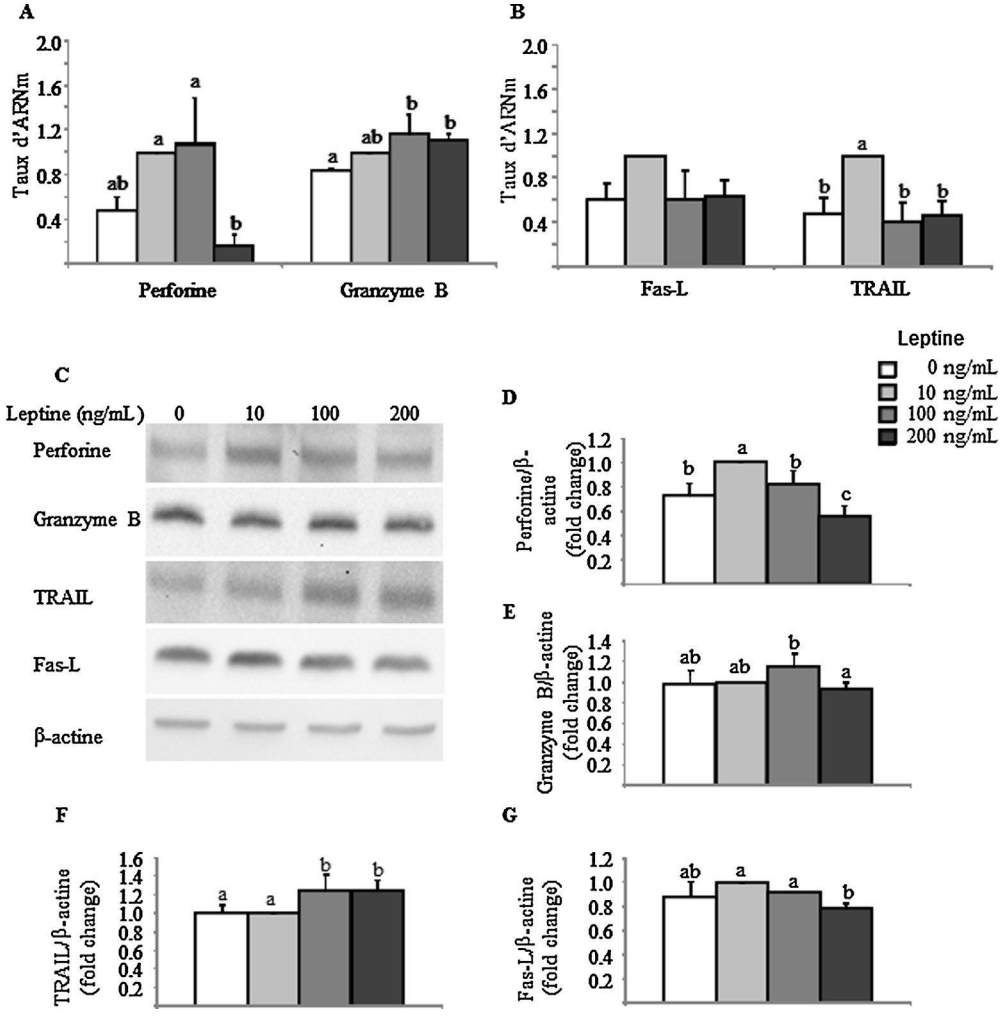


Fig. 7. Effets de la leptine sur les expressions génique et protéique des effecteurs cytotoxiques des cellules NK-92. Après 48 h de culture des cellules NK-92 dans des milieux contenant de concentrations variables en leptine, les ARNm et les protéines des granules lytiques et des ligands aux récepteurs de mort ont été déterminés par RT-qPCR (A et B) et Western Blot (C à G). Moyenne ± ESM, $n = 9$, Anova à un facteur suivie d'un test de PSLF Fisher, a ≠ b, $p < 0{,}05$.
D'après [81].

durant plus de 4 jours prolifèrent mais présentent une activité lytique et sécrétoire réduite [76], reflet d'une résistance à l'action de la leptine. De façon similaire dans un modèle animal d'obésité associée à une hyperleptinémie, l'injection de leptine provoque une réduction de l'activité lytique des cellules NK d'un facteur 4 par rapport à celle observée dans le groupe témoin [80]. Dans ces deux études, la surexpression de SOSC3 induite par une imprégnation prolongée d'un milieu enrichi en leptine pourrait expliquer la désensibilisation des cellules à la leptine.

Dans un modèle expérimental de souris Balb-c *nude*, résistantes à l'obésité [104,105] placées sous régime hypercalorique associé ou non à l'implantation d'une tumeur mammaire humaine, un tel régime provoque une réduction du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK spléniques [106]. En l'absence d'une hyperleptinémie, cet effet résulte d'une action directe des acides gras saturés sur la composition membranaire et la fluidité des micro-domaines ou rafts lipidiques, dans lesquels sont enchâssés les récepteurs inhibiteurs et activateurs [107]. Toutefois, les animaux sous régime hypercalorique et développant une tumeur présentent une diminution significative de l'activité lytique des cellules NK comparativement aux animaux sous régime standard et porteurs de tumeurs. Ainsi, le développement tumoral observé résulte non seulement du régime hypercalorique et notamment des lipides saturés qui lui sont associés mais aussi d'une moindre vigilance anti-tumorale [106]. L'expression génique tumorale de *Fas* étant inhibée sous régime hypercalorique, les tumeurs des souris pourraient être moins sensibles à la cytotoxicité des cellules NK médiée par Fas-L que les tumeurs de souris sous régime normocalorique. Par ailleurs, la baisse du taux circulant de GM-CSF, facteur de croissance connu pour stimuler indirectement l'activité cytotoxique des cellules NK [62,63], pourrait contribuer également à la moindre activité des cellules NK.

Chez l'Homme, non seulement le nombre mais aussi l'activité lytique des cellules NK sont réduits en situation d'obésité [9–11]. Il est de plus à noter, qu'indépendamment de l'âge et de l'IMC, la population de cellules NK dans le sang est inférieure chez les personnes obèses ayant développé un syndrome métabolique comparativement à ceux qui ne présentent pas de syndrome métabolique [108]. Leur phénotype diffère également : les cellules NK des sujets atteints de syndrome métabolique expriment significativement plus de récepteurs inhibiteurs CD158b et NKB1 mais aussi des marqueurs d'activation tels que le CD69. Ainsi, bien qu'elles soient activées, les cellules NK de sujets obèses atteints de syndrome métabolique ont une activité cytolytique abaissée du fait de la surexpression de récepteurs inhibiteurs. Ceci pourrait contribuer à la susceptibilité accrue aux risques tumoral et infectieux des sujets obèses atteints de syndrome métabolique comparativement aux sujets obèses sans complication métabolique.

4.5. Effet de la leptine sur l'activité sécrétoire des cellules NK

Il est clairement établi que la leptine exerce une action pro-inflammatoire en favorisant la différenciation de cellules Th0 en cellules Th1 sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN-γ [72,109,110]. Toutefois, peu de travaux ont évalué les effets de la leptine sur les capacités sécrétoires des cellules NK. L'IFN-γ, produit majoritairement par les cellules NK mais aussi par les LT helper de type 1 et les LT cytotoxiques, induit par son action autocrine et paracrine, l'activation des cellules NK, des macrophages et des LT et stimule leur activité cytotoxique [111,112]. De plus, il exerce une action anti-proliférative et pro-apoptotique vis-à-vis des cellules tumorales [113,114]. En présence de leptine à la concentration de100 ng/mL, similaire à celle retrouvée en situation d'obésité, la production, in vitro, d'IFN-γ par les cellules NK-92 est élevée et contribue à la stimulation de la cytotoxicité des cellules NK-92 vis-à-vis des cellules cibles telles que les cellules MDA-MB-231 [81].

Ex vivo, des cellules NK humaines isolées et exposées à la leptine (50 ng/mL) sur une courte période (18 h) ont une production accrue d'IFN-γ suite à leur activation objectivée par l'expression du marqueur de surface CD69 [76]. À l'inverse, une imprégnation leptinique sur une plus longue période (> 72 h) se traduit par une réduction de la production d'IFN-γ [76]. Cette différence de réponse pourrait être expliquée par une régulation spécifique de la production d'IFN-γ selon la sous-population de NK : les cellules NK $CD56^{dim}$ stimulées produisent l'IFNγ dans la phase précoce de stimulation alors que les cellules NK $CD56^{bright}$ prennent le relais dans la phase tardive de stimulation [115].

En situation d'obésité, l'hyperleptinémie chronique pourrait participer au défaut d'activité des cellules NK et contribuer ainsi à une moindre surveillance anti-tumorale. En effet, chez la souris devenue obèse en réponse à un régime hypercalorique, une hyperleptinémie prolongée induit une résistance à la leptine par une désensibilisation de la voie JAK/STAT, responsable d'une réduction de l'activation des cellules NK [80].

4.6. Impact des adipocytes sur les cellules NK

S'il est établi que la leptine altère les capacités fonctionnelles des cellules NK, l'impact des cellules adipeuses elles-mêmes et de leurs sécrétions sur l'activité des cellules NK est à ce jour mal caractérisé. À notre connaissance, seule l'étude de Huebner et al. a évalué l'influence des sécrétions adipocytaires globales sur des cellules NK humaines [77]. Pour ce faire les cellules NK ont été cultivées durant 24 h dans un milieu conditionné avec une lignée d'adipocytes d'origine humaine. Ces conditions n'altèrent pas, quelle que soit la sous-population, le nombre de cellules NK, l'expression d'Ob-R, la capacité de former des conjugués (cellules NK-cellules cibles K562) et l'expression de TRAIL. Toutefois, elles stimulent significativement l'expression d'IFN-γ par les cellules $CD56^{dim}$ mais ne modifient pas celle des cellules $CD56^{bright}$. Enfin, l'expression du granzyme A, similaire entre les deux sous-populations à l'état basal, est réduite dans les cellules $CD56^{dim}$ cultivées et est accrue dans les cellules $CD56^{bright}$. Cette étude étaye le rôle du microenvironnement adipocytaire dans la modulation des capacités fonctionnelles des cellules NK et conforte des données antérieures [75,80,81,108,116].

5. Conclusion

La leptine est un facteur clé du dialogue intercellulaire entre adipocytes, cellules épithéliales, fibroblastes et cellules immunocompétentes. Les cellules NK sont des acteurs essentiels de l'immunité anti-tumorale. La leptine, in vitro, stimule l'activité métabolique et la cytotoxicité des cellules NK en mettant en jeu positivement la voie de TRAIL et de l'IFN-γ et négativement la voie de la perforine. À l'inverse, in vivo, une hyperleptinémie chronique au long court induit une réduction du nombre et de la fonction des cellules NK selon des mécanismes non complètement élucidés. Ainsi, l'hyperleptinémie en réduisant la vigilance anti-tumorale contribue au risque de cancérogenèse associée à l'obésité.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Références

[1] Renehan AG, Roberts DL, Dive C. Obesity and cancer: pathophysiological and biological mechanisms. Arch Physiol Biochem 2008;114:71–83.
[2] Hursting SD, Berger NA. Energy balance, host-related factors, and cancer progression. J Clin Oncol 2010;28:4058–65.
[3] Roberts DL, Dive C, Renehan AG. Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives. Annu Rev Med 2010;61:301–16.
[4] Martí A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. Obes Rev 2001;2:131–40.
[5] Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. Exp Biol Med (Maywood) 2010;235:1412–24.
[6] Catalán V, Gómez-Ambrosi J, Rodríguez A, Frühbeck G. Adipose tissue immunity and cancer. Front Physiol 2013;4:275.
[7] Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. Clin Endocrinol (Oxf) 2006;64:355–65.
[8] Degawa-Yamauchi M, Bovenkerk JE, Juliar BE, Watson W, Kerr K, Jones R, et al. Serum resistin (FIZZ3) protein is increased in obese humans. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:5452–5.
[9] Chang Y-H, Chang D-M, Lin K-C, Shin S-J, Lee Y-J. Visfatin in overweight/obesity, type 2 diabetes mellitus, insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular diseases: a meta-analysis and systemic review. Diabetes Metab Res Rev 2011;27:515–27.
[10] Fantuzzi G. Adiponectin in inflammatory and immune-mediated diseases. Cytokine 2013.
[11] Caldefie-Chézet F, Dubois V, Delort L, Rossary A, Vasson M-P. Leptin: Involvement in the pathophysiology of breast cancer. Ann Endocrinol 2013;74:90–101.
[12] La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. Nat Rev Immunol 2004;4:371–9.
[13] Vivier E. What is natural in natural killer cells? Immunol Lett 2006;107:1–7.
[14] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. Nat Immunol 2008;9:503–10.
[15] Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Science 2011;331:44–9.
[16] Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of natural killer cells. Annu Rev Immunol 2004;22:405–29.
[17] Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. Immunol Rev 2006;214:56–72.
[18] Moretta L, Biassoni R, Bottino C, Cantoni C, Pende D, Mingari MC, et al. Human NK cells and their receptors. Microbes Infect 2002;4:1539–44.
[19] Moretta L, Moretta A. Unravelling natural killer cell function: triggering inhibitory human NK receptors. EMBO J 2004;23:255–9.
[20] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. Trends Immunol 2001;22:633–40.
[21] Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. Blood 2001;97:3146–51.
[22] Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. Blood 2010;116:1299–307.
[23] Walzer T, Vivier E. G-protein-coupled receptors in control of natural killer cell migration. Trends Immunol 2011;32:486–92.
[24] Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. Immunol Cell Biol 2011;89:216–24.
[25] Raulet DH, Vance RE. Self-tolerance of natural killer cells. Nat Rev Immunol 2006;6:520–31.
[26] Raulet DH, Vance RE, McMahon CW. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. Annu Rev Immunol 2001;19:291–330.
[27] Joncker NT, Fernandez NC, Treiner E, Vivier E, Raulet DH. NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. J Immunol 2009;182:4572–80.
[28] Stewart CA, Vivier E, Colonna M. Strategies of natural killer cell recognition and signaling. Curr Top Microbiol Immunol 2006;298:1–21.
[29] Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. Nature 1998;395:82–6.
[30] Varma R, Campi G, Yokosuka T, Saito T, Dustin ML. T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. Immunity 2006;25:117–27.
[31] Mace EM, Orange JS. New views of the human NK cell immunological synapse: recent advances enabled by super- and high-resolution imaging techniques. Front Immunol 2012;3:421.
[32] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. J Immunol Methods 2004;294:15–22.
[33] Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer? Nat Rev Immunol 2003;3:413–25.
[34] Law RHP, Lukoyanova N, Voskoboinik I, Caradoc-Davies TT, Baran K, Dunstone MA, et al. The structural basis for membrane binding and pore formation by lymphocyte perforin. Nature 2010;468:447–51.
[35] Bolitho P, Voskoboinik I, Trapani JA, Smyth MJ. Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin. Curr Opin Immunol 2007;19:339–47.
[36] Cullen SP, Martin SJ. Mechanisms of granule-dependent killing. Cell Death Differ 2008;15:251–62.
[37] Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascurain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. Cell Mol Immunol 2009;6:15–25.
[38] Kaspar AA, Okada S, Kumar J, Poulain FR, Drouvalakis KA, Kelekar A, et al. A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin. J Immunol 2001;167:350–6.
[39] Latinovic-Golic S, Walch M, Sundstrom H, Dumrese C, Groscurth P, Ziegler U. Expression, processing and transcriptional regulation of granulysin in short-term activated human lymphocytes. BMC Immunol 2007;8:9.
[40] Walch M, Latinovic-Golic S, Velic A, Sundstrom H, Dumrese C, Wagner CA, et al. Perforin enhances the granulysin-induced lysis of Listeria innocua in human dendritic cells. BMC Immunol 2007;8:14.
[41] Timmer T, de Vries EGE, de Jong S. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? J Pathol 2002;196:125–34.
[42] Falschlehner C, Ganten TM, Koschny R, Schaefer U, Walczak H. TRAIL and other TRAIL receptor agonists as novel cancer therapeutics. Adv Exp Med Biol 2009;647:195–206.

[43] Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrout RH, Sedger LM, Kayagaki N, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. J Exp Med 2001;193:661–70.
[44] Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, et al. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. Nat Med 2001;7:94–100.
[45] Smyth MJ, Takeda K, Hayakawa Y, Peschon JJ, van den Brink MRM, Yagita H. Nature's TRAIL–on a path to cancer immunotherapy. Immunity 2003;18:1–6.
[46] Thorén FB, Riise RE, Ousbäck J, Della Chiesa M, Alsterholm M, Marcenaro E, et al. Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. J Immunol 2012;188:1668–74.
[47] Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, et al. Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2. J Clin Invest 1993;91:123–32.
[48] Carson WE, Fehniger TA, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cell subsets: characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. Eur J Immunol 1997;27:354–60.
[49] Carson WE, Lindemann MJ, Baiocchi R, Linett M, Tan JC, Chou CC, et al. The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. Blood 1995;85:3577–85.
[50] Robertson MJ, Manley TJ, Donahue C, Levine H, Ritz J. Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. J Immunol 1993;150:1705–14.
[51] Fehniger TA, Herbein G, Yu H, Para MI, Bernstein ZP, O'Brien WA, et al. Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. J Immunol 1998;161:6433–8.
[52] Cosman D, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. Immunity 2001;14:123–33.
[53] Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, VanDeusen JB, Whitman SP, Cooper MA, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. J Immunol 1999;162:4511–20.
[54] Mainiero F, Gismondi A, Strippoli R, Jacobelli J, Soriani A, Morrone S, et al. Integrin-mediated regulation of cytokine and chemokine production by human natural killer cells. Eur Cytokine Netw 2000;11:493–4.
[55] Ortaldo JR, Bere EW, Hodge D, Young HA. Activating Ly-49 NK receptors: central role in cytokine and chemokine production. J Immunol 2001;166:4994–9.
[56] Dorner BG, Smith HRC, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman DL, et al. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. J Immunol 2004;172:3119–31.
[57] Nieto M, Navarro F, Perez-Villar JJ, del Pozo MA, González-Amaro R, Mellado M, et al. Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. J Immunol 1998;161:3330–9.
[58] Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Adv Immunol 2007;96:41–101.
[59] Nimer SD, Uchida H. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression. Stem Cells Dayt Ohio 1995;13:324–35.
[60] Zhang AL, Colmenero P, Purath U, Teixeira de Matos C, Hueber W, Klareskog L, et al. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. Blood 2007;110:2484–93.
[61] Pitrak DL. Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophils. Curr Opin Hematol 1997;4:183–90.
[62] Van den Bosch G, Preijers F, Vreugdenhil A, Hendriks J, Maas F, De Witte T. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) counteracts the inhibiting effect of monocytes on natural killer (NK) cells. Clin Exp Immunol 1995;101:515–20.
[63] Kim KY, Kang MA, Nam MJ. Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. Cancer Lett 2001;166:33–40.
[64] Schneider JE, Buckley CA, Blum RM, Zhou D, Szymanski L, Day DE, et al. Metabolic signals, hormones and neuropeptides involved in control of energy balance and reproductive success in hamsters. Eur J Neurosci 2002;16:377–9.
[65] Carlton ED, Demas GE, French SS. Leptin, a neuroendocrine mediator of immune responses, inflammation, and sickness behaviors. Horm Behav 2012;62:272–9.
[66] Procaccini C, Jirillo E, Matarese G. Leptin as an immunomodulator. Mol Aspects Med 2012;33:35–45.
[67] Carbone F, La Rocca C, Matarese G. Immunological functions of leptin and adiponectin. Biochimie 2012;94:2082–8.
[68] O'Rourke RW, Kay T, Scholz MH, Diggs B, Jobe BA, Lewinsohn DM, et al. Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity. Obes Surg 2005;15:1463–8.
[69] Lamas O, Marti A, Martínez JA. Obesity and immunocompetence. Eur J Clin Nutr 2002;56 Suppl. 3:S42–5.
[70] Zarkesh-Esfahani H, Pockley G, Metcalfe RA, Bidlingmaier M, Wu Z, Ajami A, et al. High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. J Immunol 2001;167:4593–9.
[71] Caldefie-Chezet F, Poulin A, Tridon A, Sion B, Vasson MP. Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action? J Leukoc Biol 2001;69:414–8.
[72] Mattioli B, Straface E, Quaranta MG, Giordani L, Viora M. Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming. J Immunol 2005;174:6820–8.
[73] Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. Nature 1998;394: 897–901.
[74] Martín-Romero C, Santos-Alvarez J, Goberna R, Sánchez-Margalet V. Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. Cell Immunol 2000;199:15–24.
[75] Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. Biochem Biophys Res Commun 2003;300:247–52.
[76] Wrann CD, Laue T, Hübner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, et al. Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. Am J Physiol Endocrinol Metab 2012;302:E108–16.
[77] Huebner L, Engeli S, Wrann CD, Goudeva L, Laue T, Kielstein H, et al. cell subset functions are differentially affected by adipokines. PloS ONE 2013;8:e75703.
[78] Lord GM, Matarese G, Howard JK, Bloom SR, Lechler RI. Leptin inhibits the anti-CD3-driven proliferation of peripheral blood T cells but enhances the production of proinflammatory cytokines. J Leukoc Biol 2002;72:330–8.
[79] Papathanassoglou E, El-Haschimi K, Li XC, Matarese G, Strom T, Mantzoros C. Leptin receptor expression and signaling in lymphocytes: kinetics during lymphocyte activation, role in lymphocyte survival, and response to high fat diet in mice. J Immunol 2006;176: 7745–52.
[80] Nave H, Mueller G, Siegmund B, Jacobs R, Stroh T, Schueler U, et al. Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity. Endocrinology 2008;149:3370–8.
[81] Lamas B, Goncalves-Mendes N, Nachat-Kappes R, Rossary A, Caldefie-Chezet F, Vasson M-P, et al. Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of NK-92 cells. J Cell Physiol 2013;228:1202–9.
[82] Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. Biochem J 2006;393:7–20.
[83] Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: the missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. Eur J Med Res 2013;18:12.

[84] Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Carbone F, La Rocca C, Formisano L, et al. Role of adipokines signaling in the modulation of T cells function. Front Immunol 2013;4:332.
[85] Delmastro-Greenwood MM, Piganelli JD. Changing the energy of an immune response. Am J Clin Exp Immunol 2013;2:30–54.
[86] Saucillo DC, Gerriets VA, Sheng J, Rathmell JC, Maciver NJ. Leptin metabolically licenses T cells for activation to link nutrition and immunity. J Immunol 2014;192:136–44.
[87] Procaccini C, De Rosa V, Galgani M, Carbone F, Cassano S, Greco D, et al. Leptin-induced mTOR activation defines a specific molecular and transcriptional signature controlling CD4+ effector T cell responses. J Immunol 2012;189:2941–53.
[88] Abarca-Rojano E, Muñiz-Hernández S, Moreno-Altamirano MMB, Mondragón-Flores R, Enriquez-Rincón F, Sánchez-García FJ. Reorganization of mitochondria at the NK cell immune synapse. Immunol Lett 2009;122:18–25.
[89] Chandra RK. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob) mice. Am J Clin Nutr 1980;33:13–6.
[90] Kanda T, Takahashi T, Kudo S, Takeda T, Tsugawa H, Takekoshi N. Leptin deficiency enhances myocardial necrosis and lethality in a murine model of viral myocarditis. Life Sci 2004;75:1435–47.
[91] Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. Biochem Biophys Res Commun 2002;298:297–302.
[92] Kelesidis T, Kelesidis I, Chou S, Mantzoros CS. Narrative review: the role of leptin in human physiology: emerging clinical applications. Ann Intern Med 2010;152:93–100.
[93] Rahman M, Pumphrey JG, Lipkowitz S. The TRAIL to targeted therapy of breast cancer. Adv Cancer Res 2009;103:43–73.
[94] Jang J-Y, Jeon Y-K, Choi Y, Kim C-W. Short-hairpin RNA-induced suppression of adenine nucleotide translocase-2 in breast cancer cells restores their susceptibility to TRAIL-induced apoptosis by activating JNK and modulating TRAIL receptor expression. Mol Cancer 2010;9:262.
[95] Yu W, Israel K, Liao QY, Aldaz CM, Sanders BG, Kline K, et al. Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43,000 Fas in VES-triggered apoptosis. Cancer Res 1999;59:953–61.
[96] Ruiz-Ruiz C, Muñoz-Pinedo C, López-Rivas A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. Cancer Res 2000;60:5673–80.
[97] Kim M-J, Kim H-B, Bae J-H, Lee J-W, Park S-J, Kim D-W, et al. Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting the DNA-PKcs/Akt-mediated cell survival pathway. Biochem Pharmacol 2009;78:573–82.
[98] Bhattacharya K, Samanta SK, Tripathi R, Mallick A, Chandra S, Pal BC, et al. Apoptotic effects of mahanine on human leukemic cells are mediated through crosstalk between Apo-1/Fas signaling and the Bid protein and via mitochondrial pathways. Biochem Pharmacol 2010;79:361–72.
[99] Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self-tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. J Clin Invest 2011;121:3609–22.
[100] Gómez JM, Maravall FJ, Gómez N, Navarro MA, Casamitjana R, Soler J. Interactions between serum leptin, the insulin-like growth factor-I system, and sex, age, anthropometric and body composition variables in a healthy population randomly selected. Clin Endocrinol (Oxf) 2003;58:213–9.
[101] Mahabir S, Baer D, Johnson LL, Roth M, Campbell W, Clevidence B, et al. Body Mass Index, percent body fat, and regional body fat distribution in relation to leptin concentrations in healthy, non-smoking postmenopausal women in a feeding study. Nutr J 2007;6:3.
[102] Badman MK, Flier JS. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. Gastroenterology 2007;132:2103–15.
[103] Tschöp J, Nogueiras R, Haas-Lockie S, Kasten KR, Castañeda TR, Huber N, et al. CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis. J Neurosci 2010;30:6036–47.
[104] Fearnside JF, Dumas M-E, Rothwell AR, Wilder SP, Cloarec O, Toye A, et al. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. PloS ONE 2008;3:e1668.
[105] Olson LK, Tan Y, Zhao Y, Aupperlee MD, Haslam SZ. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness. Int J Obes 2010;34:1415–26.
[106] Lamas B, Nachat-Kappes R, Goncalves-Mendes N, Mishellany F, Rossary A, Vasson M-P, et al. Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cell growth and decreases natural killer cell cytotoxicity. Mol Carcinog 2015;54:58–71.
[107] Horejsi V, Hrdinka M. Membrane microdomains in immunoreceptor signaling. FEBS Lett 2014;588:2392–7.
[108] Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C, O'Shea DB. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? Obes (Silver Spring) 2009;17:601–5.
[109] Pacifico L, Di Renzo L, Anania C, Osborn JF, Ippoliti F, Schiavo E, et al. Increased T-helper interferon-gamma-secreting cells in obese children. Eur J Endocrinol 2006;154:691–7.
[110] Palacio A, Lopez M, Perez-Bravo F, Monkeberg F, Schlesinger L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. J Clin Endocrinol Metab 2002;87:3040–6.
[111] Strowig T, Brilot F, Münz C. Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. J Immunol 2008;180:7785–91.
[112] Critchley-Thorne RJ, Simons DL, Yan N, Miyahira AK, Dirbas FM, Johnson DL, et al. Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2009;106:9010–5.
[113] Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. Blood 2001;97:192–7.
[114] Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. Cytokine Growth Factor Rev 2002;13:95–109.
[115] De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. Proc Natl Acad Sci U S A 2011;108:728–32.
[116] Lautenbach A, Wrann CD, Jacobs R, Müller G, Brabant G, Nave H. Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals. Obes (Silver Spring) 2009;17:1848–55.

Résumé

La leptine est une hormone peptidique ayant une action au niveau de nombreux tissus. Une dérégulation de la sécrétion de cette hormone est observée au cours de l'obésité. L'obésité est fréquemment associée à des troubles de santé dont les principaux sont le diabète de type II, l'hypertension artérielle et les maladies cardiovasculaires. L'obésité est également un facteur de risque du cancer du sein, particulièrement en post-ménopause favorisant la récidive et augmentant la mortalité. Ces perturbations, associées à un état de stress oxydant défini par un excès de production des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par rapport aux systèmes de défense antioxydants, pourraient avoir un impact majeur dans le risque de carcinogenèse chez le sujet obèse. Il est clairement établi aujourd'hui que le statut oxydatif des cellules est directement corrélé aux capacités de prolifération mais aussi de survie des cellules dans leur environnement. A ce jour, très peu de données existent concernant le rôle de la leptine dans la modulation du statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires saines et tumorales.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse était d'étudier, dans un premier temps, les mécanismes d'action et les effets de la leptine sur le statut oxydatif et inflammatoire des cellules épithéliales mammaires saines et néoplasiques présentant des caractéristiques différentes en termes de récepteurs hormonaux et de capacité d'invasion, puis dans un deuxième temps, une étude expérimentale a été conduite afin de caractériser *in vivo* l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur la croissance tumorale et le statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs. Le projet avait également pour finalité de mettre en œuvre une nouvelle technique d'analyse basée sur la détection de fluorescence native induite par excitation laser à 224 nm afin d'évaluer la production de composés bio-actifs de la famille des éicosanoïdes, dont les isoprostanes, impliqués dans le processus inflammatoire.

Nous avons exploré *in vitro* l'impact de la leptine sur le statut oxydatif des cellules épithéliales mammaires. Cette étude nous a permis d'établir que la réponse au signal leptinique varie en fonction du statut néoplasique de la lignée considérée, en fonction du temps de contact et non de la dose testée.

Ensuite, nous avons étudié l'impact de l'obésité associée ou non à l'activité physique sur la croissance tumorale ainsi que le statut oxydatif et inflammatoire des tumeurs à l'aide d'un modèle de souris âgées C57BL/6 de tumeur mammaire syngénique, nourries avec un régime hyper-lipidique (HL) *vs* un régime contrôle. Les animaux ovariectomisés ont été placés, soit dans un environnement enrichi (EE) pour favoriser l'activité physique et les interactions sociales, soit dans un environnement standard.

Les résultats de cette étude montrent une augmentation significative du poids dans les groupes recevant le régime HL tout en ayant une prise alimentaire journalière identique. La composition corporelle à 8 semaines montre une prise de masse grasse significative sous régime HL, majorée par l'ovariectomie et partiellement limitée par l'activité physique. Après implantation des tumeurs, le régime HL favorise la croissance tumorale et la perte de l'activité locomotrice. Par contre, l'EE prévient la perte d'activité physique des animaux.

La méthode de dosage par fluorescence native des isoprostanes, s'avère ne pas être assez sensible. Par conséquent, la fluorescence native de ces composés est trop faible pour permettre leur détection dans les milieux biologiques utilisés. En revanche, la fluorescence native semble être un outil d'exploration cellulaire potentiel.

L'ensemble de ces travaux, montre que la leptine contribue à l'apparition d'un stress oxydant en lien avec le statut tumoral des cellules épithéliales mammaires. Ceci peut expliquer en partie l'augmentation du risque de cancer mammaire associée à l'obésité en post-ménopause. Ces résultats permettront d'objectiver le bénéfice d'une intervention nutritionnelle ciblée afin de moduler la réponse des cellules aux stimulations des adipokines. A terme, cette étude doit contribuer à mieux comprendre l'intégration des signaux issus de l'environnement cellulaire.

Mots clés : obésité, leptine, statut oxydatif, cellules épithéliales mammaires, cancérogenèse, tumeurs mammaires, activité physique, souris C57BL/6, fluorescence native.