

Université de Montréal

**L'impact de l'inhibition de la iNOS et de la kininase I
dans les effets délétères du récepteur B1 des kinines dans le
diabète de type 2**

Par
Haddad Youssef

Département de Physiologie moléculaire et intégrative
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en physiologie
moléculaire, cellulaire et intégrative

Avril 2014
©Haddad Youssef

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'impact de l'inhibition de la iNOS et de la kininase I
dans les effets délétères du récepteur B1 des kinines dans le diabète de type 2

Présenté par :
Haddad Youssef

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Louis Schwartz
Président-rapporteur

Réjean Couture
Directeur de recherche

Michèle Brochu
Membre de jury

Mémoire accepté le :

« Celui qui se perd dans sa passion a moins perdu que celui qui a perdu sa passion... »

St Augustin D'Hippone.

En mémoire de mon père et de mon frère jumeau Fadi...

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Dr Réjean Couture, mon directeur de recherche, pour sa disponibilité, sa patience, son encadrement et la confiance qu'il m'a témoignée au cours de mes études. Je tiens à souligner son professionnalisme, ses qualités et son engouement pour l'excellence qui sont un exemple et une référence pour moi.

J'aimerais remercier mes collègues du laboratoire, Sénécal Jacques, Dr El Akoum Souhad, Dr Bhat Menakshi, Hachana Soumaya, Tidjane Nejla pour leur contribution et leur soutien.

Un merci spécial à ma mère pour son amour et sa prière, à ma sœur Amale pour sa présence, son soutien et ses conseils.

À ma conjointe et épouse Aline pour sa présence et sa patience, à mes deux enfants Carl et Téo.

Finalement, je tiens à souligner le support financier qui m'a été octroyé de la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université de Montréal.

Résumé

Les kinines sont des peptides vasoactifs et des neuromédiateurs centraux impliqués dans un bon nombre de processus biologiques et inflammatoires. Elles agissent sur deux types de récepteurs (R) couplés aux protéines G, le RB2 constitutif et le RB1 qui est induit par le stress oxydatif et les cytokines pro-inflammatoires via le facteur de transcription nucléaire, le NF- κ B. Le RB1 est un puissant activateur de la iNOS et il augmente son expression chez le rat insulino-résistant. Dans ce modèle de rats soumis à une diète riche en D-glucose, un traitement d'une semaine avec un antagoniste non peptidique du RB1, le SSR240612, renverse la plupart des complications diabétiques. Ces travaux nous mènent à émettre l'hypothèse que la iNOS contribue aux effets délétères du RB1 chez le rat insulino-résistant. Nous avons donc évalué les effets d'un traitement prolongé d'une semaine soit avec le 1400W (1 mg/kg x 2 fois/jour), un inhibiteur sélectif de la iNOS, ou avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour), un inhibiteur non sélectif de la carboxypeptidase M (CPM) qui supprime la formation d'agonistes du RB1. Ces deux traitements devraient reproduire les effets bénéfiques de l'antagoniste du RB1 (SSR240612). En effet, le 1400W et le Mergetpa corrigent l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline (l'indice HOMA), l'allodynie au froid et l'expression de plusieurs marqueurs de l'inflammation (Cox-2, iNOS, RB1, IL-1 β , anion superoxyde). Ces résultats confirment la contribution de la iNOS dans les effets délétères du RB1 chez le rat insulino-résistant.

Dans un autre volet, ce mémoire vise à mieux comprendre l'impact de l'inhibition du RB1 par le SSR240612 (10 μ g/g/jour) combiné ou pas avec le Pioglitazone (1.6 mg/g/jour) (un anti-diabétique de la famille des thiazolidinediones, le TZD) dans un modèle de diabète de type 2 associé à l'obésité chez la souris C57BL/6J soumise à une diète riche

en gras pendant vingt semaines. Un traitement pendant deux semaines avec le TZD corrige l'intolérance au glucose et réduit les taux plasmatiques d'insuline alors que le SSR n'a pas d'effet. Les traitements combinés du TZD avec le SSR corrigent davantage la perte de la sensibilité à l'insuline et réduisent les taux plasmatiques de leptine.

Les résultats obtenus suggèrent que le SSR n'apporte pas l'effet bénéfique souhaité, dans ce modèle avancé de diabète de type 2, contrairement au modèle des rats insulino-résistants (pré-diabétiques).

Mots-clés : adiposité, allodynie, bradykinine, hyperglycémie, obésité, résistance à l'insuline.

Abstract

Kinins are vasoactive peptides and central neuromediators involved in several biological and inflammatory processes. They act on two types of receptors (R) coupled to G proteins, B2R constitutive and B1R which is induced by oxidative stress and pro-inflammatory cytokines via the transcriptional nuclear factor, NF- κ B. The B1R is a potent activator of iNOS and increases its expression in insulino-resistant rat. In this model of rats subjected to a diet rich in D-glucose, a treatment for one week with a non-peptide B1R antagonist, SSR240612, reverses most of diabetic complications in insulino-resistant rats. These studies lead us to hypothesize that iNOS contributes to the deleterious effects of B1R in insulino-resistant rats. We therefore have evaluated the effects of a one-week treatment with either 1400W (1 mg/kg x twice/day), a selective inhibitor of iNOS, or Mergetpa (1 mg/kg x twice/day), a nonselective inhibitor of carboxypeptidase M (CPM), which suppresses the formation of B1R agonists. These treatments should reproduce the deleterious effect of the B1R antagonist (SSR240612). Indeed, 1400W and Mergetpa normalize hyperglycemia, insulin resistance (HOMA index), cold allodynia and the expression of several markers of inflammation (COX-2, iNOS, B1R, IL-1 β , superoxide anion). These results support the contribution of iNOS in the deleterious effects of B1R in insulino-resistant rats.

Another aspect of this thesis aims to understand the impact of B1R inhibition by SSR240612 (10 μ g/g/day) combined or not with Pioglitazone (1.6 mg/g/day) (an anti-diabetic of the family thiazolidinediones, TZD) in a model of type 2 diabetes associated with obesity in C57BL/6J mice subjected to a high-fat diet for a period of twenty weeks. The treatment for two weeks with TZD normalizes glucose tolerance and plasma insulin

levels while SSR has no effect. The combined treatment with TZD and SSR further reduces the loss of insulin sensitivity and reduces plasma levels of leptin.

The results obtained suggest that SSR does not provide the expected beneficial effects, in this advanced type 2 diabetic model, in contrast to the insulino-resistant (pre-diabetic) rat model.

Keywords: adiposity, allodynia, bradykinin, hyperglycemia, obesity, insulin resistance.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT.....	vii
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
PREMIER CHAPITRE: INTRODUCTION.....	1
1.1 Le diabète.....	2
1.1.1 Le diabète de type 2 et de type 1.....	2
1.1.2 Le stress oxydatif et son lien avec le glucose.....	8
1.2 Rapport entre le diabète, l'obésité et le tissu adipeux.....	11
1.2.1 La leptine.....	11
1.2.2 L'adiponectine.....	12
1.2.3 La résistine.....	13
1.2.4 Les adipocytokines : TNF- α et IL-6.....	13
1.2.5 Les PPAR.....	14
1.3 La NOS et ses trois isoformes.....	16
1.3.1 La nNOS.....	16
1.3.2 La iNOS.....	16
1.3.3 La eNOS.....	17
1.4 Le système kallibréine-kinine.....	19
1.4.1 Les kinines et leur dégradation.....	19
1.4.1.1 Les aminopeptidases.....	21
1.4.1.2 Les kininases I.....	21
1.4.1.3 Les endopeptidases/ Nephilysin/ Enképhalinases.....	22
1.4.1.4 La kininase II.....	22
1.4.2 Les récepteurs des kinines.....	23
1.4.2.1 Le récepteur B2.....	24
1.4.2.2 Le récepteur B1.....	24
1.4.2.3 Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines.....	25

1.5 Contribution du RB1 à l'insulino-résistance.....	28
DEUXIÈME CHAPITRE : MISE EN CONTEXTE ET HYPOTHÈSES	30
2.1 Contexte de l'étude.....	31
2.2 Hypothèses et objectifs chez le rat insulino-résistant.....	31
2.3 Hypothèses et objectifs chez la souris.....	33
TROISIÈME CHAPITRE : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	35
3.1 Protocoles et méthodes des rats soumis à 10% de D-glucose.....	36
3.1.1 Mesure de l'allodynie tactile.....	37
3.1.2 Mesure de l'allodynie au froid.....	38
3.1.3 Mesure de la pression artérielle systolique.....	38
3.1.4 Mesure du poids corporel.....	39
3.1.5 Mesure de l'OGTT.....	39
3.1.6 Analyse du plasma.....	39
3.1.7 Mesure de la production basale de l'anion superoxyde.....	40
3.1.8 Immunobuvardage de type western.....	40
3.2 Protocoles des souris soumises à une diète riche en gras.....	42
3.2.1 Mesure de l'IPGTT et de l'IPIST.....	43
3.3 Analyse des données.....	44
QUATRIÈME CHAPITRE : RÉSULTATS.....	45
4.1 Résultats chez le rat.....	46
4.1.1 Effets du Mergetpa et du 1400W sur les paramètres de base.....	46
4.1.2 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'OGTT.....	49
4.1.3 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'allodynie.....	50
4.1.4 Effets du Mergetpa et du 1400W sur la pression artérielle systolique.....	52
4.1.5 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression du RB1 des kinines.....	52
4.1.6 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression du RB2 des kinines.....	54
4.1.7 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de la iNOS.....	56
4.1.8 Effets du Mergetpa et du 1400W sur le stress oxydatif.....	57
4.1.9 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de la CPM.....	58
4.1.10 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de l'IL-1 β et la COX-2.....	59

4.1.11 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de la nitrotyrosine.....	61
4.2 Résultats chez la souris.....	64
4.2.1 Effets du SSR et du TZD sur le poids corporel.....	64
4.2.2 Effets du SSR et du TZD sur l'IPGTT.....	66
4.2.3 Effets du SSR et du TZD sur l'IPIST.....	67
4.2.4 Effets du SSR et du TZD sur l'insuline.....	68
4.2.5 Effets du SSR et du TZD sur la leptine.....	69
 CINQUIÈME CHAPITRE : DISCUSSION.....	71
5.1 Discussion des résultats chez le rat.....	72
5.2 Discussion des résultats chez la souris.....	80
 SIXIÈME CHAPITRE : CONCLUSION & PERSPECTIVES.....	82
6 Conclusion.....	83
7 Perspectives.....	84
 LISTE DES RÉFÉRENCES.....	85

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1 : Régulation du GLUT4 par l'insuline.....	4
Figure 2 : Signalisation du récepteur à l'insuline.....	5
Figure 3 : Pathogenèse des complications vasculaires chez les diabétiques insulino-résistants.....	7
Figure 4 : Le stress oxydatif.....	8
Figure 5 : Présentation schématique de la formation des ERO induits par l'hyperglycémie.....	9
Figure 6 : Les radicaux libres dans le diabète.....	10
Figure 7 : Action de la leptine sur l'hypothalamus.....	12
Figure 8 : Les changements induits par l'obésité dans la sécrétion des adipokines et le développement de la résistance à l'insuline.....	14
Figure 9 : Les effets positifs et les effets négatifs de l'activation des PPAR γ	15
Figure 10 : Distribution des trois isoformes de la NOS.....	17
Figure 11 : Action enzymatique de la NOS.....	18
Figure 12 : Le système kallibréine-kinine.....	20
Figure 13 : Le système kallibréine-kinine.....	23
Figure 14 : Mécanisme de signalisation du RB2 couplé à une protéine G.....	26
Figure 15 : Activation de la iNOS et la eNOS par la signalisation du RB1 et RB2 couplés à une protéine G α_q et G α_i	28

Chapitre 4 : Les résultats

Résultats chez le rat

Figure 16 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur la glycémie.....	48
Figure 17 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'indice HOMA.....	48
Figure 18 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur la leptine.....	49
Figure 19 : Schéma illustrant les valeurs de l'OGTT.....	50
Figure 20 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'allodynie au froid.....	51
Figure 21 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'allodynie tactile.....	51
Figure 22 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur la pression artérielle systolique.....	52
Figure 23 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression du RB1 dans le rein.....	53
Figure 24 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression du RB1 dans l'aorte.....	54
Figure 25 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression du RB2 dans le rein.....	55
Figure 26 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression du RB2 dans le foie.....	55
Figure 27 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression de la iNOS dans le rein.....	56
Figure 28 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression de la iNOS dans l'aorte.....	57
Figure 29 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur la production basale de l'anion superoxyde dans l'aorte.....	58

Figure 30 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur la CPM dans le rein.....	59
Figure 31 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression de l'IL-1 β dans le rein.....	60
Figure 32 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression de la COX-2 dans le rein.....	60
Figure 33 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression de la nitrotyrosine dans l'aorte.....	62
Figure 34 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa et le 1400W sur l'expression de la nitrotyrosine dans le rein.....	63

Résultats chez la souris

Figure 35 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD et SSR sur le poids corporel.....	65
Figure 36 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD et SSR sur les valeurs de l'IPGTT.....	66-67
Figure 37 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD et SSR sur l'IPIST.....	68
Figure 38 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD et SSR sur l'insuline....	69
Figure 39 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD et SSR sur la leptine....	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés chez le rat.....	41
Tableau 2 : Poids corporel pour tous les groupes de rats au sacrifice.....	46

Liste des abréviations

AGE:	Produits terminaux de glycation
Akt :	Protéine kinase B (PKB), sérine/thréonine protéine kinase
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
ARNm:	Messenger de l'acide ribonucléique
BH4:	Tétrahydrobioptérine
BK:	Bradykinine
COX-2 :	Cyclooxygénase 2
CPM :	Carboxypeptidase membranaire
CPN :	Carboxypeptidase plasmaticque
DAG:	Diacylglycérol
ECA:	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
ELISA :	Dosage d'immunoabsorption par enzyme lié
eNOS:	Monoxyde d'azote synthase endothélial
ERK:	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERO:	Espèces réactives oxygénées
FAD:	Flavine adénine dinucléotide
FMN:	Flavine mononucléotide
FXII:	Facteur Hageman ou facteur XII
GLUT1 :	Protéine transporteuse 1 de glucose
GLUT4:	Protéine transporteuse 4 de glucose
GMPc:	Guanosine monophosphate cyclique
GPI:	Glycosyl phosphatidylinositol
GSHPX:	Glutathione peroxydase
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
ICAM:	Molécule d'adhésion intracellulaire
I-KB:	Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B
IL-1 β :	Interleukine-1 Beta
IL-6:	Interleukine-6
iNOS:	Monoxyde d'azote synthase inductible
IPGTT :	Test de tolérance au glucose par voie intra péritonéale
IPIST :	Test de sensibilité à l'insuline par voie intrapéritonéale
IP3:	Inositol-1,4,5-triphosphate
IRS:	Substrat du récepteur à l'insuline
KD:	Kallidine
MAPK:	Protéines kinases activées par les mitogènes
MEK:	<i>Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase</i>
NADPH:	<i>Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydase</i>
NF-KB:	Facteur de transcription nucléaire kappa B
nNOS:	Monoxyde d'azote synthase neuronal
NO:	Monoxyde d'azote
NPY:	Neuropeptide Y
NTS:	Noyau du tractus solitaire
O ₂ ⁻ :	Anion superoxyde
OGTT :	Test de tolérance au glucose par voie orale
OH ⁻ :	Hydroxyle

ONOO ⁻ :	Peroxynitrite
PI3K:	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2:	Phosphoinositide-4,5-biphosphate
PKC:	Protéine kinase C
PLA2:	Phospholipase A2
PLC:	Phospholipase C
PLCβ:	Phospholipase C β
POMC:	Pro-opiomélanocortine
PPAR:	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes
PTB1:	Protéine tyrosine phosphatase 1B
Raf:	Protéine kinase à sérine / thréonine proto-oncogène
RAGE:	Récepteur des AGE
Ras:	Petite GTPase
RB1:	Récepteur B1 des kinines
RB2:	Récepteur B2 des kinines
RIA :	Dosage radio immunologique
SNC :	Système nerveux central
SNP:	Système nerveux périphérique
SOD:	Superoxyde dismutase
SSR:	SSR240612
TNF-α:	Facteur de nécrose tumorale alpha
TZD:	Thiazolidinediones
VCAM:	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires

Premier Chapitre

Introduction

1- Introduction

1.1 Le diabète

1.1.1 Le diabète de type 2 et de type 1

Environ 347 millions de diabétiques dans le monde ont été recensés en 2011 selon l'organisation mondiale de la santé et ce nombre atteindra 450 millions d'ici 2030. Selon Diabète Québec et l'Association canadienne du diabète dans leur rapport publié en 2011, 2,7 millions de Canadiens et Canadiennes (7,6 %) ont été diagnostiqués diabétiques en 2010, et ce chiffre augmentera de 1,5 million dans les dix prochaines années pour atteindre 4,2 millions de personnes (10,8 %) d'ici 2020. La prévalence estimée du diabète au Québec en 2010 était de 7.2% et ce nombre augmentera à 9.9% d'ici 2020 (www.diabete.qc.ca/html/activite/rapport_2011.html).

Selon l'Association canadienne du diabète, cinq diabétiques sur six meurent d'une maladie cardiaque, 60% souffrent d'hypertension et d'un taux élevé de cholestérol augmentant le risque d'une atteinte cardiaque et d'un accident vasculo-cérébral. Selon la Fédération internationale du diabète, 4 millions de personnes sont mortes des suites du diabète en 2010, soit 6,8 % de la mortalité mondiale.

On distingue deux sortes de diabète sucré (*diabète mellitus*) :

- Diabète de type I (DT1) ou insulino-dépendant (insulinopénie ou pas d'insuline provoquée par une atteinte des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas), représentant 5 % des cas recensés.

- Diabète de type 2 (DT2) ou insulino-résistant, quand l'organisme se trouve incapable ou n'arrive plus à utiliser l'insuline, représentant 90-95% des cas recensés.

Selon le même rapport, Diabète Québec et l'Association canadienne du diabète tracent un tableau alarmant du diabète et de ses conséquences socio-économiques et sanitaires. Le diabète est responsable de 25 % des opérations chirurgicales du cœur, de 34 % des insuffisances rénales et de 50 % des amputations d'origine non traumatique. Il est la première cause d'hémodialyse rénale (néphropathie) et la première cause de la cécité chez les adultes de moins de 65 ans (rétinopathie). Les personnes diabétiques occupent jusqu'à 20 % des lits d'hôpitaux aux soins actifs. Plus de 70 % d'entre elles mourront d'une maladie cardiovasculaire.

Pour qu'une personne soit diagnostiquée diabétique, sa glycémie à jeun doit être à 7 mmol/L et plus, 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose la valeur doit être à 11 mmol/L et plus et à tout moment de la journée à 11 mmol/L et plus, avec les symptômes classiques (polyurie : urine abondante ; polydipsie : soif excessive ; une perte de poids inexplicée).

Une personne non-diabétique doit avoir une glycémie à jeun de moins de 5,6 mmol/L, 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose la valeur de la glycémie doit être moins de 7,8 mmol/L et à tout moment de la journée elle doit être moins de 6.1 mmol/L.

Les causes du diabète de type 2 sont complexes et aucun facteur de risque ne peut à lui seul expliquer son évolution. Notons cependant qu'il est associé à l'hérédité, au vieillissement, à l'obésité et à l'inactivité physique.

Dans le diabète de type 2, la concentration élevée de glucose dans le sang oblige les cellules β des îlots de Langerhans à sécréter plus d'insuline que la normale. Une hyperinsulinémie s'installe accompagnée d'une résistance à l'insuline.

Tel qu'illustré en Fig. 1, l'insuline par action sur ses récepteurs permet aux vésicules contenant les GLUT4 (transporteurs de glucose 4) dans le cytosol à migrer vers la surface membranaire des cellules présentes dans les muscles squelettiques, les muscles lisses, le cœur, le tissu adipeux et cela permet l'entrée de glucose dans la cellule (Bai et al., 2007; Sakamoto et al., 2008; Thong et al., 2005).

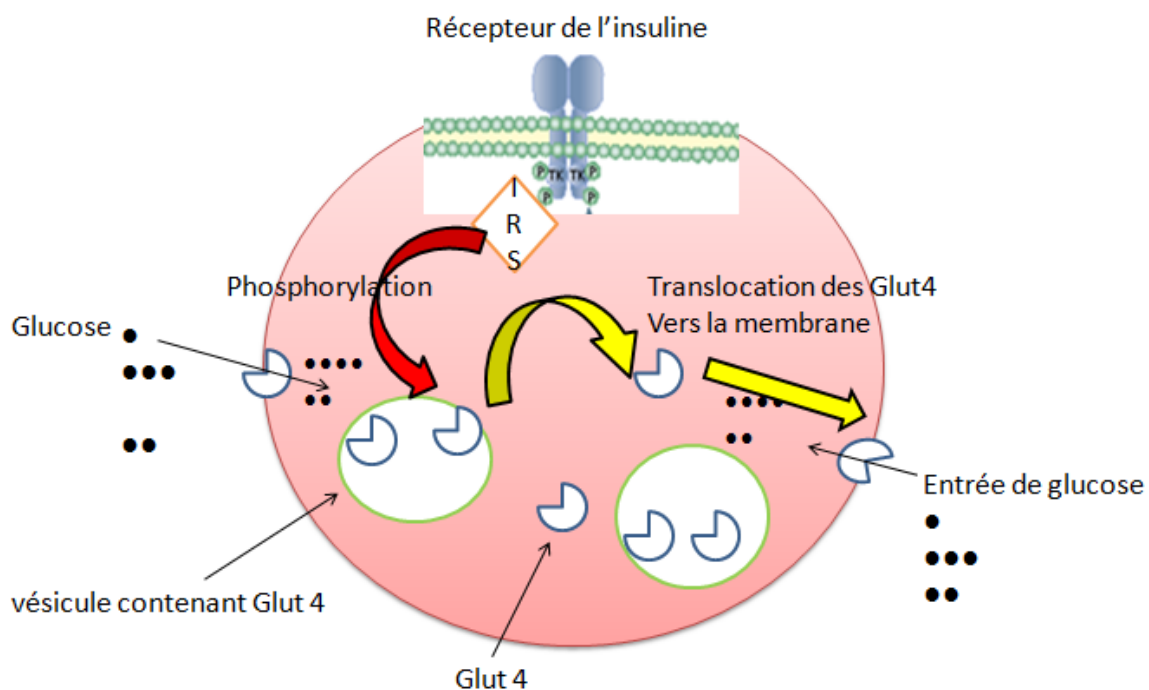


Fig. 1 : La régulation du GLUT4 par l'insuline. Adapté de Thong et al. (2005)

Tel qu'illustré en Fig. 2, le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine membranaire, formée de deux sous-unités α extracellulaires, et de deux sous-unités β intracellulaires à activité tyrosine kinase. L'insuline se lie aux sous-unités α et cause un changement de

conformation du récepteur qui subit une autophosphorylation en activant son récepteur endogène, à tyrosine kinase, l'IRS-1 (insulin receptor substrate) qui, à son tour, phosphoryle d'autres protéines cibles en activant les voies Ras, Raf, ERK, MAPK, et la voie du PI3K (phosphatidylinositol-3 kinase), Akt, PKC.

La stimulation de ces voies active le métabolisme du glucose par le déplacement des GLUT4 vers la membrane cellulaire, la synthèse des protéines et la différenciation des cellules musculaires (Nieto-Vazquez et al., 2008) (Fig. 2).

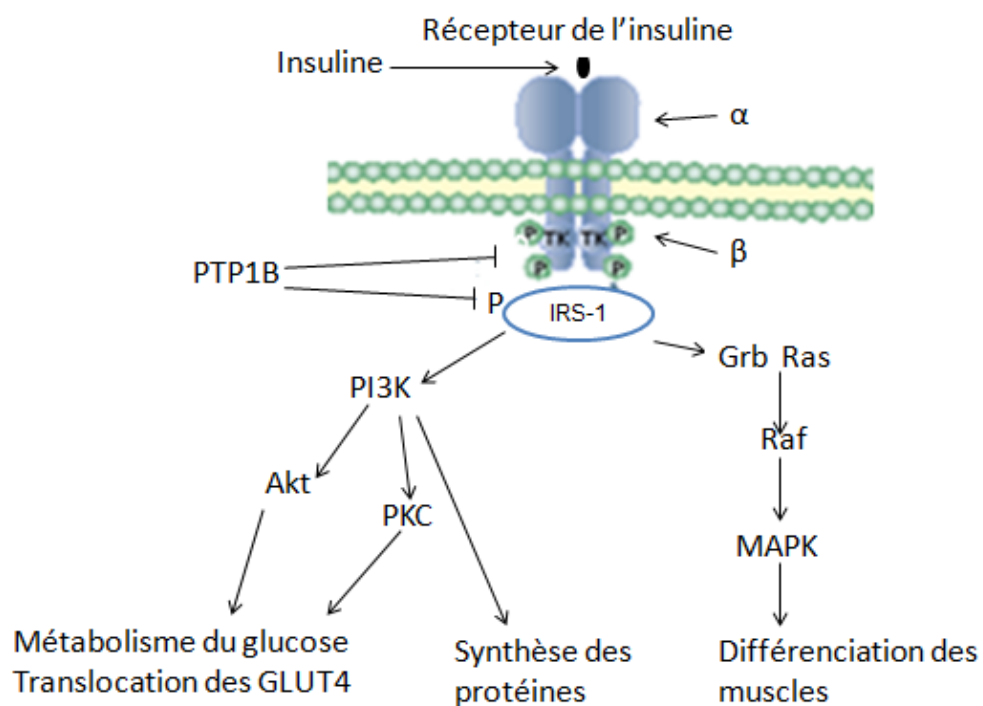


Fig.2 : Signalisation du récepteur à l'insuline. Adapté de Nieto-Vasquez et al. (2008)

En état physiologique, les taux de glucose et de l'insuline sont directement reliés ce qui veut dire que quand le glucose augmente dans le sang, le pancréas libère l'insuline pour y faire face et le ramener à la normale. Mais si le taux de glucose reste élevé dans le

sang suite à un régime alimentaire riche en gras ou en hydrates de carbone, une hyperglycémie s'installe suivie d'une hyper-insulinémie.

Cette hyper-insulinémie inonde les récepteurs, diminuant leur sensibilité, empêchant la relocalisation des GLUT4 vers la surface membranaire, maintenant le taux de glucose élevé et amenant à la résistance à l'insuline et au diabète de type 2 (Duez et al., 2008) .

Cet excès de glucose entre dans la cellule grâce au transporteur GLUT1, présent dans les vaisseaux (Barathi et al., 2010; Camenzind et al., 2010) et dans d'autres tissus (le foie, le rein, la rétine, le système nerveux, etc.), et devient toxique puisque le GLUT1 n'est pas régulé par les taux de glucose. L'entrée exagérée de glucose augmente le stress oxydatif dans la cellule et provoque un état inflammatoire dans les vaisseaux et les nerfs, diminuant la production du NO et sa biodisponibilité et, par conséquent, diminue son action vasodilatatrice et la fonction endothéliale (He et al., 2004).

Dans les conditions d'hyperglycémie, l'accumulation de métabolites dans la voie de la glycolyse, comme le glycéraldéhyde 3-phosphate, conduit à la synthèse du diacylglycérol (DAG) qui, à son tour, recrute la protéine kinase C (PKC) et la rend compétente (Fig. 3). Une fois activée, la PKC augmente le stress oxydatif, déplace le NF- κ B vers le noyau déclenchant la transcription de plusieurs gènes incluant le récepteur B1 des kinines (RB1) et les cytokines pro-inflammatoires (Fig. 3). Le TNF- α à son tour active la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) qui inhibe le récepteur IRS-1 par la déphosphorylation au niveau de la tyrosine (Fig. 2). Ceci empêche le déplacement des GLUT4 et aboutit à la résistance à l'insuline (He et al., 2004; Nieto-Vazquez et al., 2008).

Dans le diabète de type 2, la libération des cytokines pro-inflammatoires augmente l'expression des molécules d'adhésion intracellulaire (ICAM-1), les molécules d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1) et l'infiltration des macrophages et le dysfonctionnement des cellules endothéliales. Ceci amplifie la réaction inflammatoire et augmente la perméabilité vasculaire aboutissant aux complications vasculaires chez les diabétiques (Dias et al., 2012 b).

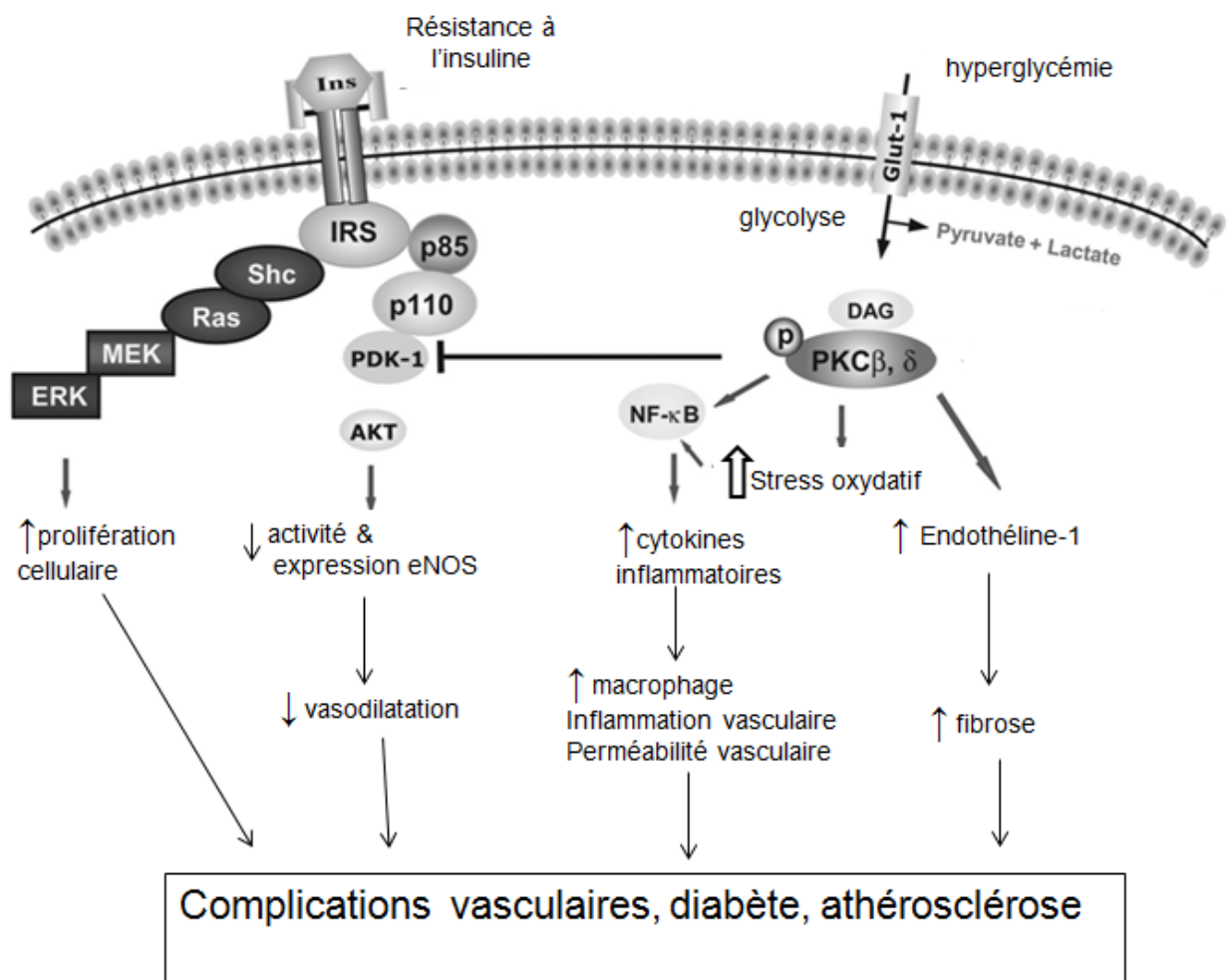


Fig. 3 : Pathogenèse des complications vasculaires chez les diabétiques insulino-résistants. Adapté de He et al. (2004)

1.1.2 Le stress oxydatif et son lien avec le glucose

Le métabolisme et les fonctions physiologiques de l'organisme génèrent des radicaux libres qui sont compensés par des antioxydants dans l'état physiologique normal. Mais cet équilibre est rompu en faveur des radicaux libres lorsque le niveau des antioxydants baisse ou lorsque le métabolisme enzymatique est dérégulé, générant une plus grande formation de radicaux libres à base d'oxygène (ERO : espèces réactives oxygénées) ou d'azote.

La pollution, le tabagisme, l'alcool, le vieillissement, une nourriture pauvre en vitamines C et E, en polyphénols (antioxydants) ou encore une baisse dans la défense enzymatique (glutathion peroxydase, catalase, superoxyde dismutase), peuvent faire pencher la balance (radicaux libres vs antioxydants) du côté des radicaux libres, augmentant le stress oxydant et ses effets nocifs sur le métabolisme (Fig. 4).

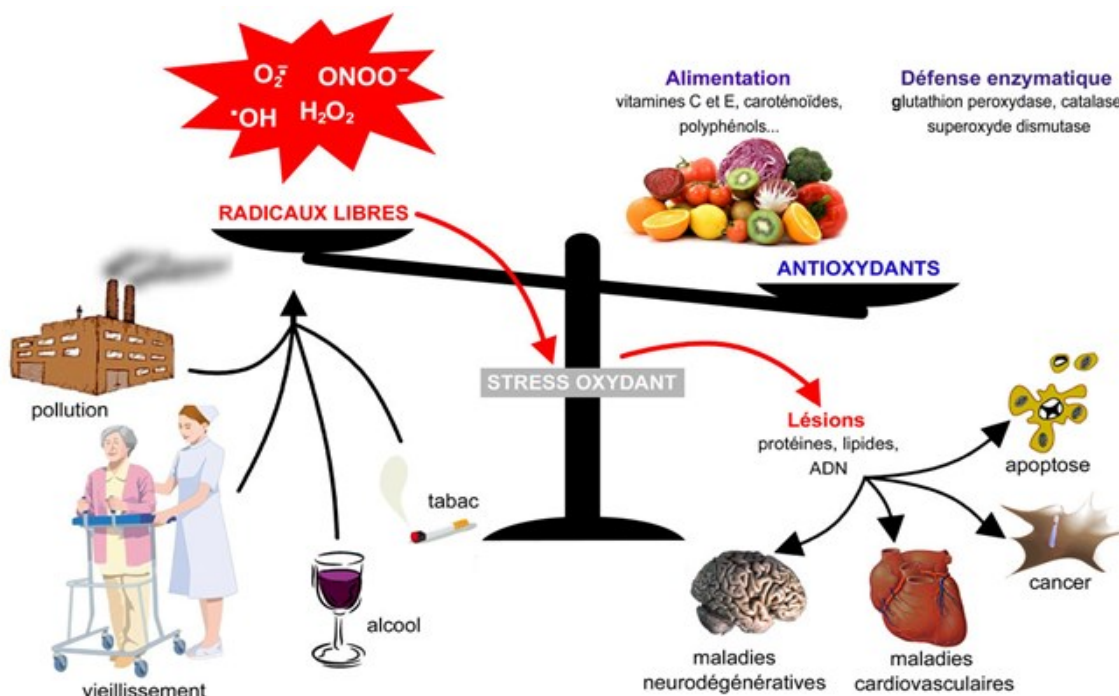


Fig. 4: Le stress oxydatif. http://www.nature-algues.com/images/balance_antioxydante2.jpg

Parmi ces ERO, on note : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le peroxynitrite (espèce nitrosylée, $ONOO^-$), l'hydroxyle (OH^{\cdot}), le monoxyde d'azote (NO), lesquelles sont caractérisées par la présence d'un e^- libre disponible à l'échange ce qui les rend très réactives.

Dans le diabète, le stress oxydatif peut être induit par une voie non enzymatique ou enzymatique. L'origine non enzymatique se produit dans la chaîne respiratoire des mitochondries par les cytochromes P450, par l'auto-oxydation du glucose générant des radicaux OH^{\cdot} , des produits terminaux de glycation (Cellier et al.) (Cellier et al.) et dans le métabolisme du glucose via la voie du polyol (glucose + aldose réductase → sorbitol) ; l'aldose réductase contribue au stress par la production d' $O_2^{\cdot-}$ en grande quantité (Fig. 5). La voie du polyol conduit à l'activation de la PKC. De plus, la formation des AGE conduit à l'activation d'un récepteur membranaire spécifique nommé RAGE (Fig. 5).

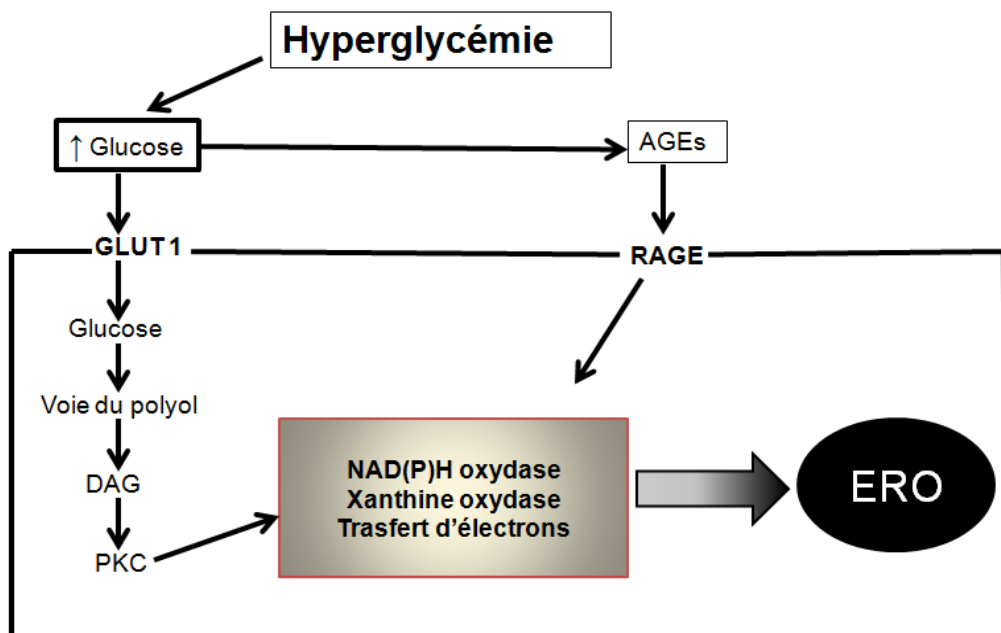


Fig. 5 : Présentation schématique de la formation des ERO induits par l'hyperglycémie. Adapté de Couture et al. (2004)

L'origine enzymatique réfère à la production des radicaux par la NAD(P)H oxydase, la xanthine oxydase, la cyclooxygénase et la eNOS découplée (Figs. 6 et 11).

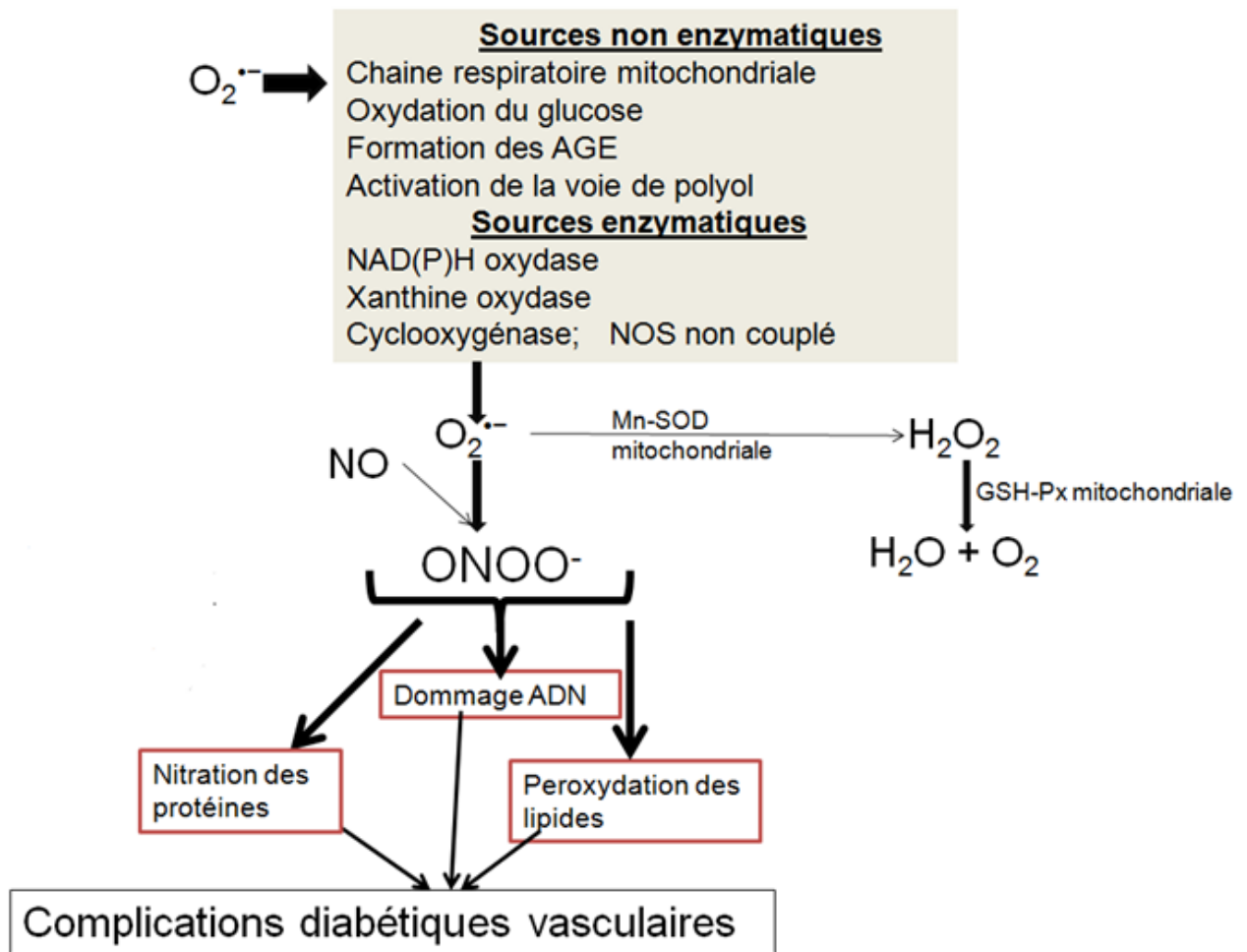


Fig. 6 : Les radicaux libres dans le diabète. Adapté de Johansen et al. (2005)

Le NO, dans un milieu oxydatif, entre en réaction avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxyntirite $ONOO^-$, très délétère par ses effets, incluant : la peroxydation des lipides (membranes), la nitration des protéines (enzymes, transporteurs, canaux ioniques) et l'action dommageable sur l'ADN (modifiant l'expression des gènes) (Johansen et al., 2005) (Fig. 6).

Dans le diabète, la concentration des enzymes antioxydants (glutathion peroxydase, catalase, superoxyde dismutase) diminue, laissant la place aux ERO aboutissant aux problèmes cardiopathiques et néphropathiques (Polidori et al., 2004).

1.2 Rapport entre le diabète, l'obésité et le tissu adipeux

Le tissu adipeux est caractérisé par un double rôle : 1- rôle de réserve, d'emmagasinement de l'énergie sous forme de triglycérides afin de répondre au besoin de l'organisme ou en réponse à une manque de nourriture (Galic et al., 2010); 2- rôle de glande endocrine dans la production d'hormones produites par les adipocytes comme la leptine, la résistine et l'adiponectine.

1.2.1 La leptine

La leptine (en grec leptos = mince) est un peptide produit par les adipocytes qui joue un rôle dans la régulation de l'appétit et de la prise pondérale via un mécanisme neuroendocrinien dans l'hypothalamus (l'axe hypothalamo-hypophysaire, GnRH/LH). En périphérie, la leptine agit sur les cellules β du pancréas (la leptine aurait un rôle de modulateur négatif de la production d'insuline), les cellules immunitaires, les muscles et les os (Badman et al., 2007; Magnan et al., 2005; Mantzoros et al., 2011; Wheatcroft et al., 2003).

La leptine, par son action sur le noyau arqué de l'hypothalamus, stimule une voie catabolique en augmentant les neuropeptides anorexigènes POMC (Pro-

opiomélanocortine) et en diminuant les neuropeptides orexigènes : NPY-neuropeptide Y et AgRP- agouti related peptides. Ces voies neuropeptidergiques projettent vers d'autres aires hypothalamiques pour atteindre le noyau du tractus solitaire (NTS) puis le nerf vague pour augmenter, entre autres, la thermogénèse et diminuer l'appétit (Badman et al., 2007) (Fig. 7).

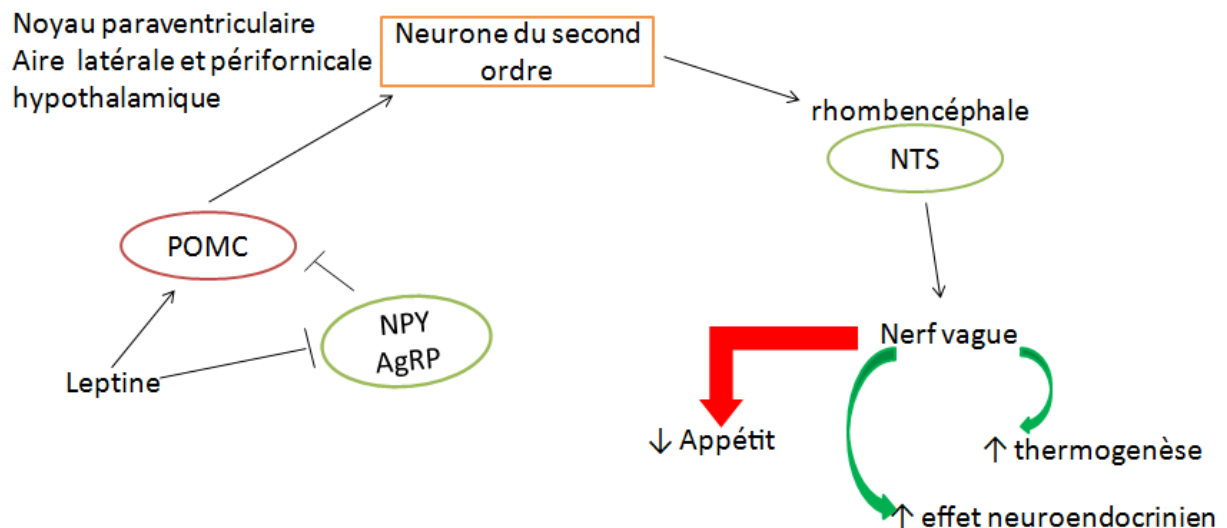


Fig.7 : Action de la leptine dans l'hypothalamus. Adapté de Badman et al. (2007)

La sécrétion de la leptine est directement reliée à l'obésité et sa teneur plasmatique chez les personnes obèses est remarquablement élevée, ce qui amène à une résistance à la leptine chez des sujets présentant une résistance à l'insuline et un DT2 (Jitprasertwong et al., 2013; Mantzoros et al., 2011).

1.2.2 L'adiponectine

L'adiponectine joue un rôle dans l'homéostasie du glucose. Elle est sécrétée par les adipocytes et sa teneur plasmatique est inversement reliée au niveau de l'obésité et de DT2 (Galic et al., 2010). Un traitement avec des antidiabétiques, TZD-thiazolidinediones

(ciglitazone, pioglitazone, rosiglitazone), sensibilisateurs d'insuline agissant comme agonistes du PPAR γ , augmente la quantité d'adiponectine et améliore ainsi la sensibilité à l'insuline, l'oxydation des acides gras et la prise de glucose par les muscles squelettiques en favorisant le déplacement des GLUT4 vers la surface membranaire. La stimulation du récepteur de l'adiponectine joue un rôle dans la régulation de l'expression du gène du PPAR γ (Galic et al., 2010).

1.2.3 La résistine

La résistine est produite par les adipocytes et est directement reliée au niveau d'obésité chez les rongeurs. Elle se trouve aussi dans les macrophages humains. Sa quantité diminue suite à l'activation du PPAR γ . Chez l'homme, sa quantité augmente avec l'obésité, induisant la résistance à l'insuline et l'intolérance au glucose (Park et al., 2011).

1.2.4 Les adipocytokines : TNF- α et IL-6

Les adipocytes sont la principale source de l'augmentation du TNF- α dans l'obésité due aussi à l'infiltration du tissu adipeux par les macrophages (Weisberg et al., 2003). Le TNF- α est fortement impliqué dans le tissu adipeux associé à l'obésité et à la résistance à l'insuline ce qui suggère que le TNF- α représente un lien entre l'obésité, l'inflammation et le diabète (Galic et al., 2010).

L'expansion du tissu adipeux dans l'obésité conduit à une augmentation de l'infiltration des macrophages avec une production accrue des cytokines telles que TNF- α et IL-6,

des marqueurs de l'inflammation, qui contribuent à la résistance systémique à l'insuline et au DT2 (Badman et al., 2007; Dias et al., 2012 a; Galic et al., 2010) (Fig. 8).

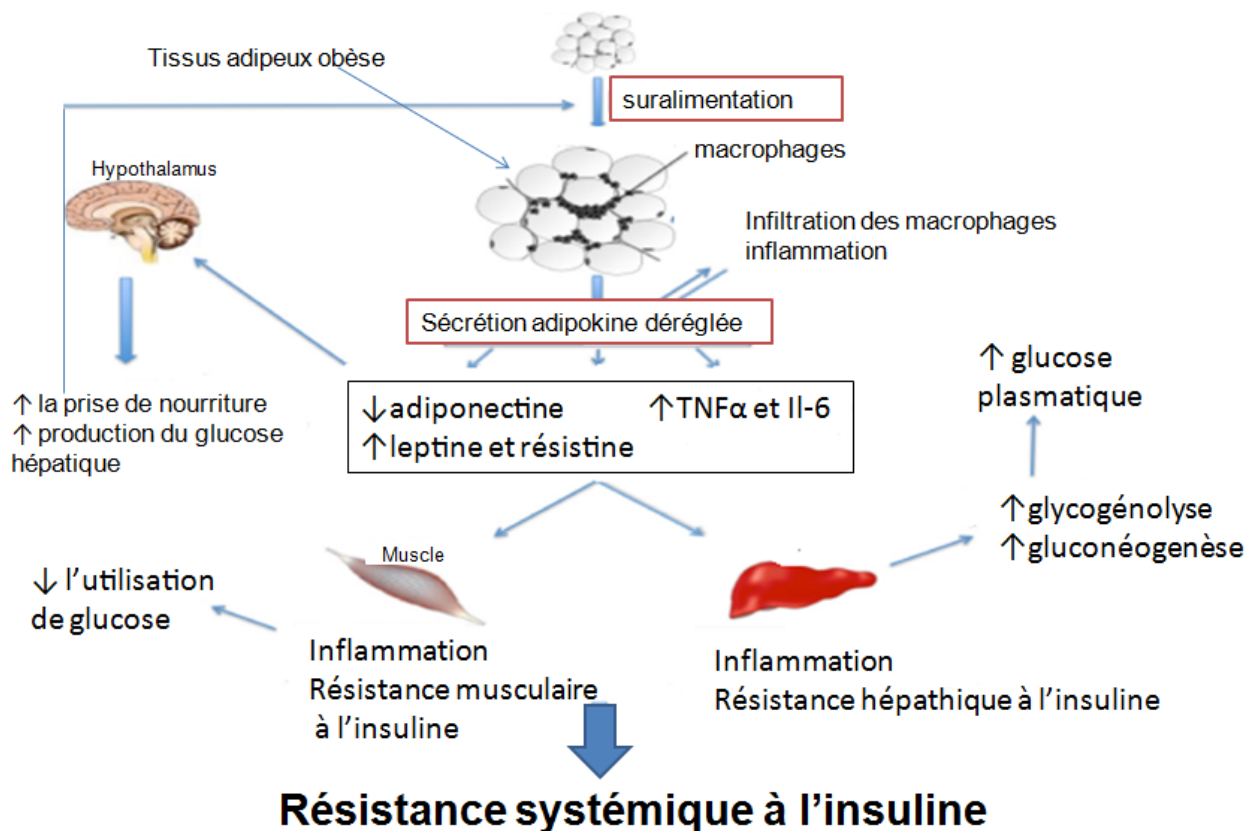


Fig. 8 : Les changements induits par l'obésité dans la sécrétion des adipokines et le développement de la résistance à l'insuline. Schéma adapté de Galic et al. (2010)

1.2.5 Les PPAR

Les PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) font partie de la famille des récepteurs nucléaires transcriptionnels activés par les inducteurs de la prolifération des peroxysomes. Il en existe 3 types : Le PPAR α est impliqué dans le métabolisme lipidique et glucidique et dans la prolifération des peroxysomes dans les hépatocytes. Le PPAR β est exprimé de façon ubiquitaire et joue un rôle crucial dans l'oxydation des acides gras

dans les tissus cibles tels que le muscle squelettique, le foie et le cœur. Le PPAR γ , récepteur nucléaire médiateur de l'activité du TZD (glitazone médicaments antidiabétiques), exprimé dans le tissu adipeux blanc (Fig. 9).

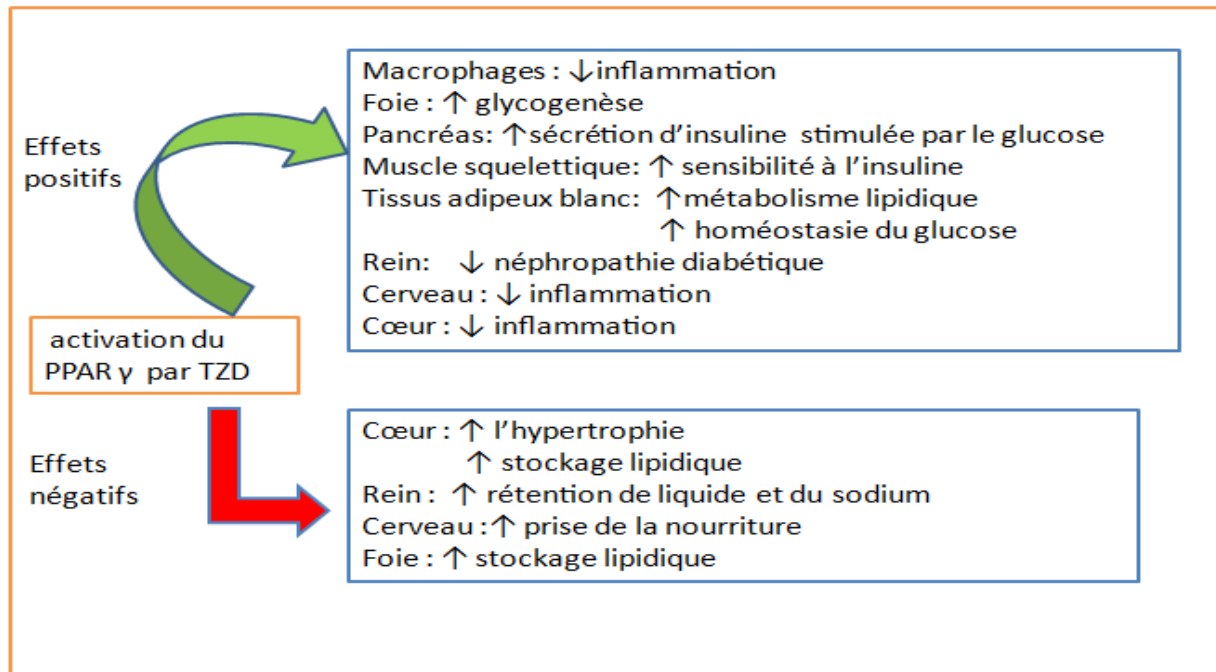


Fig. 9: Les effets positifs et les effets négatifs de l'activation du PPAR γ . Adapté de Ahmadian et al. (2013)

Les PPAR γ sont impliqués dans l'adipogénèse, jouant un rôle thérapeutique dans le diabète et dans l'homéostasie du glucose en augmentant l'expression des GLUT4 à la surface membranaire et en améliorant la sensibilité à l'insuline (Ahmadian et al., 2013) (Fig. 9).

De plus, les ligands du PPAR γ dont TZD contrôlent l'expression de nombreux facteurs sécrétés à partir du tissu adipeux, tels que l'adiponectine, la résistine, la leptine et le TNF- α , lesquels influencent également la sensibilité à l'insuline, en diminuant la gluconéogenèse au niveau du foie et en augmentant l'utilisation du glucose dans les

muscles squelettiques. Cependant, les avantages uniques des TZD sont amoindris par le risque de rétention d'eau, le gain de poids, la perte osseuse et l'insuffisance cardiaque congestive (Ahmadian et al., 2013; Cariou et al., 2012).

1.3 La NOS et ses trois isoformes

Le NO est une molécule de signalisation omniprésente dans la plupart des organes et tissus. Ce gaz active la guanylate cyclase soluble pour déclencher la réponse physiologique via le GMPc, lequel agit comme neuromédiateur et vasodilatateur. Le NO est généré par trois isoformes d'une enzyme selon la localisation cellulaire.

1.3.1 La nNOS : monoxyde d'azote synthase neuronal ou NOS I. La NOS neuronale est exprimée dans les neurones spécifiques du système nerveux central. Dans le système nerveux périphérique, le NO dérivé de la NOS neuronale agit comme un neurotransmetteur atypique, qui assure la détente péristaltique intestinale, la vasodilatation et l'érection du pénis.

1.3.2 La iNOS : monoxyde d'azote synthase inductible ou NOS II. L'expression de la NOS inductible peut être augmentée par des cytokines pro-inflammatoires et d'autres agents dans la plupart des types cellulaires. La iNOS est également régulée à la hausse dans les maladies inflammatoires et le NO produit par cette action enzymatique agit comme médiateur dans divers symptômes de l'inflammation.

1.3.3 La eNOS : monoxyde d'azote synthase endothélial ou NOS III. Le NO dérivé de la eNOS est un vasodilatateur physiologique. Le NO libéré vers la lumière vasculaire est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de leur adhésion à la paroi vasculaire (Fig. 10).

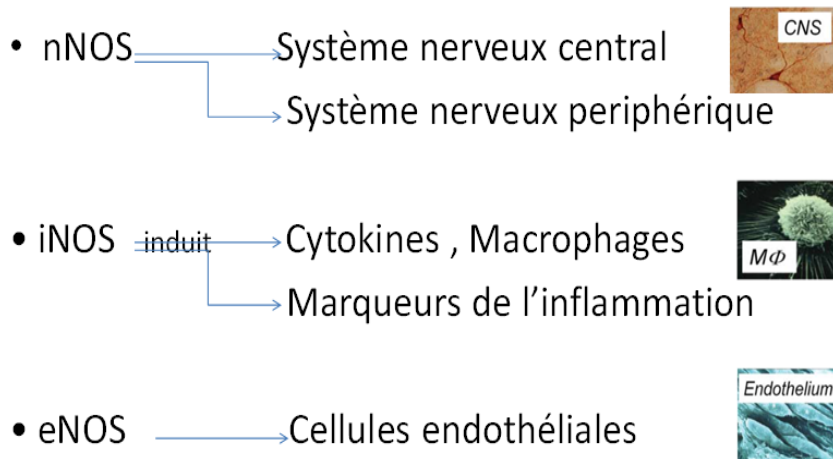


Fig. 10: Distribution des trois isoformes de la NOS. Adapté de Förstermann et al. (2012)

Chez ces trois isoformes, la NOS utilise la L-Arginine comme substrat, l'O₂, la NAD(P) H (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate), la FMN (flavine mononucléotide), la FAD (flavine adénine dinucléotide), la BH₄ (tétrahydrobioptérine), comme cofacteur pour donner du NO + L-citrulline (Fig. 11).

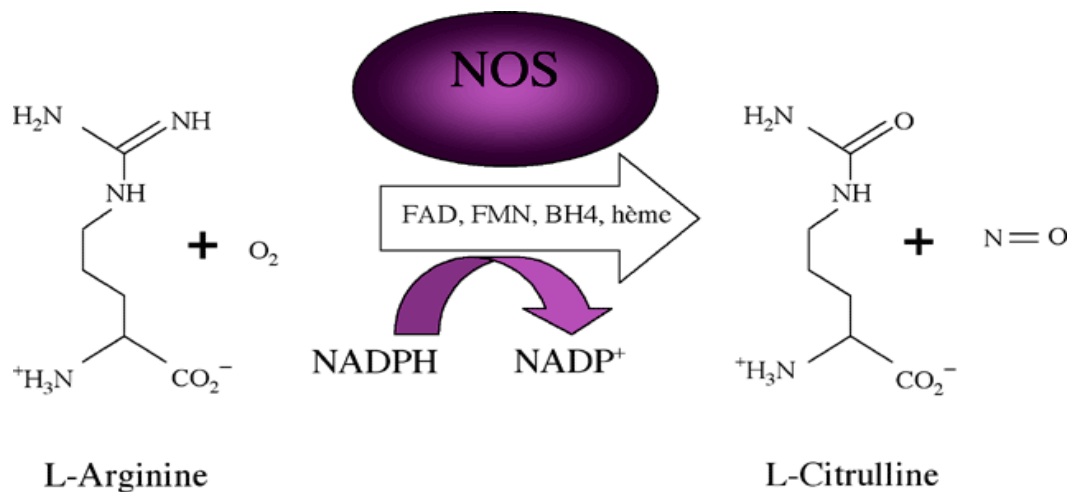


Fig. 11 : Action enzymatique de la NOS. www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/lmg/fig11.gif.

La NOS est formée de deux domaines : N-terminal (domaine oxygénase) site de liaison de BH₄ et de l'hème, et C-terminal (domaine réductase) site de liaison de L-arginine, FMN, FAD, NADPH (Alderton et al., 2001).

Toutes les NOS sont des monomères. En présence de l'hème, NOS forme un dimère fonctionnel et transfère les électrons à partir de NADPH, via le FAD et le FMN du premier monomère à l'hème se trouvant dans le monomère opposé. Au niveau du site de l'hème, et en présence du BH₄, les électrons sont utilisés pour réduire et activer l'O₂ et pour oxyder la L-arginine en L-citrulline + NO (Förstermann et al., 2012). Lors du découplage, la eNOS se trouve alors incapable de lier le tétrahydrobioptérine (BH₄) et la L-arginine pour catalyser la production de la L-citrulline + NO (Johansen et al., 2005).

1.4 Le système kallibréine-kinine

Le système kallibréine-kinine a été découvert vers les années 1900-1909 quand Abelous & Bardier remarquèrent une chute de la tension artérielle chez le lapin à la suite d'une injection d'urine humaine (Abelous, 1909). Vers 1928, Frey et al. identifièrent cette substance hypotensive dans le pancréas en la surnommant kallibréine (kallikréas qui signifie pancréas en grec) (Kraut, 1930).

1.4.1 Les kinines et leur dégradation

Le système kallibréine-kinine est une voie d'activation métabolique endogène, impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathophysiologiques. Il comprend la synthèse de peptides vasoactifs (les kinines) produits par l'action des kallibréines (enzymes) sur les kininogènes (précurseurs) (Kashuba et al., 2013; Moreau et al., 2005).

Les kallibréines sont des sérines protéases retrouvées dans la plupart des tissus et des liquides biologiques (Bhoola et al., 1992; Moreau et al., 2005) , sous forme de pro-kallibréines (dans les tissus) et pré-kallibréines inactives (dans le plasma activées en contact avec le facteur de coagulation FXIIa nommé facteur de Hageman) (Bhoola et al., 1992). Elles agissent sur les précurseurs des kinines « les kininogènes» (Regoli et al., 1980).

Les kininogènes hépatiques se retrouvent chez l'humain sous deux formes : les kininogènes à haut poids moléculaire (KHPM) de 120 Kda, sont des α -globulines dont la concentration dans le plasma humain (80 $\mu\text{g/ml}$) peut augmenter avec l'âge (Perez et al., 2005), et les kininogènes à faible poids moléculaire (KFPM) de 68-75 Kda dont la

concentration dans les tissus est de 60 µg/ml (Sainz et al., 2007). À celles-ci s'ajoutent les T-kininogènes se trouvant seulement chez les rongeurs (Okamoto, 1983).

Les kallibréines tissulaires clivent les KFPM pour former la kallidine (KD ou Lysyl-BK), un décapeptide: Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg. Les kallibréines plasmatiques (après être activées par le facteur FXIIa) clivent les KHPM pour former la bradykinine (BK), un nonapeptide: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) (Regoli et al., 1980). Ces kinines agissent sur des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G, déclenchant une cascade de signalisation cellulaire aboutissant aux réponses physiologiques (Couture. R et al., 2004; Pathak et al., 2013) (Fig. 12).

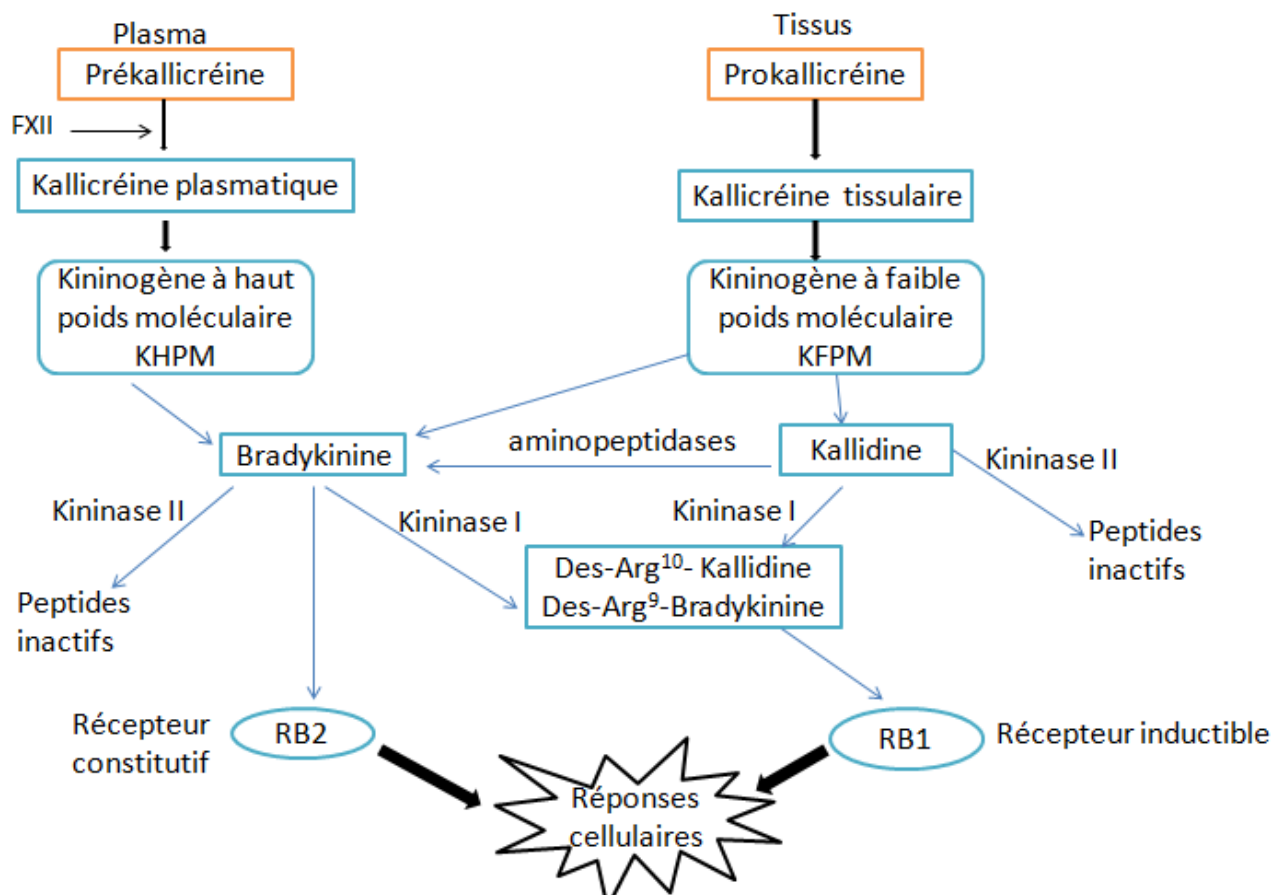


Fig. 12 : Le système kallibréine-kinine (KKS). Schéma adapté de Pathak et al. (2013)

Les kinines sont des peptides vasoactifs et des neuromédiateurs du système nerveux central impliqués dans un bon nombre des processus biologiques et inflammatoires (hyperthermie, douleur, œdème) (Couture et al., 2001; Talbot et al., 2012).

Les kinines subissent une dégradation rapide par les aminopeptidases M et P, les endopeptidases, les carboxypeptidases M ou N (kininase I) et la kininase II (aussi appelée enzyme de conversion de l'angiotensine I) (Regoli et al., 1980).

1.4.1.1 Les aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des enzymes qui clivent les kinines en position N-terminale. L'aminopeptidase M clive la lysine en position N-terminale sur la KD et la des-Arg¹⁰-KD pour former la BK et la des-Arg⁹-BK (Marceau et al., 1998). L'aminopeptidase P clive l'arginine en position N-terminale de la T-Kinine et de la des-Arg¹¹-T-kinine pour donner la BK ou la des-Arg⁹-BK (Chen et al., 1991).

1.4.1.2 Les kininases I

Les kininases I sont des métallopeptidases qui nécessitent du Zinc au niveau de leur site catalytique pour hydrolyser leurs substrats. Les CPM (carboxypeptidases membranaires) et les CPN (plasmatiques) sont des glycoprotéines tétramériques solubles (Couture. R et al., 2004; Moreau et al., 2005). Ces enzymes agissent en clivant l'arginine du COOH-terminal des kinines pour former la des-Arg⁹-BK (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe) et la des-Arg¹⁰-KD (Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe) (Kuhr et al., 2010) qui constituent les agonistes du récepteur B1 des kinines (Leeb-Lundberg et al., 2005) (Figs. 12 et 13).

1.4.1.3 Les endopeptidases / Neprilysin / enképhalinases

Ces enzymes sont des métallopeptidases Zinc-dépendant, impliquées dans le métabolisme de plusieurs peptides. Elles sont présentes dans plusieurs types cellulaires chez l'homme. Leurs substrats sont Angiotensin I, Angiotensin II, BK et Endothéline et elles clivent deux acides aminés en position C-terminale, aboutissant à des métabolites inactifs (Couture. R et al., 2004).

1.4.1.4 La kininase II

Cette enzyme agit sur la BK, KD, des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-KD en clivant deux acides aminés (Phe et Arg) en C-terminale conduisant à la formation des métabolites inactifs (Tang et al., 2011) (Fig. 13).

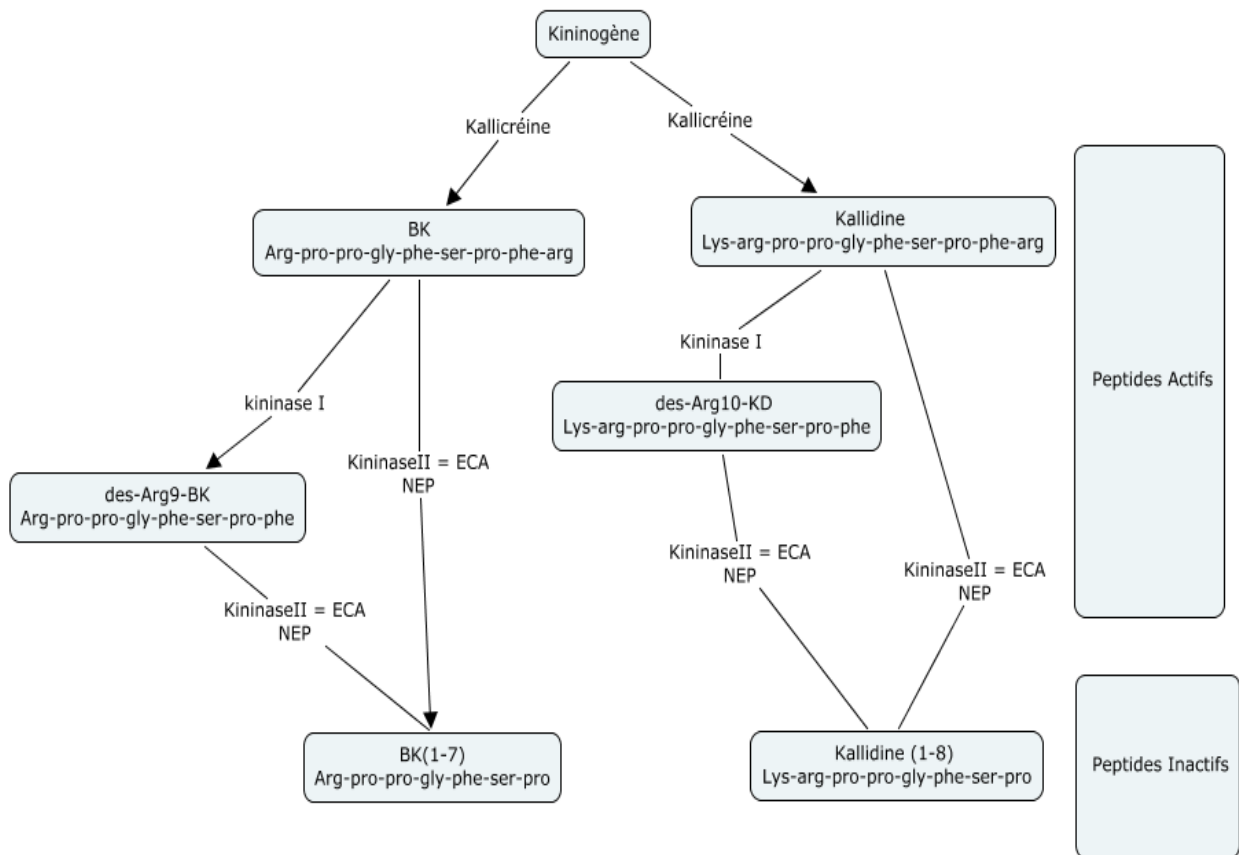


Fig. 13 : Le système Kallibréine-Kinine. Schéma adapté de Tang et al. (2011). NEP= Neprilysine, endopeptidase N ; ECA = enzyme de conversion de l'angiotensine.

1.4.2 Les récepteurs des kinines

Les kinines et leurs métabolites actifs agissent sur deux types de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (GPCR) nommés récepteurs B1 et B2 (RB1 et RB2). La BK et la KD sont les agonistes du RB2, tandis que la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD sont les agonistes endogènes sélectifs du RB1 (Couture. R et al., 2004).

1.4.2.1 Le récepteur B2

Le récepteur B2 est exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus, les muscles lisses, les neurones, les cellules endothéliales, les cellules immunes et les fibroblastes (Bhoola et al., 1992). Il est responsable de la phase aiguë de l'inflammation (Couture. R et al., 2004). Suite à une activation de courte durée par la BK et la KD, le récepteur B2 est inactivé par séquestration et internalisation cellulaire rapide (Kuhr et al., 2010).

1.4.2.2 Le récepteur B1

Contrairement au RB2 qui est exprimé de façon constitutive dans les divers tissus, le RB1 est quasiment absent en situation physiologique. Il est induit en présence de pathogènes, de dommages tissulaires et à la suite de maladies métaboliques et inflammatoires. Ces conditions déclenchent une cascade protéolytique, surtout la CPM aboutissant à la formation des métabolites sélectifs du RB1 (Couture. R et al., 2004; Kashuba et al., 2013; Moreau et al., 2005).

La localisation de la CPM ancrée à la membrane par le glycosylphosphatidylinositol (GPI), et proche du RB1, rend plus efficace la formation des agonistes B1 et la stimulation du récepteur. Ceci ralentit la dissociation récepteur-ligand et maintient plus longtemps l'activité du récepteur B1 (Kuhr et al., 2010).

L'induction du RB1 par les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α) est relayée par l'activation du NF- κ B (facteur de transcription nucléaire Kappa B). Le blocage pharmacologique du NF- κ B a permis de renverser l'expression du RB1 (He et al., 2004; Morand-Contant et al., 2010).

Dans les cellules au repos, le NF- κ B est séquestré dans le cytosol par association avec des protéines inhibitrices de la famille I- κ B (Mehta et al., 2007). La stimulation par des agents tels que le TNF- α , le lipopolysaccharide, et l'IL-1 β initie une dégradation protéolytique de la phosphorylation dépendante de l'I- κ B, ce qui active la relocalisation du NF- κ B dans le noyau et induit la transcription de nombreux gènes inclus dans les processus inflammatoires et d'interventions immunitaires (Ni et al., 1998).

L'engagement du NF- κ B est cohérente avec l'induction de la transcription du gène du récepteur B1 et avec la régulation positive des gènes médiateurs de l'inflammation, y compris les cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α), les enzymes pro-inflammatoires (cyclooxygénase) (COX) -2 et la forme inductible de la monoxyde d'azote synthase par le RB1 (iNOS) (Medeiros et al., 2004).

1.4.2.3. Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines

La stimulation des récepteurs B1 et B2 couplés aux protéines G α q déclenche l'activation de la PLC (phospholipase C) qui transforme la phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). L'IP₃ mobilise les réserves de Ca²⁺ dans le réticulum endoplasmique et le DAG active une protéine kinase calcium-dépendante (PKC) ainsi qu'une lipase (Fig. 14).

Le RB2 conduit aussi à l'activation de la phospholipase A₂ qui permet la production d'acide arachidonique et la libération des prostanoides (Leeb-Lundberg et al., 2005) et à l'activation directe (via Gas) ou indirecte de l'adénylate cyclase et de la guanylate cyclase qui mène à la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Gabra et al., 2003) (Fig. 14).

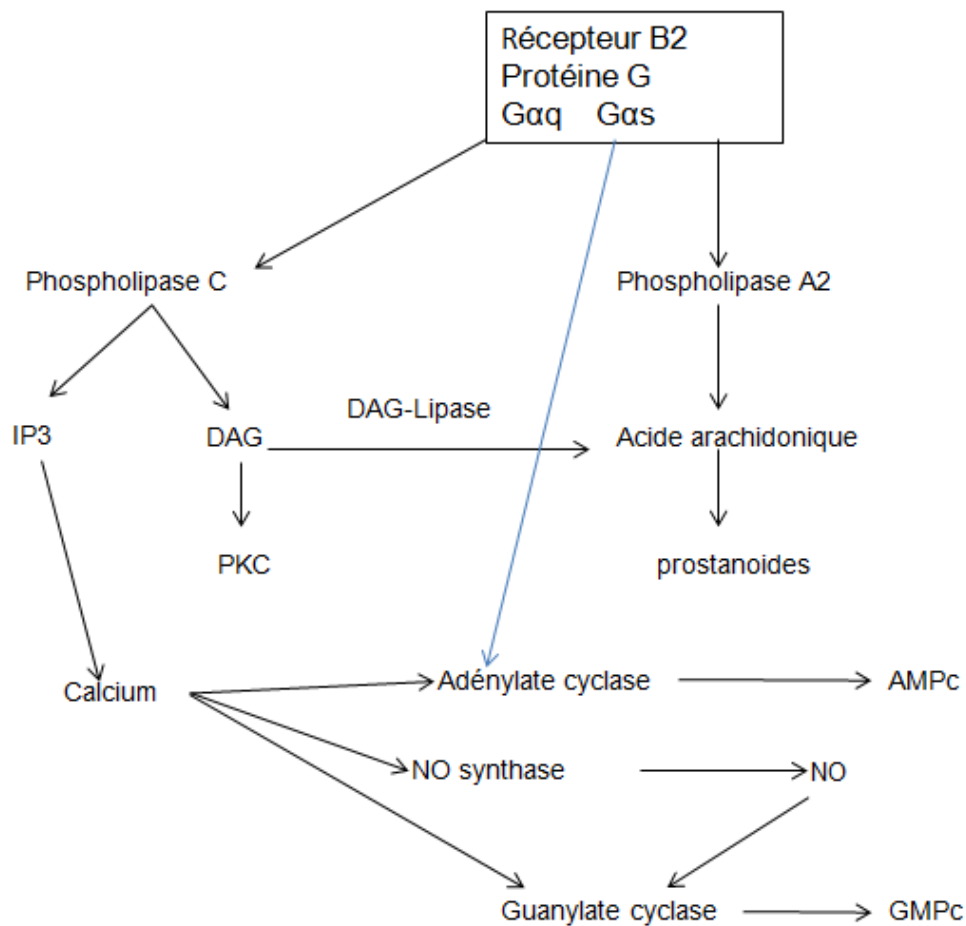


Fig. 14 : Mécanisme de signalisation du RB2 couplé à une protéine G. Adapté de Gabra et al. (2003)

La stimulation du RB2 couplé à la $G_{\alpha q}$ active la voie de la $PLC-\beta \rightarrow IP3 \rightarrow Ca^{++}$ tandis que la sous unité $\beta\gamma$ active la voie du PI3K, Akt rejoignant le Ca^{++} pour activer et phosphoryler la eNOS et la nNOS. Ces deux enzymes ont une activité réduite ou arrêtée par le retour du $[Ca^{++}]$ à la valeur de base par la dissociation de Ca-calmoduline et la déphosphorylation des sites actifs en faveur des sites inhibiteurs (Kuhr et al., 2010) (Fig. 15).

La stimulation du RB1 couplé à la protéine $G_{\alpha i}$ et $G_{\beta\gamma}$ active Src, Ras, Raf et ERK, aboutissant à la phosphorylation et à l'activation de la iNOS responsable de synthétiser

le NO, en quantité et en durée plus importantes qu'après activation de la eNOS suite à la stimulation du RB2 (Brovkovich et al., 2011; Kuhr et al., 2010) (Fig. 15).

L'activité des nNOS et eNOS se trouve régulée par le Ca^{++} et la calmoduline, alors que la iNOS est insensible au changement de la concentration du Ca^{++} intracellulaire (Kuhr et al., 2010). L'activité constitutive des nNOS et eNOS se trouve alors régulée par la concentration du Ca^{++} intracellulaire et par la phosphorylation de sérine, thréonine et tyrosine aboutissant à la synthèse du NO (Fig. 15).

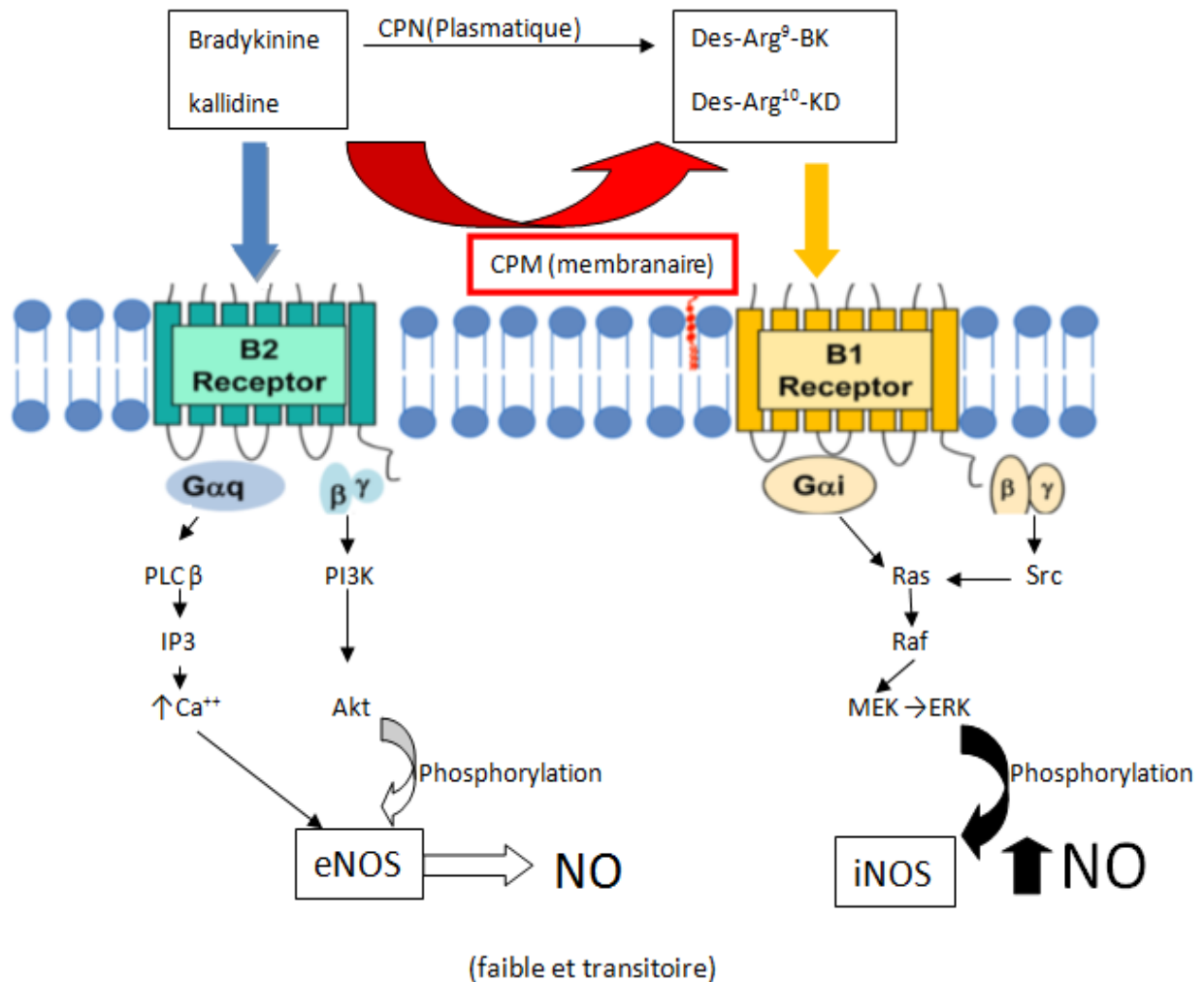


Fig. 15 : Activation de la iNOS et la eNOS par la signalisation du RB1 et RB2 couplés à une protéine Gαq et Gαi. Adapté de Kuhr et al. (2010).

1.5 Contribution du RB1 à l'insulino-résistance

Le modèle utilisé dans notre laboratoire est celui du rat rendu insulino-résistant par la prise d'une diète riche en hydrates de carbone (accès libre et à volonté à l'eau de boisson contenant 10 % de D-glucose). L'équipe du Dr de Champlain a montré que ces rats, après 4 semaines, développent les symptômes du DT2 tels l'hyperglycémie, l'hypertension, l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et une augmentation du

stress oxydatif dans les tissus cardiovasculaires (El Midaoui et al., 2002, 2005). Notre équipe a montré la présence de symptômes de douleur neuropathique caractérisés par l'allodynie tactile et au froid (Dias et al., 2010; Lungu et al., 2007).

De plus, nos études ont montré dans ce modèle un lien entre la résistance à l'insuline, le stress oxydatif et la surexpression du récepteur B1 des kinines car des traitements avec des diètes antioxydantes (N-acetyl-L-cystéine ou acide alpha-lipoïque) préviennent la surexpression du RB1 et les anomalies citées (Ismael et al., 2008; Lungu et al., 2007). Le blocage d'une semaine du RB1 avec son antagoniste renverse l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et la résistance à l'insuline (Dias et al., 2010), ainsi que l'expression du RB1 et d'autres marqueurs inflammatoires (iNOS, macrophage, Cox-2, IL-1 β , E-sélectine, ICAM-1) dans l'aorte (Dias et al., 2012 b).

La présence du RB1 sur la microglie dans la moelle épinière (Talbot et al., 2009) explique son implication active dans la neuropathie diabétique; son inhibition prévient la douleur neuropathique caractérisée par l'allodynie tactile et au froid (Dias et al., 2007; Talbot et al., 2009). L'hypertension associée à la résistance à l'insuline est corrigée par un antagoniste du RB1 impliquant la voie dopaminergique de l'aire tégmentale ventrale (De Brito Gariépy et al., 2010; Dias et al., 2010; Lungu et al., 2007).

Deuxième Chapitre

Mise en contexte et Hypothèses

2.1 Contexte de l'étude

Notre laboratoire a montré qu'un traitement d'une semaine avec un antagoniste du RB1 (SSR240612) renverse les complications diabétiques en corrigeant l'hypertension, la douleur neuropathique manifestée par des allodynies tactile et au froid, la résistance à l'insuline ainsi que le stress oxydatif et l'inflammation vasculaire chez le rat soumis à une diète riche au glucose (Dias et al., 2012 b; Dias et al., 2010). Or, la stimulation du RB1 augmente à la fois l'expression et l'activité de la iNOS et ceci par la voie des protéines kinases activées par les mitogènes (MAPK) (Kuhr et al., 2010). Cette surproduction de NO est néfaste car en s'associant à l'anion superoxyde, le NO forme le peroxynitrite, une molécule hautement toxique.

2.2 Hypothèses et objectifs chez le rat insulino-résistant

L'impact positif de l'inhibition du RB1 par son antagoniste SSR240612, dans le modèle des rats insulino-résistants, nous mène à formuler deux hypothèses :

Hypothèse # 1 : La iNOS contribue à l'effet délétère du RB1 dans l'insulino-résistance, donc l'inhibition de la iNOS devrait reproduire les effets bénéfiques assurés par l'antagoniste du RB1.

Hypothèse # 2 : La suppression de la formation d'agonistes endogènes pour le RB1 devrait prévenir l'induction de la iNOS et les complications associées à l'insulino-résistance. Ainsi, l'inhibition de la kininase I devrait reproduire les mêmes effets que l'antagoniste du RB1 (SSR).

Ces deux hypothèses sont testées dans le modèle du rat soumis à une diète riche en glucose (10% D-glucose dans l'eau de boisson). Ces rats traités au glucose développent des complications diabétiques comme l'hypertension, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, une augmentation du stress oxydatif dans l'aorte et des allodynies tactile et au froid (El Midaoui et al., 2002, 2005; Lungu et al., 2007).

Dans ce modèle, les rats sont traités pendant une semaine soit avec un inhibiteur sélectif de la iNOS (1400W : N-(3 aminométhyl benzyl acetamidine) (Garvey et al., 1997) ou avec un inhibiteur de la kininase I (Mergetpa : DL-2-Mercaptométhyl-3 guanidino-ethylthio-propanoic acid) (Salgado et al., 1986).

L'impact de ces traitements est mesuré sur la pression artérielle, la douleur neuropathique (allodynie tactile et au froid) et le poids corporel. Après le sacrifice, le sang et les tissus cibles (aorte, rein, foie, masse adipeuse) sont prélevés pour mesurer la glycémie et les taux plasmatiques d'insuline et de leptine par dosages radio immunologiques (RIA). Les taux de glucose et d'insuline plasmatiques à jeun permettent de mesurer la résistance à l'insuline avec l'indice HOMA (Homeostasis Model Assessment index). Les protéines, l'ADN, l'ARNm de ces organes sont extraits pour mesurer l'expression de plusieurs marqueurs de l'inflammation (RB1, RB2, iNOS, nitrotyrosine, IL-1 β , Cox-2, kininase I) par immunobuvardage de type western, par qRT-PCR ou les deux.

2.3 Hypothèses et objectifs chez la souris

De plus, notre laboratoire a montré que le traitement pendant une semaine avec SSR, l'antagoniste du RB1, renverse l'accumulation de la graisse corporelle et les anomalies dans le profil des acides gras dans le plasma chez le rat soumis à une diète riche en glucose (Dias et al., 2012 a). Cet impact positif du SSR sur l'adiposité et la prise pondérale nous mène à poser deux hypothèses additionnelles :

Hypothèse # 3 : L'inhibition du récepteur B1 des kinines avec le SSR240612 corrige la prise pondérale et l'adiposité dans un modèle de DT2 associé à l'obésité.

Hypothèse # 4 : L'activation du récepteur PPAR γ et l'inhibition du RB1 ont des effets similaires ou additifs sur la prise pondérale et l'adiposité dans un modèle de DT2 associé à l'obésité.

Ces hypothèses sont évaluées dans un modèle de DT2 associé à l'obésité, décrit par Planchal et Brown (2011), induit chez la souris C57BL/6J nourrie pendant 20 semaines avec une diète riche en gras (High Fat Diet) (El Akoum et al., 2011).

Dans ce modèle, on détermine les effets sur la prise pondérale et la graisse corporelle, d'un antagoniste du RB1 (SSR) et d'un anti-diabétique de type thiazolidinedione (TZD) administré seul ou en combinaison pendant deux semaines.

Les TZD sont des médicaments antidiabétiques qui agissent comme des sensibilisateurs à l'insuline et ils sont utilisés dans la gestion du DT2. Ils sont des ligands pour le

récepteur PPAR γ qui agissent sur l'homéostasie du glucose et des lipides, l'inflammation, l'athérosclérose ainsi sur le remodelage osseux et la prolifération cellulaire (Cariou et al., 2012).

L'impact des traitements est mesuré sur les taux plasmatiques d'insuline et de leptine par ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme lié) et RIA. La tolérance au glucose est estimée par IPGTT (test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale) et la sensibilité à l'insuline est mesurée par IPIST (test de sensibilité à l'insuline par voie intrapéritonéale). Au sacrifice, des organes sont prélevés (aorte, reins, foie, graisse péritonéale) et congelés. Les protéines, l'ADN, l'ARN de ces organes sont extraits pour mesurer l'expression de plusieurs cibles et marqueurs de l'inflammation (RB1, RB2, iNOS) par immunobuvardage de type western, par qRT-PCR ou les deux, pour des études ultérieures.

Troisième Chapitre Matériels et Méthodes

3- Matériels et méthodes

3.1 Protocoles et méthodes des rats soumis à 10% de D-glucose.

Notre protocole a été approuvé par le CDEA (comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux) de l'Université de Montréal. Des rats mâles Sprague-Dawley (24-30 jours d'âge), entre 50-75g de poids, ont été achetés des laboratoires Charles River (St Constant, Québec, Canada) et hébergés deux par cage dans des conditions standards d'hébergement (22.5°C et 42.5% d'humidité, avec un cycle de 12h/12h de lumière/obscurité) avec un libre accès à la nourriture (Charles River Rodent Chow diet). Les rats ont eu libre accès pendant huit semaines soit à 10% de D-glucose dans l'eau de boisson soit à l'eau du robinet (témoins). Au cours de la neuvième semaine, les rats glucosés (groupes 1, 2 et 3) et témoins (groupes 4,5 et 6) ont été traités deux fois par jour à 12h d'intervalle pendant une semaine comme suit :

Groupes 1 et 4 : le 1400W (N-3-Aminomethyl benzyl acetamidine), un inhibiteur sélectif de la iNOS, avec une dose de 1mg/kg en sous-cutané.

Groupes 2 et 5 : le Mergetpa (DL-2-Mercaptomethyl-3-guanidino-ethylthio-propanoic acid), un inhibiteur des kininases I (des carboxypeptidases M et N) à la dose de 1mg/kg en sous-cutané.

Groupes 3 et 6 : le véhicule (une solution saline) dans un volume de 1ml/kg en sous-cutané.

Ces groupes de rats ont été soumis à plusieurs mesures au cours de la dernière semaine : des tests d'allodynies tactile et au froid afin de déterminer la présence de neuropathie douloureuse, la pression artérielle systolique, la glycémie, le poids corporel et l'OGTT (test de tolérance au glucose par voie orale).

À la fin du traitement, le sang a été prélevé par ponction cardiaque chez les rats anesthésiés à l'isoflurane, pour mesurer les taux plasmatiques d'insuline et de leptine par RIA (dosage radio immunologique). Au sacrifice, plusieurs tissus et organes ont été prélevés (aorte, reins, foie, graisse péritonéale) et congelés. Les protéines, l'ADN et l'ARN de ces organes ont été extraits pour mesurer l'expression de plusieurs marqueurs de l'inflammation (RB1, RB2, iNOS, nitrotyrosine, IL-1 β , Cox-2) par immunobuvardage de type western et qRT-PCR. Le stress oxydatif a été évalué en mesurant le taux de production de l'anion superoxyde avec une technique de chimioluminescence utilisant la lucigénine.

3.1.1 Mesure de l'allodynie tactile

L'allodynie tactile est évaluée par le seuil de retrait de la patte arrière en utilisant une série calibrée de filaments de Von Frey (2, 4, 6, 8, 10, 15 et 26g) (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) selon une méthode adaptée de (Chaplan et al., 1994). Les rats sont installés sur un plancher en treillis métallique sous une cage en plastique inversée et le test est initié en appliquant d'une façon perpendiculaire, le plus petit filament (2g), au centre de la surface plantaire avec une force suffisante pour plier le bout du filament. Le soulèvement ou le retrait rapide de la patte est considéré comme une réponse positive. Chaque filament est appliqué, en ordre croissant, cinq fois à chaque patte, pour une

durée de 6-8 secondes, et d'une façon alternative à intervalle de 1-2 min. Le filament retenu est celui ayant causé un minimum de cinq réponses positives sur 10 stimulations (valeur en gramme).

3.1.2 Mesure de l'allodynie au froid

L'allodynie au froid est évaluée selon la méthode de (Choi et al., 1994) en plaçant les rats sur un plancher en treillis métallique sous une cage en plastique inversée. Une goutte d'acétone formée sur le bout d'une seringue en plastique est appliquée à la surface plantaire des pattes postérieures. En s'évaporant l'acétone crée une sensation de froid non douloureuse. L'acétone est appliquée à cinq reprises et à intervalle de 3-5 min sur chacune des deux pattes d'une façon alternative. Le comportement de fuite ou le retrait intense et rapide de la patte est considéré comme une réponse positive. La fréquence des réponses est exprimée en pourcentage comme suit :

$$\left[\frac{\text{Nombre de retrait de la patte}}{\text{Nombre total d'applications}} \right] \times 100$$

3.1.3 Mesure de la pression artérielle systolique

La pression systolique est mesurée par un brassard placé autour de la queue du rat touchant un tapis chauffé à 37°C. Les valeurs sont enregistrées à l'aide du système de ADI Instruments (ADI instruments Inc., Colorado, CO, USA) assisté par le logiciel de ADI Instruments (Lab Chart Pro7.Ink). La valeur est ensuite calculée en faisant la moyenne de 5-7 mesures effectuées à intervalle de 1-2 minutes.

3.1.4 Mesure du poids corporel

La mesure du poids corporel, prise une fois par semaine, est exprimée en gramme.

3.1.5 Mesure de l'OGTT

L'OGTT est effectué deux jours avant le sacrifice pour permettre aux rats de récupérer. Après la prise de la glycémie à l'aide d'un glucomètre Accu-Check (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada), les rats sont mis à jeun pendant la nuit pour une période de 18h. En matinée, une solution concentrée à 50% de D-glucose est administrée par gavage (2g/kg) en introduisant l'embout d'une seringue à pointe émoussée dans l'estomac. La glycémie, à l'aide du glucomètre, est ensuite prise par ponction de la veine caudale après 30, 60, 90 et 180 minutes pour évaluer la tolérance au glucose.

3.1.6 Analyse du plasma

Au sacrifice, après un jeûne de 18 heures, les échantillons de sang sont collectés par ponction cardiaque dans des tubes contenant un anticoagulant (Héparine, Sandoz, Jules Léger, Boucherville, QC, Canada), et le plasma est séparé par centrifugation à 2500 rpm pendant 15 min à 4°C et stocké à -20°C.

La concentration d'insuline plasmatique est ensuite déterminée selon la double technique anticorps polyéthylène glycol en utilisant la méthode de dosage radio immunologique (Rat Insulin Radioimmunoassay Kit) de Millipore, St-Charles, Missouri, USA.

L'indice HOMA (Homeostasis Model Assessment index) est utilisé comme indice de la résistance à l'insuline par le calcul de la valeur de l'insuline (par le RIA) et de la glycémie (par le glycomètre) à jeun et selon la formule suivante :

HOMA = (insuline ($\mu\text{U/ml}$) x glucose (mM)) / 22.5 (Matthews et al., 1985).

La concentration de leptine plasmatique est déterminée selon la double technique anticorps polyéthylène glycol en utilisant la méthode de dosage radio immunologique (Rat Leptin Radioimmunoassay Kit) de Millipore, St-Charles, Missouri, USA.

3.1.7 Mesure de la production basale de l'anion superoxyde

La production de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ est mesurée sur l'aorte thoracique décongelée, selon la méthode de chimioluminescence utilisant la lucigénine (Munzel et al., 1995).

L'aorte thoracique (2-5 mg) est pré-incubée dans un tampon Krebs-HEPES (saturé à 95% O_2 et 5% CO_2 à température ambiante pour 30 min) puis transférée dans un vial à scintillation contenant 5 μM de lucigénine pour déterminer le niveau basal d' $\text{O}_2^{\bullet-}$. La chimioluminescence est ensuite enregistrée chaque minute pendant 6 min dans une chambre noire dans un compteur à scintillation liquide (Wallac 1409, Turku, Finland). Le bruit de fond est compté par la machine en utilisant un vial avec la solution sans tissus.

La valeur finale est calculée comme suit :

$$\frac{(\text{Valeur du tissu} - \text{valeur du bruit de fond})}{\text{Poids du tissu utilisé}}$$

3.1.8 Immunobuvardage de type western

L'immunobuvardage de type western est effectué selon la méthode de (Pouliot et al., 2011). Après la fin de la migration, les protéines dans le gel d'électrophorèse sodium dodecyl sulfate polyacrylamide (SDS-PAGE) sont transférées sur une membrane de nitrocellulose de BIO-RAD à 100V pour une heure. La membrane est alors lavée avec

du PBS-Tween 20 et incubée pour une heure dans une solution de blocage composée de lait à 5% dissout dans du PBS-Tween 20. La membrane est ensuite coupée selon le poids moléculaire des protéines et incubée avec des anticorps spécifiques primaires (Tableau 1), dans du PBS-Tween 20 pour toute la nuit à 4⁰C. La dynéine et la β -actine sont utilisées comme protéines de référence. Après trois séries de lavage de 10 min avec du PBS-Tween 20, la membrane est incubée dans du PBS-Tween 20 contenant du lait 5% avec des anticorps secondaires (tableau 1). La membrane est lavée trois fois (10 min/lavage) avec du PBS-Tween 20 avant d'être soumise à une réaction avec un réactif de détection chimioluminescent amélioré pour le western blot (Super –Signal, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). Une analyse quantitative des protéines est assurée par un balayage densitométrique utilisant le système MCID-M1 (Imaging Research, Ste-Catherines, ON, Canada).

Tableau 1 : Liste des anticorps utilisés chez le rat.

Anticorps	Numéro de catalogue	Dilution anticorps primaire	Dilution anticorps secondaire
RB1 des kinines, lapin polyclonal	Produit au laboratoire	1/1000	1/25000
Dynéine, souris monoclonal, Santa Cruz	SC-13524	1/4000	1/5000
β -actine, souris polyclonal, Santa Cruz	SC-47778	1/5000	1/5000
IL-1 β , lapin polyclonal, Santa Cruz	SC-7884	1/500	1/5000
iNOS (NOS2), lapin polyclonal, Santa Cruz	SC-650	1/1000	1/5000
RB2 des kinines, lapin polyclonal, Santa Cruz	Produit au laboratoire	1/1000	1/25000
Cox-2, lapin polyclonal, Santa Cruz	SC-7951	1/500	1/5000
Antinitrotyrosine, souris, Millipore	1A6-05233	1/1500	1/3000
CPM, lapin, Santa Cruz	SC-98698	1/500	1/5000

(SC = Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; Millipore, Billerica, MA, USA). Les anticorps secondaires sont : chèvre anti-souris, Santa Cruz, SC-2005 ; et chèvre anti- lapin, Santa Cruz, SC-2004.

3.2 Protocoles des souris soumises à une diète riche en gras

Des souris mâles C57BL/6J (Jackson Laboratory, Bar Harbor, MN, USA) âgées de 5 semaines sont hébergées dans des conditions standards (22.5°C et 42.5% d'humidité avec un cycle de 12h/12h de lumière/obscurité). Les souris sont réparties dès leur arrivée à l'animalerie en 2 groupes selon les régimes alimentaires auxquels elles sont soumises pendant 21 semaines:

Groupe 1 : 40 souris nourries avec un régime standard (Charles River Rodent Chow diet)

Groupe 2 : 40 souris nourries avec un régime enrichi en graisses (HFD, Research Diets), Le régime enrichi en graisses contient 60% de graisses animales, 20% de sucrose et 20% de protéines pour fournir ainsi une charge calorique de 5.2 kcal/g de nourriture comme valeur énergétique. Les animaux ont libre accès à la nourriture et à l'eau et sont soumis à un cycle jour/nuit de 12 h. Un suivi hebdomadaire du poids corporel est effectué durant toute la durée du protocole pour mesurer l'effet de la diète riche en graisses sur la prise de poids des animaux.

Au terme des 19 semaines, chaque groupe de souris est alors divisé en quatre sous-groupes de traitement pour deux semaines :

Groupe 1 : 10 souris non traitées;

Groupe 2 : 10 souris traitées avec un antidiabétique (agoniste des PPAR γ) de la famille des thiazolidinediones (pioglitazone) administré à la dose de 1.6 mg/g/jour en sous-cutané.

Groupe 3 : 10 souris traitées avec un antagoniste des récepteurs B1 de la bradykinine (SSR240612, 10 μ g/g/jour) en sous-cutané;

Groupe 4 : 10 souris traitées avec la pioglitazone combinée avec le SSR240612.

Les traitements sont administrés chaque jour le matin (entre 8h et 10h) sur deux semaines.

À la fin du traitement, le sang est prélevé par ponction cardiaque chez les souris anesthésiées à l'isoflurane, pour mesurer les taux d'insuline et de leptine par ELISA et RIA. Au sacrifice, des organes sont prélevés (aorte, reins, foie, graisse péritonéale) et congelés. Les protéines et l'ARN de ces organes sont extraits pour mesurer l'expression de plusieurs cibles et marqueurs de l'inflammation (RB1, RB2, iNOS) par immunobuvardage de type western et qRT-PCR (selon les techniques décrites précédemment).

3.2.1 Mesure de l'IPGTT et de l'IPIST

La tolérance au glucose est estimée par IPGTT (Intra Peritoneal Glucose Tolerance Test) et la sensibilité à l'insuline est mesurée par IPIST (Intra Peritoneal Insulin Sensibility Test). L'IPGTT est effectué le jour du sacrifice et l'IPIST deux jours précédant le sacrifice pour permettre une meilleure récupération des animaux tout en restant au même niveau pathologique.

Après la prise de la glycémie à l'aide d'un glucomètre Accu-Check (Roche Diagnostics, Laval, Qc, Canada), les souris sont mises à jeun pendant la nuit pour une période de 18h. En matinée, pour l'IPGTT, une solution concentrée à 50% de D-glucose est administrée par voie intrapéritonéale (2g/kg). C'est ainsi que l'on peut établir la courbe de rétablissement de la glycémie de nos animaux et c'est la surface sous cette courbe qui reflète leur tolérance glucidique. Pour l'IPIST, nous injectons de l'insuline porcine (I 5523- SIGMA) par voie intrapéritonéale à nos animaux (0.5 mUI/g de souris). Les sujets insulino-résistants devraient garder une glycémie élevée.

La glycémie, à l'aide du glucomètre, est prise à partir d'une goutte de sang obtenue par ponction de la veine caudale après 30, 60, 90 et 180 minutes pour évaluer la tolérance au glucose et à l'insuline.

3.3 Analyse des données

L'analyse des données est réalisée grâce au logiciel GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc.). Les graphiques représentent les valeurs de la moyenne \pm l'écart-type dans chaque groupe analysé où «n» représente le nombre de rats ou de souris. Les analyses statistiques sont effectuées au moyen d'une ANOVA suivi du test de Bonferroni où la valeur de $P < 0.05$ est considérée comme significative.

Quatrième Chapitre

Résultats

4- Résultats

4.1 Résultats chez le rat

Les résultats obtenus avec les tests effectués in vivo jusqu'au sacrifice et ex vivo sur les tissus prélevés sont présentés ci-dessous.

4.1.1 Effets du Mergetpa et du 1400W sur les paramètres de base

Le poids corporel des rats soumis à une diète riche en D-glucose (10% dans l'eau de boisson) et celui des rats témoins ne diffèrent pas significativement tout au long des 8 semaines de traitement. Ainsi, le tableau 2 ne représente que les valeurs de poids corporel au sacrifice. Les rats glucosés ont connu un gain de poids plus important que les rats témoins pendant la dernière semaine avant le sacrifice. La valeur de 43 ± 2 g est significative par rapport aux rats témoins ($P < 0.001$) en employant le test de student non pairé. Les deux traitements (Mergetpa et 1400W) n'ont pas produit d'effet sur la prise de poids chez les témoins. Par contre, ils ont causé une perte significative de gain de poids chez les rats traités au D-glucose (Tableau 2).

Tableau 2 : Poids corporel pour tous les groupes des rats au sacrifice : Témoins et Glucose + véhicule, et l'effet d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour). Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs Glucose (Anova). +++ $P < 0.001$, Glucose vs Témoin + véhicule (test de student non pairé).

Poids corporel (g)	Témoin + Véhicule	Témoin+ Mergetpa	Témoin+1400W	Glucose + Véhicule	Glucose + Mergetpa	Glucose + 1400W
8 semaines	587 \pm 25	538 \pm 38	566 \pm 21	592 \pm 29	622 \pm 29	571 \pm 37
8 semaines + 1sem de traitement	603 \pm 26	554 \pm 38	573 \pm 20	635 \pm 18	604 \pm 17	537 \pm 15
Gain de poids	16 \pm 2	16 \pm 4	13 \pm 3	43 \pm 2 +++	-18 \pm 20*	- 34 \pm 20**

Cette diète riche en D-glucose cause une augmentation des taux plasmatiques de glucose, de leptine, et une augmentation de l'indice HOMA (indice d'évaluation du modèle d'homéostasie de la résistance à l'insuline) (Figs.16, 17 et 18).

La glycémie des rats soumis à une diète riche en D-glucose augmente significativement par rapport à celle des rats témoins. Un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour), corrige la hausse de la glycémie à jeun chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose (Fig. 16).

Pour l'indice HOMA, l'augmentation chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose est significative par rapport aux rats témoins. Un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose diminue significativement l'indice HOMA, en particulier, avec le 1400W (Fig. 17). Les traitements n'ont pas d'effet chez les rats témoins avec une diète normale.

La leptine plasmatique des rats soumis à une diète riche en D-glucose est augmentée significativement par rapport à celle des rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) n'a pas eu d'effet correctif, mais plutôt tend à augmenter la leptine circulante chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose (Fig. 18). Les traitements n'ont pas d'effet chez les rats témoins avec une diète normale.

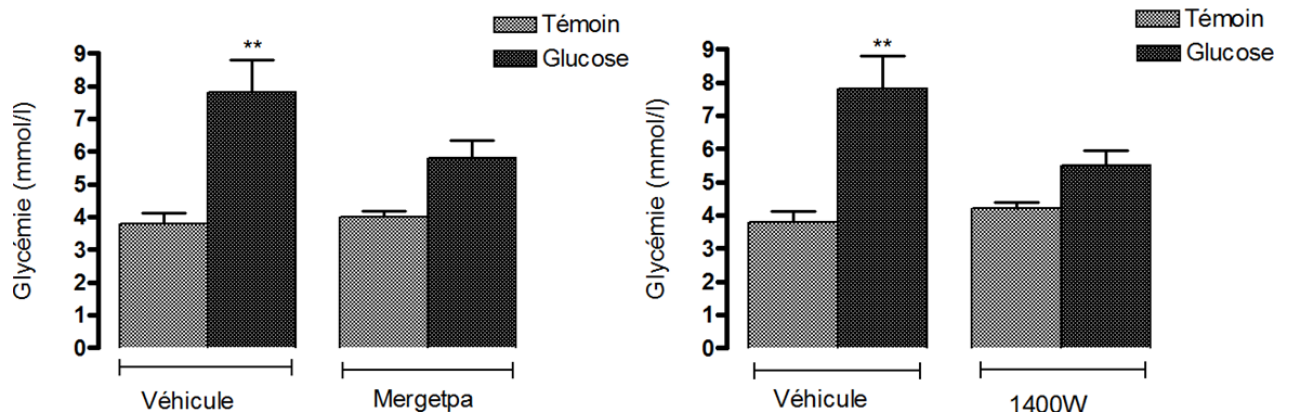


Fig. 16 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur **la glycémie** à jeun au sacrifice. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), ** P<0.01 vs Témoins.

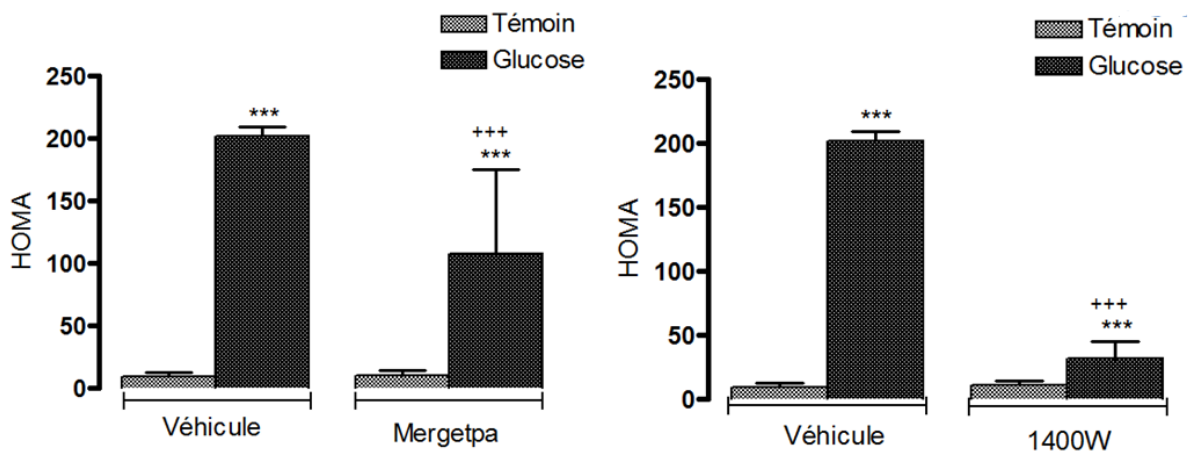


Fig. 17 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/ jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/ jour) sur l'indice **HOMA**, calculée en fonction des valeurs de la glycémie et de l'insuline à jeun selon : $HOMA (mmol/L \times \mu U/ml) = \text{glycémie} (mmol/L) \times \text{insuline} (\mu U/ml) / 22.5$. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *** P<0.001 vs Témoins, *** P<0.001 vs glucose.

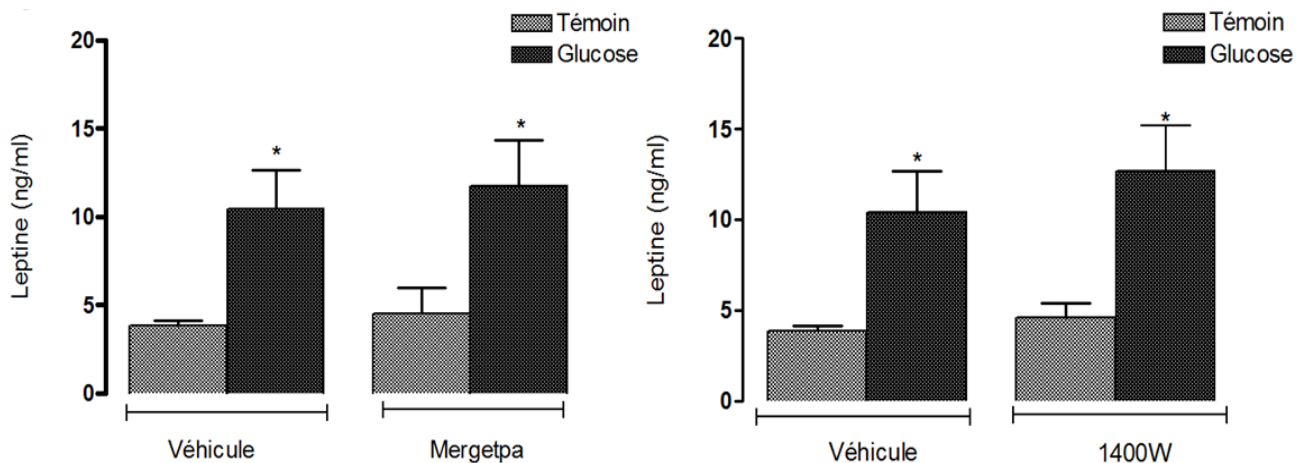


Fig. 18 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/ jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/ jour) sur la valeur de **la leptine** circulante. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *P<0.05 vs Témoin.

4.1.2 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'OGTT

L'OGTT (test de tolérance au glucose par voie orale) est effectué deux jours avant le sacrifice, après 18h de jeûne, en administrant 2g/kg de D-glucose à 50% par gavage. Les valeurs présentent une différence significative entre les rats témoins et ceux soumis à une diète riche en glucose, illustrant une augmentation de la glycémie chez ces derniers. Le traitement d'une semaine avec le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) ne corrige pas l'intolérance au glucose, alors que le traitement avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) augmente significativement cette intolérance au glucose (Fig. 19).

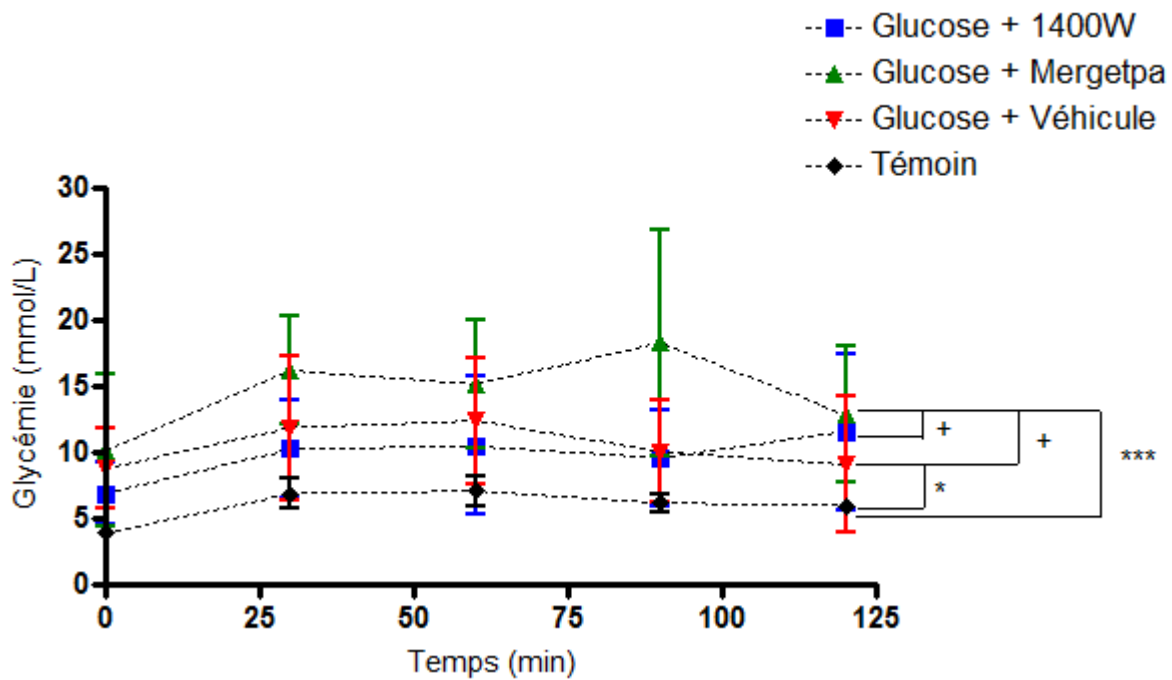


Fig. 19 : Après 18h de jeûne, l'OGTT est effectué 2 jours avant sacrifice en administrant 2g/kg de D-glucose par gavage. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *** P<0.001 vs Témoin, *P<0.05 vs Témoin, +P<0.05 vs Glucose.

4.1.3 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'allodynie

Les rats soumis à une diète riche en D-glucose présentent une allodynie au froid qui est significative comparativement aux témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) cause une réduction significative de l'allodynie au froid chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Toutefois, chez les rats témoins, le Mergetpa réduit significativement les valeurs de base alors que le 1400W les augmente (Fig. 20).

Les rats soumis à une diète riche en D-glucose présentent une allodynie tactile qui n'atteint cependant pas le niveau de significativité par rapport aux témoins. Un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2

fois/jour) reverse cette tendance chez les rats traités au glucose. Cependant chez les rats témoins, le Mergetpa tend à diminuer les valeurs de base (Fig. 21).

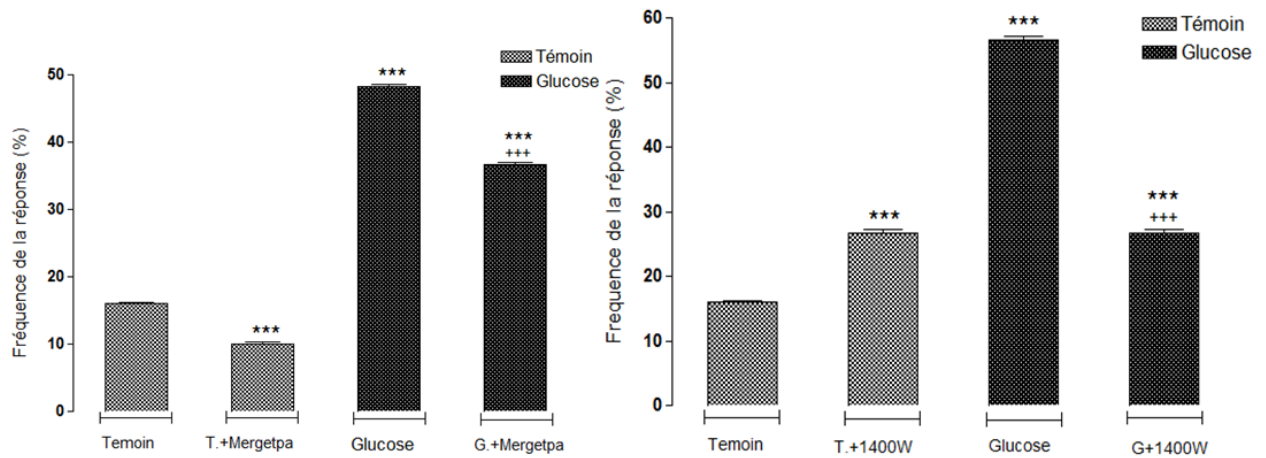


Fig. 20 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'**allodynie au froid** (fréquence de la réponse du retrait de la patte en %). Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *** P<0.001 vs Témoin, +++P<0.001 vs Glucose.

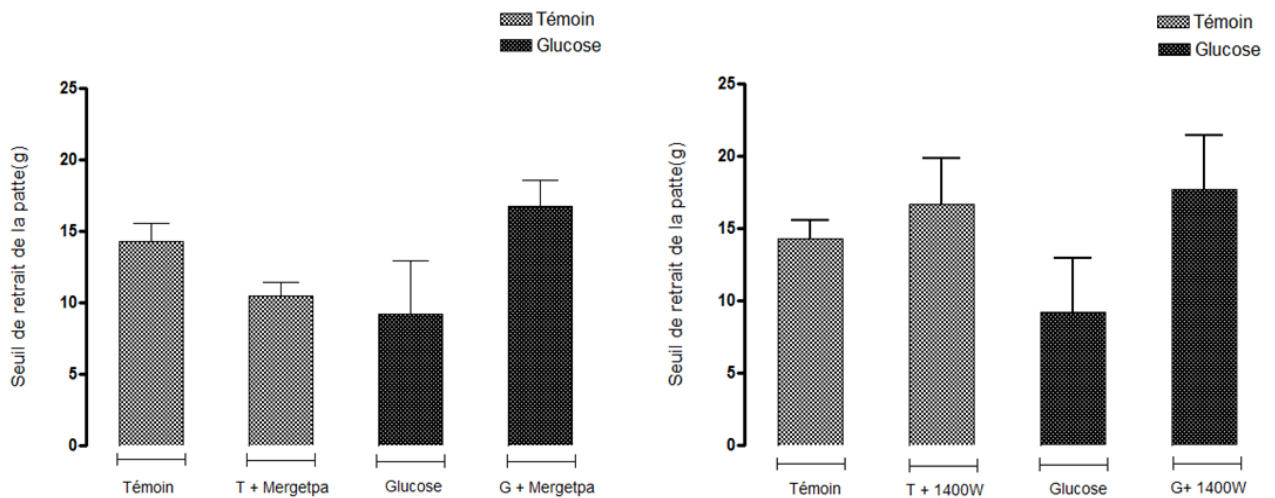


Fig. 21 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'**allodynie tactile** (seuil de retrait de la patte en gramme). Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6). Aucune différence significative n'a été mesurée entre les groupes.

4.1.4 Effets du Mergetpa et du 1400W sur la pression artérielle systolique

Les rats soumis à une diète riche en D-glucose présentent une augmentation significative de la pression artérielle systolique lorsque comparée aux rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) n'a pas eu d'effet significatif sur les valeurs de la pression systolique tant chez les rats témoins que chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose (Fig. 22).

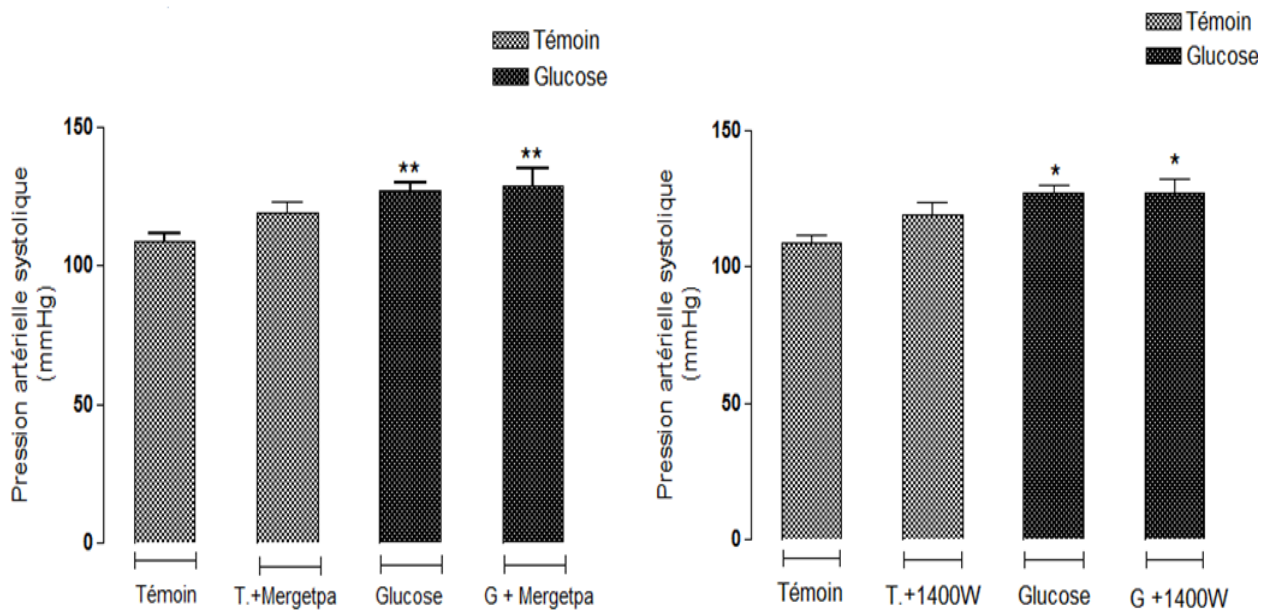


Fig. 22 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/ jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/ jour) sur la **pression systolique**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), **P<0.01 et *P<0.05 vs Témoin.

4.1.5 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression du RB1 des kinines

L'expression du RB1 (protéine par western blot) est parfois indétectable dans l'aorte et faiblement détectée dans le rein chez les rats témoins. L'expression de la protéine du RB1 est significativement augmentée, dans le rein et l'aorte, chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose lorsque comparée à celle des rats témoins. Le traitement d'une

semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/ jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/ jour) réduit significativement l'expression du RB1 chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Cependant le Mergetpa a un effet plus marqué que le 1400W sur l'expression du RB1 dans l'aorte. Ces traitements n'ont pas eu d'effet détectable sur l'expression du RB1 dans le rein et dans l'aorte des rats témoins (Figs. 23 et 24).

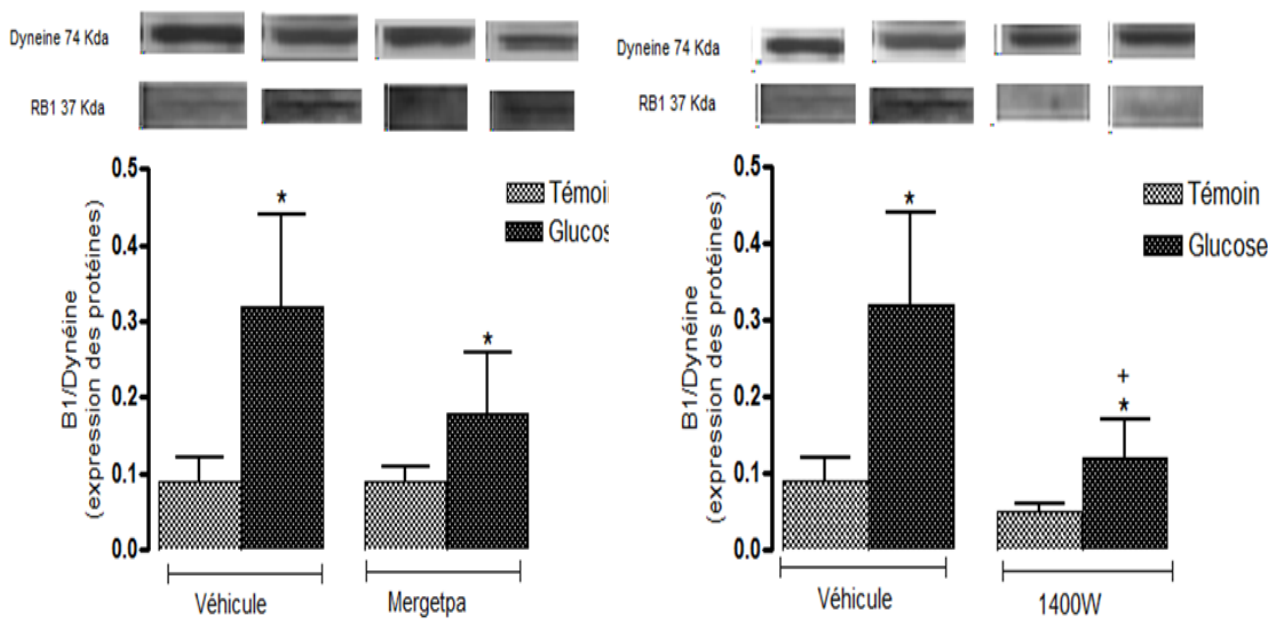


Fig. 23 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de la protéine du **RB1 dans le rein**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *P<0.05 vs Témoin, +P< 0.05 vs Glucose. Les bandes RB1/ Dynéine proviennent du même rat.

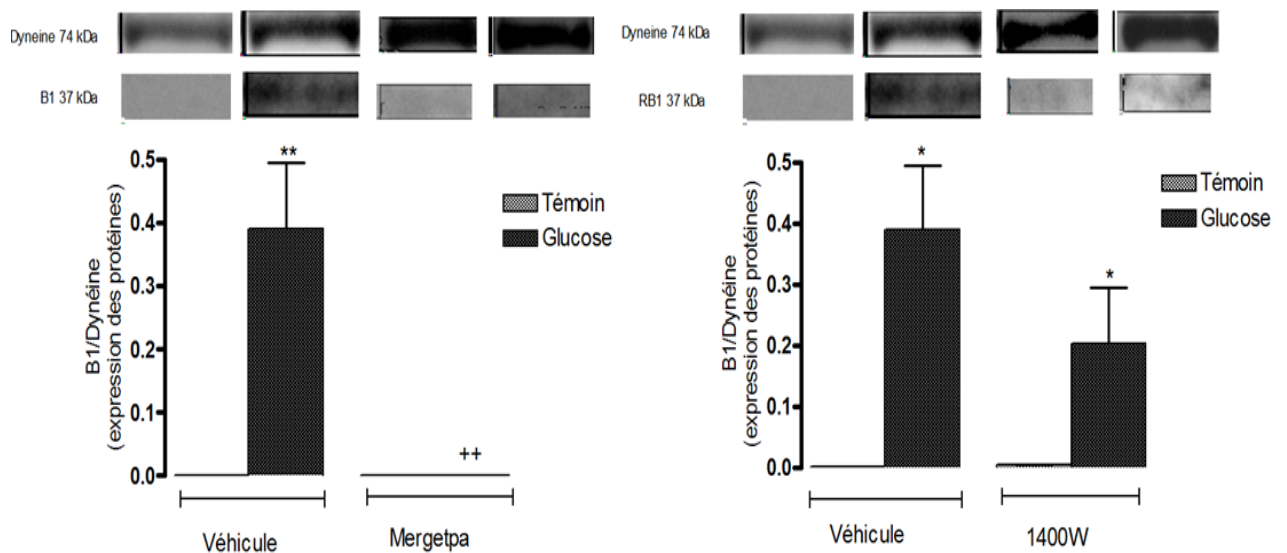


Fig. 24 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de la protéine du **RB1 dans l'aorte**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), ++P<0.01 vs glucose, **P<0.01 vs Témoin, *P<0.05 vs Témoin. Les bandes RB1/ Dyneine proviennent du même rat.

4.1.6 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression du RB2 des kinines

L'expression du RB2 (protéine par western blot), dans le rein, ne présente pas de différence significative entre les rats soumis à une diète riche en D-glucose et les rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ne montre aucun effet sur l'expression du RB2 chez les rats traités au D-glucose mais provoque une augmentation significative chez les rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) réduit significativement l'expression du RB2 à la fois chez les rats traités au glucose et les rats témoins (Fig. 25). Contrairement au rein, le foie montre une augmentation significative de l'expression du RB2 chez le rat traité au D-glucose (Fig. 26). Cette augmentation n'est pas affectée par le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour). Le RB2 présente parfois deux bandes (Fig. 26) tel qu'observé antérieurement (Blaes et al., 2012).

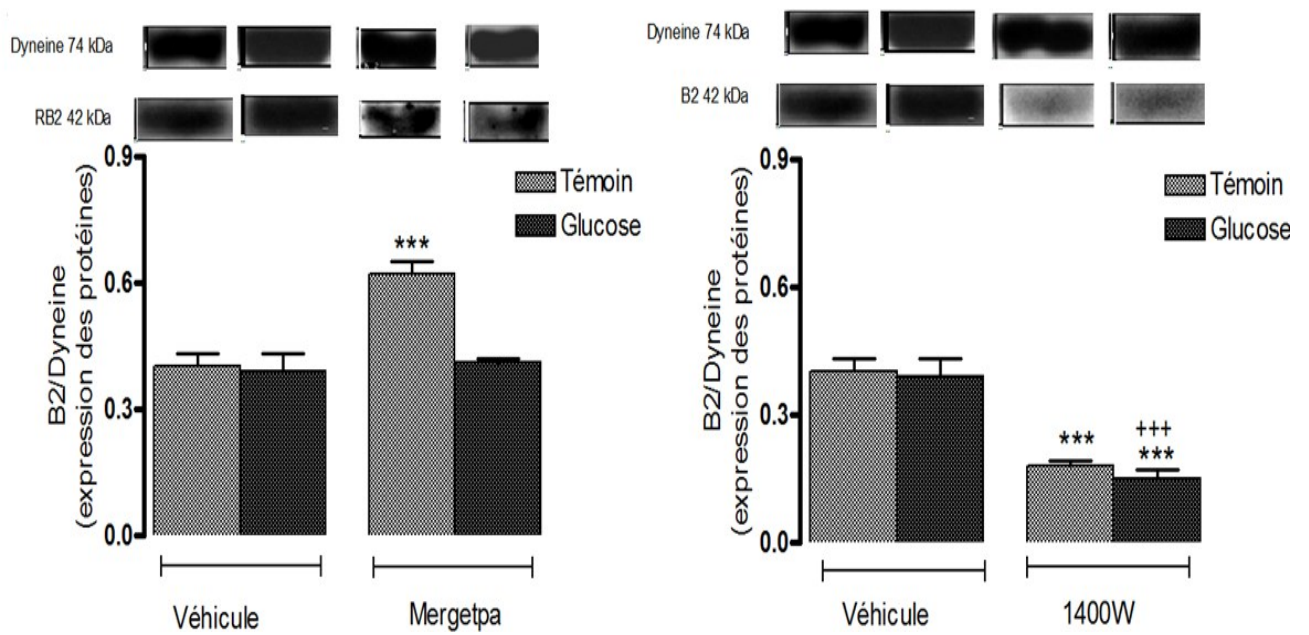


Fig. 25 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/ jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/ jour) sur l'expression de la protéine du RB2 **dans le rein**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), +++P<0.001 vs glucose, ***P<0.001 vs Témoins. Les bandes RB2/ Dynéine proviennent du même rat.

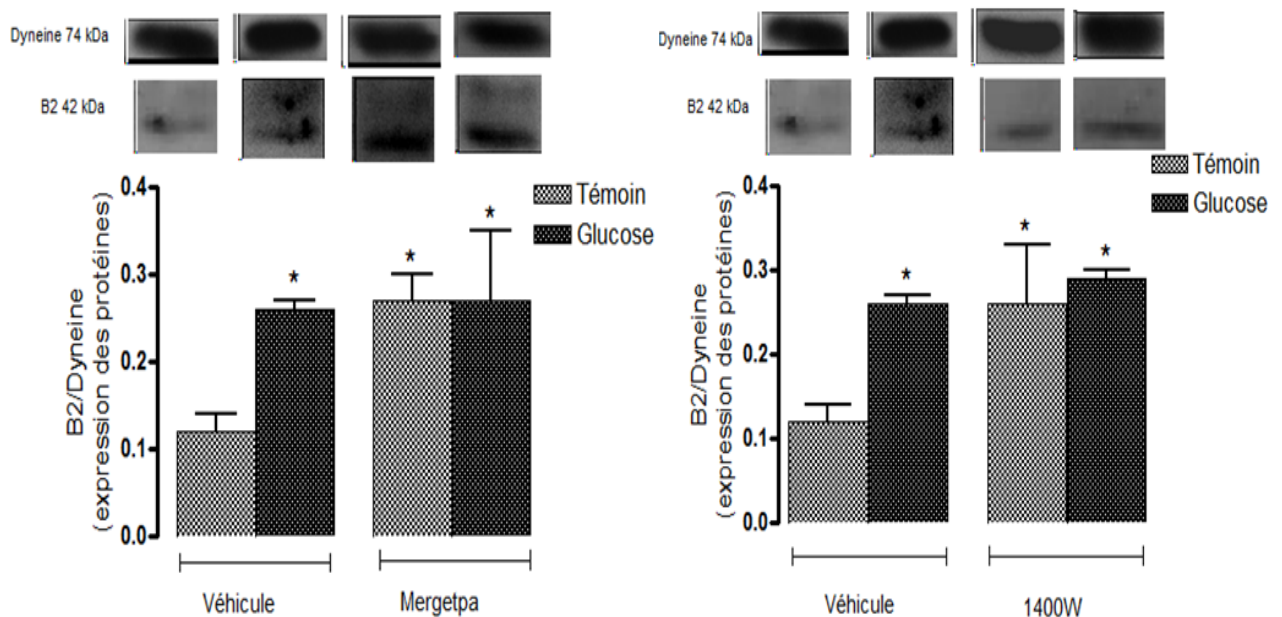


Fig. 26 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de la protéine du **RB2 dans le foie**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *P<0.05 vs Témoins. Les bandes RB2/ Dynéine proviennent du même rat.

4.1.7 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de la iNOS

L'expression de la protéine de la forme inductible du monoxyde d'azote synthase est significativement augmentée, dans le rein et l'aorte, chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose lorsque comparée aux rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) corrige complètement la surexpression de la iNOS dans le rein et l'aorte chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Ces deux traitements n'ont aucun effet sur l'expression de la iNOS chez les rats témoins (Figs.27 et 28).

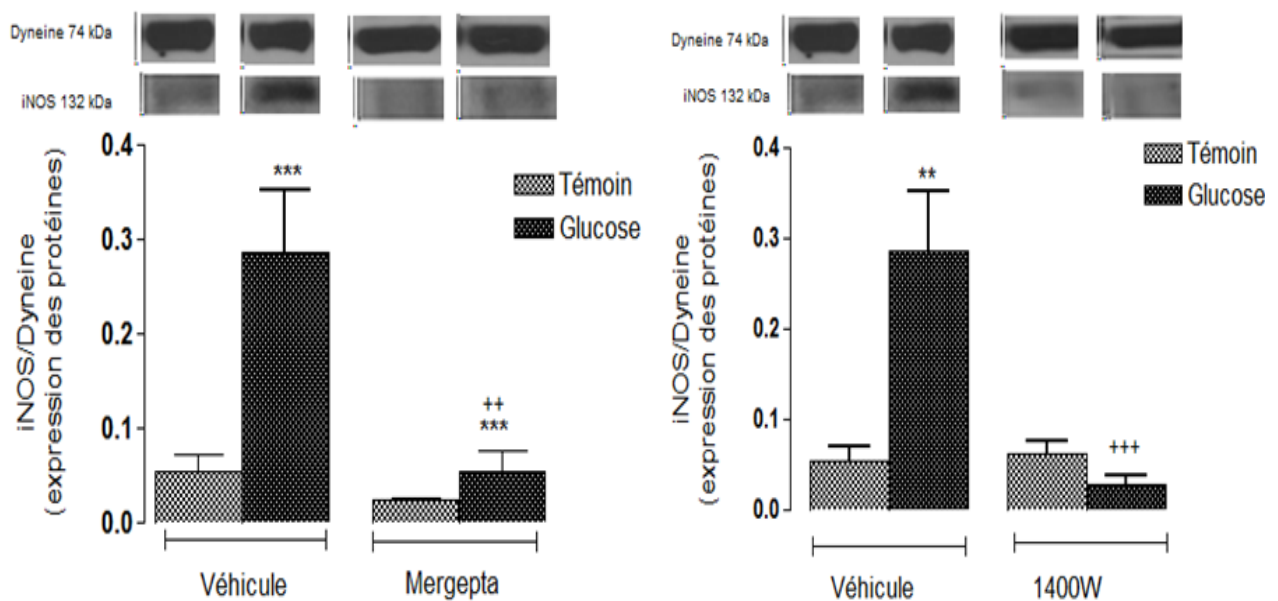


Fig. 27 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de **la iNOS dans le rein**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), ***P<0.001, ++P<0.01 vs glucose, ***P<0.001 et **P<0.01 vs Témoins. Les bandes iNOS/ Dyneine proviennent du même rat.

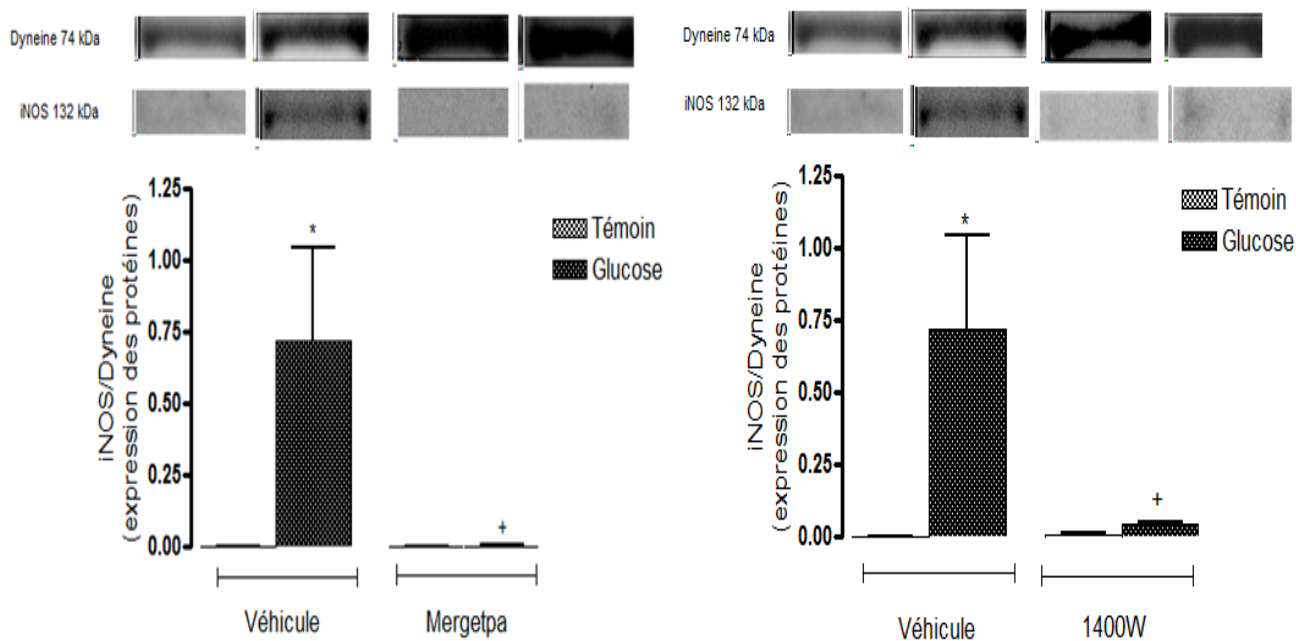


Fig. 28 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de **la iNOS dans l'aorte**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écart-type (n=6), *P<0.05 vs Témoins, +P<0.05, vs glucose. Les bandes iNOS/Dyneine proviennent du même rat.

4.1.8 Effets du Mergetpa et du 1400W sur le stress oxydatif

La production basale de l'anion superoxyde est augmentée dans l'aorte des rats soumis à une diète riche en D-glucose lorsque comparée aux rats témoins et cela en utilisant la méthode de chimioluminescence par la lucigénine amplifiée. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) réduit davantage la production de l'O₂⁻ que le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) chez les rats traités au glucose. Par contre, les traitements d'une semaine avec le Mergetpa et en particulier avec le 1400W semblent l'augmenter dans l'aorte des rats témoins (Fig. 29).

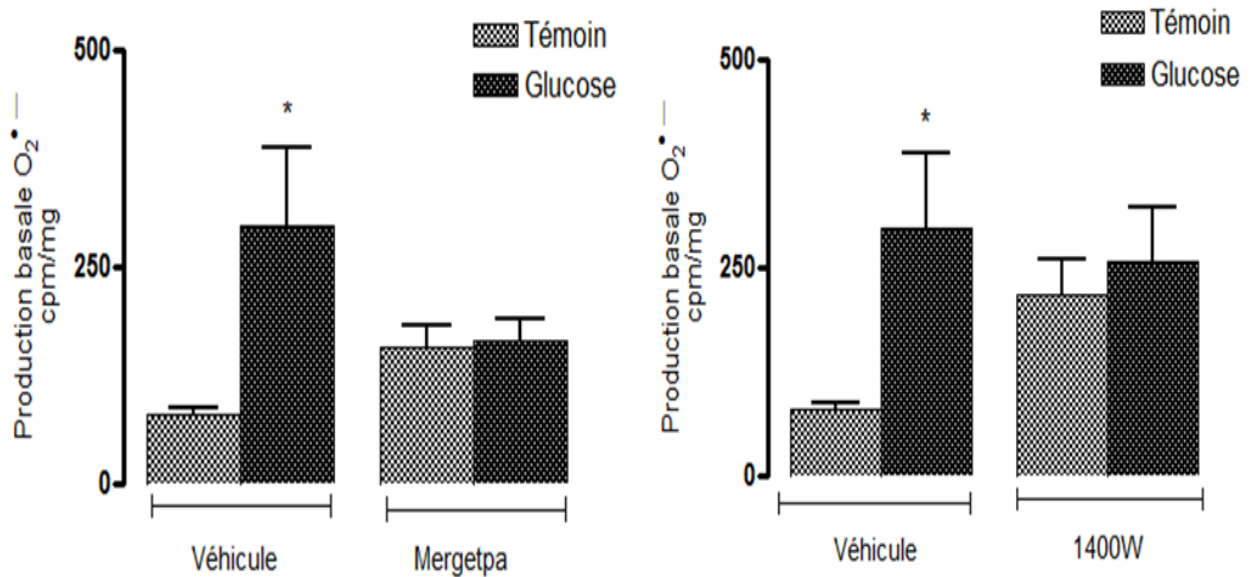


Fig. 29 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur la **production basale de l'anion superoxyde dans l'aorte**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *P<0.05 vs Témoin.

4.1.9 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de la CPM

L'expression protéinique de la carboxypeptidase M dans le rein est significativement augmentée chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose lorsque comparée aux rats témoins. Les traitements d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) corrigent la surexpression de la carboxypeptidase M chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Le 1400W réduit l'expression de la carboxypeptidase M chez les rats témoins alors que le Mergetpa est sans effet (Fig.30).

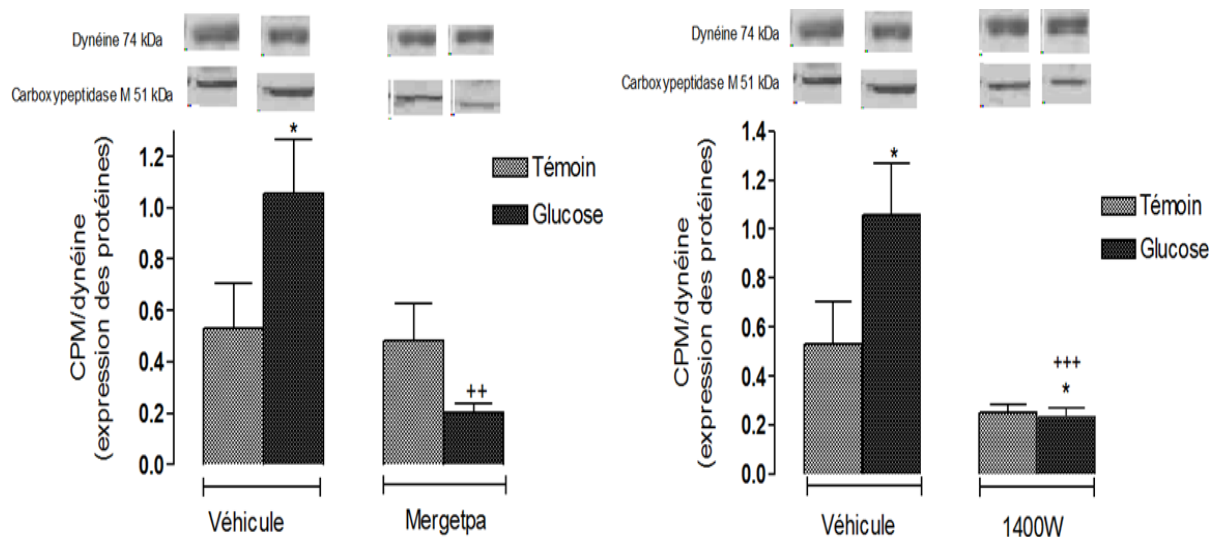


Fig. 30 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de **la CPM dans le rein**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *P<0.05 vs Témoin, ++P<0.01, +++P<0.001 vs glucose. Les bandes CPM/ Dynéine proviennent du même rat.

4.1.10 Effets du Mergetpa et 1400W sur l'expression de l'IL-1 β et la Cox-2

Les rats soumis à une diète riche en D-glucose présentent une augmentation de l'expression protéinique de l'IL-1 β , dans le rein, lorsque comparée aux rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) réduit significativement la surexpression de l'IL-1 β dans le rein chez les rats soumis à une diète riche en glucose. Le 1400W ne présente pas d'effet sur l'expression de l'IL-1 β chez les rats témoins contrairement au Mergetpa qui l'augmente significativement (Fig. 31).

Les rats soumis à une diète riche en glucose présentent une grande variabilité de l'expression protéinique de la Cox-2 dans le rein lorsque comparée aux rats témoins. Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) corrige cette variabilité sur la surexpression de la Cox-2 dans le rein chez

les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Ces mêmes traitements, le Mergetpa et le 1400W, ont peu d'effet sur l'expression de la Cox-2 chez les rats témoins (Fig. 32).

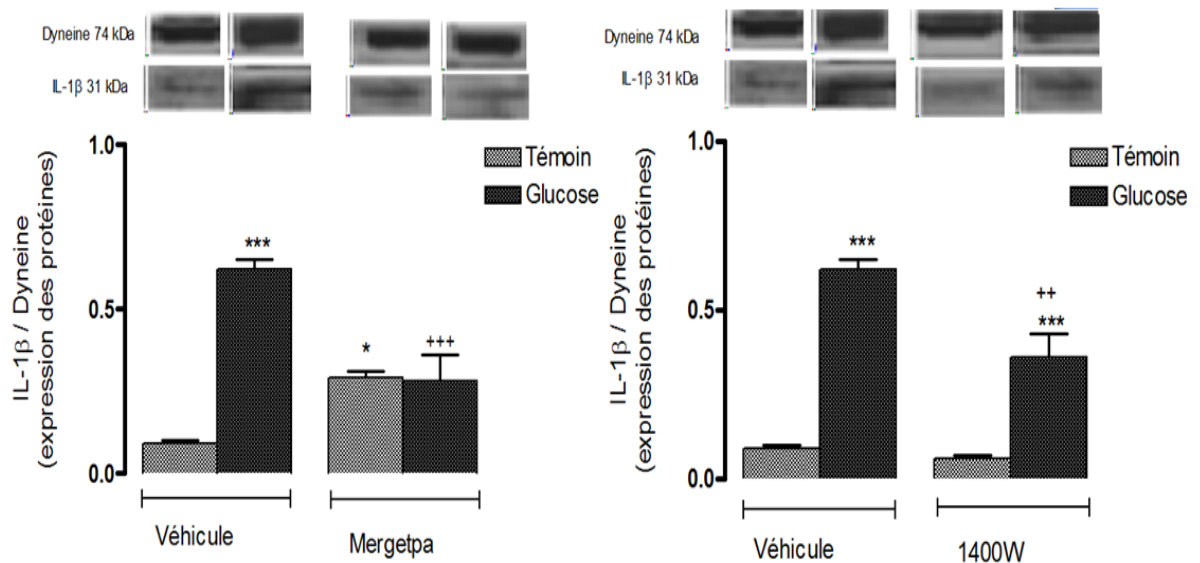


Fig. 31 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de l'**IL-1beta** dans le rein. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *** P<0.001, *P<0.05 vs Témoins ; +++P<0.001, ++P<0.01 vs glucose. Les bandes IL-1 β / Dynéine proviennent du même rat.

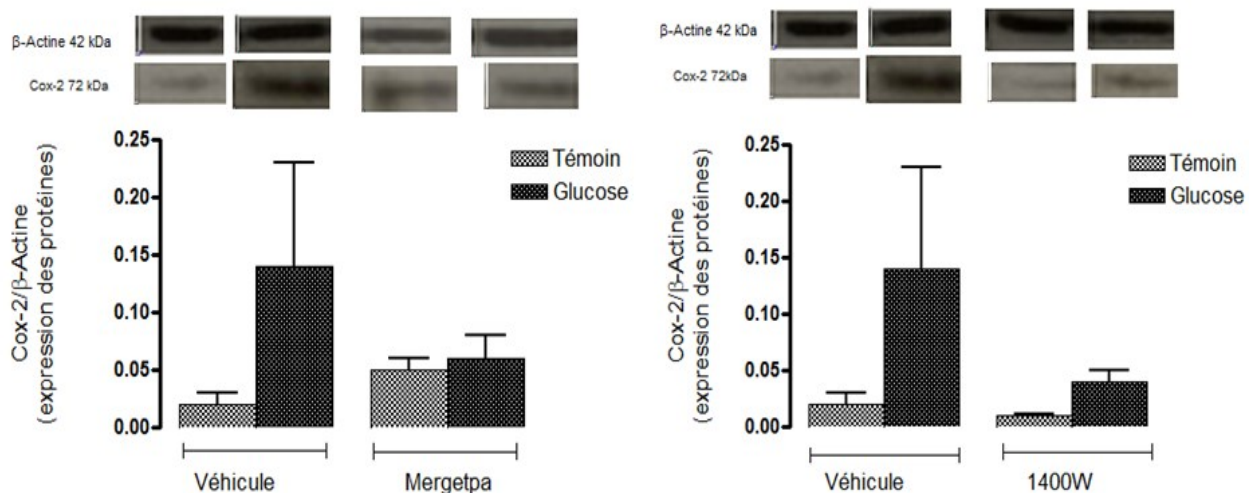


Fig. 32 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de la **cyclooxygénase-2 : Cox-2** dans le rein. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6). Aucune différence significative n'a été mesurée entre les groupes. Les bandes Cox-2 / Dynéine proviennent du même rat.

4.1.11 Effets du Mergetpa et du 1400W sur l'expression de la nitrotyrosine

L'expression de la nitrotyrosine (marqueur de la formation du peroxy-nitrite) est augmentée significativement dans le rein et l'aorte, chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Le traitement pendant une semaine avec le 1400W ou le Mergetpa corrige cette surexpression chez les rats soumis à une diète riche en D-glucose. Dans l'aorte, le 1400W et le Mergetpa réduisent également l'expression de la nitrotyrosine chez les rats témoins. Dans le rein des rats témoins, le traitement avec le 1400W augmente légèrement l'expression de la nitrotyrosine alors que le Mergetpa est sans effet significatif (Figs.33 et 34).

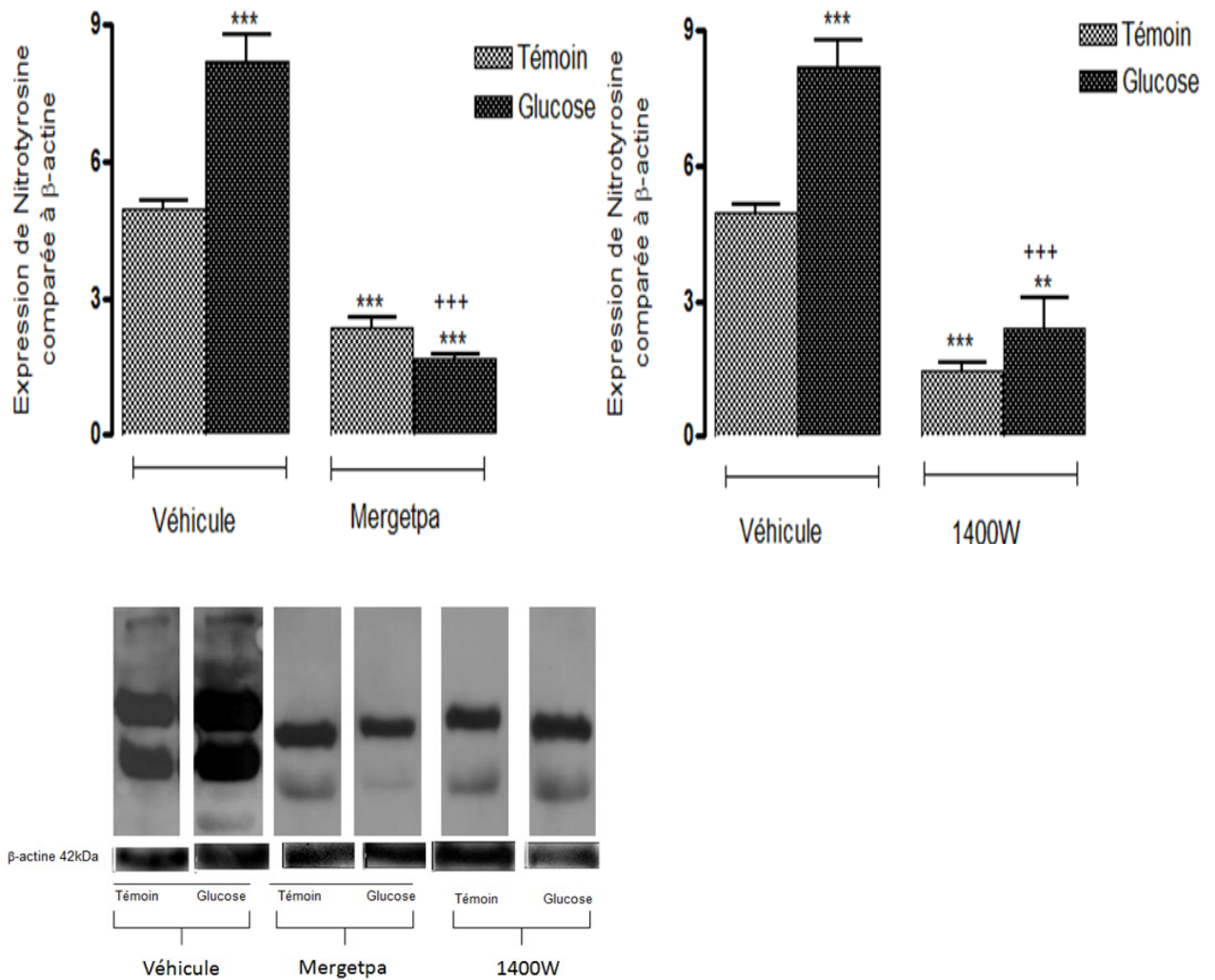


Fig. 33 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2fois/jour) sur l'expression de la **nitrotyrosine dans l'aorte**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ vs Témoins, +++ $P < 0.001$ vs glucose. Les bandes nitrotyrosine / β -actine proviennent du même rat.

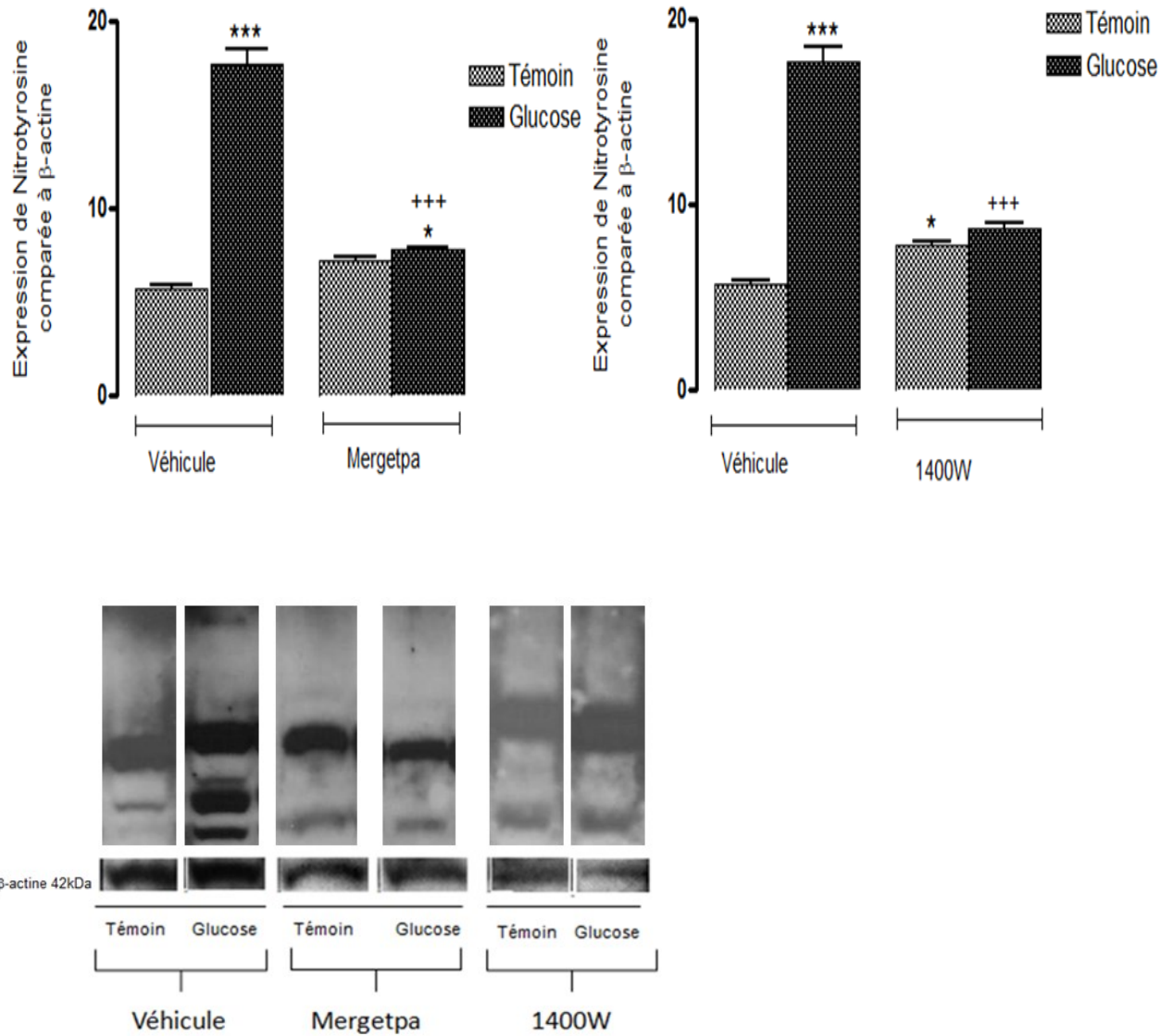


Fig. 34 : Effets d'un traitement d'une semaine avec le Mergetpa (1mg/kg x 2 fois/jour) ou le 1400W (1mg/kg x 2 fois/jour) sur l'expression de **la nitrotyrosine dans le rein**. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=6), *** P<0.001, *P<0.05 vs Témoin, +++P<0.001 vs glucose. Les bandes nitrotyrosine / β -actine proviennent du même rat.

4.2 Résultats chez la souris

Dans ce modèle de diabète de type 2 associé à l'obésité, les résultats obtenus chez la souris *in vivo* sont représentés par le poids, l'IPGTT, l'IPISTT. Pour les résultats *ex vivo*, seulement les taux de leptine et d'insuline plasmatiques par ELISA ont été effectués (l'extraction des protéines et d'ARN sont en cours pour effectuer l'immunobuvardage de type western et le RT-qPCR).

4.2.1 Effets du SSR et du TZD sur le poids corporel

Les souris soumises au régime riche en gras (HFD) présentent une augmentation significative du poids corporel par rapport aux souris soumises à une diète standard (SD). Les traitements pendant les deux dernières semaines avec un antagoniste du RB1 (SSR) ou avec le pioglitazone (un antidiabétique, agoniste des PPAR γ , de la famille des thiazolidinediones) (TZD) ou les deux, n'ont pas affecté significativement la prise pondérale corporelle chez les souris HFD et SD (Fig. 35).

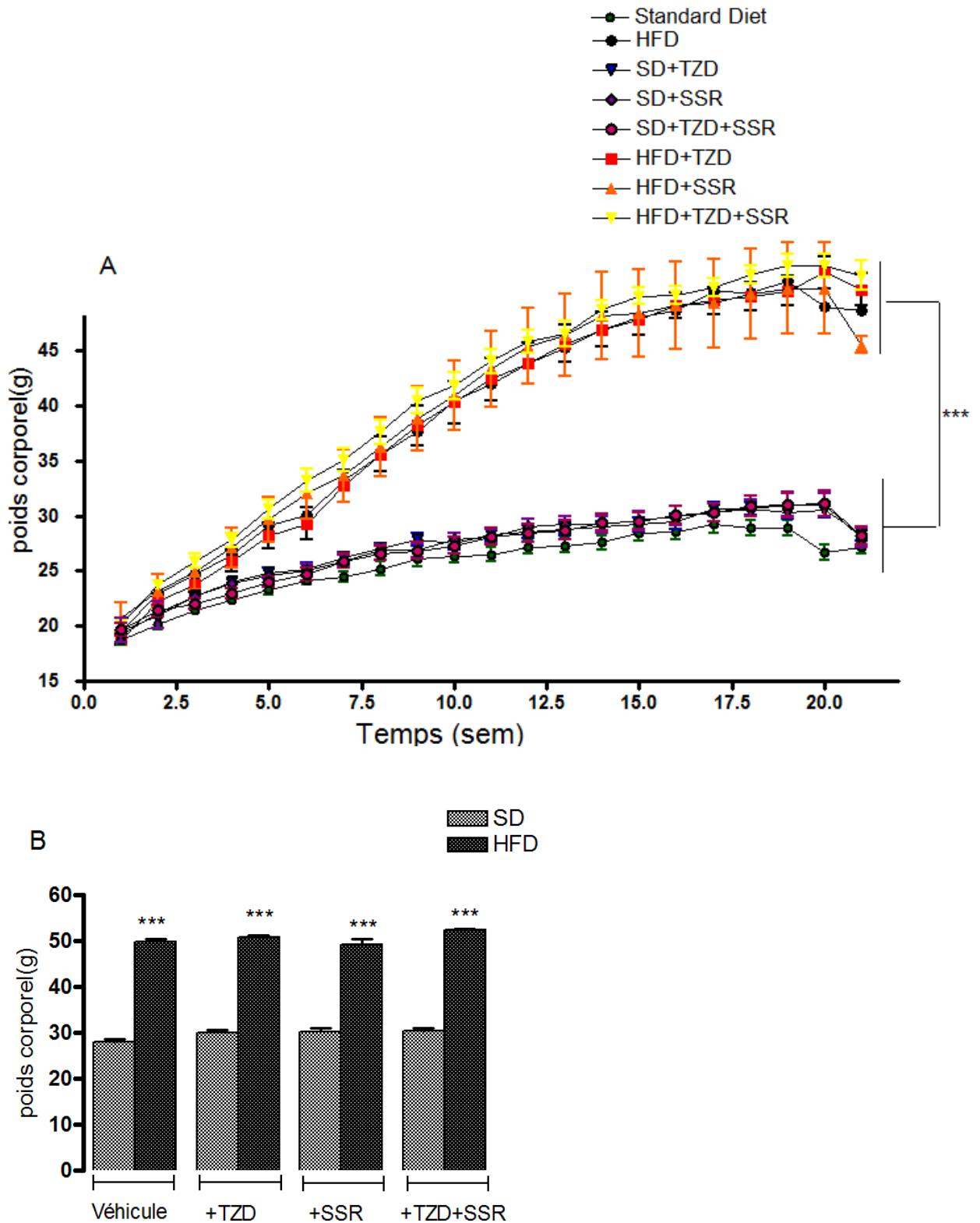


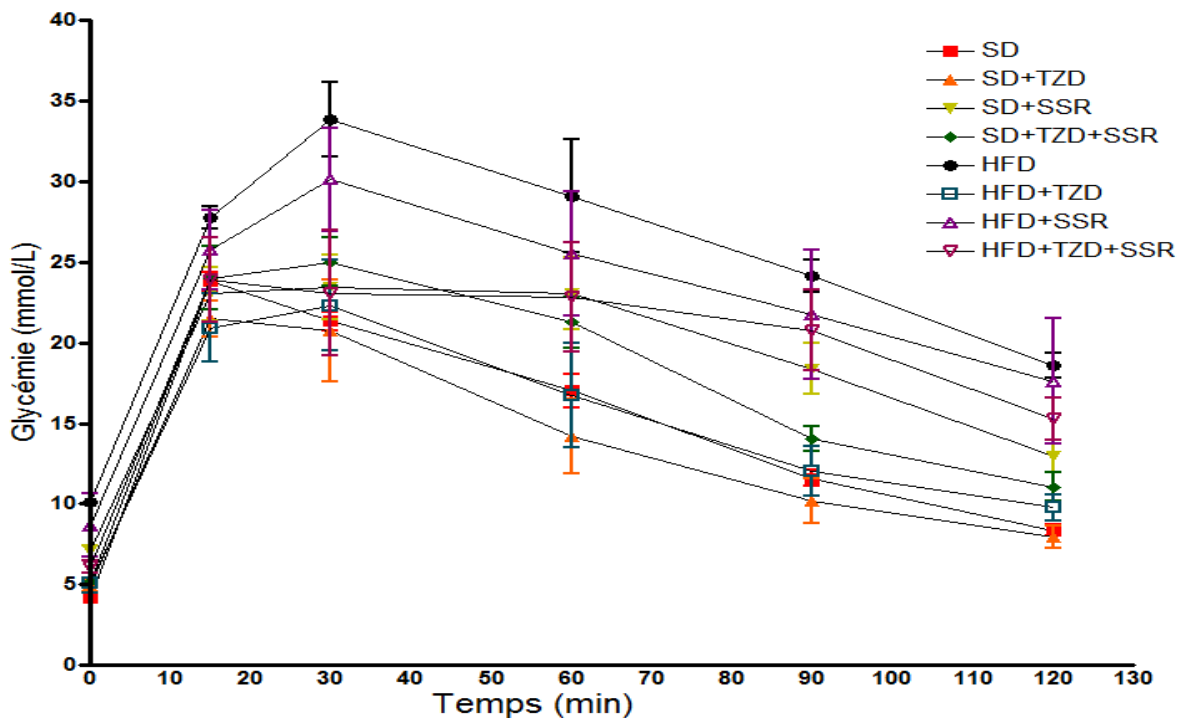
Fig. 35 : Effets d'un traitement de deux semaines (semaines 19 à 21) avec TZD (1.6 mg/g/jour en sous-cutané) et/ou avec le SSR240612 (10 µg/g/jour en sous-cutané) sur le poids corporel. A) poids corporel de la 1^{ère} sem jusqu'au sacrifice. B) poids corporel au sacrifice (semaine 21). Les valeurs représentent les moyennes ± écarts-types (n=10), *** P<0.001 vs SD.

4.2.2 Effets du SSR et du TZD sur l'IPGTT

La tolérance au glucose est estimée par IPGTT (Intra Peritoneal Glucose Tolerance Test). Les souris sont mises au jeûne pendant la nuit pour une période de 18h. En matinée, une solution concentrée à 50% de D-glucose est administrée par voie intrapéritonéale (2 g/kg). La glycémie est ensuite prise, à l'aide d'un glucomètre, après 15, 30, 60, 90 et 120 minutes pour évaluer la tolérance au glucose.

Chez les souris soumises au régime riche en gras (HFD), l'intolérance au glucose augmente significativement lorsque comparée aux souris soumises à une diète standard (SD). Le traitement avec l'antidiabétique, le TZD, corrige l'intolérance en ramenant la sensibilité au glucose. Bien que le traitement avec le SSR (antagoniste RB1) semble améliorer légèrement la sensibilité au glucose, le SSR rend moins efficace l'effet inhibiteur du TZD. Chez les souris soumises à la diète standard, les traitements n'ont pas eu d'effet significatif (Fig. 36).

A



B

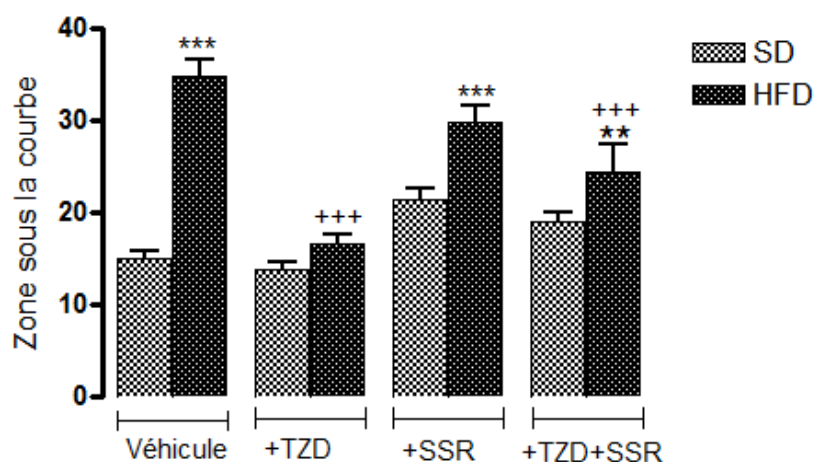


Fig. 36 : A) Après 18h de jeûne, l'IPGTT est effectué en administrant 2g/kg de D-glucose par voie intrapéritonéale. B) À partir de ces courbes, les zones sous la courbe ont été calculées pour estimer la tolérance au glucose chez la souris correspondante. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=10). ***P<0.001, **P<0.01 vs SD, +++P<0.001 vs HFD-véhicule.

4.2.3 Effets du SSR et du TZD sur l'IPIST

La sensibilité à l'insuline est mesurée par IPIST (Intra Peritoneal Insulin Sensibility Test). Les souris sont mises à jeun pendant la nuit pour une période de 18h. En matinée, une solution d'insuline est administrée par voie intrapéritonéale (de l'insuline porcine - I 5523 - SIGMA, à 0.5 mUI/g de souris). La glycémie est ensuite prise à l'aide d'un glucomètre après 15, 30, 60, 90 et 120 minutes pour évaluer la sensibilité à l'insuline. Chez les souris soumises au régime riche en gras (HFD) la sensibilité à l'insuline diminue significativement lorsque comparée aux souris soumises à une diète standard (SD). En effet, l'insuline ne réussit pas à abaisser la glycémie qui demeure élevée durant tout le test. Le traitement combiné du TZD+SSR corrige davantage la perte de la sensibilité à l'insuline que le TZD seul. Le SSR seul n'a aucun effet sur la sensibilité à l'insuline chez

les souris (HFD) alors qu'il réduit la sensibilité chez la souris soumises à une diète standard (SD) (Fig. 37).

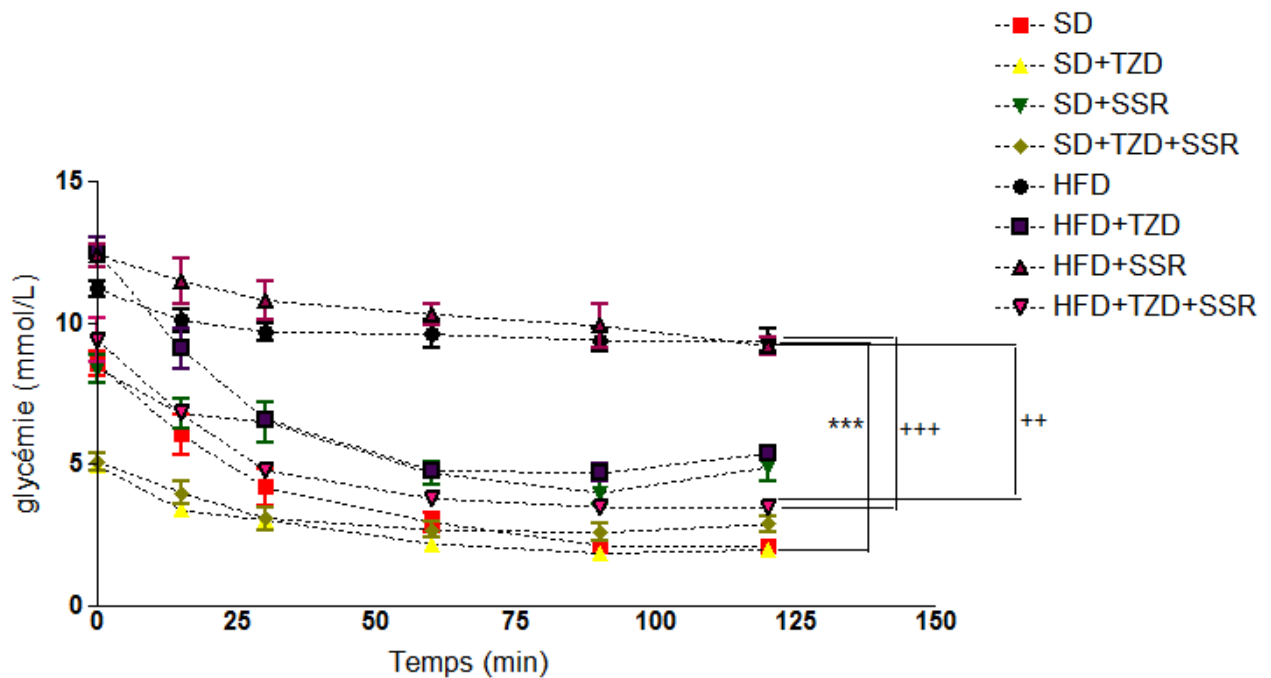


Fig. 37 : Après 18h de jeûne, l'IPIST est effectué en administrant 0.5 mUI/g d'insuline porcine par voie intra péritonéale. Les valeurs représentent les moyennes \pm écarts-types (n=10). ***P<0.001vs SD, +++P<0.001 vs HFD+TZD+SSR, ++P<0.01 HFD+SSR vs HFD+TZD+SSR.

4.2.4 Effets du SSR et du TZD sur l'insuline

Les souris soumises au régime riche en gras (HFD) présentent une augmentation significative de l'insuline plasmatique lorsque comparée aux souris soumises à une diète standard (SD). Chez les souris HFD, le traitement avec le TZD réduit significativement le taux d'insuline plasmatique, alors que le traitement avec le SSR n'a aucun effet significatif. Le traitement conjoint TZD et SSR n'a pas eu un effet inhibiteur additif par rapport au traitement TZD seul. Aucun des traitements n'a eu un effet significatif chez les souris SD (Fig. 38).

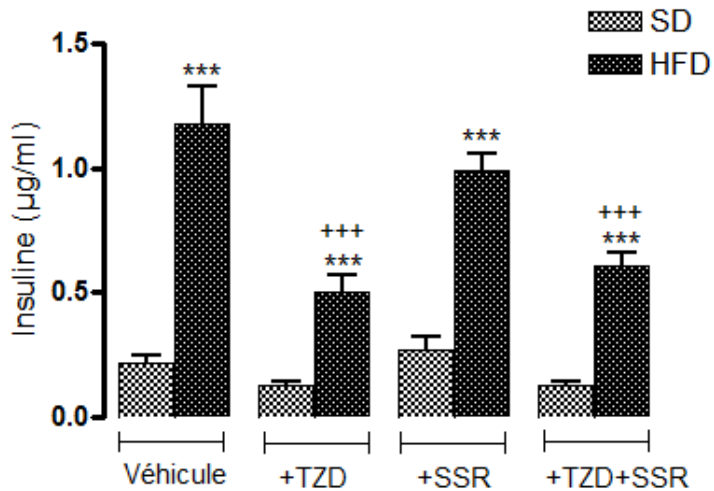


Fig. 38 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD (1.6 mg/g/jour en sous-cutané) et/ou avec le SSR240612 (10 µg/g/jour en sous-cutané) sur les taux plasmatiques de l'insuline. Les valeurs représentent les moyennes ± écarts-types (n=10), *** P<0.001 vs SD, +++P<0.001 vs HFD-véhicule.

4.2.5 Effets du SSR et du TZD sur la leptine

Les souris soumises au régime riche en gras (HFD) présentent une augmentation significative de la leptine circulante lorsque comparée aux souris soumises à une diète standard (SD). Chez les souris HFD, le traitement avec le SSR réduit significativement les taux de leptine alors que le TZD n'a pas d'effet significatif. Le traitement combiné TZD et SSR réduit les taux plasmatiques de leptine à des valeurs comparables à celles du traitement unique avec le SSR. Aucun des traitements n'a eu un effet significatif chez les souris SD (Fig. 39).

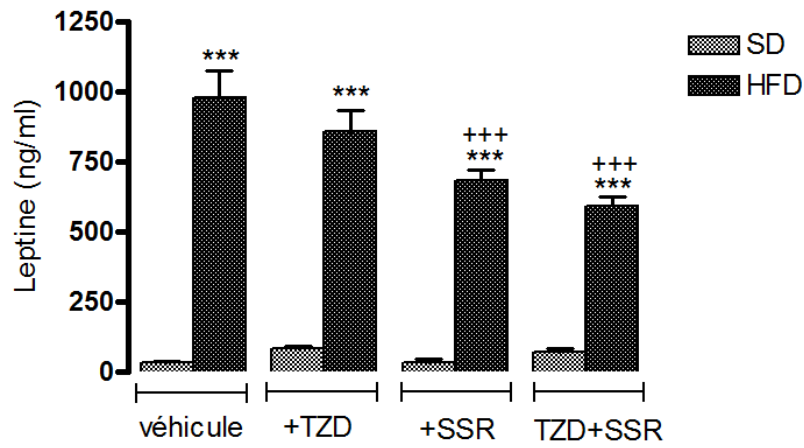


Fig. 39 : Effets d'un traitement de deux semaines avec TZD (1.6 mg/g/jour en sous-cutané) et/ou avec le SSR240612 (10 µg/g/jour en sous-cutané) sur les taux plasmatiques de **la leptine**. Les valeurs représentent les moyennes ± écarts-types (n=10), *** P<0.001 vs SD, +++P<0.001 vs HFD-véhicule.

Cinquième Chapitre

Discussion

5. Discussion

5.1 Discussion des résultats chez le rat

Les résultats obtenus dans ce mémoire visent à mieux comprendre et à connaître le rôle du RB1 dans l'insulino-résistance et le diabète de type 2 et, en particulier, à définir la contribution de la iNOS dans les effets délétères du RB1 et ceci :

- par l'inhibition de la iNOS en utilisant un inhibiteur spécifique, le 1400W (Garvey et al., 1997), sachant que le RB1 augmente l'expression de la iNOS (via le stress oxydatif) (Dias et al., 2012 b) et l'activité de la iNOS par la voie des MAP kinases (Kuhr et al., 2010).
- par la suppression de la formation des agonistes endogènes pour le RB1 par le Mergetpa (Salgado et al., 1986), qui devrait prévenir l'induction de la iNOS et reproduire les mêmes effets que le SSR240612 (antagoniste du RB1).

La consommation des hydrates de carbone (boissons sucrées, sirop, desserts sucrés) représente un risque majeur dans le développement du diabète de type 2 et l'insulino-résistance. Dans le but d'avoir un modèle représentatif de la diète de notre société, notre laboratoire a utilisé le modèle de rat rendu insulino-résistant avec une consommation élevée en hydrates de carbone (accès libre et à volonté à l'eau de boisson contenant 10% de D-glucose). L'équipe du Dr de Champlain a montré que ces rats traités au D-glucose pendant 4 semaines développent les symptômes du DT2 tels l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hypertension, la résistance à l'insuline et une augmentation de l'anion superoxyde dans le cœur et les vaisseaux sanguins (El Midaoui et al., 2002, 2005). Notre équipe a aussi montré des symptômes de douleur neuropathique caractérisés par le développement des allodynies tactile et au froid (Dias et al., 2010;

Ismael et al., 2008; Lungu et al., 2007). Cette exposition chronique au régime riche en glucose a permis de développer un modèle nutritionnel non génétique et peu coûteux. Ce modèle d'insulino-résistance permet de mieux comprendre les mécanismes qui déclenchent le DT2. Toutefois, ce modèle présente aussi des limites car il ne permet pas de bien étudier les complications vasculaires. La phase pré-diabétique ne montre que des changements anatomiques mineurs au niveau de la structure vasculaire sans aucune hypertrophie vasculaire ou cardiaque (Pilon et al., 2009).

L'inflammation et le stress oxydatif via les espèces réactives oxygénées (ERO) induisent l'expression du RB1 (Ismael et al., 2008; Lungu et al., 2007). Ce dernier active la iNOS par la voie de Gαi et la ERK/MAP kinase (Brovkovych et al., 2011). La iNOS génère une grande quantité de NO qui, se trouvant dans un milieu oxydatif en présence de l'anion superoxyde, forme le peroxynitrite hautement toxique, et diminue la biodisponibilité du NO (Couture et al., 2014). De plus, le RB1 active la NADPH oxydase qui augmente la formation de l'anion superoxyde (Dias et al., 2010). Ainsi, le RB1 amplifie et perpétue le stress oxydatif.

-Similitudes entre l'inhibition du RB1 et de la iNOS

Le traitement pendant une semaine avec l'antagoniste du RB1, le SSR240612, a permis de réduire ou de corriger l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'indice HOMA (indice de la résistance à l'insuline) chez les rats soumis au régime riche en D-glucose (Dias et al., 2012 a; Dias et al., 2010). Dans notre étude, le traitement pendant une semaine avec le 1400W chez les rats traités au D-glucose a permis de corriger l'hyperglycémie et l'indice HOMA, par l'inhibition de la iNOS et de la surproduction du NO. Il a été montré que la iNOS est impliquée dans la résistance à l'insuline (Cook et al., 2002). En effet, la

délétion génétique de la iNOS prévient le développement de la résistance à l'insuline chez la souris exposée à une diète riche en gras (Perreault et al., 2001).

Toutefois, le traitement pendant une semaine avec le 1400W chez les rats insulino-résistants n'a pas diminué la hausse de la leptine plasmatique ni l'intolérance au glucose, bien que la résistance à la leptine soit un signe de la résistance à l'insuline (Badman et al., 2007; Wheatcroft et al., 2003) et qu'une correction de la résistance à l'insuline devrait améliorer la résistance à la leptine et l'intolérance au glucose. Bien que de plus amples études soient nécessaires pour élucider ce paradoxe, il faut noter qu'un traitement d'une semaine avec le SSR n'a pas affecté les taux élevés de leptine dans ce modèle (Dias et al., 2012 a). Ces résultats montrent donc une dissociation entre le RB1, la iNOS et la leptine. Le RB1 semble donc corriger la résistance à l'insuline par un mécanisme périphérique (vraisemblablement via la iNOS) indépendant de la leptine qui agit centralement sur le centre de l'appétit.

Le gain de poids corporel présente une différence significative entre les rats glucosés et les rats témoins. Le traitement avec le 1400W, inhibiteur sélectif de la iNOS, n'a pas d'effet chez les rats témoins. Par contre, il a causé une perte significative de gain de poids chez les rats glucosés. Ce résultat est en accord avec le SSR qui a permis de prévenir le gain de poids chez les rats glucosés (Dias et al., 2012 a). Une étude sur la composition corporelle sera nécessaire afin de déterminer si le 1400W réduit le gain de la masse adipeuse corporelle au même titre que le SSR.

L'exposition des rats au régime riche en D-glucose active la NADPH oxydase qui augmente la production de l'anion superoxyde et les ERO. Ces ERO sont connus pour déclencher l'expression des cytokines proinflammatoires, des interleukines, de la Cox-2

et de la iNOS après activation du NF- κ B (facteur transcriptionnel responsable de la surexpression du RB1 et autres gènes proinflammatoires) (Passos et al., 2004; Shoelson et al., 2006). En activant à son tour la NADPH oxydase, le RB1 amplifie et perpétue ce processus inflammatoire créant un véritable cercle vicieux (Couture et al., 2014). L'inhibition prolongée du RB1 a permis d'interrompre la boucle de rétroaction positive (ERO-RB1-cytokines) et de renverser la surexpression du RB1 et des marqueurs de l'inflammation, la résistance à l'insuline et le développement du DT2 (Dias et al., 2012 b; Dias et al., 2010).

Dans notre étude, l'inhibition de la iNOS par le 1400W a aussi permis de corriger la surexpression du RB1, de la iNOS, de l'IL-1 β , de la Cox-2 avec une légère diminution de la production basale de l'anion superoxyde. Cette inhibition de la iNOS avec le 1400W a aussi diminué la surexpression de la nitrotyrosine (marqueur de la formation du peroxy-nitrite) par la diminution du NO et de l'anion superoxyde (Johansen et al., 2005).

Le traitement prolongé pendant une semaine avec des antagonistes du RB1 qui traversent la barrière hémato-encéphalique (SSR) (Dias et al., 2010) et LF22-0542 (Lungu et al., 2007) a permis de renverser l'hypertension artérielle chez les rats insulino-résistants. Par contre, l'administration prolongée de l'antagoniste du RB1 qui ne traverse pas la barrière (R715) ne bloque pas l'hypertension (Lungu et al., 2007). Une étude a montré que la surexpression du RB1 contribue via un mécanisme dopaminergique intracérébral au maintien de l'hypertension dans des modèles génétiques et expérimentaux d'hypertension chez le rat (De Brito Gariépy et al., 2010).

Des études ont montré que le 1400W infusé à forte dose (2.5 mg/kg/h), pendant 72h avec des mini-pompes osmotiques par voie intrapéritonéale, prévient les dommages

cérébraux induits par la iNOS dans un modèle d'ischémie cérébrale chez le rat (Pérez-Asensio et al., 2005). Dans notre étude, le 1400W n'a pas eu d'effet sur l'hypertension malgré sa capacité à agir centralement. Ce résultat suggère que la iNOS n'est pas impliquée dans l'hypertension artérielle associée à l'action centrale du RB1. Cette affirmation devra cependant être appuyée par d'autres études. Entre autres, nous devons mesurer l'impact du traitement avec le 1400W sur l'expression du RB1 dans le cerveau. Il est possible que l'inhibition de la iNOS supprime l'expression du RB1 seulement en périphérie.

L'augmentation du stress oxydatif associée à l'hyperglycémie cause aussi la neuropathie diabétique dans notre modèle (Dias et al., 2010). Un traitement prolongé avec l'antagoniste du RB1, le SSR240612, corrige la neuropathie diabétique représentée par des allodynies tactile et au froid (Dias et al., 2010). Cette inhibition semble associée au RB1 en périphérie car l'antagoniste peptidergique R715, qui ne pénètre pas dans le cerveau, bloque également cette réponse neuropathique (Lungu et al., 2007). Le traitement prolongé pendant une semaine avec l'inhibiteur de la iNOS, le 1400W, a permis de corriger l'allodynie au froid et d'améliorer l'allodynie tactile (des données additionnelles seront nécessaires sur ce paramètre) chez les rats insulino-résistants, suggérant un rôle de la iNOS dans l'effet délétère du RB1 sur la neuropathie.

L'expression de la CPM augmente dans les tumeurs et l'inflammation (Deiteren et al., 2009; Denis et al., 2013) ainsi que dans notre modèle de rats insulino-résistants. L'inhibition de la iNOS par le 1400W montre une diminution dans l'expression de la CPM. Ceci nous mène à nous intéresser à l'action de la iNOS, en amont, sur la synthèse de l'agoniste endogène du RB1, et à la relation qui existe entre la iNOS et la CPM dans l'inflammation. Le scénario plausible est que l'inhibition de l'inflammation par

le 1400W inhibe tous les marqueurs inflammatoires, incluant la CPM. Ceci montre que l'effet délétère de la iNOS peut agir à la fois sur l'expression du RB1 et sur sa voie d'activation par les agonistes endogènes. Par conséquent, l'interaction RB1 et iNOS serait réciproque en vue d'amplifier l'inflammation.

Le RB2 des kinines est présent dans divers tissus et est responsable de la phase aiguë de l'inflammation (Bhoola et al., 1992; Couture et al., 2001). Aucune différence n'a été montrée dans son expression rénale entre les rats glucosés et témoins. Cependant, le traitement avec le 1400W cause une diminution de l'expression du RB2 (dans le rein) qui peut être due à l'action du 1400W sur la eNOS bien que le 1400W soit 200-500 fois plus sélectif pour la iNOS que pour la eNOS (activée par le RB2) et la nNOS (Lehnardt et al., 2002). L'effet du 1400W sur l'expression du RB2 chez le rat témoin (inhibition dans le rein et augmentation dans le foie) rend cependant l'interprétation plus difficile.

-Similitudes entre l'inhibition du RB1 et de la CPM

Le second volet des résultats porte sur l'effet de la suppression de la formation des agonistes endogènes pour le RB1 par le Mergetpa qui devrait prévenir l'induction de la iNOS et reproduire les mêmes effets que l'antagoniste du RB1 (SSR240612).

Les conditions inflammatoires dans le diabète déclenchent la cascade protéolytique aboutissant à la formation des agonistes endogènes du RB1 par la CPM (Couture et al., 2014; Kashuba et al., 2013).

La CPM est constitutive et présente dans plusieurs tissus (système hématopoïétique, cellules mésenchymateuses, système respiratoire, rein, SNC, SNP, système cardiovasculaire, etc.). Son expression est augmentée dans l'inflammation et les

tumeurs (Deiteren et al., 2009; Zhang et al., 2011) . La CPM est ancrée à la membrane par le GPI à la surface extracellulaire à côté du RB1 et forme un complexe CPM-RB1 qui permet la livraison rapide et efficace des agonistes endogènes et l'activation du RB1 (Kuhr et al., 2010; Zhang et al., 2011). Pour bloquer ce complexe, on a utilisé le Mergetpa (DL-2-Mercaptomethyl-3-guanidino-ethylthio-propanoic acid) qui est un inhibiteur compétitif mais non sélectif pour la CPM (Salgado et al., 1986) puisqu'il agit sur d'autres carboxypeptidases (Deiteren et al., 2009).

Bien que le traitement prolongé pendant une semaine avec le Mergetpa n'ait pas causé de différence significative sur le poids corporel chez les rats glucosés et les rats témoins, la prise de poids chez les rats glucosés pendant la durée du traitement a été abolie au même titre qu'avec le traitement au 1400W (présente étude) et le SSR (Dias et al., 2012 a). De plus, le Mergetpa a permis de réduire l'hyperglycémie, l'indice HOMA, la surexpression de l'IL-1 β et de la COX-2 ainsi que la production basale de l'anion superoxyde. Ce traitement avec le Mergetpa chez les rats glucosés a aussi permis de réduire la surexpression de la CPM contribuant à l'inhibition de la formation des agonistes et de l'induction du RB1. Ceci étant conforme à l'inhibition de la surexpression de la iNOS et de la nitrotyrosine (marqueur du peroxyde nitrique).

L'effet central et la capacité du Mergetpa à traverser la barrière hémato-encéphalique demeurent inconnus. Il n'a pas pu corriger l'hypertension, l'intolérance au glucose et l'augmentation du taux plasmatique de la leptine chez les rats glucosés et l'explication pourrait venir de son incapacité à pénétrer le cerveau pour inhiber la CPM. Bien que de plus amples études soient nécessaires pour clarifier ce point, ces résultats sont similaires à ceux obtenus avec le 1400W et le SSR tel que discuté ci-haut.

Le traitement pendant une semaine avec le Mergetpa a permis de réduire significativement l'allodynie au froid et d'améliorer l'allodynie tactile chez les rats insulino-résistants. Des études additionnelles seront requises pour confirmer son effet sur l'allodynie tactile qui n'a pas montré de changements significatifs contrairement à nos études précédentes (Dias et al., 2010).

Le traitement prolongé avec le Mergetpa chez les rats insulino-résistants a permis d'abolir la surexpression du RB1 et d'augmenter l'expression du RB2 chez les rats témoins. Ce mécanisme demeure à être expliqué bien qu'il puisse s'agir d'un mécanisme compensatoire. En effet, l'expression du RB2 est augmentée dans des modèles de souris génétiquement modifiées avec une délétion du RB1 (RB1KO-Knockout) (Couture et al., 2014; Marcon et al., 2013). Cet effet du Mergetpa à l'égard du RB2 qui s'est manifesté chez les rats témoins et non pas chez les rats glucosés reste à élucider.

5.2 Discussion des résultats chez la souris

Les souris C57BL/6J nourries pendant 20 semaines avec une diète riche en gras (HFD) développent une résistance à l'insuline et le DT2 associé à l'obésité (El Akoum et al., 2011; Panchal et al., 2011; Shertzer et al., 2011). Les taux plasmatiques de l'insuline et de la leptine augmentent et affectent l'homéostasie du glucose contribuant à l'hyperglycémie et à l'hyperinsulinémie (Toyoshima et al., 2005). Les résultats obtenus dans cette étude visent à mieux comprendre et à connaître le rôle du RB1 dans ce modèle de DT2 associé à l'obésité, et ceci en déterminant l'effet de l'inhibition conjointe ou séparée du RB1 et du PPAR γ sur la prise pondérale et la résistance à l'insuline.

Des études ont montré que le traitement avec le SSR pendant une semaine chez les rats insulino-résistants cause une perte du gain de poids, de la masse adipeuse et une réduction des acides gras plasmatiques (Dias et al., 2012 a). Des études effectuées chez la souris ont montré que la déficience en RB1 cause une hypoleptinémie, une hypoinsulinémie, une amélioration de la sensibilité à la leptine et augmente la résistance à l'obésité en protégeant les souris contre l'effet de l'exposition au HFD (Mori et al., 2008).

Le poids corporel des souris soumises au régime HFD présente une augmentation importante par rapport aux souris soumises à une diète standard. Le traitement prolongé pendant deux semaines avec le SSR n'a pas eu d'effet significatif, ce qui reste à comparer avec le traitement pour six semaines (en cours pour confirmer l'effet du SSR sur la prise pondérale). De plus, le traitement avec le TZD seul (un antidiabétique qui active le PPAR γ) ou combiné avec le SSR n'a pas eu d'effet sur le poids corporel. Une période de traitement plus prolongée (6 semaines) est en cours d'analyse.

Le traitement d'une semaine avec l'antagoniste du RB1, le SSR, a permis de réduire ou de corriger l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie et l'indice HOMA (indice de la résistance à l'insuline) chez les rats insulino-résistants (Dias et al., 2012 b; Dias et al., 2010). Le traitement de deux semaines avec le TZD seul, chez la souris soumise à une diète riche en gras, a permis de corriger l'hyperinsulinémie, l'intolérance au glucose et la résistance à l'insuline (test IPIST) sans que le traitement avec le SSR seul ou combiné avec le TZD ait un effet correctif ou additif sur ces paramètres. Ceci suggère que le SSR dans ce modèle avancé de DT2 n'apporte pas l'effet souhaité contrairement au modèle des rats traités au D-glucose (insulino-résistants).

Le taux plasmatique élevé de la leptine a été cependant diminué par le traitement prolongé avec le SSR chez les souris soumises au HFD. Le traitement combiné du SSR + TZD n'a pas eu d'effet additif, suggérant un rôle du RB1 dans la résistance à la leptine dans ce modèle de DT2 associé à l'obésité. D'autre part, l'inhibition en amont (par le Mergetpa) et en aval (par le 1400W) du RB1 n'a pas réduit le taux plasmatique de la leptine chez les rats insulino-résistants. Ceci nous mène à conclure que le RB1 contrôle le taux de leptine dans le modèle de DT2 avancé associé à l'obésité mais non chez le rat insulino-résistant (prédiabète).

D'autres études en cours sont nécessaires pour compléter les résultats du protocole de deux semaines chez la souris et de les comparer avec celui de 6 semaines de traitement afin d'en tirer des conclusions plus convaincantes.

Sixième Chapitre
Conclusion & Perspectives

6- Conclusion

Le traitement d'une semaine avec le 1400W, un inhibiteur sélectif de la iNOS, ou avec le Mergetpa, un inhibiteur compétitif mais non sélectif pour la CPM, a permis de corriger l'hyperglycémie, la résistance à l'insuline (en diminuant l'indice HOMA) et de diminuer l'allodynie au froid (un aspect de la neuropathie diabétique) chez les rats insulino-résistants. Ces deux traitements ont permis aussi de diminuer l'expression des biomarqueurs représentatifs de l'inflammation en réduisant la surexpression du RB1, l'anion superoxyde, la Cox-2, l'interleukine-1 β , la iNOS et la nitrotyrosine (marqueur de la formation de peroxynitrite). Ceci reproduit les effets bénéfiques de l'antagoniste du RB1 (le SSR240612) dans ce modèle et suggère un rôle de la iNOS dans les effets délétères du RB1 en périphérie, appuyant les deux hypothèses de travail.

7- Perspectives

D'autres études peuvent être envisagées pour mieux comprendre les mécanismes entre le modèle pré-diabétique chez le rat insulino-résistant et celui du DT2 associé à l'obésité chez la souris soumise à une diète riche en gras. L'inhibition des effets du RB1, en aval par le 1400W et en amont par le Mergetpa, exige de plus amples recherches et, en particulier, sur l'effet des traitements sur l'hypertension et sur les taux plasmatiques de la leptine. La capacité du 1400W à traverser la barrière hémato-encéphalique pour bloquer la iNOS et l'expression du RB1 restent à déterminer. D'autres études seront aussi nécessaires pour vérifier le passage du Mergetpa à travers la barrière hémato-encéphalique, sachant que le Mergetpa par son action non sélective sur la kininase I agit sur d'autres enzymes (par un mécanisme non connu). D'autres inhibiteurs plus sélectifs de la kininase I demandent à être développés.

Des études, en cours, chez la souris exposée au HFD et traitée pendant 6 semaines avec le SSR et le TZD, permettront de mieux comprendre les résultats obtenus à deux semaines. La finalité étant d'élucider le rôle du RB1 sur la prise pondérale, la résistance à l'insuline et l'adiposité dans le DT2.

Liste des Références

Liste des références

- Abelous, J., Bardier, E. (1909). *Les substances hypotensives de l'urine humaine normale*. *C R Soc Biol.* 66, (Vol. 66).
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nat Med*, 19(5), 557-566. doi: 10.1038/nm.3159.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. [Review]. *Biochem J*, 357(Pt 3), 593-615.
- Badman, M. K., & Flier, J. S. (2007). The Adipocyte as an Active Participant in Energy Balance and Metabolism. *Gastroenterology*, 132(6), 2103-2115. doi: <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2007.03.058>.
- Bai, L., Wang, Y., Fan, J., Chen, Y., Ji, W., Qu, A., Xu, P., James, D. E., & Xu, T. (2007). Dissecting Multiple Steps of GLUT4 Trafficking and Identifying the Sites of Insulin Action. *Cell Metabolism*, 5, 47-57. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.013>.
- Barathi, S., Angayarkanni, N., & Sumantran, V. N. (2010). GLUT-1 Expression in Bovine Retinal Capillary Endothelial Cells and Pericytes Exposed to Advanced Glycation End Products. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 51, 6810-6814. doi: 10.1167/iovs.10-5312.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, 44(1), 1-80.
- Blaes, N., Pecher, C., Mehrenberger, M., Cellier, E., Praddaude, F., Chevalier, J., Tack, I., Couture, R., & Girolami, J. P. (2012). Bradykinin inhibits high glucose- and growth factor-induced collagen synthesis in mesangial cells through the B2-kinin receptor. *Am J Physiol Renal Physiol*, 303(2), F293-303. doi: 10.1152/ajprenal.00437.2011.
- Brovkovych, V., Zhang, Y., Brovkovych, S., Minshall, R. D., & Skidgel, R. A. (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 15(2), 258-269. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00992.x.
- Camenzind, R. S., Chip, S., Gutmann, H., Kapfhammer, J. P., Nitsch, C., & Bendfeldt, K. (2010). Preservation of transendothelial glucose transporter 1 and P-glycoprotein transporters in a cortical slice culture model of the blood-brain barrier. *Neuroscience*, 170(1), 361-371. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.073.
- Cariou, B., Charbonnel, B., & Staels, B. (2012). Thiazolidinediones and PPARγ agonists: time for a reassessment. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(5), 205-215. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.001>.
- Cellier, E., Mage, M., Duchene, J., Pecher, C., Couture, R., Bascands, J. L., & Girolami, J. P. (2003). Bradykinin reduces growth factor-induced glomerular ERK1/2 phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 284(2), F282-292. doi: 10.1152/ajprenal.00115.2002.

- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., & Yaksh, T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53(1), 55-63. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9).
- Chen, X., Orfanos, S. E., Ryan, J. W., Chung, A. Y., Hess, D. C., & Catravas, J. D. (1991). Species variation in pulmonary endothelial aminopeptidase P activity. *J Pharmacol Exp Ther*, 259(3), 1301-1307.
- Choi, Y., Yoon, Y., Na, H., Kim, S., & Chung, J. (1994). Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 59, 369 - 376.
- Cook, S., & Scherrer, U. (2002). Insulin resistance, a new target for nitric oxide-delivery drugs. *Fundam Clin Pharmacol*, 16(6), 441-453.
- Couture, R., Blaes, N., & Girolami, J. P. (2014). Kinin Receptors in Vascular Biology and Pathology. *Curr Vasc Pharmacol*, 12, 223-248.
- Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M., & Cloutier, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, 429(1-3), 161-176.
- Couture, R., & JP., G. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*, 500(1-3), 467-485. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.045.
- De Brito Gariépy, H., Carayon, P., Ferrari, B., & Couture, R. (2010). Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides*, 44(2), 191-198. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.011.
- Deiteren, K., Hendriks, D., Scharpe, S., & Lambeir, A. M. (2009). Carboxypeptidase M: Multiple alliances and unknown partners. *Clin Chim Acta*, 399(1-2), 24-39. doi: 10.1016/j.cca.2008.10.003
- Denis, C., & AM., L. (2013). The potential of carboxypeptidase M as a therapeutic target in cancer. *health informa, UK.*, 17, 265-279. doi: 10.1517/14728222.2012.741122.
- Dias, J. P., & Couture, R. (2012 a). Blockade of kinin B1 receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14, 244-253. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x.
- Dias, J. P., & Couture, R. (2012 b). Suppression of Vascular Inflammation by Kinin B1 Receptor Antagonism in a Rat Model of Insulin Resistance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 60, 61-69. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182576277.
- Dias, J. P., Ismael, M. A., Pilon, M., de Champlain, J., Ferrari, B., Carayon, P., & Couture, R. (2007). The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol*, 152(2), 280-287. doi: 10.1038/sj.bjp.0707388.
- Dias, J. P., Talbot, S., Senecal, J., Carayon, P., & Couture, R. (2010). Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*, 5(9), e12622. doi: 10.1371/journal.pone.0012622.

- Duez, H., Pavlic, M., & Lewis, G. F. (2008). Mechanism of intestinal lipoprotein overproduction in insulin resistant humans. *Atherosclerosis Supplements*, 9(2), 33-38. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2008.05.013>.
- El Akoum, S., Lamontagne, V., Cloutier, I., & Tanguay, J. F. (2011). Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol Metab Syndr*, 3(34), 1758-5996.
- El Midaoui, A., & de Champlain, J. (2002). Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension*, 39(2), 303-307.
- El Midaoui, A., & de Champlain, J. (2005). Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens*, 23(3), 581-588.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, 33, 829-837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Gabra, B. H., Couture, R., & Sirois, P. (2003). [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)*, 19(11), 1101-1110. doi: 10.1051/medsci/200319111101.
- Galic, S., Oakhill, J. S., & Steinberg, G. R. (2010). Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 316(2), 129-139. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2009.08.018>.
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J., & Knowles, R. G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, 272(8), 4959-4963.
- He, Z., & King, G. L. (2004). Protein Kinase C β Isoform Inhibitors: A New Treatment for Diabetic Cardiovascular Diseases. *Circulation*, 110(1), 7-9. doi: 10.1161/01.cir.0000133428.02295.6c.
- Ismael, M. A., Talbot, S., Carbonneau, C. L., Beausejour, C. M., & Couture, R. (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol*, 589(1-3), 66-72. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.05.006
- Jitprasertwong, P., Jaedicke, K. M., Nile, C. J., Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2013). Leptin enhances the secretion of interleukin (IL)-18, but not IL-1 β , from human monocytes via activation of caspase-1. *Cytokine*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.10.008>.
- Johansen, J., Harris, A., Rychly, D., & A, E. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*. doi: 10.1186/1475-2840-4-5.
- Kashuba, E., Bailey, J., Allsup, D., & Cawkwell, L. (2013). The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*, 18(4), 279-296. doi: 10.3109/1354750X.2013.787544.

- Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E. (1930). Der nachweis eines krislauf hormones in der pankreasdruse. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 189, 97-106 (1930), 189, 97-106.
- Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., Brovkovich, V., & Skidgel, R. A. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, 44(2), 145-154. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004
- Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D. J., & Zuraw, B. L. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 57(1), 27-77. doi: 10.1124/pr.57.1.2.
- Lehnardt, S., Lachance, C., Patrizi, S., Lefebvre, S., Follett, P., Jensen, F., Rosenberg, P., Volpe, J., & Vartanian, T. (2002). The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci.*, 22(7), 2478-2486.
- Lungu, C., Dias, J. P., Franca, C. E., Ongali, B., Regoli, D., Moldovan, F., & Couture, R. (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides*, 41(6), 375-387. doi: 10.1016/j.npep.2007.09.005.
- Magnan, C., & Ktorza, A. (2005). Production et sécrétion de l'insuline par la cellule b pancréatique. *EMC Endocrinologie*, 2 241–264.
- Mantzoros, C. S., Magkos, F., Brinkoetter, M., Sienkiewicz, E., Dardeno, T. A., Kim, S. Y., Hamnvik, O. P., & Koniaris, A. (2011). Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301(4), E567-584. doi: 10.1152/ajpendo.00315.2011.
- Marceau, F., & Bachvarov, D. (1998). Kinin receptors. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 16(4), 385-401. doi: 10.1007/bf02737658.
- Marcon, R., Claudino RF, Dutra RC, Bento AF, Schmidt EC, Bouzon ZL, Sordi R, Morais RL, Pesquero JB, & JB., C. (2013). Exacerbation of DSS-induced colitis in mice lacking kinin B(1) receptors through compensatory up-regulation of kinin B(2) receptors: the role of tight junctions and intestinal homeostasis. *British journal of pharmacology*, 168(2), 389-402. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.02136.x.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., & Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7), 412-419.
- Medeiros, R., Cabrini, D. A., Ferreira, J., Fernandes, E. S., Mori, M. A. S., Pesquero, J. B., Bader, M., Avellar, M. C. W., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2004). Bradykinin B1 Receptor Expression Induced by Tissue Damage in the Rat Portal Vein: A Critical Role for Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- κ B Signaling Pathways. *Circulation Research*, 94(10), 1375-1382. doi: 10.1161/01.res.0000128404.65887.08.
- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 292(1), C82-C97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006.

- Morand-Contant, M., Anand-Srivastava, M. B., & Couture, R. (2010). Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 299(5), H1625-H1632. doi: 10.1152/ajpheart.00735.2009.
- Moreau, M., N., G., & Molinaro, G. (2005). The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci*, 99, 6–38.
- Mori, M. A., Araujo, R. C., Reis, F. C., Sgai, D. G., Fonseca, R. G., Barros, C. C., Merino, V. F., Passadore, M., Barbosa, A. M., Ferrari, B., Carayon, P., Castro, C. H., Shimuta, S. I., Luz, J., Bascands, J. L., Schanstra, J. P., Even, P. C., Oliveira, S. M., Bader, M., & Pesquero, J. B. (2008). Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes*, 57(6), 1491-1500. doi: 10.2337/db07-1508.
- Munzel, T., Sayegh, H., Freeman, B. A., Tarpey, M. M., & Harrison, D. G. (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest*, 95(1), 187-194.
- Ni, A., Chao, L., & Chao, J. (1998). Transcription Factor Nuclear Factor κ B Regulates the Inducible Expression of the Human B1 Receptor Gene in Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 273(5), 2784-2791. doi: 10.1074/jbc.273.5.2784.
- Nieto-Vazquez, I., Fernández-Veledo, S., Krämer, D. K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., & Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, 114(3), 183-194. doi: doi:10.1080/13813450802181047.
- Okamoto, H. G., LH. (1983). Pharmacological properties of T-kinin (isoleucyl-seryl-bradykinin) from rat plasma. *Biochemical pharmacology 1983*, 32, 2637-2638. doi: 10.1016/0006-2952(83)90039-4.
- Panchal, S. K., & Brown, L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*, 351982(10), 30.
- Park, H. K., Qatanani, M., Briggs, E. R., Ahima, R. S., & Lazar, M. A. (2011). Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. *Diabetes*, 60(3), 775-783. doi: 10.2337/db10-1416.
- Passos, G. F., Fernandes, E. S., Campos, M. M., Araujo, J. G., Pesquero, J. L., Souza, G. E., Avellar, M. C., Teixeira, M. M., & Calixto, J. B. (2004). Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol*, 172(3), 1839-1847.
- Pathak, M., Wong, S. S., Dreveny, I., & Emsley, J. (2013). Structure of plasma and tissue kallikreins. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(9), 423-433. doi: 10.1160/th12-11-0840.
- Pérez-Asensio, F. J., Hurtado, O., Burguete, M. C., Moro, M. A., Salom, J. B., Lizasoain, I., Torregrosa, G., Leza, J. C., Alborch, E., Castillo, J., Knowles, R. G., & Lorenzo, P. (2005). Inhibition of iNOS activity by 1400W decreases glutamate release and ameliorates stroke outcome after experimental ischemia. *Neurobiology of Disease*, 18(2), 375-384. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.018.

- Perez, V., Velarde, V., Acuna-Castillo, C., Gomez, C., Nishimura, S., Sabaj, V., Walter, R., & Sierra, F. (2005). Increased kinin levels and decreased responsiveness to kinins during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *60*(8), 984-990.
- Perreault, M., & Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*, *7*(10), 1138-1143. doi: 10.1038/nm1001-1138.
- Pilon, M., Wu, R., Huot-Marchand, J. E., deBlois, D., Champlain, J., & Couture, R. (2009). Effect of chronic inhibition of nitric oxide on hypertension, insulin resistance, and cardiovascular remodeling in glucose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, *53*(5), 405-413. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181a1d88a.
- Polidori, M. C., Praticó, D., Savino, K., Rokach, J., Stahl, W., & Mecocci, P. (2004). Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *Journal of Cardiac Failure*, *10*(4), 334-338. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2003.11.004>.
- Pouliot, M., Hetu, S., Lahjouji, K., Couture, R., & Vaucher, E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res*, *92*(6), 482-489.
- Regoli, D., & Barabe, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*, *32*(1), 1-46.
- Sainz, I. M., Pixley, R. A., & Colman, R. W. (2007). Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost*, *98*(1), 77-83.
- Sakamoto, K., & Holman, G. D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *295*, E29-37. doi: 10.1152/ajpendo.90331.2008.
- Salgado, H. C., Carretero, O. A., Scicli, A. G., & Murray, R. D. (1986). Effect of DL-2-mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid on the blood pressure response to vasoactive substances. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *237*(1), 204-208.
- Shertzer, H. G., Woods, S. E., Krishan, M., Genter, M. B., & Pearson, K. J. (2011). Dietary whey protein lowers the risk for metabolic disease in mice fed a high-fat diet. *J Nutr*, *141*(4), 582-587. doi: 10.3945/jn.110.133736.
- Shoelson, S. E., Lee, J., & Goldfine, A. B. (2006). Inflammation and insulin resistance. [Review]. *J Clin Invest*, *116*(7), 1793-1801. doi: 10.1172/JCI29069.
- Talbot, S., De Brito Gariépy, H., Saint-Denis, J., & R., C. (2012). Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. *J Neuroinflammation*, *9*:214 doi: doi:10.1186/1742-2094-9-214.
- Talbot, S., Theberge-Turmel, P., Liazoghli, D., Senecal, J., Gaudreau, P., & Couture, R. (2009). Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin. *J Neuroinflammation*, *6*, 11. doi: 10.1186/1742-2094-6-11.

- Tang, S. C. W., J.C.K., L., & K.N., L. (2011). The Kallikrein-Kinin System. In L. K. N. H. K. T. S. C. W. H. Kong (Ed.), *Diabetes and the Kidney* (Vol. vol 170, pp. pp 145–155).
- Thong, F. S. L., Dugani, C. B., & Klip, A. (2005). Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. *Physiology*, *20*, 271-284.
doi: 10.1152/physiol.00017.2005.
- Toyoshima, Y., Gavrilova, O., Yakar, S., Jou, W., Pack, S., Asghar, Z., Wheeler, M. B., & LeRoith, D. (2005). Leptin improves insulin resistance and hyperglycemia in a mouse model of type 2 diabetes. *Endocrinology*, *146*(9), 4024-4035. doi: 10.1210/en.2005-0087.
- Weisberg, S. P., & Daniel McCann, M. D., Michael Rosenbaum, Rudolph L. Leibel, and Anthony W. Ferrante, Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 December 15; *112*(12): 1796–1808.
doi: 10.1172/JCI200319246.
- Wheatcroft, S. B., Williams, I. L., Shah, A. M., & Kearney, M. T. (2003). Pathophysiological implications of insulin resistance on vascular endothelial function. *Diabetic Medicine*, *20*(4), 255-268. doi: 10.1046/j.1464-5491.2003.00869.x.
- Zhang, X., Tan F, Brovkovich V, Zhang Y, & RA., S. (2011). Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B1 receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M110.214940.