

Université de Montréal

**Le rôle du récepteur B1 des kinines dans l'insulite et dans les complications
du diabète de type 1 dans un modèle de choc septique**

Rédigé par :

Nejla Tidjane

Département de physiologie moléculaire et intégrative

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

Philosophia Doctor (Ph.D.)

en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Avril 2015

© Nejla Tidjane, 2015

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée:

**Le rôle du récepteur B1 des kinines dans l'insulite et dans les complications
du diabète de type 1 dans un modèle de choc septique**

Présentée par :

Nejla Tidjane

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Jean-Louis Schwartz, président-rapporteur

Dr Réjean Couture, directeur de recherche

Dr André Gougoux, membre du jury

Dr Fernand Gobeil Jr, membre externe du jury

Dr Guy Rousseau, représentant du doyen

Résumé

Les kinines sont des peptides vasoactifs et des neuromédiateurs centraux impliqués dans le contrôle cardiovasculaire, la douleur et l'inflammation. Leurs actions sont relayées par deux types de récepteurs couplés aux protéines G : le récepteur B2 (RB2), constitutif, et le récepteur B1 (RB1), inductible en présence de lésions tissulaires, de cytokines pro-inflammatoires, d'endotoxines bactériennes et dans certaines pathologies tel que le diabète. Le diabète sucré augmente à l'échelle mondiale et son étiologie est complexe; il aggrave les infections sévères et augmente la mortalité par hyperbactériémie résistante à un contrôle thérapeutique et une prise en charge en soins intensifs. Les décès surviennent dans la grande majorité des cas à la suite de l'apparition d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD). Ce projet a pour but d'étudier le rôle du RB1 dans la CIVD dans un modèle de diabète de type 1 induit par la streptozotocine (STZ) (Article 1) et dans l'insulite (Article 2). La CIVD est produite par l'injection de lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg, i.p.), 4 jours après le traitement à la STZ (65 mg/kg, i.p.). Dans le premier article, nous avons montré une augmentation significative de l'œdème et de la perméabilité vasculaire par le bleu d'Évans dans le rein, le poumon, le coeur et le foie chez les rats traités au LPS et/ou à la STZ, une situation qui favorise une hémocoagulation et le développement d'un état d'hypercoagulabilité. Nous avons aussi montré la présence d'indices de thrombus et de lésions tissulaires dans l'étude histologique ainsi qu'une augmentation de l'expression du RB1 dans le coeur, le rein et les plaquettes sanguines. Un traitement avec l'antagoniste du RB1, le SSR240612, a corrigé l'apparition de ces anomalies et a rendu normale la glycémie chez les rats STZ et l'hyperthermie induite par le LPS. De même, le SSR240612 a nettement amélioré la survie des animaux. Les bénéfices du SSR240612 ont été reproduits par l'inhibition de la iNOS avec le 1400W et de la COX-2 avec l'acide niflumique, suggérant que les médiateurs de ces enzymes pro-inflammatoires agissent en aval du RB1.

Dans le deuxième article, le rat STZ est traité du jour 4 au jour 7 avec le SSR240612 (10 mg/kg/jr per os). Cet antagoniste du RB1 bloque l'infiltration du pancréas par les macrophages et les lymphocytes TCD4⁺ qui sont porteurs du RB1. L'antagoniste prévient aussi l'augmentation de l'expression de la iNOS, du TNF- α , du RB1 et du TRPV1 dans le pancréas des rats diabétiques. Le traitement avec l'antagoniste du RB1 a limité la perte des cellules β des îlots de Langerhans et a corrigé l'hypoinsulinémie et l'hyperglycémie.

Ces deux études mettent en lumière un rôle important du RB1 dans la létalité associée au choc septique, à la thrombose et à l'insulite. Par conséquent, le RB1 représente une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du diabète et de ses complications.

Mots-clés : CGRP, diabète, hyperglycémie, assaut immun, récepteur B1 des kinines lipopolysaccharide, macrophage, choc septique, streptozotocine, lymphocyte TCD4⁺, TRPV1

Abstract

Kinins are vasoactive peptides and central neuromediators involved in cardiovascular control, pain and inflammation. Their effects are mediated by two G protein-coupled receptors: the constitutive B2 receptor (B2R) and the inducible B1 receptor (B1R) that is upregulated during tissue injury, in the presence of proinflammatory cytokines, bacterial endotoxins and diabetes. Diabetes has reached epidemic level and its etiology is complex. Diabetes mellitus worsens severe infections and increases mortality caused by hyperbacteremia resistant to therapeutic control and management in intensive care units. Mortality is largely secondary to the occurrence of disseminated intravascular coagulation (DIC). This project examines the role of B1R in DIC in a model of type 1 diabetes induced by streptozotocin (STZ) (Article 1) and insulinitis (Article 2). DIC was induced by injection of lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg i.p.) four days after treatment with STZ (65 mg/kg, i.p.). In the first article, we have shown a significant increase in edema and vascular permeability (Evans blue) in kidney, lung, heart and liver in rats treated with LPS and/or STZ, increasing the haemoconcentration and the development of hypercoagulability state. Also, we showed the presence of thrombus formation and tissue damage by histological studies, and increased expression of B1R in the heart, kidney and platelets. Treatment with the B1R antagonist, SSR240612, alleviated all those abnormalities, in addition to reducing hyperglycemia in STZ rats, LPS-induced hyperthermia and improving survival. The beneficial effects of SSR240612 were reproduced by the inhibition of iNOS with 1400W and of COX-2 with niflumic acid, suggesting that the mediators of these proinflammatory enzymes act downstream to B1R.

In the second article, STZ rats were treated with SSR240612 (10 mg/kg/d, per os) from day 4 to day 7. This B1R antagonist blocked the infiltration of the pancreas by macrophages and

TCD4⁺ lymphocytes which express B1R. The antagonist also prevented the increased expression of iNOS, TNF- α , B1R and TRPV1 in the pancreas of STZ-diabetic rats. The treatment with the B1R antagonist limited the loss of Langerhans β cells, which improved plasma insulin and normalized hyperglycemia.

These studies highlight a primary role for B1R in lethality associated with septic shock, thrombosis and insulinitis. Therefore, kinin B1R is a promising therapeutic target in the treatment of diabetes and its complications.

Keywords : CGRP, diabetes, hyperglycemia, immune assault, kinin B1R, lipopolysaccharide, macrophage, septic shock, streptozotocin, TCD4⁺ lymphocyte, TRPV1

Table des matières

RÉSUMÉ	i
ABSTRACT	iii
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	ix
DÉDICACE	xiii
REMERCIEMENTS	xiv
CHAPITRE I- INTRODUCTION	
1.1. Mise en contexte	1
1.2 Rappel historique	3
1.3 Le diabète	4
1.3.1 Classification du diabète	5
1.3.1.1 Le diabète de type 1	5
1.3.1.2 Le diabète idiopathique	6
1.3.1.3 Le diabète de type 2	7
1.3.1.4 Autres types spécifiques de diabète	8
1.3.1.4.1. Les failles génétique atteignant les cellules β de Langerhans	8
1.3.1.4.2. Le diabète de type Mody	8
1.3.1.5 Les anomalies génétiques du récepteur de l'insuline	10
1.3.1.6 Les maladies du pancréas exocrine	11
1.3.1.7 Les endocrinopathies	11
1.3.1.8 Le diabète induit par des substances chimiques et des toxines	12
1.3.1.9 Les infections	12
1.3.1.10 Formes rares de diabète auto-immun	12
1.3.1.11 Autres syndromes génétiques parfois associés au diabète	13

1.3.1.12 Le diabète gestationnel.....	13
1.3.1.13 Le diabète de type 3.....	15
1.3.1.14 Le diabète de type 4.....	16
1.4 Diagnostic du diabète.....	16
1.5 Le pancréas.....	18
1.6 L'insulite.....	19
1.7 Le TRPV1.....	21
1.8 Le TRPV1 dans le sepsis.....	22
1.9 Peptide relié au gène calcitonine.....	23
1.10 Les modèles animaux de diabète de type1.....	25
1.10.1 <i>Les modèles animaux de diabète induit par des substances chimiques.....</i>	25
➤ <i>L'alloxane.....</i>	25
➤ <i>La streptozotocine</i>	26
1.10.2 <i>Les modèles animaux de diabète induit par inoculation de virus</i>	27
1.10.3 <i>Les modèles animaux de diabète induit par pancréatectomie.....</i>	27
1.10.4 <i>Modèles de diabète de type 1 auto-immun spontané.....</i>	27
1.10.5 <i>Le modèle de diabète induit génétiquement.....</i>	28
1.11 Les plaquettes sanguines.....	28
1.11.1 <i>Structure des plaquettes sanguines.....</i>	29
1.11.2 <i>La fonction plaquettaire.....</i>	32
1.11.3 <i>Les grandes voies de signalisation plaquettaire.....</i>	32
1.12 Le sepsis et le choc septique	36
1.13 La coagulation intravasculaire disséminée.....	40
1.14 Système kallicroïne-kinine (SKK)	44
1.14.1 <i>Biosynthèse des kinines.....</i>	44
1.14.2 <i>Voies alternatives menant à la production des kinines.....</i>	46
1.14.3 <i>Les kininases I ou carboxypeptidases.....</i>	46
1.14.4 <i>Métabolisme des kinines.....</i>	47
1.14.5 <i>Les kinines et leurs récepteurs.....</i>	48
1.14.6 <i>Les voies de signalisation cellulaire des récepteurs des kinines.....</i>	50
1.14.7 <i>Pharmacologie et biochimie des kinines.....</i>	53
1.14.7.1 <i>Les agonistes et antagonistes récepteur B1.....</i>	53
1.14.7.2 <i>Les agonistes et antagonistes du récepteur B2.....</i>	55

1.14.8 Rôles du récepteur B1 des kinines.....	57
1.14.8.1 RB1 et diabète sucré.....	57
1.14.8.2 RB1 et inflammation.....	58
1.14.8.3 RB1 et vasomotricité.....	59
1.14.8.4 Le RB1 et pathologie cardiaque.....	60
1.14.8.5 RB1 et douleur inflammatoire.....	61
1.14.8.6 RB1 et stress oxydant.....	62
1.15 Hypothèses et objectifs.....	63
CHAPITRE II-ARTICLE1.....	65-79
Problématique.....	65
Hypothèse.....	65
Méthode expérimentale.....	65
Contribution.....	66
Références.....	66
CHAPITRE III-ARTICLE 2.....	80-120
Problématique.....	80
Hypothèse.....	80
Méthode expérimentale.....	80
Contribution.....	81
Références.....	81
CHAPITRE IV-DISCUSSION.....	121-138
CHAPITRE V-BIBLIOGRAPHIE.....	139-178

Liste des Figures

Figure 1. Mécanismes d'activation plaquettaire conduisant à.....	31
Figure 2. Mécanismes de signalisation reliant les principaux récepteurs et.....	35
Figure 3. Mécanismes de signalisation du TNF et du TLR4.....	39
Figure 4. Pathogenèse de la coagulation intra vasculaire disséminée.....	42
Figure 5. Cascade de coagulation.....	43
Figure 6. Schéma illustrant le système Kallikreine- kinine.....	45
Figure 7. Voies de signalisation des récepteurs B1 et B2 des kinines.....	52
Figure 8. Mécanisme suggéré d'activation (RB1) et d'inhibition (RB2).....	129
Figure 9. Les interactions entre le système du complément.....	133
Figure 10. La voie classique et alterne du complément.....	134

Liste des sigles et abréviations

ABCC8	<i>ATP-binding cassette, sub-family C member 8</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
APN	Aminopeptidase N
APP	Aminopeptidase P
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
BB	<i>Rat BioBreed</i>
BK	Bradykinine
BMI	<i>Body mass index</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CIVD	Coagulation intra-vasculaire disséminée
COX-2	Cyclo-oxygénase de type 2
CpG	Cytosine-phosphate-guanine
CPM	Carboxypeptidase M
CPN	Carboxypeptidase N
DAG	Diacylglycérol
Death Domain	Domaine DD
DIC	<i>Disseminated intravascular coagulation</i>
DNT	Diabète néonatal transitoire
DNP	Diabète néonatal permanent
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2

ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
FID	Fédération internationale du diabète
GAD65	<i>Anti-glutamic acid decarboxylase 65</i>
GMPc	GMP cyclique
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
GSK-3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HbA1c	Hémoglobine glycosylée ou glyquée A1c
HGPO	Hyperglycémie provoquée orale
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
HNF-4 α	<i>Hepatocyte Nuclear Factor-4α</i>
HNF-1 β	<i>Hepatocyte Nuclear Factor-4β</i>
IA-2	<i>Insulinoma associated protein 2</i>
IGF- I	<i>Insulin growth factor I</i>
IGF-II	<i>Insulin growth factor II</i>
IMC	Index de masse corporelle
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IP3	Inositol-triphosphate
IPF-1	<i>Insulin promotor factor-1</i>
KBPM	Kininogène de bas poids moléculaire
KCNJ11	<i>Potassium inwardly-rectifying channel subfamily J, member 11</i>
KD	Kallidine
KHPM	Kininogène de haut poids moléculaire

LBP	<i>LPS Binding Protein</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAP3K	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MLCK	<i>Myosin light-chain kinase</i>
MODY2	<i>Maturity-onset diabetes of the young 2</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene88</i>
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NF- κ B	<i>Nuclear Factor of immunoglobulin κ light-chain in B cells</i>
NIK	<i>NF-κB- Inducing Kinase</i>
NO	Monoxyde d'azote
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAR1	<i>Protease-Activated Receptor 1</i>
PAR4	<i>Protease-Activated Receptor 4</i>
PDK1	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 1</i>
PDK2	<i>Phosphoinositide-dependent kinase 2</i>
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein kinase C</i>
PLA2	Phospholipase A2
PLC β	Phospholipase C β
PolyIC	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PP	Polypeptide P
RB1	Récepteur B1 des kinines

RB2	Récepteur B2 des kinines
SHR	Rat spontanément hypertendu
SKK	Système kallibréine-kinine
SP	Substance P
STZ	Streptozotocine
TLR4	Récepteur de type Toll 4
TNF α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
t-PA	Activateur de plasminogène tissulaire
TRAF 6	<i>TNF Receptor Associated Factor</i>
TRPV1	<i>Transient receptor vanilloid 1</i>
VASP	<i>Vasodilator Stimulated Phosphoprotein</i>
ZnT8	<i>Zinc transporter 8</i>

À mes chers parents

À mon précieux mari

À Selma, Adel et Wissam que j'aime tant

À ma chère Joanne Payette

Remerciements

Ce travail n'aurait pu aboutir sans la précieuse aide de nombreuses personnes. Que me pardonnent celles que j'oublie ici, mais j'adresse une pensée particulière au Dr Couture, pour m'avoir confié ce projet de recherche, pour son soutien permanent et sa présence, son encadrement, ses encouragements et surtout sa confiance et sa patience. Merci à M. Jacques Sénécal notre technicien de laboratoire, à mes collègues des laboratoires des Drs Réjean Couture, Madhu Arnand-Srivastava et Daniel Bichet. Je tiens également à remercier le Dr Jean-Pierre Girolami (*INSERM*, France), le Dr Yahye Merhi et son équipe (Institut de Cardiologie de Montréal), le Dr Louis Gaboury et ses techniciennes Julie Hinsinger, Micheline Fortin et Melinas Narlis (Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie), et enfin les Drs Julie Labonté et Pedro d'Orléans-Juste du Département de pharmacologie de l'Université de Sherbrooke.

1. 1 Mise en contexte

L'Amérique du Nord est une région confrontée à une forte augmentation du diabète sucré. En 2013, le nombre d'enfants âgés entre 0 et 14 ans diagnostiqués avec le diabète de type 1 était de 108,600 avec 16,7 nouveaux cas diagnostiqués par 100,000 enfants. Chez les adultes âgés de 20 à 79 ans, il y avait près de 36,755,500 personnes atteintes de diabète. La prévalence chez les adultes est de 9,6% selon les données de la Fédération internationale du diabète (FID). Cette estimation devrait croître de 9,9% en 2035. L'impact économique est également considérable, avec des dépenses de santé dues au diabète estimées à 263,2 milliards USD pour 2013, le plus élevé de toutes les régions de la FID. Le diabète menace la santé publique et les économies des pays de l'Amérique du Nord, et les efforts en matière de prévention et de gestion doivent être intensifiés afin de surmonter ce problème croissant (Yisahak, Beagley et al. 2014). Les patients atteints de diabète sont connus pour leurs sensibilités aux infections du fait d'un taux de glycémie plus élevé et de leur système immunitaire précaire. La vulnérabilité de l'organisme du diabétique face aux infections est due au fait que les microbes se nourrissent de sucre. Or les malades ayant un diabète non contrôlé présentent une constante hyperglycémie et entretiennent les infections qu'ils contractent. Sous traitement adapté aux bactéries responsables, l'évolution est souvent favorable, mais dans certains cas leur pronostic peut évoluer vers l'apparition du sepsis et du choc septique. Le choc septique par définition est l'évolution ultime du sepsis. Ce dernier étant une infection sévère grave et générale qui menace le pronostic vital par la survenue d'un état de choc hémodynamique. Selon une étude publiée aux États-Unis, on dénombre 750,000 cas de sepsis/an avec 215,000 décès/an et une augmentation annuelle de 9% (Martin, Mannino et al. 2003).

Mon projet de recherche porte sur deux volets : le premier consiste à étudier l'expression du récepteur B1 des kinines (RB1), ses effets inflammatoires et prothrombotiques dans un modèle de choc septique chez le rat diabétique; le deuxième vise à déterminer le rôle du RB1 des kinines dans l'insulite (inflammation des cellules β du pancréas), phase initiale du diabète de type 1 (DT1). Ces études sont motivées par le fait que le diabète est connu pour sa contribution à l'émergence des maladies cardiovasculaires qui sont plus fréquentes chez les diabétiques que dans la population générale. De plus, il est connu qu'un taux élevé de glucose dans le sang contribue à la coagulation du sang (Ceriello, Giacomello et al. 1995, Rao, Chouhan et al. 1999, Stegenga, van der Crabben et al. 2006).

Pour atteindre nos objectifs, nous avons eu recours à deux modèles animaux bien connus et validés, le modèle de diabète de type 1 par injection de streptozotocine (STZ, 65 mg/kg, i.p.) en injection unique et le modèle de choc septique par injection d'une dose de lipopolysaccharide bactérien (LPS, 2 mg/kg, i.p.). La principale caractéristique du diabète de type 1 est une destruction auto-immune des cellules bêta pancréatiques, conduisant à un manque de production d'insuline. Les modèles animaux les plus couramment utilisés de diabète de type 1 seront décrits ultérieurement. Les modèles animaux de septicémie sont typiquement à base d'injection mono- ou polymicrobienne, et seront aussi détaillés dans une section ultérieure.

1.2 Rappel historique

Le diabète a été décrit pour la première fois il y a 2000 ans par le médecin indien Shushruta (Tipton 2008), qui rapporta un goût sucré dans l'urine des sujets atteints. Aux alentours de l'an 250 avant Jésus-Christ, nous trouvons la première utilisation du mot «diabète» qui est dérivé du mot grec « un siphon », faisant référence à la miction excessive commune chez ces patients. En 1861, Paul Langerhans a découvert des amas de cellules dans le pancréas qui ont ensuite été nommés d'après son nom (Schnalke 1989). En 1889, Joseph Mering et Oskar Minowski découvrent que le diabète se développe après l'ablation du pancréas (Brogard, Vetter et al. 1992, Minkowski and Bretzel 2002), mais ce n'est qu'en 1921 que Fredrik Banting et Charles Best ont réussi à démontrer que l'extrait des tissus pancréatiques peut abaisser le taux de glucose dans le sang chez les chiens diabétiques et que son rôle est donc crucial dans l'homéostasie des glucides (Karamitsos 2011). La pureté de l'extrait pancréatique a été améliorée et un an plus tard, Banting a injecté de l'insuline de chien à un garçon diabétique de 14 ans du nom de Leonard Thompson (Rosenfeld 2013) qui a réussi à prolonger sa vie, ce qui lui a valu avec son collègue John Macleod, le prix Nobel de physiologie et de médecine en 1923 (Shampo and Kyle 2006). Les entreprises spécialisées dans le domaine du médicament ont rapidement commencé à produire des dérivés de l'insuline provenant d'animaux abattus (porcs, vaches), et à commercialiser l'insuline sous forme de médicament qui a aidé des millions de personnes à vivre aisément avec leur diabète.

1.3 Le diabète

Le diabète est un groupe de maladies métaboliques caractérisées par une hyperglycémie persistante résultant d'un défaut de sécrétion de l'insuline, de son action, ou des deux (Kuzuya, Nakagawa et al. 2002, Canivell and Gomis 2014). L'hyperglycémie chronique du diabète est associée à des dommages à long terme occasionnant des dysfonctionnements d'organes, en particulier les yeux, les reins, les nerfs, le cœur et les vaisseaux sanguins (Araki 2013, Rotimi-Samuel, Akinsola et al. 2013, Zychowska, Rojewska et al. 2013, Alavi, Sibbald et al. 2014, Dandamudi, Slusser et al. 2014, Gao and Zheng 2014). Plusieurs processus pathogènes sont impliqués dans le développement du diabète. Ceux-ci vont de la destruction auto-immune des cellules β du pancréas avec insuffisance insulinémique à la résistance à l'insuline (Yoon and Jun 2001, Meigs 2003). Le défaut de sécrétion de l'insuline et les anomalies de son action coexistent souvent chez le même patient, et il est souvent difficile de savoir quelle est la principale cause de l'hyperglycémie. Les symptômes de l'hyperglycémie marquée comprennent la polyurie, la polydipsie (Xiao, Wang et al. 2013), la perte de poids, parfois la polyphagie et les troubles de la vision (Fante, Durairaj et al. 2010). Les troubles de la croissance et la prédisposition à certaines infections peuvent également accompagner l'hyperglycémie chronique (Stipancic, La Grasta Sabolic et al. 2006, Casqueiro, Casqueiro et al. 2012). Les conséquences aiguës du diabète non contrôlé sont l'hyperglycémie avec acidocétose et le syndrome hyperosmolaire non cétosique qui peuvent engager le pronostic vital (Fadini, de Kreutzenberg et al. 2011, Fagher, Nilsson et al. 2013). Les complications à long terme du diabète comprennent la rétinopathie avec risque de cécité (Lutty 2013), la néphropathie pouvant conduire à une insuffisance rénale (Drummond, Mauer et al. 2002, Auinger, Edlinger et al. 2012), la neuropathie périphérique avec risque d'ulcères de pied (Metelko and Brkljacic Crkvencic 2013, Yasuda 2013) et d'amputations (Armstrong and Lavery 1998, Apelqvist, Bergqvist et al. 1999), la neuropathie

autonome provoquant des troubles gastro-intestinaux, génito-urinaires (Manolov 1984), et des symptômes cardiovasculaires résultant souvent à des dysfonctions sexuelles (Chessa, Butera et al. 2002, Vinik, Maser et al. 2003, Kempler, Amarenco et al. 2011). Les patients atteints de diabète ont une incidence accrue de maladies athérosclérotiques des artères périphériques et de maladies cérébrovasculaires. L'hypertension et les anomalies du métabolisme des lipoprotéines sont souvent observées chez les personnes atteintes de diabète (Dan, Chakraborty et al. 2014, Szuszkiewicz-Garcia and Davidson 2014). Les termes de diabète de type 1 (DT1) et de diabète de type 2 (DT2) ont été proposés en 1985 par l'OMS mais l'American Diabetes Association (ADA) propose une classification plus exhaustive et dont les détails suivront plus bas.

1.3.1. Classification du diabète

1.3.1.1 Le diabète de type 1

Cette forme ne représente que 5-10% des personnes atteintes de diabète; elle englobe les termes de diabète insulino-dépendant ou diabète juvénile, elle est le résultat d'une destruction auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas (Wild, Roglic et al. 2004, Washington, Andrews et al. 2006). Les marqueurs de cette destruction d'origine immunitaire incluent des auto-anticorps anti-îlots, des auto-anticorps anti-insuline, des auto-anticorps anti-glutamic acid decarboxylase (GAD65), et des auto-anticorps contre les tyrosine phosphatases IA-2 et IA-2b. Ces auto-anticorps sont généralement présents dans 85-90% des individus lorsque l'hyperglycémie à jeun est détectée (Merger, Leslie et al. 2013). En outre, la maladie a de fortes associations HLA (*human leukocyte antigen*), en liaison aux gènes DQA et DQB, et semble aussi être influencée par les gènes DRB (Saruhan-Direskeneli, Uyar et al. 2000, Rabbani, Abbasi et al. 2013). Dans ce type de diabète, le taux de destruction des cellules β est très variable, étant rapide chez les nourrissons et les enfants et lent chez les adultes. Dans certains cas, en particulier les enfants et les adolescents, une acidocétose peut

se présenter comme une manifestation initiale de la maladie (Dehan, Tran Van et al. 2008, Szypowska and Skorka 2011). Dans d'autres cas, on assiste à la présence d'une modeste hyperglycémie à jeun qui peut rapidement se transformer en hyperglycémie sévère avec acidocétose en présence d'une infection ou d'un stress. Les sujets adultes diabétiques, bien qu'ils puissent conserver une fonction résiduelle suffisante des cellules β pour empêcher l'acidocétose pendant de nombreuses années, finissent par devenir dépendants de l'insuline pour survivre et deviennent à risque de développer une acidocétose (Trachtenbarg 2005, Westerberg 2013). À ce stade de la maladie, il existe peu ou pas de sécrétion d'insuline se manifestant par des taux plasmatiques de pro-insuline faibles ou indétectables (Shafqat, Melles et al. 2006, Walenciak, Fendler et al. 2007). La destruction auto-immune des cellules β a pour origine des prédispositions génétiques et implique aussi la présence de facteurs environnementaux qui sont encore mal définis. Les patients sont rarement obèses dans ce type de diabète, mais la présence de l'obésité n'est pas incompatible avec le diagnostic. Ces patients sont également enclins à d'autres maladies auto-immunes tels que la maladie d'Addison, la maladie de Basedow, le vitiligo, la thyroïdite de Hashimoto, la maladie cœliaque, l'hépatite auto-immune, la myasthénie auto-immune, et l'anémie pernicieuse (Suzuki, Hirai et al. 2004, Queiroz 2008, Kota, Meher et al. 2012, Leeds, Hopper et al. 2013, Pinto, Dantas et al. 2013, Salgin, Meissner et al. 2013).

1.3.1.2 Le diabète idiopathique

Certaines formes de diabète de type 1 n'ont pas d'étiologies connues. Les patients entrant dans cette catégorie présentent une insulino-pénie permanente et sont sujets à une acidocétose, mais bizarrement ils ne présentent aucune preuve d'auto-immunité. Cette catégorie représente une minorité de patients atteints de diabète de type 1, et sont pour la plupart d'origine africaine ou asiatique. Les personnes

atteintes de cette forme de diabète souffrent d'acidocétose épisodique et présentent des degrés de déficience en insuline entre ces épisodes. Cette forme de diabète est fortement héréditaire, elle manque de preuves immunologiques, pour l'auto-immunité des lymphocytes B, et n'est pas associée au système HLA. Cette forme de diabète pose encore un problème thérapeutique (Fajans, Cloutier et al. 1979).

1.3.1.3 Le diabète de type 2

Cette forme de diabète représente 90-95% des personnes atteintes de diabète. Anciennement appelé diabète non insulino-dépendant, le diabète de type 2 affecte l'adulte. Ce diabète englobe les personnes qui ont une résistance à l'insuline et qui ont généralement une hyperinsulinémie au début, et souvent tout au long de leur vie, ces personnes n'ont pas besoin d'un traitement à l'insuline pour survivre (Martin, Warram et al. 1992). Il y a probablement différentes causes à cette forme de diabète. Bien que les étiologies spécifiques ne soient pas connues, la destruction auto-immune des cellules β ne se produit pas. La plupart des patients atteints de cette forme de diabète sont obèses, et l'obésité elle-même entraîne la résistance à l'insuline. Les patients qui ne sont pas obèses peuvent avoir un pourcentage accru de graisse corporelle distribué principalement dans la région abdominale (Mokdad, Ford et al. 2003, Kahn, Hull et al. 2006, Yang, Kang et al. 2013, Samson and Garber 2014). L'acidocétose se produit rarement spontanément dans ce type de diabète, et lorsqu'elle se manifeste, elle est généralement associée à autre maladie comme une infection sévère. Cette forme de diabète reste souvent non diagnostiquée pendant de nombreuses années à cause du développement progressif et insidieux de l'hyperglycémie (Hotamisligil 2005, Boni-Schnetzler, Ehses et al. 2008). Néanmoins, ces patients sont à risque accru de développer des complications macro- et micro-vasculaires (Hardt and Ewald 2011, Motataianu, Balasa et al. 2013). Les patients atteints de cette

forme de diabète peuvent avoir des niveaux d'insuline qui apparaissent normaux ou élevés alors que les niveaux de glucose dans le sang sont augmentés. Ainsi, la sécrétion d'insuline est défectueuse chez ces patients et insuffisante pour compenser la résistance à l'insuline (Montane, Cadavez et al. 2014). Cette résistance à l'insuline peut être réduite par la réduction de poids ou par un traitement pharmacologique de l'hyperglycémie, ou les deux, mais celle-ci est rarement ramenée à la normale. Le risque de développer cette forme de diabète augmente avec l'âge, l'obésité et le manque d'activité physique (Spruijt-Metz, O'Reilly et al. 2014). Il survient plus fréquemment chez les femmes atteintes de diabète gestationnel et chez les personnes souffrant d'hypertension ou de dyslipidémie (Ayyobi and Brunzell 2003, Ogle 2013, Lastra, Syed et al. 2014, Umamahesh, Vigneswari et al. 2014). Sa fréquence varie selon les sous-groupes raciaux / ethniques et il est souvent associé à une prédisposition génétique forte, complexe et pas entièrement définie (Misra, Endemann et al. 2006, Sumner and Cowie 2008, Grundy, Neeland et al. 2014, Hivert, Vassy et al. 2014).

1.3.1.4 Autres types spécifiques de diabète

1.3.1.4.1 *Les défauts génétiques atteignant les cellules β de Langerhans.* Plusieurs formes de diabète sont associées à des défauts monogéniques de la fonction des cellules β . Ces formes de diabète sont souvent caractérisées par l'apparition d'une hyperglycémie à un âge précoce, en général avant l'âge de 25 ans (Yamagata 2014).

1.3.1.4.2 *Le diabète de type MODY*

“Maturity onset type diabetes of the young” est un diabète insulino-dépendant à transmission autosomique dominante en rapport avec une anomalie primaire de la sécrétion d'insuline (Schwartz and Chadha 2008). Quatre des cinq gènes responsables, les MODY 1, 3, 4 et 5, correspondent à des

mutations des gènes suivants: HNF-4 α “Hepatocyte Nuclear Factor-4 α ”, HNF-1 α , IPF-1 (insulin promotor factor-1) et HNF-1 β . Le cinquième, MODY 2, constitue une exception puisqu’il est dû à des mutations des gènes de la glucokinase, enzyme clé dans le métabolisme qui conduit à l’insulino sécrétion en réponse au glucose (Byrne, Sturis et al. 1996, Ihara, Yamagata et al. 2005, Tjora, Wathle et al. 2013, Yamagata 2014). Plus récemment, le facteur de transcription NEUROD1/BETA2 “Neurogenic differentiation1” a été impliqué dans la survenue d’un diabète à transmission autosomique dominante (Liu, Furuta et al. 2007). D’autres causes sont responsables de l’induction du diabète de type MODY comme les maladies infectieuses tels que la grippe, les oreillons, les pneumonies, la tuberculose (Palmer, Cooney et al. 1981, Saruki, Ogata et al. 2009), quelques maladies endocriniennes tels que l’acromégalie, la maladie de Cushing, l’hyperthyroïdie et les pancréatites chroniques (Kasayama, Otsuki et al. 2000, Pivonello, De Leo et al. 2010, Giordano, Guarnotta et al. 2014). Les médicaments tels que ceux utilisés en chimiothérapie anticancéreuse et pour la contraception par voie orale, les diurétiques, les glucocorticoïdes et les anti-épileptiques sont aussi connus pour leurs effets hyperglycémiant (Gourdy 2013). Des mutations ponctuelles de l’ADN mitochondrial ont été associées au diabète et à la surdité. La mutation la plus courante se produit à la position 3,243 de l’ARNt du gène de la leucine, conduisant à un remplacement d’une alanine par une glycine (Cataldo, Olmos et al. 2013). Une lésion identique se produit dans le syndrome MELAS (myopathie mitochondriale, encéphalopathie, acidose lactique, et le syndrome de stroke-like), mais le diabète ne fait pas partie de ce syndrome, ce qui suggère différentes expressions phénotypiques de cette lésion génétique (Petrovic, Mandic et al. 2012). Les anomalies génétiques qui conduisent à l’impossibilité de convertir la pro-insuline en insuline ont été identifiées dans quelques familles, et ces traits sont transmis selon un mode autosomique dominant mais l’intolérance au glucose dans ces cas est peu prononcée. De même, la production de molécules d’insuline mutantes

avec des liaisons altérées aux récepteurs a également été identifiée dans plusieurs familles et elle est associée à une transmission autosomique où le métabolisme du glucose est normal ou légèrement altéré (Weiss 2009, Liu, Hodish et al. 2010).

1.3.1.5 Les anomalies génétiques du récepteur de l'insuline

Il y a des causes inhabituelles du diabète qui résultent d'anomalies génétiques. Les anomalies métaboliques associées à des mutations du récepteur de l'insuline peuvent varier de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie modérée au diabète sévère (Dominguez-Garcia, Martinez et al. 2014). Certaines personnes atteintes de ces mutations peuvent présenter un tableau d'acanthosis nigricans (Zaridoust, Rabbani et al. 2013, Malisiewicz, Boehncke et al. 2014). Les femmes peuvent être virilisées et présenter des ovaires polykystiques (Ramanand, Ghongane et al. 2013). Ce syndrome porte l'appellation de résistance à l'insuline de type A (Dominguez-Garcia, Martinez et al. 2014). Le leprechaunisme et le syndrome de Rabson - Mendenhall sont deux syndromes touchant l'enfant et qui sont caractérisés par des mutations dans le gène du récepteur à l'insuline avec des modifications de sa fonction et une résistance extrême à l'insuline. Le premier est accompagné de troubles caractéristiques du faciès et il est fatal dans la petite enfance, tandis que le second est associé à des anomalies des dents et des ongles avec une hyperplasie de la glande pinéale (Ma, Wang et al. 2013, Planchenault, Martin-Coignard et al. 2014). Des altérations de la structure et de la fonction du récepteur à l'insuline ne peuvent être démontrées chez des patients atteints de diabète lipoatrophique insulino-résistants. Par conséquent, il est suggéré que la lésion se trouve dans les voies de transduction du signal post-récepteur (Laustsen, Michael et al. 2002).

1.3.1.6 Les maladies du pancréas exocrine

Tout processus pouvant altérer la structure du pancréas peut causer le diabète. Les processus acquis comprennent la pancréatite, les traumatismes, les infections, la pancréatectomie, et le cancer du pancréas. À l'exception de ceux provoqués par le cancer, les dommages au pancréas doivent être étendus pour que le diabète se déclare; les adénocarcinomes qui comportent seulement une petite portion du pancréas ont été associés au diabète. Ceci implique un mécanisme autre que la simple réduction de la masse des cellules β . Si suffisamment vaste, la fibrose kystique et l'hémochromatose peuvent également endommager les cellules β et altérer la sécrétion d'insuline (Larger, Philippe et al. 2012).

1.3.1.7 Les endocrinopathies

Plusieurs hormones comme l'hormone de croissance, le cortisol, l'adrénaline et le glucagon antagonisent l'action de l'insuline. Des quantités excessives de ces hormones dans des pathologies comme l'acromégalie, le syndrome de Cushing, le glucagonome et le phéochromocytome peuvent causer le diabète. Cela se produit généralement chez les personnes présentant des déficits préexistants dans la sécrétion d'insuline. L'hyperglycémie disparaît généralement lorsque l'excès d'hormone est résolu. Le somatostatine et l'hypokaliémie induite par un aldostérone peuvent causer le diabète, au moins en partie, par inhibition de la sécrétion d'insuline. L'hyperglycémie se résout généralement après suppression de la tumeur (Widimsky, Strauch et al. 2001, Castro, de Leon et al. 2011, Prieto Tenreiro and Diaz Guardiola 2011, Giordano, Guarnotta et al. 2014).

1.3.1.8 Le diabète induit par des substances chimiques et des toxines

Plusieurs médicaments peuvent altérer la sécrétion d'insuline. Ces médicaments peuvent ne pas causer le diabète par eux-mêmes, mais ils peuvent précipiter le diabète chez les individus avec une résistance à l'insuline. Certaines toxines telles que Vacor (un poison à rat) et la pentamidine intraveineuse peuvent détruire de façon permanente les cellules β pancréatiques. Ces réactions médicamenteuses sont heureusement rares. Il y a aussi de nombreux médicaments et des hormones qui peuvent nuire à l'action de l'insuline comme l'acide nicotinique et les glucocorticoïdes. Des études ont rapporté que des patients recevant l'interféron ont développé un diabète associé à des anticorps anti-îlots et dans certains cas, une carence sévère à l'insuline (Kim, Lee et al. 2002, Chebane, Tavassoli et al. 2010, Kobayashi 2013, Popescu, Popescu et al. 2013).

1.3.1.9 Les infections

Certains virus ont été associés à la destruction des cellules β . Le diabète se produit chez les patients atteints de rubéole congénitale, bien que la plupart de ces patients aient un profil HLA et des marqueurs immunitaires caractéristiques du DT1. En outre, le virus Coxsackie B, le cytomégalovirus, l'adénovirus et le virus ourlien ont été impliqués dans certains cas dans l'induction de la maladie (Hara, Alkanani et al. 2013, Bernsmeier, Calabrese et al. 2014).

1.3.1.10 Formes rares de diabète auto-immun

Dans cette catégorie, rentre le syndrome de l'homme raide qui est une maladie auto-immune du système nerveux central caractérisée par une raideur des muscles axiaux avec des spasmes douloureux. Les patients ont généralement des titres élevés d'auto-anticorps anti-GAD65, et environ

un tiers développent le diabète. Ces anticorps peuvent provoquer le diabète par la liaison au récepteur de l'insuline, ce qui bloque la liaison de l'insuline à son récepteur dans les tissus cibles. Dans certains cas, ces anticorps qui se lient au récepteur à l'insuline peuvent provoquer une hypoglycémie (Jayakrishnan, Hoke et al. 2011). Des anticorps anti-récepteur de l'insuline sont parfois mesurés chez les patients atteints de lupus érythémateux systémique et d'autres maladies auto-immunes. Comme dans les autres états de la résistance extrême à l'insuline, les patients avec des anticorps anti-récepteur de l'insuline ont souvent un acanthosis nigricans. Dans le passé, ce syndrome a été appelé la résistance à l'insuline de type B (Kang, Jin et al. 2013).

1.3.1.11 Autres syndromes génétiques parfois associés au diabète

De nombreux syndromes génétiques sont accompagnés d'une augmentation de l'incidence du diabète. Il s'agit notamment des anomalies chromosomiques du syndrome de Down (Kota, Tripathy et al. 2013), le syndrome de Klinefelter (Nan, Zhang et al. 2013) et le syndrome de Turner (Callea, Radovich et al. 2013). Le syndrome de Wolfram est une maladie autosomique récessive caractérisée par un diabète insulino-dépendant et l'absence de cellules β à l'autopsie (Zmyslowska, Borowiec et al. 2014). Ce syndrome peut aussi inclure le diabète insipide, l'hypogonadisme, une atrophie optique et surdité neurale (Rigoli and Di Bella 2012, Bonnycastle, Chines et al. 2013).

1.3.1.12 Le diabète gestationnel

Le diabète gestationnel est une intolérance au glucose qui apparaît pendant la grossesse et disparaît dans la plupart des cas après l'accouchement. La prévalence du diabète gestationnel aux États-Unis est de 1% à 25% (Hartling, Dryden et al. 2012). Les femmes enceintes atteintes de diabète

gestationnel sont à risque accru de complications maternelles et fœtales, dont la prééclampsie, la macrosomie fœtale (ce qui peut provoquer une dystocie des épaules et des traumatismes à la naissance), et l'hypoglycémie néonatale (Mitanchez 2010). Les femmes atteintes de diabète gestationnel sont également à risque accru de développer un diabète de type 2; environ 15% à 60% des femmes développent le diabète de type 2 dans les 5 à 15 ans suivant leur accouchement (Ward, Johnston et al. 1985, Kim, Newton et al. 2002). Le dépistage du diabète gestationnel survient généralement après la 24e semaine de grossesse. Le dépistage avant 24 semaines peut identifier les femmes avec une intolérance au glucose tôt dans la grossesse. Les besoins en insuline augmentent pendant la grossesse et si la sécrétion durant cette phase est insuffisante, le diabète apparaît. Les facteurs de risque de diabète gestationnel sont : l'âge maternel (> 30 ans), le surpoids maternel avant la grossesse (BMI > 25 kg/m²), la prise de poids excessive pendant la grossesse, l'origine ethnique (origine indienne, asiatique, chinoise, les races noires et latino), les antécédents familiaux de diabète, les antécédents de diabète gestationnel, la macrosomie et les antécédents d'hypertension artérielle (Baraban, McCoy et al. 2008). Il n'existe pas de test diagnostique parfaitement validé pour le diabète gestationnel et le seul test qui garde sa place à travers le monde dans cette situation pathologique est l'hyperglycémie provoquée orale (HGPO). Le principal risque est lié à l'hyperinsulinisme fœtal qui a pour conséquence une macrosomie fœtale; poids à la naissance supérieur à 4 kg avec risque d'hypoglycémie dans les premiers jours de vie, car le pancréas du bébé a pris l'habitude de fabriquer beaucoup d'insuline pendant la grossesse (Perichart Perera, Alonso de la Vega et al. 2006). Le traitement repose sur le régime diététique, la suppression d'aliments à très fort index glycémique, la prise de probiotiques et l'auto-surveillance glycémique (Shyam, Arshad et al. 2013, Barrett, Dekker Nitert et al. 2014). En cas d'échec ou d'insuffisance du traitement diététique, une insulinothérapie est instaurée.

1.3.1.13 Le diabète de type 3

Un modèle de diabète de type 3 a été expérimenté par l'injection intra-cérébrale de streptozotocine (Lester-Coll, Rivera et al. 2006). Les résultats ont montré des caractéristiques similaires à la neurodégénérescence de la maladie d'Alzheimer (Wang, Yu et al. 2013) par l'altération sélective des fonctions du couple insuline/IGF, "insulin growth factor" I et II (IGFI et IGFI) avec une augmentation du stress oxydatif soutenant l'hypothèse que la maladie d'Alzheimer représente un trouble neuro-endocrinien associé à des perturbations spécifiques de l'insuline produite par le cerveau et les mécanismes de signalisation de l'IGFII (Steen, Terry et al. 2005). En effet, les cerveaux de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer montrent des taux réduits d'insuline et des protéines associées (Kar, Poirier et al. 2006). Lorsque les niveaux de ces protéines sont inférieurs à la normale, les neurones du système nerveux central meurent (Steen, Terry et al. 2005, De Felice, Lourenco et al. 2014). La diminution marquée de l'expression des gènes codant pour l'insuline, les facteurs de croissance et les récepteurs associés suggère que la maladie d'Alzheimer est un désordre semblable, quoique distinct, à celui du diabète mellitus. Ainsi, l'appellation de « diabète de type 3 » permet de classer ce mécanisme pathogénique nouvellement identifié de neurodégénération. Les personnes qui souffrent de diabète ont un risque accru (jusqu'à 65 % de plus) de développer la maladie d'Alzheimer. Cette nouvelle source d'insuline produite par le cerveau n'affecterait pas les niveaux de glucose sanguin mais il a été proposé qu'elle pourrait affecter la phosphorylation des protéines-Tau au moyen de la régulation de la protéine GSK-3 β , puisqu'il s'agit d'une kinase intervenant en aval de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline (Lee, Shin et al. 2014). Les recherches se poursuivent afin de mieux connaître le lien entre le diabète et la maladie d'Alzheimer (de la Monte and Wands 2005, de la Monte, Tong et al. 2006).

1.3.1.14 Le diabète de type 4

Le diabète néonatal transitoire (DNT) et permanent (DNP), sont des formes de diabète rares qui touchent 1 enfant sur 300,000-400,000. Le diagnostic est facile mais la prise en charge reste encore problématique chez le jeune enfant (AvRuskin and Juan 2002). Le DNT résulte d'un défaut de développement et de maturation des cellules β . Il se manifeste par une hyperglycémie dans la première semaine de vie; les bébés touchés présentent généralement un retard de croissance à cause du manque d'insuline qui est un facteur majeur de croissance fœtale. Le problème se résorbe habituellement dans la première année de vie. Les bébés nés avec un DNT montrent un plus grand risque à développer le DT2 plus tard dans la vie. La persistance de la défaillance pancréatique prédispose à un risque accru, en particulier pendant les périodes de puberté et de grossesse. Les mécanismes physiopathologiques ne sont pas encore connus même si de nombreuses anomalies génétiques ont été décrites : anomalies de la région 6q24 lors d'un DNT et les mutations de gènes codant pour le canal potassique de la cellule β (KCNJ11 et ABCC8) lors d'un DNP (Flanagan, Patch et al. 2007, Flechtner, Vaxillaire et al. 2007, Polak and Cave 2007). La distinction entre un diabète auto-immun précoce et une forme monogénique n'est pas toujours aisée à définir.

1.4 Le diagnostic du diabète

Le diabète est souvent diagnostiqué à l'occasion d'un examen général. Il peut aussi être découvert à l'occasion d'une hypoglycémie réactionnelle à une insulinosécrétion retardée et inadéquate. Les premiers symptômes cliniques du DT1 comprennent généralement la polyurie, la perte de poids, la faim, la soif, les maux de tête et les nausées, mais la maladie peut parfois être asymptomatique (Kim, Yoon et al. 2013). Environ 40-90 % des cellules β sont détruites ou ne sont plus fonctionnelles au

moment du diagnostic (Foulis, Liddle et al. 1986, Klinke 2008). Cependant, la perte de cellules productrices d'insuline semble être moins élevée chez les sujets adultes (Klinke 2008, Klinke 2011). Le diagnostic de tous les types de diabète repose essentiellement sur la mesure de la glycémie sanguine à jeun et sur l'hyperglycémie provoquée. L'hyperglycémie provoquée (HGPO) consiste en la mesure de la glycémie veineuse 2 h après l'ingestion de 75 g de glucose dissout dans 250 mL d'eau, à absorber en moins de 5 minutes. Les sujets dont la glycémie est supérieure à 11.1 mmol/L 2h après une charge orale en glucose sont considérés diabétiques. Cette technique est rendue une méthode de référence pour les études de dépistage chez les sujets asymptomatiques. La méthode de l'hémoglobine glycosylée ou glyquée (HbA1c) est le résultat de la réaction non enzymatique entre l'hémoglobine et le glucose dans le sang; elle reflète l'équilibre glycémique moyen de chaque individu durant les 2 à 3 mois précédents. La simplicité technique par rapport à l'HGPO, l'absence de modification du mode alimentaire des jours précédents contrairement à la glycémie à jeun sont des atouts sérieux en faveur de cette méthode. Les seuils de glycémie à jeun sont définis par l'OMS et l'American Diabetes Association comme suit: le seuil proposé de diabète est supérieur ou égal à 6,9 mmol/L, le seuil d'intolérance au glucose supérieur ou égal à 5,8 mmol/L et le seuil de normalité est inférieur à 5,8 mmol/L. Pour distinguer le DT1 et DT2, les cliniciens considèrent généralement des facteurs de risque potentiels de diabète tels que l'âge, l'index de masse corporelle (IMC) et les antécédents familiaux de diabète. Une autre méthode consiste à rechercher la présence d'auto-anticorps anti-îlots dans le sang comme marqueur des dommages aux cellules β de Langerhans. Il est estimé que jusqu'à 90% des patients atteints de DT1 nouvellement diagnostiqués ont des anticorps anti-îlots dans le sang qui comprennent : la tyrosine phosphatase ou insulinoma associated protein 2 (IA-2), la glutamic acid decarboxylase 65 (GAD65), le Zinc transporter 8 (ZnT8) et l'insuline/IAA.

1.5 Le pancréas

Le pancréas s'étend de la concavité du duodénum jusqu'à la rate. Bien qu'il n'y ait pas de limites anatomiques déterminées, l'organe peut être divisé en trois régions: la tête, située à proximité du duodénum, le corps et la queue. La majeure partie, environ 80% de la masse totale du pancréas, est constituée de cellules acineuses exocrines qui produisent des enzymes digestives sécrétées dans le duodénum par l'intermédiaire d'un canal qui traverse le pancréas. Les cellules endocrines (~ 1-2 % de la masse pancréatique totale) sont disposées en groupes de différentes tailles portant le nom d'îlots de Langerhans; elles se trouvent dispersées dans le parenchyme exocrine et sécrètent des hormones dans le sang. Les îlots de Langerhans sont d'une importance capitale dans la régulation du métabolisme glucidique. Ils comprennent plusieurs types de cellules dont les cellules bêta qui produisent l'insuline, les cellules alpha, le glucagon, les cellules delta, la somatostatine et des cellules produisant des polypeptides (PP) (In't Veld and Marichal 2010). Récemment, un cinquième type d'hormone, la ghréline, a été découvert (Wierup, Svensson et al. 2002). Les cellules bêta sont les plus nombreuses (~ 55 %), suivies par les cellules alpha (~ 30 %) et les cellules delta (~ 10%). Contrairement aux îlots murins, dans lesquels les cellules bêta sont normalement situées dans le noyau de l'îlot et entourées par les cellules alpha, delta et les cellules PP, l'anatomie spatiale est plus hétérogène chez l'homme (Brissova, Fowler et al. 2005, Cabrera, Berman et al. 2006). En outre, les îlots sont très vascularisés avec des capillaires fenêtrés et riches en innervation autonome (In't Veld and Marichal 2010). L'insuline, le glucagon et la somatostatine peuvent être facilement distingués au microscope sous forme de granules. Les granules dans les cellules bêta ont souvent un noyau cristallin dense aux électrons qui est entouré d'un halo translucide et leur taille moyenne varie entre ~ 250 à 350 nm (Fava, Dehghany et al. 2012, Masini, Marselli et al. 2012). Les granules de glucagon sont approximativement de la même taille que les granules d'insuline et ressemblent à des yeux de

taureau. Les granules de la somatostatine sont environ de 100 nm supérieurs à ceux de l'insuline et du glucagon et ont des densités électroniques variables (In't Veld and Marichal 2010).

1.6 L'insulite

L'insulite est définie comme un état inflammatoire du pancréas avec une infiltration de cellules immunitaires autour ou à l'intérieur des îlots de Langerhans. Cet assaut immun est considéré comme un marqueur d'apparition récente du DT1 (Gepts 1965, Foulis, Liddle et al. 1986). Les cellules immunitaires sont principalement les cellules CD8⁺, T-CD3⁺, T-CD4⁺, CD68⁺ macrophages, BCD20 (Richardson, Willcox et al. 2011) et les cellules NK (Dotta, Censini et al. 2007). L'infiltration est normalement inégale, c'est-à-dire qu'elle peut être retrouvée dans certains lobes, et est généralement localisée dans les îlots contenant l'insuline (Gepts 1965). Dans les modèles d'animaux de DT1 à savoir chez des souris diabétiques non obèses (NOD) et le rat BioBreed (BB), une insulite massive peut être observée, mais chez l'humain diabétique l'infiltration est beaucoup plus faible (Roep, Atkinson et al. 2004). Depuis que le concept a été décrit pour la première fois, il y a plus de 100 ans, il y a eu environ 150 cas d'insulite rapportés. Dans une méta-analyse comprenant 213 patients atteints de DT1, la prévalence de l'insulite était plus fréquente chez les personnes de 14 ans ou moins que chez les adultes (~ 73 % contre 29 %), avec des délais d'apparition de la maladie inférieurs à un mois. Les taux d'insulite diminuent avec le temps d'évolution de la maladie et après une année, l'insulite est retrouvée chez seulement 4.2 % des patients (In't Veld 2011) .

Un des grands problèmes réside dans la détermination du seuil de cellules immunitaires infiltrantes nécessaires pour définir l'insulite. En juin 2013, un consensus a été établi pour le diagnostic de l'insulite. Ce dernier reconnaît la présence prédominante de lymphocytes qui visent principalement les îlots de Langerhans; il peut être en périphérie des îlots (péri-insulite) et peut aussi être diffus

(intra-insulite). Les lésions touchent surtout les cellules β et la lésion doit être présente dans au moins trois îlots avec un seuil d'au moins 15 cellules CD45⁺ par îlot pour le diagnostic positif. Le récepteur CD45 peut être exprimé par une variété de cellules immunes dont les macrophages, les cellules B, T et les cellules NK (Campbell-Thompson, Atkinson et al. 2013).

La réalisation d'un modèle expérimental d'insulite a été difficile à atteindre en pratique. En 1956, Witebsky et ses collègues ont rapporté que la maladie auto-immune de la thyroïde pouvait être induite par l'administration d'antigènes de la thyroïde dans l'adjuvant de Freund. Cette observation a conduit à la caractérisation de modèles animaux de maladies auto-immunes atteignant l'homme. Le modèle animal de diabète spontané avec troubles immunitaires est devenu le prototype du DT1. Dans les années 1960, Renold, Soeld et leurs associés ont reproduit l'insulite chez des vaches immunisées avec de l'insuline bovine dans l'adjuvant complet de Freund. Ces études n'ont pas été poursuivies en raison de la difficulté du modèle animal. Toujours dans les années 1960, Grodsky et coll reportaient l'induction de l'insulite chez le lapin après la vaccination avec de l'insuline bovine dans l'adjuvant complet de Freund. Les préparations d'insuline utilisées n'étaient pas aussi pures et les études ultérieures n'ont pas abouti. L'insulite a été également induite par l'administration d'une "heat shock protein" à des souris, induisant ainsi un diabète transitoire. Aussi, l'utilisation de l'acide polyinosinique-polycytidylique (PolyIC) a été considéré comme un agent mimant l'ARN viral pour stimuler le système immunitaire inné chez des rats RT1u afin d'induire l'insulite. Dans cette thèse, l'insulite a été induite par injection de streptozotocine (STZ) chez le rat Sprague-Dawley. Ce modèle de rat rendu diabétique par la STZ reproduit les mécanismes lésionnels, métaboliques et les symptômes habituels de l'insulite et du diabète de type 1. Il a été utilisé dans de nombreuses études qui ont contribué à une meilleure connaissance physiopathologique du DT1 et à l'émergence de

nouveaux concepts thérapeutiques (Like and Rossini 1976, Zucollo, Dziubecki et al. 2002, Catanzaro, Dziubecki et al. 2010).

1.7 Le TRPV1

Le transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) est un canal cationique non sélectif impliqué dans la thermonociception. Il est activé par la chaleur au dessus de 42 °C, un faible pH, certaines molécules comme l'anandamine, les leukotriènes ainsi que la capsaïcine. Le TRPV1 est exprimé au niveau des projections périphériques et centrales des fibres de type C et A δ , ainsi qu'au niveau de toute la surface du parenchyme cérébral (Zschenderlein, Gebhardt et al. 2011, Brown, Chirila et al. 2013). L'expression du TRPV1 est positivement régulée dans des conditions inflammatoires; à ce titre, il est considéré comme un intégrateur de la douleur inflammatoire. Chez l'homme, des modifications de l'expression du TRPV1 ont été rapportées au niveau de l'inflammation intestinale dans le syndrome du côlon irritable (Scalera and Loguercio 2012, Zielinska, Jarmuz et al. 2014), dans le DT1 (Talbot and Couture 2012), dans l'asthme et la toux (Adcock 2009, Rehman, Bhat et al. 2013), et dans l'insuffisance rénale (Rayamajhi, Contractor et al. 2009). La stimulation du TRPV1 augmente la production des espèces réactives oxygénées et des cytokines pro-inflammatoires dans un modèle de douleur neuropathique (Schaible, von Banchet et al. 2010). Bien que le TRPV1 soit caractérisé comme un récepteur de la douleur, des études récentes lui confèrent un rôle dans le système immunitaire. En effet, le TRPV1 a été identifié récemment sur les lymphocytes TCD4⁺ (Bertin, de Jong et al. 2014). Les cellules TCD4⁺ TRPV1-déficientes présentent une activité réduite du NF- κ B et sécrètent des quantités significativement réduites de cytokines comme l'interleukine-2 (IL-2) et l'interféron- γ (IFN- γ), lorsqu'on les compare aux cellules témoins (Bertin, Aoki-Nonaka et al. 2014, Bertin, de Jong et al. 2014). De plus, dans des modèles animaux de maladies inflammatoires

de l'intestin humain, la délétion génétique ou l'inhibition pharmacologique du TRPV1 réduit sensiblement la gravité de l'inflammation colique. Le TRPV1 semble être impliqué dans l'induction de l'influx calcique dépendant dans les cellules TCD4⁺ (Dai, Cho et al. 2010, Verma, Kumar et al. 2010). Des travaux suggèrent que le développement de l'insulite n'est pas seulement relié à des évènements immunologiques, mais comporte aussi une composante sensorielle neuronale (Tsui, Razavi et al. 2007). Le récepteur TRPV1 est impliqué dans le stress des cellules β des îlots de Langerhans et l'inflammation des îlots en contrôlant la libération des neuropeptides et la sécrétion d'insuline. L'ablation des neurones exprimant le TRPV1 par la capsaïcine semble améliorer la tolérance au glucose chez des rats STZ (Guillot, Coste et al. 1996). La libération de SP endogène par les fibres sensorielles exprimant le TRPV1 favorise l'inflammation neurogénique dans le pancréas en contribuant au processus d'extravasation plasmatique et à l'infiltration mononucléaire du pancréas (Hutter, Wick et al. 2005).

1.8 Le TRPV1 dans le sepsis

Un rôle pour le TRPV1 a été suggéré dans le sepsis. La première étude démontrant l'implication de ce récepteur dans la septicémie a été menée chez le rat, où le prétraitement avec un agoniste du TRPV1 (la capsaïcine) a augmenté la survie (Bryant, Shumate et al. 2003). Dans une autre étude, la fièvre induite par les LPS a été réduite chez les rats prétraités avec la capsaïcine (Romanovsky 2004). Cependant, il est important de considérer que la capsaïcine désensibilise les fibres sensorielles de type polymodal, ce qui conduit à une perte de la signalisation causée par TRPV1 et par de nombreux autres récepteurs neuronaux qui peuvent avoir des rôles distincts dans la réponse à la septicémie tels les canaux TRP (Almeida, Steiner et al. 2006, Konno, Shirakawa et al. 2012), les neuropeptides (Neunaber, Zeckey et al. 2011) ou le NO (Berg, Moller et al. 2011). Le rôle protecteur du TRPV1

dans le sepsis a été confirmé dans des expériences utilisant des souris knock-out TRPV1 (TRPV1^{-/-}) où il a été démontré que le TRPV1 est une composante essentielle dans la réponse inflammatoire à l'infection bactérienne (Fernandes, Fernandes et al. 2012). Les souris TRPV1^{-/-} atteinte de septicémie induite par le LPS présentent une hypotension et une hypothermie augmentées par rapport aux témoins (Clark, Keeble et al. 2007). La même étude a également montré que les souris TRPV1^{-/-} traitées avec du LPS présentaient des taux accrus de TNF α en plus d'une insuffisance hépatique marquée par rapport aux souris sauvages. Bien que cette étude ait suggéré une issue fatale pour le sepsis en l'absence de TRPV1, Wang et ses collaborateurs (2008) ont montré une plus grande hypotension et diminution de la survie chez les souris prétraitées avec un antagoniste du TRPV1 (la capsazépine). L'utilisation d'un antagoniste sélectif du TRPV1 (SB366791) provoque une souffrance organique (Fernandes, Fernandes et al. 2012) et une mortalité élevée chez les souris atteintes de septicémie (Guptill, Cui et al. 2011). Inversement, certains résultats négatifs ont été rapportés comme l'étude de Iida et al. (2005). Les mécanismes responsables de ces différences entre les études n'ont pas encore été clarifiés, mais la plupart d'entre elles ont débouché sur des effets néfastes des TRPV1^{-/-} dans des modèles animaux de septicémie.

1.9 Peptide relié au gène calcitonine (*Calcitonin gene related peptide-CGRP*)

Le CGRP est un peptide de 37 acide aminés possédant un pont disulfure entre les cystéines en positions 2 et 7 (Amara, Jonas et al. 1982). Il fait partie de la même famille que la calcitonine, l'adrénoméduline et l'amyline (Wimalawansa 1997). Considéré comme un neurotransmetteur, ses concentrations plasmatiques sont modifiées dans plusieurs pathologies comme la migraine, l'hypertension, l'arthrose et le diabète. Son rôle dans l'inflammation neurogénique dans les tissus périphériques se fait par le recrutement des cellules immunes et l'activation des nerfs sensoriels

(Holzmann 2013, Granstein, Wagner et al. 2014, Lotti, D'Erme et al. 2014). Le CGRP est largement reconnu comme un vasodilatateur puissant dans le système cardiovasculaire par ses actions sur le muscle lisse vasculaire. De plus, le CGRP semble être impliqué dans l'hypertrophie vasculaire. Récemment, ce peptide a été impliqué dans la protection contre l'infarctus (Russell, King et al. 2014). Il existe deux isoformes: α CGRP et β CGRP. L'isoforme α CGRP semble impliqué dans divers phénomènes biologiques comme le développement placentaire, l'inflammation musculaire, l'ostéopénie et la dépression nerveuse, alors que très peu de travaux portent sur le β CGRP (Ambalavanar, Dessem et al. 2006, Hartman, Berger et al. 2006, Villa, Mrak et al. 2006, Dong, Reddy et al. 2007).

Les effets du CGRP sont relayés par un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine Gs qui active l'adénylate cyclase et mène à la formation d'AMPc intracellulaire (Edwards, Trizna et al. 1996, Disa, Parameswaran et al. 2000). Le CGRP agit via deux types de récepteurs : CGRP1 et CGRP2 (van Rossum, Menard et al. 1993). Ils sont localisés dans les lymphocytes, les macrophages et les cellules dendritiques. Le CGRP a la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur activation par les macrophages. Il augmente l'AMPc dans les lymphocytes B, permet la relâche de l'histamine par les mastocytes et augmente le contact des neutrophiles avec les cellules endothéliales vasculaires (Levite 2008, Talme, Liu et al. 2008, Holzmann 2013, Baliu-Pique, Jusek et al. 2014). Dans le pancréas, l'immunoréactivité au CGRP a été décrite dans les fibres nerveuses et dans différents types de cellules des îlots de Langerhans. Les cellules contenant le CGRP se trouvent en périphérie dans les îlots pancréatiques de rat et sont situées au centre du pancréas de toutes les autres espèces (Sternini, De Giorgio et al. 1992). Des résultats récents suggèrent que le développement de l'insulite n'est pas seulement lié à des événements

immunologiques, mais comporte aussi une composante sensorielle neuronale (Holzmann 2013). L'activation du TRPV1 provoque la libération de neuropeptides, notamment la SP et le CGRP. Le CGRP, à son tour, inhibe la libération d'insuline à partir des cellules β et exerce une activité immunosuppressive en libérant des cytokines anti-inflammatoires à partir des macrophages, des lymphocytes T et des cellules dendritiques en inhibant l'activité du NF- κ B (Campana, Serra et al. 1986, Pettersson and Ahren 1990, Tsui, Razavi et al. 2007).

1.10 Les modèles animaux de diabète de type 1

L'utilisation de modèles expérimentaux est nécessaire à la compréhension de la genèse et des complications du diabète. Les modèles de DT1 confirment l'hypothèse selon laquelle les anomalies de l'insulino-sécrétion seraient secondaires à une réduction de la population de cellules β dans le pancréas. L'induction de ce type de diabète peut se faire par intervention chirurgicale, chimique, endocrine, immunologique ou par génie génétique.

1.10.1 Modèles de diabète induit par des substances chimiques

1.10.1.1 L'alloxane (2,4,5,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil): l'alloxane est largement utilisée pour induire le diabète chez les animaux expérimentaux (Szkudelski 2001, Roep, Atkinson et al. 2004). Le mécanisme de son action dans les cellules β du pancréas a été intensivement étudié et est maintenant assez bien compris. L'action cytotoxique de cet agent diabétogène est associée aux espèces réactives de l'oxygène, cependant la source de leur génération est différente dans le cas de l'alloxane et de la streptozotocine. L'alloxane et le produit de sa réduction, l'acide dialurique, établissent des cycles d'oxydo-réduction avec la formation de radicaux superoxydes. Ces radicaux

sont soumis à une dismutation par le peroxyde d'hydrogène. Par la suite, les radicaux hydroxyles hautement réactifs sont formés par la réaction de Fenton. Cette dernière est une réaction d'oxydation avancée aboutissant à la formation des radicaux hydroxyles (HO[•]), agents oxydants des plus puissants présents dans la nature après le fluor. L'action des espèces réactives de l'oxygène avec une augmentation massive simultanée de la concentration de calcium cytosolique provoque la destruction rapide et la nécrose des cellules β . d'un

1.10.1.2 La streptozotocine (STZ): il s'agit d'un agent de chimiothérapie de type alcalin extrait de *Streptomyces achromogenes*. La STZ détruit les cellules β lorsqu'elle est administrée à forte dose. Lorsqu'elle est injectée à faibles doses répétées, elle induit une insulite (Lukic, Stosic-Grujicic et al. 1998) suivie de la destruction des cellules β par un mécanisme immunitaire dépendant des cellules T (Horwitz, Ilic et al. 2002). La STZ exerce sa toxicité grâce à une activité d'alkylation du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) (Szkudelski 2001). La glycosylation des protéines est un facteur délétère supplémentaire. L'ADP ribosylation est alors stimulée de façon excessive ce qui entraîne une baisse de NAD⁺ cellulaire, du stock d'ATP et conduit à la mort des cellules β et de toutes les cellules porteuses du transporteur GLUT2, y compris les cellules du rein et du foie (Eleazu, Eleazu et al. 2013). Les signes cliniques constants du diabète induit par la STZ sont l'hyperglycémie qui apparaît le lendemain de l'injection de STZ, est persistante et irréversible, signant l'importance de la toxicité; un arrêt de la croissance pondérale suivie d'une perte de poids et une hypo-insulinémie. Ces signes sont accompagnés d'une polydipsie, d'une polyurie et d'une polyphagie (Szkudelski 2001). Ce modèle a été utilisé dans toutes les études de cette thèse.

1.10.2 Modèles de diabète induit par inoculation de virus

Certaines infections virales peuvent engendrer un diabète aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Le virus entraîne un diabète en pénétrant dans la cellule β . L'ADN viral s'intégrant au génome de la cellule provoque une altération des fonctions de ces cellules et notamment de la synthèse et de la sécrétion d'insuline. La destruction peut être due aussi à l'initiation d'une réponse auto-immune contre les cellules β . Les virus les plus utilisés pour induire le diabète chez des modèles animaux comprennent le virus Coxsackie B (Yoon, London et al. 1986, Kang, Chatterjee et al. 1994, Jaidane, Sane et al. 2009) et celui de l'encéphalomyocardite (Craighead and McLane 1968, Baek and Yoon 1991, Shimada and Maruyama 2004).

1.10.3 Modèles de diabète induit par pancréatectomie

La méthode de pancréatectomie chirurgicale induite chez le rat permet de réaliser une ablation de 90% du pancréas endocrine. Les animaux pancréatectomisés maintiennent un poids normal. La glycémie à jeun reste d'abord normale mais, 6 à 7 semaines après pancréatectomie, elle s'élève légèrement et il apparaît, chez ces animaux, une intolérance au glucose (Kobayashi, Kobayashi et al. 2004, He, Chen et al. 2011).

1.10.4 Modèles de diabète de type 1 auto-immun spontané

Les modèles auto-immuns les plus couramment utilisés sont les souris diabétiques non obèses (NOD) et le rat BioBreeding (BB) (Yang and Santamaria 2006). Un autre modèle de DT1 auto-immun a été décrit en 2001, il s'agit du rat LEW.1AR1 / ZTM-DID (Lenzen, Tiedge et al. 2001). Cependant, le modèle de souris NOD domine la littérature et il est considéré comme le modèle de choix de diabète auto-immun induit.

1.10.5 Modèle de diabète induit génétiquement

La souris AKITA a été développée au Japon à partir de souris C57BL / 6NSlc avec une mutation spontanée dans le gène de l'insuline 2 empêchant une synthèse correcte de la pro-insuline, ce qui aboutit à une production de protéines mal repliées et un stress ultérieur permanent du réticulum endoplasmique. Il en résulte un diabète insulino-dépendant sévère à partir de trois à quatre semaines d'âge, qui est caractérisé par une hyperglycémie, hypoinsulinémie, polyurie et polydipsie (Mathews, Langley et al. 2002, Zhou, Pridgen et al. 2011).

1.11 Les plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines sont les plus petites cellules du sang. Elles furent découvertes en 1882 par Giulio Bizzozero (Ribatti and Crivellato 2007). Elles proviennent de la fragmentation du cytoplasme des mégacaryocytes qui sont de grandes cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse, pour être relâchées ensuite dans le sang où elles circulent à raison de 150 000 à 350 000/ μ l dans les conditions physiologiques. Elles se développent à partir d'une cellule souche pluripotente selon le schéma suivant :

Mégacaryoblaste \longrightarrow Promégacaryocytes \longrightarrow Mégacaryocytes \longrightarrow Plaquettes

Leur durée de vie est de 7 à 12 jours avant leur élimination par phagocytose par les macrophages du système réticulo-histiocytaire dans le foie, la rate et la moelle osseuse. Les plaquettes jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'intégrité vasculaire et leur fonction majeure est d'assurer l'hémostase primaire qui aboutit à la formation d'un thrombus riche en plaquettes ou « thrombus blanc » (Furie and Furie 2008). Cependant, on s'aperçoit aujourd'hui qu'elles ont également un rôle important dans

les processus de cicatrisation, de régulation de l'inflammation, d'angiogenèse et de séparation des vaisseaux lymphatiques et sanguins (Leslie 2010).

1.11.1 Structure des plaquettes sanguines

Les plaquettes sanguines aussi nommées thrombocytes sont composées d'une membrane, d'un cytosquelette et de granules de sécrétion.

1.11.1.1 La membrane plasmique

Elle présente des invaginations membranaires servant de conduit par lequel les granules cytoplasmiques après leur fusion déversent leur contenu dans le milieu extracellulaire suite à l'activation plaquettaire. La membrane plasmique des plaquettes constitue aussi un lieu d'ancrage pour une variété de récepteurs et de molécules d'adhésion.

1.11.1.2 Le cytosquelette plaquettaire

Cet attribut donne une résistance aux plaquettes et agit comme un mur d'ancrage aux différentes glycoprotéines membranaires. Il est également le lieu de bon nombre de réactions biochimiques impliquées dans l'activation plaquettaire. Il est formé d'une couche membranaire à base de spectrine, d'une couche cytoplasmique formée d'un réseau de filament d'actine et d'une couche unique de microtubules enroulés sous la membrane plasmique. On assiste à une réorganisation du cytosquelette lors de l'activation plaquettaire aboutissant à un changement de forme des plaquettes d'une forme discoïde à une forme sphérique dotée de filopodes. Le cytoplasme des plaquettes contient un nombre important de granules de sécrétion nommées granules plaquettaires alpha, granules denses et

lysosomes. Ces granules contiennent des substances nécessaires à l'activation, l'adhésion et l'agrégation plaquettaire (Saluk, Bijak et al. 2014) .

1.11.1.3 Les molécules d'adhésion plaquettaire

La fonction plaquettaire doit assurer la formation du clou hémostatique et pour ce faire les plaquettes doivent être dotées de moyens d'adhérence tels que des molécules d'adhésion et des récepteurs leur permettant de se lier à l'endothélium, à la matrice sous-endothéliale et à d'autres plaquettes. L'étude des molécules d'adhésion plaquettaire a permis une analyse plus approfondie du rôle et des voies mécanistiques par lesquelles les plaquettes participent à l'hémostase physiologique, mais aussi à la thrombose pathologique.

On distingue 4 grandes classes de molécules d'adhésion :

a) Les intégrines

L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (récepteur du collagène), l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (récepteur de la vitronectine), l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (récepteur de la fibronectine), l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ (récepteur de la laminine) et l' $\alpha IIb\beta 3$ (récepteur du fibrinogène) qui est la plus importante et la plus impliquée dans l'agrégation plaquettaire (Figure 1). Elle s'associe au filament d'actine du cytosquelette membranaire, ce qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique et qui a pour but d'augmenter la résistance des agrégats plaquettaires (Qin and Plow 2013).

b) Les immunoglobulines

La glycoprotéine VI (**GPVI**) est l'une des plus importantes molécules d'adhésion plaquettaire et constitue, avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, un des deux récepteurs majeurs pour le collagène. Les autres immunoglobulines sont les récepteurs Fc ($Fc\gamma RIIA$, $Fc\epsilon RI$), les ICAM-2 et PECAM-1 (Naitoh, Hosaka et al. 2014).

c) Les sélectines

Seule la P-sélectine est retrouvée dans les plaquettes; suite à l'activation plaquettaire, environ 10000 copies de P-sélectine sont redistribuées des granules cytoplasmiques à la membrane cellulaire. Une des fonctions principale de la P-sélectine est l'interaction adhésive entre les plaquettes et les leucocytes.

d) L'unique complexe GPIb-IX-V

Le complexe GPIb-IX-V est principalement responsable de la régulation de l'activation et de l'adhérence initiale des plaquettes sanguines à la lésion du vaisseau sanguin endommagé. L'importance de la GPIb est démontrée par les problèmes de saignement chez les patients atteints du syndrome de Bernard-Soulier, où ce récepteur est absent ou défectueux.

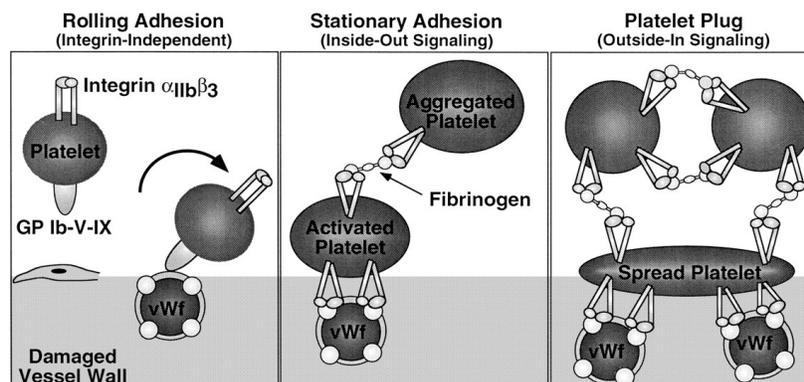


Figure 1. Mécanismes d'activation plaquettaire conduisant à l'activation de $\alpha IIb\beta 3$. Activation de $\alpha IIb\beta 3$ favorise la liaison du fibrinogène et du facteur de von Willebrand (vWf) conduisant à l'agrégation plaquettaire et la formation de thrombus. (Adapté de Shatil, Kashiwagi et al.1998).

1.11.2 La fonction plaquettaire

Les plaquettes sont connues pour leur rôle dans l'hémostase et la thrombose vasculaire, mais les études scientifiques effectuées ces dernières années et la meilleure connaissance des voies de signalisation impliquées dans l'activation plaquettaire font ressortir leur rôle dans l'apparition et l'évolution de plusieurs pathologies et complications, notamment l'athérosclérose, les syndromes coronariens, les pathologies vasculaires périphériques, le cancer, les accidents vasculaires cérébraux (AVC), les maladies auto-immunes, le diabète, les maladies psychiatriques, et bien d'autres (Gasparyan, Ayvazyan et al. 2014, Gros, Ollivier et al. 2014, Koc, Uzar et al. 2014, Tamagawa-Mineoka 2014, Chadha, Kocak-Uzel et al. 2015).

1.11.3 Les grandes voies de signalisation plaquettaire

La réponse physiologique à une lésion vasculaire se fait par la formation d'un thrombus plaquettaire et a pour but initial de freiner de façon contrôlée le saignement. La formation d'un caillot stable est nécessaire jusqu'à ce que la cicatrisation prenne place. L'activation des plaquettes implique la participation de molécules d'adhésion de support (collagène, facteur Von Willebrand) et des molécules solubles (thrombine, ADP, thromboxane A₂) (Offermanns 2006, Varga-Szabo, Pleines et al. 2008). Des agonistes sont impliqués dans l'initiation et la propagation de l'activation plaquettaire (ADP, thromboxane A₂, épinephrine). Les études montrent que la plupart des agonistes plaquettaires solubles utilisent des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) (Offermanns 2006). Ces récepteurs plaquettaires ne sont pas tous responsables d'une activation car des mécanismes d'inhibition plaquettaire impliquent aussi des GPCR, comme c'est le cas pour la voie de PGI₂ ainsi que la voie du NO qui activent des adénylate et guanylate cyclases, respectivement (Roberts, Riba et al. 2008).

1.11.3.1 Voies de signalisation dépendantes des protéines G

De nombreux agonistes solubles jouent un rôle clé dans l'amplification de l'activation et le recrutement plaquettaire dans le sang (ADP, thromboxane A₂, thrombine). L'interaction de ces agonistes solubles avec leurs GPCR génère une signalisation menant à l'activation de l'intégrine α IIb β 3 qui changera de conformation (signalisation *inside-out*) et pourra alors lier le fibrinogène soluble. Cette étape est indispensable au phénomène d'agrégation plaquettaire (Offermanns, 2006). L'activation plaquettaire via les GPCR comprend trois grandes voies de signalisation initiées par l'activation des sous-unités $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha 12/13}$ et $G_{\alpha i}$ (Figure 2). PAR1, PAR4 (protease-activated receptors), TP (thromboxane receptor) et P2Y1 (ADP receptor) sont couplés à $G_{\alpha q}$, alors que P2Y12 et PAR1 sont couplés à $G_{\alpha i}$. TP et PAR1 sont aussi couplés à $G_{\alpha 12/13}$. La protéine $G_{\alpha q}$ induit l'activation de la phospholipase C β (PLC β) responsable de la formation d'IP₃ et de DAG conduisant respectivement à la mobilisation calcique induisant notamment l'activation de la MLCK (myosin light-chain kinase) et à l'activation des protein-kinase C (PKCs). La MLCK phosphoryle la chaîne légère de la myosine impliquée dans la formation de complexes d'actomyosine responsables de la génération de forces de tension nécessaires à une agrégation forte.

Il existe plusieurs isoformes de PKC: les isoformes conventionnelles (α , β), nouvelles (δ , θ , ϵ , η) et atypiques (ζ). PKC β , PKC δ et PKC θ sont localisées dans les plaquettes sanguines, les PKC β et PKC α sont impliquées dans la régulation de la signalisation dite « *outside-in* » tandis que la PKC δ régule la formation des filopodes (Harper and Poole 2007). La protéine $G_{\alpha 12/13}$ induit l'activation de la GTPase RhoA qui stimule la Rho-kinase laquelle contribue au maintien de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine (Klages, Brandt et al. 1999, Gratacap, Payrastre et al. 2001). La protéine $G_{\alpha i}$ inhibe l'adénylate cyclase responsable de la production d'AMPc, induisant donc une diminution

des taux d'AMPc intracellulaire. Cela conduit donc à une diminution de l'activité sérine/thréonine kinase de la Protein kinase A (PKA) qui joue un rôle inhibiteur dans l'activation plaquettaire. Une des cibles de cette dernière est la protéine VASP (vasodilatator stimulated phosphoprotein) dont la phosphorylation contribue à réguler négativement l'agrégation plaquettaire via l'inhibition de l'intégrine α Ib β 3. Par ailleurs, le complexe β/γ de la protéine G_i participe à l'activation de PI3Ks responsables de la production de phosphatidyl inositols (3,4,5), conduisant à la phosphorylation de la sérine/thréonine kinase Akt via les phosphoinositide-dependent kinase 1 et 2 (PDK1 et PDK2). Les sous-unités β/γ de G_i participent également à l'activation de la GTPase Rap1b impliquée dans l'activation de l'intégrine α Ib β 3 (Woulfe, Jiang et al. 2002, Lova, Paganini et al. 2003).

TXA2, thrombine, ADP, 5HT

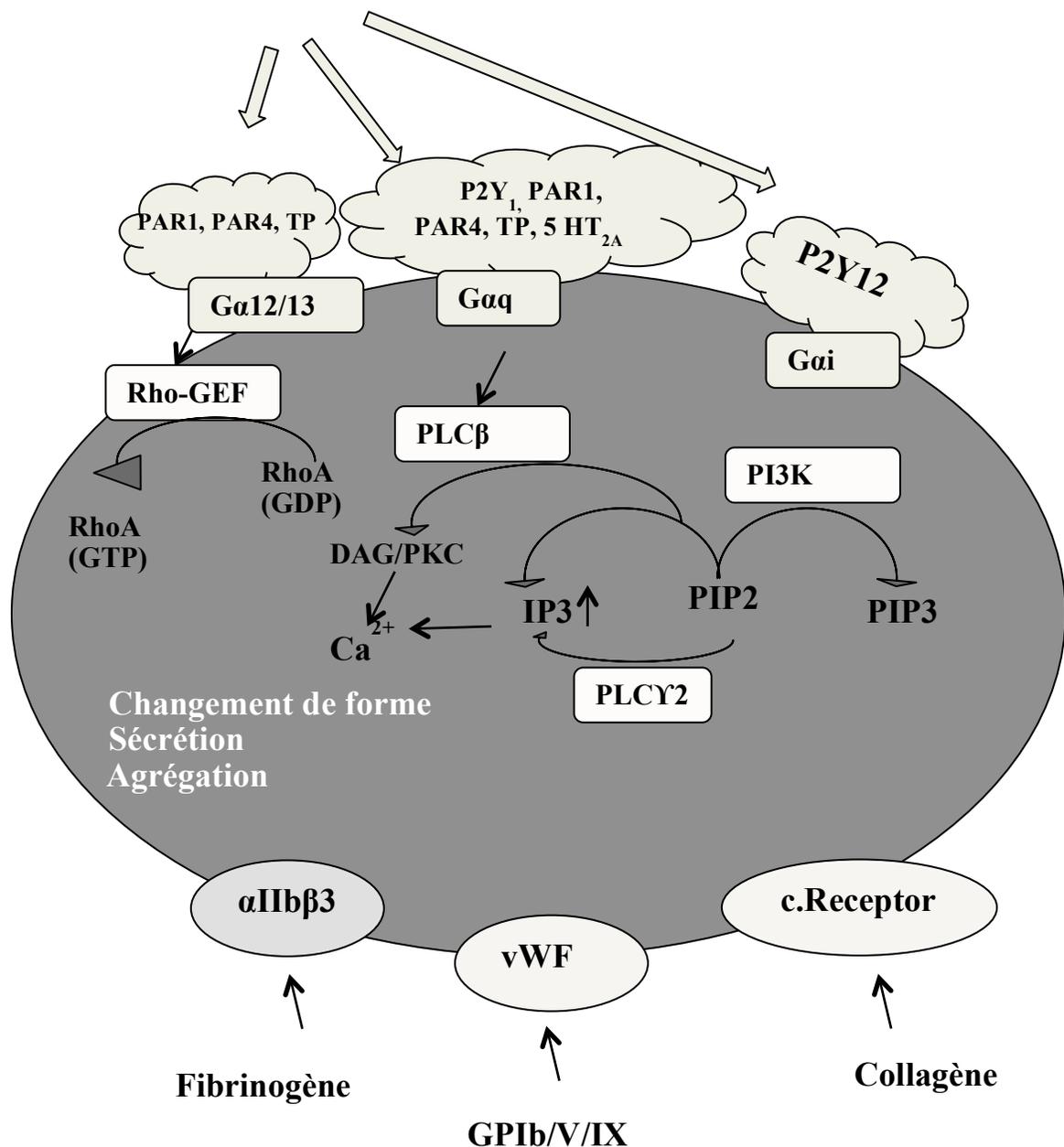


Figure 2. Mécanismes de signalisation reliant les principaux récepteurs et intégrines plaquettaires. Le GPIIb/IIIa active la voie des ITAM, alors que la voie de signalisation dépendante des protéines G active Gα_q, Gα_{i/z}, et Gα_{12/13}, adénylyl cyclase. GPIIb/IIIa = glycoprotein receptor pour collagène, DAG=diacyl glycérol; IP₃= inositol-1,4,5-trisphosphate; PI-3-Kβ/γ= phosphoinositide-3-kinase β/γ; PIP₂=phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate; PIP₃= phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate; PKC= protein kinase C; PLCβ=phospholipaseC-β; RhoGEF= Rho-specific guanine nucleotide exchange factor. (Tiré de Varga-Szabo, Pleines et al. 2008).

1.12 Le sepsis et le choc septique

Le sepsis sévère et le choc septique comptent parmi les premières causes de mortalité chez les patients admis en réanimation. L'incidence aux États-Unis a été évaluée à 750 000 cas par an (Angus, Linde-Zwirble et al. 2001). Une étude française a évalué que le choc septique est la cause d'admission en réanimation pour 8,4% des cas, avec une mortalité de 60% (Annane, Aegerter et al. 2003). Le sepsis est un syndrome inflammatoire systémique en réponse à une infection qui s'accompagne d'une défaillance fonctionnelle associée à l'infection et qu'on regroupe sous le terme de choc septique. Le choc septique est caractérisé par une hypotension artérielle; celle-ci est la conséquence d'une importante vasodilatation périphérique et d'une hypovolémie à laquelle participe l'augmentation de la perméabilité capillaire. En plus des conséquences sur le système cardiovasculaire avec hypovolémie et troubles de la vasomotricité (Dougnac, Mercado et al. 2007), il y a une atteinte rénale et des troubles de la microcirculation et une atteinte métabolique avec acidose témoignant d'un métabolisme anaérobie et une hyperthermie. Cette dernière dérive de l'élévation de la demande métabolique et elle est souvent accompagnée de troubles de l'hémostase avec coagulation intravasculaire disséminée. Les infections à l'origine du choc septique sont causées par des bactéries qui tiennent leurs pouvoirs immunogènes des peptidoglycanes, des porines, des lipopeptides, des lipoprotéines, des pili, des flagellines, de l'ADN riche en motifs cytosine-phosphate-guanine (CpG) non méthylée, ou des toxines bactériennes (Heumann and Roger 2002). Les infections fongiques, virales et parasitaires ne représentent qu'un petit pourcentage des chocs septiques (Annane, Bellissant et al. 2005). Un des composés bactériens le plus immunogène est l'endotoxine des bactéries Gram-négatives. Il s'agit d'un lipopolysaccharide (LPS) entrant dans la composition de la membrane externe. Le LPS est formé d'un polysaccharide et d'un lipide A, site actif de l'endotoxine, qui est ancré dans la bicouche lipidique de la membrane bactérienne et d'une

chaîne de polysaccharides orientée directement vers l'extérieur (Lynn 1998). Les effets des LPS sont multiples et on compte parmi ces actions la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β , la production d'espèces réactives oxygénées, de monoxyde d'azote et de peroxyde d'azote qui semblent avoir un rôle dans les effets cardiovasculaires du sepsis. Les LPS sont libérés de la paroi externe des bactéries Gram-négatives lors de leur multiplication ou lorsqu'elles sont endommagées par le complément ou les antibiotiques (Lynn 1998, Heumann and Roger 2002). Les LPS se lient ensuite à la LBP (LPS Binding Protein), une glycoprotéine synthétisée par le foie à la phase aiguë de l'inflammation. Cette dernière permet le transfert du LPS vers le CD14 qui est une glycoprotéine exprimée par les cellules de la lignée myélo-monocytaire, et qu'on retrouve également sous forme soluble, ce qui permet aux cellules qui ne l'expriment pas constitutivement à leur surface comme les cellules de l'endothélium d'être stimulées par le LPS. Une fois le complexe LPS-LBP formé, le CD14 interagit avec un autre récepteur membranaire, le récepteur de type Toll 4 (TLR4) pour activer la voie de signalisation intracellulaire (Miyake 2004, Takeda and Akira 2005). Une fois l'interaction complétée avec le complexe LPS-LBP-CD14, la partie intracytoplasmique du récepteur Toll 4 recrute la protéine MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) qui se distingue par un domaine TIR (Toll/IL1R homology domain) carboxy-terminal et un domaine DD (Death Domain) amino-terminal, par l'intermédiaire duquel elle se lie à une sérine/thréonine kinase IRAK-1/IRAK4 (IL1R Associated Kinase-1) (Figure 3). Après stimulation, IRAK-1/IRAK-4 est phosphorylée, se décroche de MyD88 et se lie à TRAF 6 (TNF Receptor Associated Factor) dans le cytoplasme qui active NIK (NF- κ B- Inducing Kinase), protéine de la famille des MAP3K (Mitogen-Activated Protein Kinase). C'est le complexe NIK-IKK α -IKK β qui entraîne la phosphorylation de l'inhibiteur I- κ B et la translocation nucléaire de NF- κ B (Nuclear Factor of immunoglobulin κ light chain in B cells). Le facteur nucléaire se lie alors aux promoteurs des gènes des protéines de la

réaction inflammatoire et induit la transcription de ceux-ci. Le NF- κ B est un facteur de transcription capable de se fixer sur une séquence d'une dizaine de nucléotides, située au niveau des régions promotrices des gènes codant pour les protéines pro-inflammatoires. Il est constitutif et se trouve dans le cytoplasme sous forme inactive par une liaison non covalente avec des I- κ Bs (inhibiteurs du NF- κ B). Le NF- κ B peut être activé dans les cellules sous l'effet de stimuli variés tels que le LPS, le TNF- α , l'IL-1 β , les radicaux libres, les radiations ionisantes et certains agents chimiques. Certains de ces stimuli entraînent une phosphorylation de I- κ B, qui induit un signal pour une poly-ubiquitination précédant la dégradation de I- κ B par la voie du protéasome 26S. Ainsi libéré de son inhibiteur naturel, le NF- κ B expose sa séquence du signal d'adressage intranucléaire NLS (Nuclear Localisation Sequence) qui permet son transfert vers le noyau, où il se fixe sur les séquences κ B du promoteur des gènes cibles pour activer leur transcription. Les promoteurs du facteur transcriptionnel NF- κ B sont localisés au niveau de nombreuses séquences, codant pour des protéines impliquées dans la cascade immuno-inflammatoire : NO- synthase, des molécules d'adhérence membranaires (ICAM-1), des protéines inflammatoires de la phase aiguë et de nombreuses cytokines (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6). L'association entre l'activité du NF- κ B et la mortalité au cours du sepsis a été démontrée dans le score de risque de mortalité (score APACHE II, signifiant Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) et semble largement impliquée dans la physiopathologie du choc septique (Murphy, Haudek et al. 1998, Dawn, Xuan et al. 2001, Haudek, Spencer et al. 2001).

Le traitement du choc septique est avant tout étiologique; il vise à traiter l'infection responsable par une antibiothérapie adaptée et efficace choisie en fonction des résultats de l'antibiogramme, du foyer infectieux suspecté, du terrain et en fonction des facteurs de risques éventuels de résistance aux antibiotiques. Dans de rares cas, un traitement chirurgical est nécessaire à l'éradication du foyer

infectieux. Pour ce qui est du traitement symptomatique, il faut favoriser le transport d'oxygène en assurant une bonne ventilation, maintenir un taux d'hémoglobine supérieur à 10 g/dL et corriger les troubles métaboliques, surtout l'acidose métabolique en essayant de maintenir un pH supérieur à 7,2. On aura également recours au remplissage vasculaire pour corriger l'hypotension secondaire au collapsus avec utilisation de catécholamines et de corticoïdes (Popovic et al., 2008).

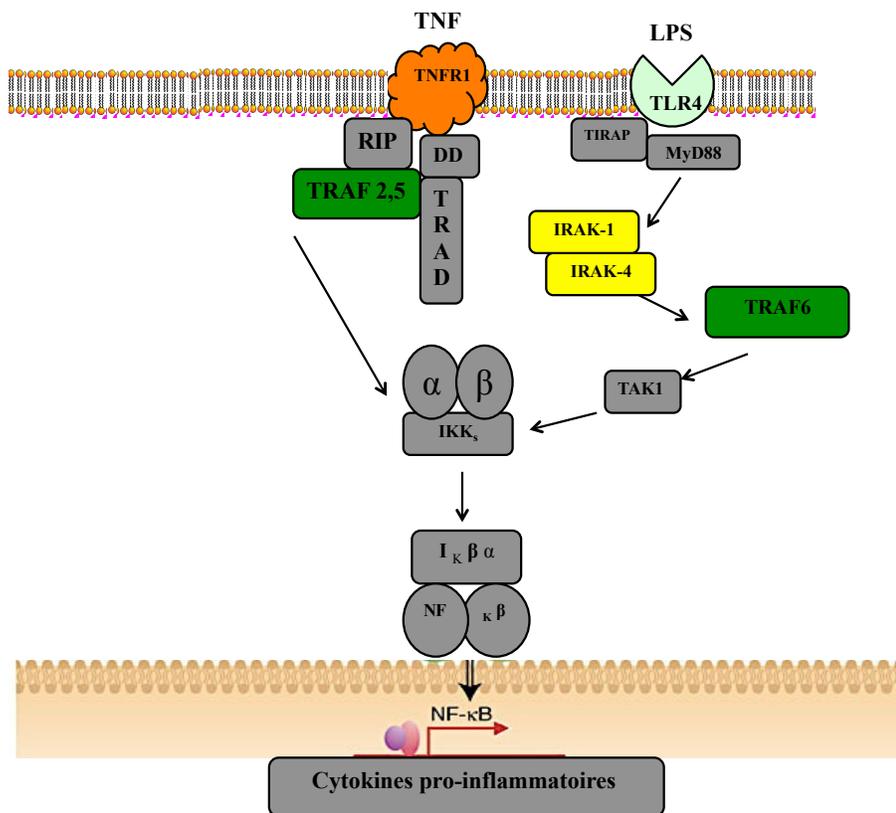


Figure 3. Mécanismes de signalisation du TNF et du TLR4 qui utilisent les mêmes composantes de signalisation qui activent le NF- κ B via le complexe IKK α / β / γ et abouti à la synthèse des cytokines pro-inflammatoires. (Image inspirée de Heissmeyer and Rao 2008, Lu, Yeh et al. 2008).

1.13 La coagulation intravasculaire disséminée

La coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) est un syndrome acquis qui fait suite à une défaillance des systèmes inhibiteurs de la coagulation. Ceux-ci sont incapables de limiter l'hypercoagulabilité plasmatique associée à une activation systémique excessive de la coagulation. Ce syndrome se définit par l'association d'anomalies cliniques et biologiques avec consommation excessive de fibrine, de plaquettes et de facteurs de la coagulation. Un dysfonctionnement de la fibrinolyse ainsi qu'une incapacité d'assurer la dégradation de la fibrine aggravent les phénomènes thrombotiques (Gando 2013, Levi 2014). La CIVD s'inclut dans un processus complexe qui commence par un syndrome d'activation systémique de la coagulation difficile à mettre en évidence et qui se poursuit par l'apparition de troubles biologiques puis cliniques de l'hémostase. Ces derniers peuvent engager le pronostic vital s'ils s'associent à une ou plusieurs défaillances d'organes (Wada, Gando et al. 2013). Dans les cas du sepsis qui représente la principale cause des CIVD, c'est l'induction de la synthèse et de l'expression membranaire du facteur tissulaire (FT) par les cellules au contact du sang, en réponse à des stimuli inflammatoires qui provoquent l'activation anormale de la coagulation et génèrent la thrombine et de ce fait active le contact entre facteur tissulaire et facteur activé (FVIIa), qui représente l'événement clé de la CIVD (Levi 2005, Asakura 2011) (Figures 4 et 5). La source du facteur tissulaire n'est pas clairement élucidée et plusieurs origines cellulaires sont possibles. Certaines cellules vasculaires, les monocytes/macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires, peuvent synthétiser le FT sous l'effet de nombreux stimuli infectieux et inflammatoires, mais la réponse la plus forte est celle des monocytes/macrophages. L'activation de la coagulation génère des protéases interagissant avec des récepteurs cellulaires impliqués dans les voies de signalisation pro-inflammatoires (Esmon 2001). Le facteur Xa, la thrombine et les

complexes FT-FVIIa ont ainsi des propriétés pro-inflammatoires (Bastiaans, van Meurs et al. 2013). La thrombine et le FXa stimulent la production endothéliale d'IL6 et d'IL8 en augmentant aussi l'expression membranaire de molécules favorisant l'adhésion leucocytaire (VCAM-1, P-sélectine) (Senden, Jeunhomme et al. 1998, Busch, Seitz et al. 2005). Les récepteurs PAR couplés à des protéines G sont importants dans ce processus (Bukowska, Zacharias et al. 2013). On en dénombre quatre types: PAR-1, PAR-3 et PAR-4 sont activés par la thrombine tandis que les PAR-2 se lient aux complexes FT-FVIIa. De nombreux travaux ont été consacrés au rôle du FT dans le déclenchement de la CIVD. L'expression du FT par les monocytes sous l'action des endotoxines est la cause de la CIVD des sepsis causés par les bactéries Gram-négatives (Losche 2005). Le mécanisme responsable de cette expression est une liaison du lipide A de l'endotoxine à un ou plusieurs récepteurs de la membrane monocytaire. Le récepteur CD14 est le récepteur le plus important dans la liaison de l'endotoxine. L'endotoxine induit par ailleurs une diminution de l'expression de la thrombomoduline au niveau des cellules endothéliales (Ma, Shi et al. 2012). Elle induit donc un profil « thrombogène » au niveau des cellules endothéliales, qui participe probablement à la genèse de microthromboses, en particulier au niveau capillaire. À côté de l'abondante littérature concernant l'induction du FT dans les monocytes par l'endotoxine, relativement peu de données concernent les bactéries Gram-positives. L'importance de l'expression du FT monocytaire dans l'activation de la coagulation au cours du choc septique a été progressivement démontrée par des études cliniques et expérimentales.

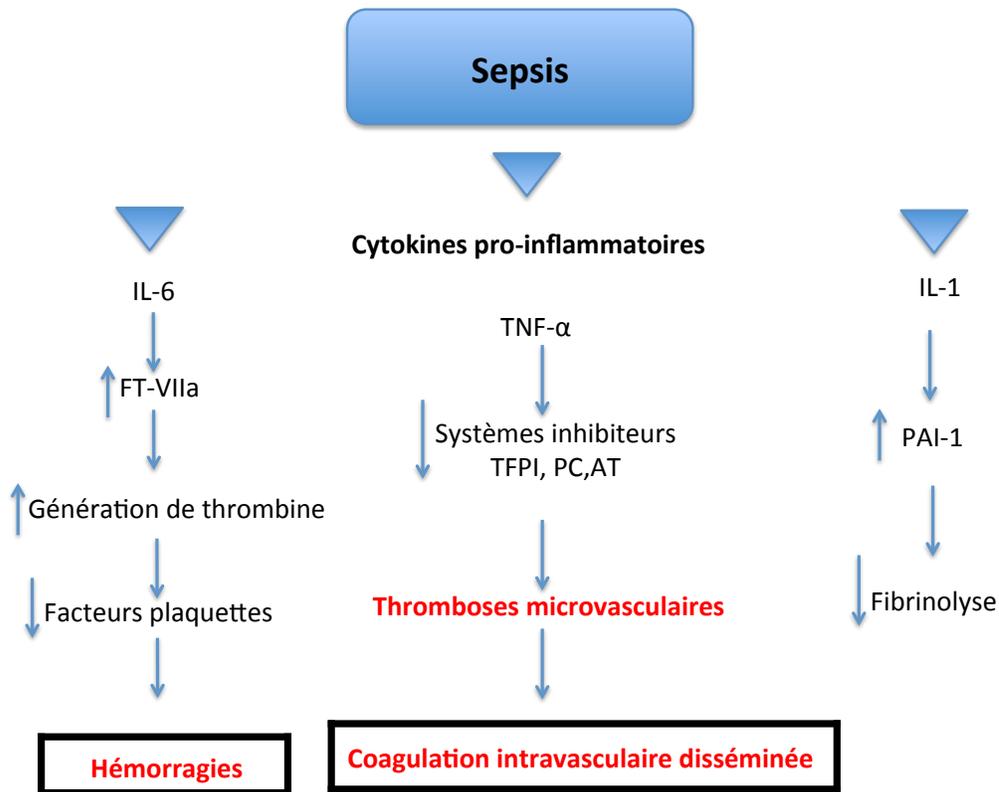


Figure 4. Pathogenèse de la coagulation intra-vasculaire disséminée montrant le déséquilibre entre l'activation excessive de la coagulation et la diminution des mécanismes anticoagulants. TFPI=tissu factor pathway inhibitor, PC= protéine-C, AT= antithrombine, PAI-1= inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1, IL-1=interleukine1, TNF- α = tumour necrosis factor-alpha, IL-6=interleukine 6, FT =facteur tissulaire, VIIa= le facteur VII activé. (Inspiré de Zeerleder, Hack et al, 2005)

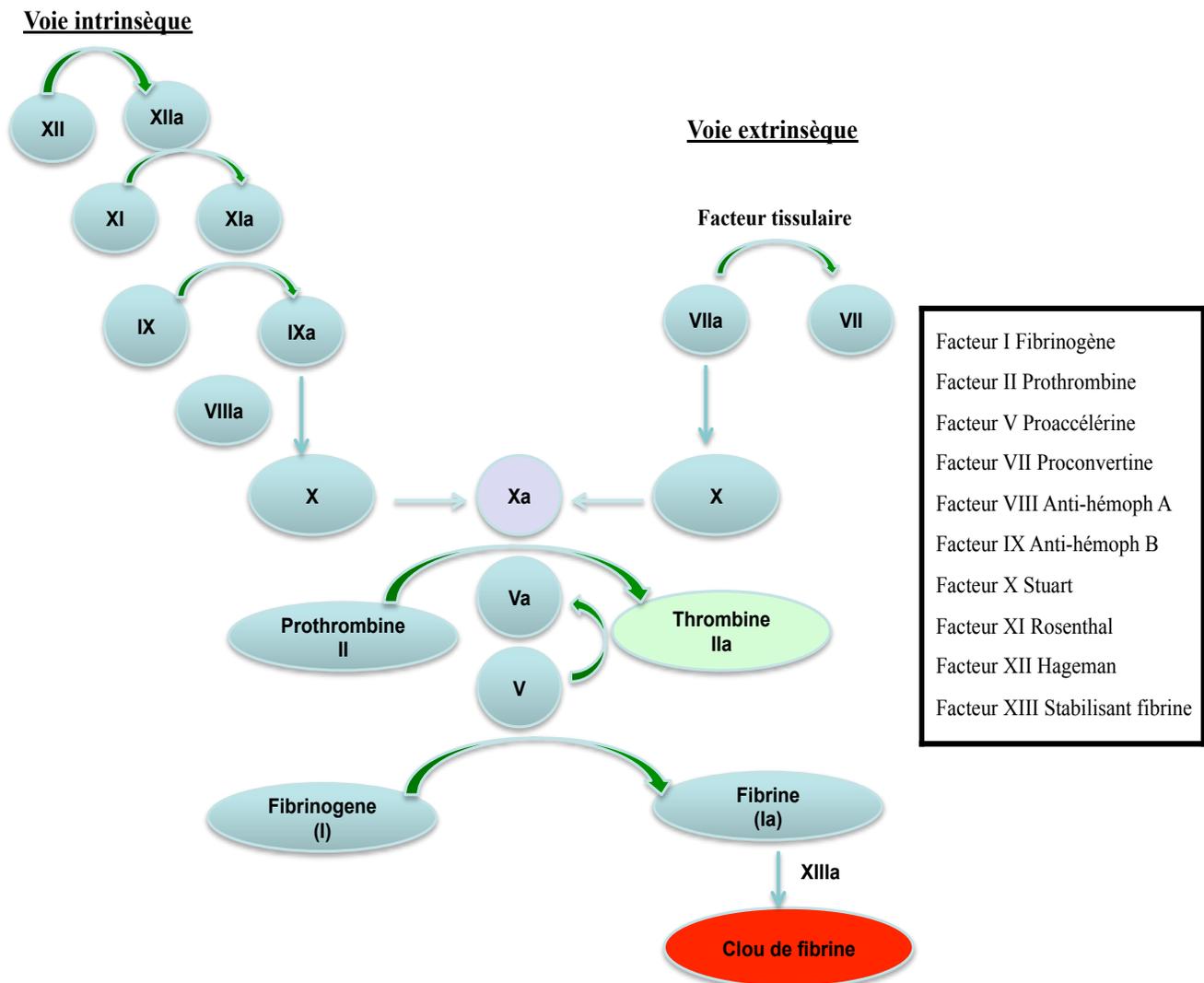


Figure 5. Cascade de coagulation (inspirée de Sabir, Khavandi et al. 2014).

1.14 Système kallibréine-kinine (SKK)

Le SKK est un système peptidergique complexe comprenant des enzymes de synthèse, les kallibréines, leurs substrats, les kininogènes, et les peptides vasoactifs, les kinines (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). Les kinines sont formées après clivage des kininogènes à haut et bas poids moléculaires respectivement sous l'action des kallibréines plasmatiques et tissulaires qui sont activées par des protéases (Figure 6). Ce système joue un rôle majeur dans l'inflammation, la réponse immunitaire, les troubles de la perméabilité vasculaire, la résistance à l'insuline, les dysfonctions endothéliales et les complications du diabète (Stadnicki, Pastucha et al. 2005, Dias and Couture 2012, Liu and Feener 2013, Couture, Blaes et al. 2014). Des études récentes ont aussi montré que les kallibréines tissulaires chez l'homme et l'animal ont un rôle protecteur dans le diabète et l'ischémie cardiaque. Les kinines jouent un rôle de neuromédiateurs dans certaines fonctions cérébrales notamment dans le contrôle des informations nociceptives et de la pression artérielle (Caous, Koepf et al. 2008, Talbot and Couture 2012, Sharma and Narayanan 2014, Couture et Lindsey 2001).

1.14.1 Biosynthèse des kinines

Les kinines sont des peptides de 9 à 11 acides aminés, composés de la bradykinine (BK), de la kallidine (KD; Lys-BK), de la T-kinine (Ile-Ser-BK) et de leurs métabolites actifs dépourvus de l'arginine en position carboxy-terminale (Gabra, Couture et al. 2003, Couture, Blaes et al. 2014). Deux voies biochimiques aboutissent à la production de la BK et de la KD; la voie sanguine et la voie tissulaire. La formation de BK fait suite à l'activation du facteur de Hageman (facteur XII de la coagulation) lorsque le sang entre en contact avec des surfaces possédant des charges négatives telles que les composantes de la matrice cellulaire (collagène) ou d'autres particules chargées négativement (lipopolysaccharide). La pré-kallibréine plasmatique, associée au kininogène de haut poids

moléculaire (KHPM), est convertie par le facteur de Hageman activé en kallibréine. La kallibréine plasmatique agit sur le KHPM pour libérer la BK. La kallibréine tissulaire est activée par des enzymes protéolytiques et assure le clivage du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM) pour former la KD (Figure 6). La T-kinine est présente uniquement chez le rat. Les KHPM et KBPM proviennent d'un seul gène, le gène K, et résultent de la transcription de deux ARNm différents (Marceau and Regoli 2004).

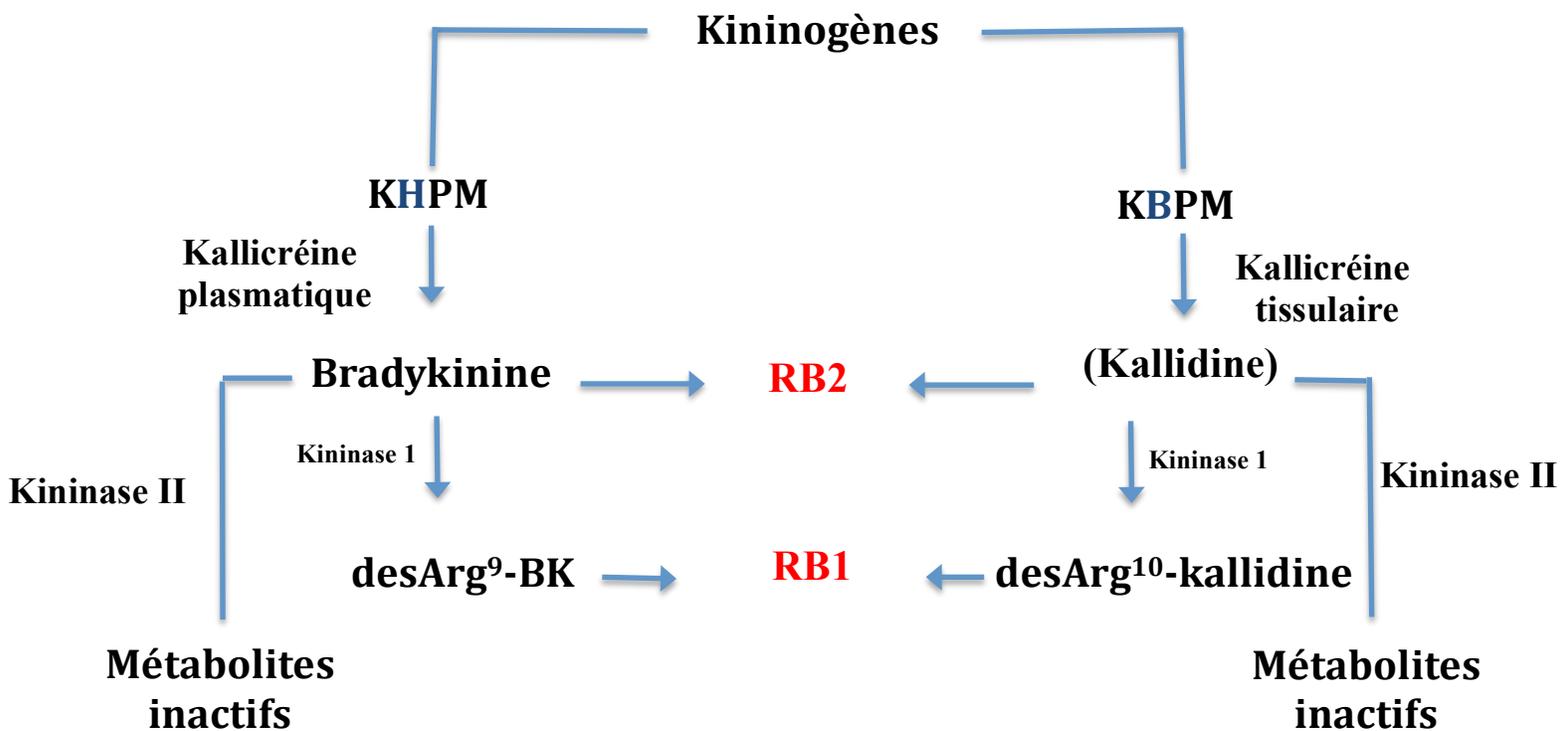


Figure 6. Schéma illustrant le système kallibréine-kinine

1.14.2 Voies alternatives menant à la production des kinines

Certaines protéases ont été rapportées comme possédant une activité kininogénase en plus des kallikréines tissulaires et plasmatiques. La plasmine, qui se retrouve sous forme de zymogène au niveau de la circulation sanguine, est une enzyme essentielle à la fibrinolyse qui produit la libération de la BK ainsi que de la desArg⁹-BK par son activité sur le KHPM (Molinaro, Gervais et al. 2002). Le plasminogène, zymogène de la plasmine, est activé par l'activateur de plasminogène tissulaire (t-PA), sécrété par les cellules endothéliales, très actif lorsqu'il est lié à la fibrine (Kruithof and Dunoyer-Geindre 2014). Il a été rapporté récemment que la protéinase 3 (PR3), une sérine protéase qui se trouve dans le cytoplasme des neutrophiles vieillissants, est libérée lors de la dégranulation des neutrophiles (Loison, Zhu et al. 2014) et permet la relâche d'un peptide alternatif de 13 acides aminés à partir du KHPM des neutrophiles humains. Cette kinine vasoactive libérée par la PR3 comporte quatre acides aminés additionnels : deux en N-terminal et, deux en C-terminal de la séquence de la bradykinine, **Met-Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-Ser-Ser** (Gera, Roy et al. 2011). Une autre étude rapporte que la PR3-kinine, le nom donné à ce composé, est un agoniste du récepteur B1, mais suivant son métabolisme peut aussi activer le récepteur B2 des kinines (Kahn, Hellmark et al. 2009). Finalement, il est à rappeler que certains micro-organismes pathogènes comme *Candida* libèrent des enzymes protéolytiques qui ont pour substrats les kininogènes et qui permettent la libération de kinines (Bras, Bochenska et al. 2013).

1.14.3 Les kininases I ou carboxypeptidases

Les carboxypeptidases M et N (CPM et CPN), également appelées kininases I, sont des métallopeptidases dépendantes d'un atome de zinc présent dans leur site catalytique (Arolas, Vendrell et al. 2007). Elles permettent de transformer la BK et la Lys-BK en métabolites actifs, la des-Arg⁹-

BK et la Lys-des-Arg⁹-BK, qui sont les agonistes du RB1. La CPN est localisée au niveau du foie et du plasma alors que la CPM est ancrée à la membrane plasmique de l'endothélium vasculaire via un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI) (Reverter, Maskos et al. 2004, Keil, Maskos et al. 2007). La cathepsin X, une cysteine protease lysosomale présente au niveau des monocyte/macrophage et des cellules endothéliales peut également jouer le rôle de kininase I (Nagler, Kraus et al. 2010). Ces enzymes hydrolysent plusieurs peptides possédant un résidu Lys ou Arg à leur extrémité C-terminale, comme les protéines C3a et C5a du système du complément.

1.14.4 Métabolisme des kinines

La demi-vie des kinines dans le plasma est très courte (Marceau, Hess et al. 1998). La BK est métabolisée par différentes amino-, carboxy- et endopeptidases qui aboutissent à son inactivation à l'exception de la kininase I qui transforme la BK en son métabolite actif, la des-Arg⁹-BK (Skidgel 1992). Les kinines exercent leurs activités pharmacologiques de façon autocrine ou paracrine. Trois enzymes sont principalement impliquées lors du métabolisme de la BK. La voie métabolique principale fait intervenir l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA, kininase II) qui compte pour près de 75% de l'activité enzymatique responsable du métabolisme plasmatique de la BK. L'ECA transforme la BK(1-9) en BK(1-7) et enfin en BK(1-5) et relie le système KK ayant des propriétés vasodilatatrices et le système rénine-angiotensine-aldostérone aux propriétés vasoconstrictrices. La deuxième enzyme responsable de l'inactivation de la BK est l'aminopeptidase P (APP) qui transforme la BK(1-9) en BK(2-9) qui à son tour sera transformée en BK(4-9) par la dipeptidyl peptidase IV. Enfin, la kininase I joue un rôle mineur dans la transformation de la BK(1-9) en BK(1-8) (des-Arg⁹-BK). Cette voie devient majeure lorsque l'ECA est inhibée. Le métabolisme de la desArg⁹-BK se fait par deux enzymes, l'ECA d'une part et l'APP d'autre part, l'APP étant la

voie métabolique majeure. La dégradation de la BK au niveau de l'endothélium vasculaire se fait par l'ECA qui constitue l'enzyme principale responsable de sa dégradation. Une inhibition de l'ECA entraîne la mise en jeu d'une autre enzyme, l'endopeptidase neutre (EPN) (Kokkonen, Lindstedt et al. 2000, Cyr, Lepage et al. 2001, Erdos and Marcic 2001, Cilia La Corte, Carter et al. 2008, Couture, Blaes et al. 2014). Ces peptidases nécessitent pour leur activité catalytique la présence de zinc comme groupe prosthétique (Moreau, Dubreuil et al. 2005). Récemment, la thimet oligopeptidase a aussi été identifiée comme étant impliquée dans le métabolisme des kinines (Sanden, Enquist et al. 2008).

1.14.5 Les kinines et leurs récepteurs

Les kinines exercent leurs effets via deux types de récepteurs membranaires couplés aux protéines G ($G_{\alpha q} / 11$ et $G_{\alpha i}$) : un récepteur B2 (RB2) constitutif et un récepteur B1 (RB1) inductible. Le RB2 participe à la phase aiguë de l'inflammation alors que le RB1 joue surtout un rôle dans la phase chronique de la réponse inflammatoire où il est l'acteur principal des pathologies à forte composante immune comme le diabète ou le choc septique. Ceci justifie l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs comme agents thérapeutiques (Couture, Blaes et al. 2014). Les récepteurs B1 et B2 des kinines ont été clonés et définis sur la base de critères pharmacologiques par l'usage d'agonistes et d'antagonistes peptidiques et non peptidiques (Regoli et al., 2001). Le RB1 a pour agoniste la desArg⁹-BK et la desArg¹⁰-KD (Lys-des-Arg⁹-BK) alors que le RB2 est la cible préférentielle de la BK, la KD et la T-kinine (Marceau and Bachvarov 1998).

Le RB1 des kinines est absent ou sous exprimé en situation physiologique normale; il est induit et surexprimé à la suite de lésions tissulaires ou après l'exposition à des endotoxines bactériennes ou à

des cytokines tels que IL-1 β et TNF α . Cette induction est contrôlée par la MAP-Kinase, le facteur de transcription NF- κ B et la protéine kinase p38 activée par le stress (Larrivee, Bachvarov et al. 1998). Des études *in vivo* suggèrent que l'activation du RB2 peut également induire l'expression du RB1 probablement par la production autocrine de cytokines ou sa désensibilisation par séquestration, ou les deux (Couture, Harrisson et al. 2001). Le RB1 joue un rôle dans la phase chronique de l'inflammation et de la douleur. Son activation chronique peut être amplifiée par l'accumulation de la des-Arg⁹-BK au site de l'inflammation (Couture, Harrisson et al. 2001).

Le RB2 est exprimé de façon ubiquitaire : on le retrouve au niveau des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des fibroblastes, des cellules épithéliales et mésangiales, de certains neurones, des astrocytes et des polynucléaires neutrophiles (Bhoola, Figueroa et al. 1992). Il est impliqué dans la vasomotricité, surtout la vasodilatation via le NO à la suite de l'activation de la eNOS; il est aussi impliqué dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'œdème et la douleur (Couture, Harrisson et al. 2001). Le RB2 aurait des propriétés antifibrosantes via la BK à l'inverse du RB1 (Wollert and Drexler 1997) et un rôle antihypertrophique (Maestri, Milia et al. 2003). La stimulation du RB2 induit l'activation des récepteurs nociceptifs polymodaux comme le TRPV1 et cause l'hyperalgésie par la production de DAG et l'activation de la PKC (Mizumura, Sugiur et al. 2005). Le RB2 semble jouer un rôle dans l'hémostase. L'hétérodimérisation du RB2 avec le récepteur AT1 de l'angiotensine II sur les plaquettes sanguines de femmes en période de grossesse a été rapportée. Cette hétérodimérisation semble s'exacerber en cas de pré-éclampsie expliquant l'hypertension observée dans cette maladie. Dans une autre étude, les souris knock-out RB2 ont été protégées contre la thrombose par un mécanisme impliquant le NO et la prostacycline (PGI₂) (Shariat-Madar, Mahdi et al. 2006, Fang, Stavrou et al. 2013). Paradoxalement, la BK via le RB2

bloque l'agrégation plaquettaire via le NO et la PGI₂ endothéliale, cet effet étant aboli chez les souris knock-out RB2. Par contre, la BK possède un effet procoagulant et antifibrinolytique via l'augmentation de l'expression du facteur tissulaire et de PAI-1 au niveau de l'endothélium vasculaire (Radomski, Palmer et al. 1987, Labonte, Brochu et al. 2001, Kimura, Tsuji et al. 2002). Le rôle du RB2 dans l'hémostase est donc complexe et dépend de la situation expérimentale ou clinique.

1.14.6 Les voies de signalisation cellulaire des récepteurs des kinines

Les récepteurs B1 et B2 des kinines sont essentiellement couplés aux protéines Gαq et moins souvent à Gαi, Gαs et Gα12/13 (Figure 7). La Gαq conduit à l'activation de la PLCβ qui induit la scission du phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) et produit le diacylglycérol (DAG) et l'inositol-triphosphate (IP3). Ces seconds messagers causent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire via l'activation des canaux IP3R situés sur le réticulum endoplasmique (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). L'augmentation du calcium intracellulaire (Ca²⁺) stimule la production de NO à partir de la eNOS dans les cellules endothéliales et active la phospholipase A2 (PLA₂) permettant la relâche de l'acide arachidonique et la production de prostaglandines. Outre ces voies de signalisation classiques, les récepteurs des kinines peuvent également activer la voie des MAP-kinases et la voie JAK/STAT impliquées dans la régulation de la transcription de gènes spécifiques (Marceau *et al.*, 1998; Moreau *et al.*, 2005). En outre, la stimulation du RB1 peut entraîner, selon le type cellulaire, en plus de l'activation subséquente de la phospholipase A2, la phospholipase D, des MAPK (Medeiros, Cabrini et al. 2004), la voie NF-κB (Morand-Contant, Anand-Srivastava et al. 2010) et la nicotinamide adenine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Dias, Talbot et al. 2010, Talbot, Lin et al. 2011).

Voie de signalisation *via* eNOS et iNOS

Les souris ayant une délétion génétique de la iNOS ne développent pas de résistance à l'insuline contrairement à celles qui sont dépourvues de la eNOS. Ceci permet de faire le constat de l'effet délétère de la iNOS comparativement à la eNOS qui semble avoir un effet plutôt protecteur (Shankar, Wu et al. 2000, Perreault and Marette 2001). L'activation du RB2 entraîne la relâche transitoire de NO à partir de la eNOS (Marrero, Venema et al. 1999). Cette activation est complexe et nécessite la dissociation de la eNOS du RB2 en plus de la phosphorylation par la PKC (Venema 2002). L'activation du RB1 est capable de générer du NO à partir de la iNOS via la Gαi impliquant la β arrestin 2 et la voie ERK/MAP kinase (Kuhr, Zhang et al. 2010). Le NO généré par eNOS agit comme médiateur vasodilatateur, anti-inflammatoire et anti-oxydant; il empêche l'adhésion des leucocytes à l'endothélium vasculaire, la prolifération des cellules musculaires lisses et inhibe l'activation plaquettaire (Wink and Mitchell 1998). Le NO produit en grande quantité par la iNOS interagit avec l'anion superoxyde aboutissant à la genèse de peroxynitrite (ONOO⁻) augmentant ainsi le stress oxydatif et l'inflammation (Domenico 2004). De récents travaux suggèrent que l'interaction de la carboxypeptidase M (CPM) avec le RB1 des kinine améliore la signalisation du RB1 par une activation conformationnelle du RB1 suite à la formation du complexe CPM-RB1 et en délivrant efficacement l'agoniste au RB1 (Zhang, Tan et al. 2013). Une autre étude suggère une nouvelle approche pour contrôler la signalisation du RB1 dans des conditions pathologiques en démontrant la nécessité d'une co-endocytose du RB2 (Zhang, Brovkovich et al. 2015). Enfin, bien que les récepteurs B1 et B2 présentent des similarités dans la transduction du signal, la signalisation du RB1 dépend de son endocytose alors que la signalisation du RB2 en est indépendante (Enquist, Sanden et al. 2014).

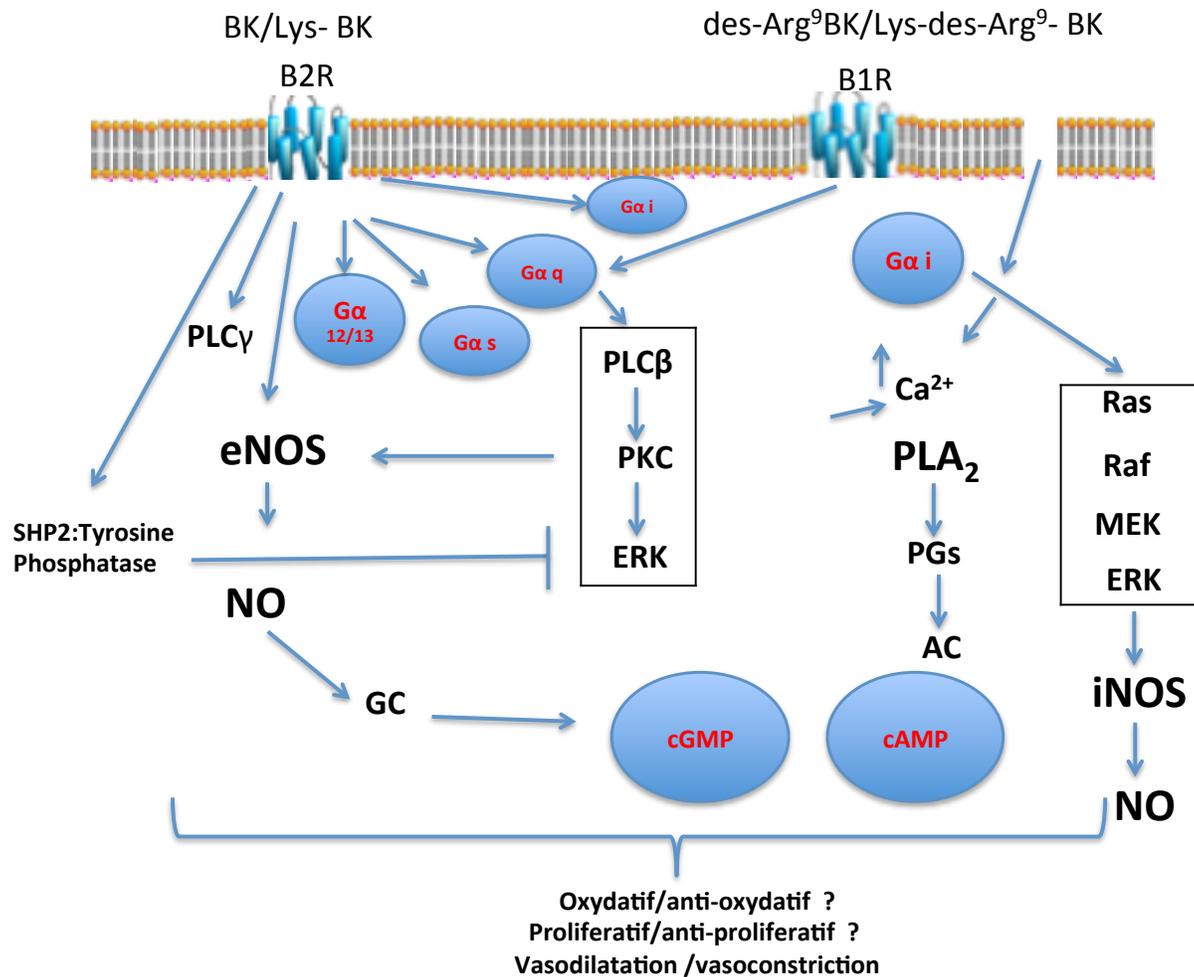
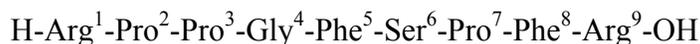


Figure 7. Voies de signalisation des récepteurs B1 et B2 des kinines. Le RB2 s'associe essentiellement à Gαq et à un moindre degré aux Gαi, Gαs et Gα_{12/13}. La Gαq active la PLCβ, PKC et MAP kinase (MAPK). Le RB1 interagit aussi avec Gαq et Gαi et emprunte la même voie de signalisation que le RB2. Cependant l'augmentation du calcium par le RB2 est tributaire du pool intracellulaire alors que le RB1 favorise l'influx de calcium extracellulaire. La production du NO est dépendante de la iNOS pour le RB1 alors que pour le RB2 cette production nécessite l'activation de la eNOS. Les prostaglandines sont produites à la suite de l'activation de la PLA₂ par le RB2. (Schéma tiré de l'article Couture, Blaes et al. 2014).

1.14.7 Pharmacologie et biochimie des kinines

Le développement des analogues des kinines s'est fait à partir du nonapeptide BK présenté ci-dessous:



C'est grâce aux travaux de Regoli et al., 1977 qu'on doit la nomenclature et l'analyse des récepteurs de la BK. Les auteurs ont proposé la nomenclature des récepteurs B1 et B2 qui demeure celle en vigueur (Regoli and Barabe 1980). Depuis, un grand nombre d'agonistes et d'antagonistes B1 et B2 ont été synthétisés et leur profil pharmacologique a été évalué.

1.14.7.1 Les agonistes et antagonistes du récepteur B1

Les deux agonistes naturels pour le RB1, la des-Arg¹⁰-KD et la des-Arg⁹-BK ont été évalués sur plusieurs systèmes contractiles (veine jugulaire de lapin, veine portale du rat) ou relaxant (artère rénale du chien dépourvue d'endothélium). L'ensemble des données obtenues avec ces études révèle que l'activité de la Lys-des-Arg⁹-BK est plus forte que celle de la des-Arg⁹-BK chez l'homme, le lapin et le cochon (Regoli, Rizzi et al. 2001). La différence d'affinité entre la des-Arg¹⁰-KD et la des-Arg⁹-BK peut s'expliquer par une co-évolution du gène codant pour le RB1 et du gène codant pour le kininogène afin de garder une fonction physiologique optimale suivant l'activation du RB1 (Marceau and Bachvarov 1998, Marceau, Hess et al. 1998). Cette théorie est étayée par le fait que dans le kininogène du rat et de la souris, la séquence de la BK est précédée par une arginine (Furuto-Kato, Matsumoto et al. 1985) alors que le kininogène humain contient la séquence pour la Lys-BK (Leeb-Lundberg, Marceau et al. 2005). À partir de la structure de la Lys-des-Arg⁹-BK, des modifications ont été apportées pour améliorer sa résistance au métabolisme. L'importance des résidus lysil dans la partie N-terminal des agonistes et des antagonistes du RB1 chez l'homme a été décrite initialement

par (Menke, Borkowski et al. 1994) et (Gobeil, Pheng et al. 1996). L'agoniste B1 synthétique, le Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, a une forte affinité et sélectivité pour le RB1 chez le lapin (Drapeau, deBlois et al. 1991) et chez l'humain (Gobeil, Neugebauer et al. 1997); il est 7 fois plus puissant que la des-Arg⁹-BK, mais 11 fois moins puissant que la Lys-des-Arg⁹-BK (Levesque, Harvey et al. 1995). Le premier antagoniste du RB1, le [Leu⁸]-des-Arg⁹-BK, a aussi été mis au point par l'équipe de Regoli (1997). L'ajout de l'acide aminé Lysine en N-terminal de cet antagoniste augmente par un facteur de 10 son affinité pour le RB1 humain (Drouin, Gaudreau et al. 1979). L'antagoniste du RB1, Ac Lys-[D-βNal⁷,Ile⁸]des-Arg⁹-BK (R715) n'a montré aucune activité d'agoniste partiel et il est un antagoniste de type compétitif chez l'homme, le lapin et la souris (Gabra and Sirois 2003, Gobeil, Neugebauer et al. 1996, Allogho, Gobeil et al. 1995). L'antagoniste non peptidique du RB1, le SSR240612, a été développé par la compagnie pharmaceutique Sanofi-Aventis; il est actif par voie orale (Gougat, Ferrari et al. 2004). Il est efficace dans plusieurs modèles de douleur et d'inflammation *in vivo*. L'efficacité de l'administration par voie orale du SSR240612 a aussi été démontrée dans des modèles de pleurésie et de douleur neuropathique chez la souris (Costa, Fernandes et al. 2006) et le rat (Dias, Ismael et al. 2007), dans un modèle de souris Alzheimer (Lacoste, Tong et al. 2013), dans l'inhibition du stress oxydatif et de l'inflammation vasculaire et adipocytaire dans un modèle de résistance à l'insuline chez le rat (Dias, Talbot et al. 2010, Dias and Couture 2012, Dias and Couture 2012, Talbot, De Brito Garipey et al. 2012). Un autre antagoniste non peptidique, LF22-0542, au profil compétitif pour le RB1, s'est avéré efficace dans le traitement de la douleur neuropathique et l'inflammation (Porreca, Vanderah et al. 2006, Petcu, Dias et al. 2008). En 2008, un antagoniste du RB1, le B10324, a été développé et possède des propriétés contre le cancer du poumon et de la prostate (Gera, Stewart et al. 2008). Et finalement, le R-954 (Ac-Orn[Oic²,αMePhe⁵,D-βNal⁷,Ile⁸]desArg⁹-bradykinin), qui a trouvé son application dans de nombreux

modèles pathologiques, incluant le diabète, le cancer et la douleur neuropathique, a été breveté et a reçu l'approbation de Santé Canada pour des essais cliniques (Gobeil, Sirois et al. 2014).

1.14.7.2 Les agonistes et antagonistes du récepteur B2

La BK demeure l'agoniste le plus utilisé. Il existe d'autres agonistes synthétiques pour le RB2, le [Tyr(Me)⁸]-BK et le [Hyp³,Tyr(Me)⁸]-BK, lesquels sont des agonistes du RB2 plus actifs que la BK (Barabe and Regoli 1988) mais qui sont peu utilisés du fait qu'ils ne sont pas commercialement disponibles. Au cours des dernières années, quelques agonistes peptidiques et non peptidiques ont aussi été synthétisés pour le RB2 humain. Parmi ceux-ci, notons le JMV1609 et le FR190997 (Belanger, Bovenzi et al. 2009, Sharif, Katoli et al. 2014). Certaines modifications de la structure primaire de la BK ont été apportées afin d'améliorer sa résistance au métabolisme et son affinité pour le RB2. Le labradimil (RMP-7; [Hyp³, Thi⁵, 4-Me-Tyr⁸(psi CH₂-NH)Arg⁹]-BK) est un agoniste sélectif du RB2 résistant aux kininases I et II (Doctrow, Abelleira et al. 1994). Cette résistance est obtenue en partie grâce au remplacement du lien peptidique entre les deux acides aminés présents en C-terminal dans la séquence originale de la BK par un lien non hydrolysable. Les agonistes du RB2 présentent un intérêt clinique du fait qu'ils augmentent la perméabilité de la barrière hématoencéphalique et permettent à des agents anticancéreux de mieux pénétrer dans le cerveau (Cote, Savard et al. 2013). Le Cereport® formellement appelé RMP-7 est efficace pour augmenter la concentration d'agents chimiothérapeutiques à l'intérieur de tumeurs cérébrales (Emerich, Dean et al. 2001). Toutefois, cette étude fut terminée en 2003 sans preuve d'efficacité véritable (Prados, Schold et al. 2003). Récemment, un nouvel agoniste du RB2 humain [Hyp³,Thi⁵,(N)Chg⁷,Thi⁸]-bradykinin (NG291) ayant une meilleure stabilité métabolique que la BK a été développé à cet effet (Savard, Labonte et al. 2013).

Trois générations d'antagonistes du RB2 ont été décrites. La première génération, décrite par le groupe de Vavrek et Stewart (1985), toujours à partir de la structure de la BK avec des remplacements de la proline en position 7 par un acide aminé D-aromatique, la D-phénylalanine (D-Phe), a produit un premier antagoniste du RB2, le [D-Phe⁷]-BK. Les composés de cette génération se sont révélés limités en raison de leur activité agoniste partielle sur certaines préparations tissulaires, de leur activité antagoniste relativement faible et de leur pauvre sélectivité pour le RB2 (Regoli, Jukic et al. 1993). La deuxième génération est marquée par le HOE140 (D-Arg-[Hyp³,Thi⁵, D-Tic⁷,Oic⁸]-BK) mis au point par la compagnie Hoechst (Hock, Wirth et al. 1991); cet antagoniste est caractérisé par une forte affinité et sélectivité pour le RB2. Le HOE140 renommé Icatibant a été licencié en 2001 par Aventis, et en 2008, l'entreprise Jerini a obtenu l'autorisation de sa mise en marché sous le nom de Firazyr® (icatibant) dans le traitement des crises aiguës d'angioedème héréditaire (Longhurst 2010, Ghazi and Grant 2013). Une troisième génération d'antagonistes du RB2 a été lancée en synthétisant des molécules non peptidiques destinées à l'administration orale. Le premier prototype, le WIN 64338, a été synthétisé par la compagnie pharmaceutique Sterling Winthrop (Salvino, Seoane et al. 1993). Il s'est avéré presque inactif chez l'homme (Regoli, Gobeil et al. 1994, Camarda, Rizzi et al. 2002). Peu de temps après, le FR 173657 a été proposé par la compagnie pharmaceutique Fujisawa (Asano, Inamura et al. 1997) et représente le premier antagoniste B2 actif oralement. L'équipe d'Evelise Fernandes Pietrovski a démontré l'efficacité de cette molécule par voie topique dans l'inflammation cutanée (Pietrovski, Otuki et al. 2009). La compagnie pharmaceutique Fournier en France a développé un antagoniste non peptidiques, le LF 16-0687 (Pruneau, Paquet et al. 1999) qui semble prometteur d'après les résultats obtenus *in vivo* dans divers modèles animaux de traumatismes crâniens (Plesnila, Schulz et al. 2001). Cet antagoniste

n'est malheureusement pas disponible car la compagnie Fournier a été vendue à Solvay qui n'a pas poursuivi son développement.

1.14.8 Rôles du récepteur B1 des kinines

1.14.8.1 RB1 et diabète sucré

Le DT1 cause une hyperglycémie persistante avec surproduction de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives oxygénées. Ce stress oxydatif et les cytokines activent le facteur NF- κ B, lequel induit et augmente l'expression du RB1 (Medeiros, Cabrini et al. 2004, Lin, Talbot et al. 2010, Shin and Ha 2011, Talbot, Lin et al. 2011). Des études moléculaires et pharmacologiques ont montré une augmentation de l'expression du RB1 dans plusieurs tissus tels que le rein, le cerveau, la moelle épinière, la rétine, les poumons, le pancréas, le cœur et l'aorte chez le rat diabétique après traitement avec la streptozotocine (STZ) (Prat, Biernacki et al. 2000, Mage, Pecher et al. 2002, Abdouh, Khanjari et al. 2003, Vianna, Ongali et al. 2003, El Midaoui, Ongali et al. 2005, Pouliot, Talbot et al. 2012). Chez le rat STZ, l'inhibition du RB1 réduit l'hyperglycémie (Catanzaro, Dziubecki et al. 2010), améliore la fonction rénale (Zuccollo, Navarro et al. 1996), les neuropathies douloureuses (Talbot and Couture 2012) et réduit l'hyperperméabilité vasculaire (Abdouh, Talbot et al. 2008, Pouliot, Talbot et al. 2012). Néanmoins, le rôle du RB1 reste controversé dans le diabète; en effet, la délétion du RB1 semble bénéfique dans la prévention de la fibrose rénale (Wang, Cenedeze et al. 2009) et les études portant sur les souris Akita (modèle de DT1) avec une délétion du RB1 supportent plutôt un rôle protecteur puisque ces animaux présentent une exacerbation de la néphropathie diabétique ainsi qu'une augmentation du stress oxydant et des dommages causés à l'ADN mitochondrial (Kakoki, Sullivan et al. 2010, Tomita, Sanford et al. 2012). Dans un modèle de DT2

chez la souris soumise à une diète riche en gras, la délétion génétique du RB1 protège contre la stéatose hépatique (Fonseca, Sales et al. 2013), l'obésité et la résistance à la leptine (Mori, Araujo et al. 2008). Le RB1 est aussi surexprimé dans un modèle expérimental de résistance à l'insuline chez les rats traités au glucose pendant une période allant de un à trois mois. Ces rats développent une hyperinsulinémie, l'allodynie tactile et au froid, l'hypertension artérielle avec une augmentation marquée du stress oxydant dans divers organes dont le cœur et l'aorte (El Midaoui et al., 2005; El Midaoui et de Champlain, 2005; Lungu et al., 2007; Dias et al., 2010). Ces symptômes sont corrigés par la prise prolongée (une semaine) d'un antagoniste du RB1 (SSR240612) ainsi que par une diète riche en anti-oxydant. Ces résultats montrent un lien entre le stress oxydatif, la résistance à l'insuline et le RB1 (Dias et al., 2007; Dias et al., 2010; El Midaoui et al., 2005). Plusieurs travaux prouvent aussi que le RB1 pourrait contribuer aux effets thérapeutiques des IECA. L'angiotensine II induit l'expression du RB1 dans des modèles *in vivo* et *in vitro* via l'augmentation du stress oxydatif impliquant la voie NADPH oxydase (Morand-Contant et al., 2010; Ceravolo et al., 2007; De Brito Garipey et al., 2010). Un traitement chronique avec le ramipril (IECA) prévient l'induction et la surexpression du RB1 dans le modèle de résistance à l'insuline mentionné ci-dessus (Ismael et al., 2008). Les IECA s'avèrent efficaces dans le traitement du diabète et des complications cardiovasculaires car ils bloquent la voie de la NADPH oxydase, source d'espèces réactives oxygénées dans les tissus vasculaires (Cai et al., 2003; McFarlane et al., 2003).

1.14.8.2 RB1 et inflammation

L'induction du RB1 par les cytokines pro-inflammatoires et les LPS a été étudiée dans l'œdème et la perméabilité vasculaire (deBlois and Horlick 2001, Seguin, Buleon et al. 2008). L'administration d'antagonistes du RB1 diminue la perméabilité vasculaire dans plusieurs tissus dont le rein, le

pancréas, le cœur, le foie, la peau, le poumon et la rétine dans un modèle de diabète induit par STZ (Simard, Gabra et al. 2002, Lawson, Gabra et al. 2005). Cette réponse inflammatoire relayée par le RB1 est liée à la libération de la substance P (SP) et du CGRP à partir de fibres sensorielles de type C, à la production de sérotonine, histamine et de prostaglandines (Le Bars and Adam 2002). La libération de neuropeptides pro-inflammatoires tels que la SP et le CGRP par la BK amplifie les phénomènes inflammatoires et entraîne une extravasation plasmatique. La SP produit également une vasodilatation via la libération de NO par les cellules endothéliales ce qui augmente le flux sanguin. Le RB1 semble aussi impliqué dans le développement des réponses inflammatoires locales dans des modèles d'arthrite aiguë ou chronique chez le rat (œdème de la patte, œdème articulaire) (Bhoola, Elson et al. 1992), dans les phénomènes inflammatoires de la rétinopathie diabétique (Pouliot, Talbot et al. 2012) et dans l'inflammation intestinale (Stadnicki, Gil et al. 2005, Stadnicki, Pastucha et al. 2005). Les antagonistes sélectifs du RB1 comme le R-715 (Austinat, Braeuninger et al. 2009) et du RB2 comme le LF 16-0687 (Ongali, Hellal et al. 2006) sont prometteurs dans le traitement de l'œdème lors d'un traumatisme cérébral. De plus, l'activation du RB1 induit un recrutement des leucocytes associé à une augmentation de l'expression du RB1 dans les veinules post-capillaires (Vianna, Ongali et al. 2003). Tous ces travaux confirment le rôle important que joue le RB1 dans la réponse inflammatoire.

1.14.8.3 RB1 et vasomotricité

Le RB1 ne joue pas de rôle dans la vasomotricité chez le sujet sain car il n'est pas exprimé. Dans l'hypertension où il est exprimé, son rôle périphérique reste controversé. Il est connu pour avoir une action vasodilatatrice en l'absence du RB2. Cette action ne semble pas être totalement tributaire du NO comme c'est le cas pour le RB2 puisque l'inhibition de la synthèse du NO par le L-NAME dans

l'étude de Duka et al, 2003 n'accentue pas l'effet hypertenseur secondaire au blocage du RB1 dans le modèle de souris invalidée pour le RB2. L'effet vasodilatateur semble plutôt être lié à un facteur en aval de la cascade de l'acide arachidonique (Duka, Duka et al. 2003). D'autres études montrent un lien entre l'administration d'inhibiteurs de l'ECA et la modulation de l'expression (soit augmentation ou soit diminution) du RB1 dans les vaisseaux sanguins, le rein et la moelle épinière (Marin-Castano, Schanstra et al. 2002, Ongali, Campos et al. 2003, Duguay, Der Sarkissian et al. 2004, Ismael, Talbot et al. 2008). Dans le système nerveux central, le RB1 semble contribuer au maintien de l'hypertension artérielle à travers un mécanisme dopaminergique dans des modèles génétiques et expérimentaux d'hypertension (De Brito Gariepy, Carayon et al. 2010).

1.14.8.4 Le RB1 et pathologie cardiaque

Des travaux sur le système kallikréine-kinine chez les rats spontanément hypertendus (SHR) transfectés par le gène de la kallikréine montrent une atténuation de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque et une amélioration de la croissance capillaire par la suppression de l'activité de JNK, TGF- β 1 et de l'*inhibiteur de l'activateur de plasminogène-1* via la voie du NO-GMPc (Bledsoe, Chao et al. 2003). Au niveau du coeur et dans un contexte d'hypertension artérielle, le RB1 semble atténuer le remodelage cardiaque par l'inhibition de l'expression des MAP kinases et du TGF- β 1 secondaire à une activité accrue de la e-NOS (Moniwa, Agata et al. 2006). Il a aussi été démontré un effet cardioprotecteur unique du blocage du RB1 chez les souris STZ via l'activation de la voie PI3-kinase/Akt et la voie MAP kinase, alors qu'une résistance a été notée avec des agonistes du RB2 (Potier, Waeckel et al. 2013). Des études portant sur le syndrome X cardiaque, caractérisé par la présence de signes et de symptômes d'ischémie en l'absence de maladie coronarienne obstructive, ont montré une surexpression impressionnante du RB1 comparée à celle du RB2, suggérant ainsi la

contribution du RB1 à la vasoconstriction locale et à l'ischémie (Dabek, Wilczok et al. 2007). Toutes ces données suggèrent un rôle tantôt cardioprotecteur, tantôt délétère, mais qui peut s'expliquer par le contexte expérimental et les espèces étudiées.

1.14.8.5 RB1 dans la douleur inflammatoire

Des données expérimentales suggèrent que le RB1 des kinines est impliqué dans le contrôle de la douleur inflammatoire. Pesquero et al. (2000) ont montré une réduction du phénomène de sensibilisation aux stimuli nociceptifs chez la souris knock-out pour le RB1, avec une perte de la sensibilité aux stimuli chimiques et thermiques. Le rôle du RB1 dans le contrôle normal des informations douloureuses chez l'animal sain reste incertain. En effet, les agonistes de ce récepteur n'ont pas d'effet sur la nociception chez des rats normaux ou dans des modèles d'inflammation aiguë (Calixto et al., 2000). Les antagonistes pharmacologiques du RB1 causent une analgésie uniquement dans des modèles animaux d'hyperalgésie mécanique et thermique persistante, d'origine inflammatoire, ou dans la douleur viscérale soutenue. Ces résultats peuvent être expliqués par l'induction du RB1 sur des cellules autres que les neurones sensoriels (macrophages ou cellules endothéliales) où ils peuvent être responsables de la libération de médiateurs (PG, cytokines et NO) qui sensibilisent et activent les nocicepteurs (Couture et al., 2001). Plusieurs études ont montré un effet bénéfique des antagonistes du RB1 dans le traitement des douleurs neuropathiques dans des modèles animaux de diabète de types 1 et 2 (Dias, Ismael et al. 2007, Kakoki, Sullivan et al. 2010, Talbot, Chahmi et al. 2010). Aussi, des études en autoradiographie quantitative ont permis de révéler une augmentation des sites de liaison du RB1 dans la moelle épinière du rat diabétique (Ismael, Talbot et al. 2008). Le RB1 exprimé sur la microglie dans la moelle épinière contribue à la douleur neuropathique chez le rat STZ (Talbot, Chahmi et al. 2010). En plus de ces travaux, des études ont

montré le rôle du RB1 dans le traitement de la douleur neuropathique dans la sclérose multiple; en effet, l'administration d'antagoniste du RB1 a réduit significativement le syndrome douloureux dans cette pathologie (Dutra, Bento et al. 2013).

1.14.8.6 RB1 et stress oxydant

Le stress oxydatif contribue à l'induction du RB1 en activant la voie NF- κ B (Couture et al. 2014). Une étude récente chez le rat rendu insulino-résistant avec une diète riche en glucose montre qu'un traitement d'une semaine avec l'antagoniste du RB1, SSR240612, normalise l'expression de ce récepteur et la production de l'anion superoxyde dans l'aorte via une inhibition de l'activité de la NADPH oxydase (Dias and Couture 2012). Dans ce même modèle, l'expression du RB1 est inhibée par une diète riche en acide alpha-lipoïc, un produit antioxydant. Ce traitement corrige la résistance à l'insuline, l'hypertension artérielle, l'allodynie et la production de l'anion superoxyde dans le cœur et l'aorte (Lungu, Dias et al. 2007, El Midaoui, Lungu et al. 2011).

1. 15 Hypothèses et objectifs

Le premier article de la thèse porte sur l'étude du rôle du RB1 des kinines dans la létalité induite par le choc septique dans le DT1. L'hypothèse est la suivante : l'activation endogène du RB1 des kinines exprimé à la fois par le tissu cardiovasculaire et les thrombocytes entraîne l'agrégation plaquettaire et une plus grande viscosité sanguine tributaire d'un œdème et d'une augmentation de la perméabilité vasculaire. La conséquence est la formation de microthrombi pouvant entraîner la mort par atteinte des organes vitaux, dont le rein. Les paramètres suivants ont donc été mesurés: l'œdème et la perméabilité vasculaire dans différents organes périphériques après injection du colorant bleu d'Evans, l'expression du RB1 par qRT-PCR, western blot et cytométrie en flux, l'agrégation des plaquettes par agrégométrie optique et l'évaluation des dommages tissulaires par histologie. Nous avons observé que la létalité due au choc septique à la suite de l'injection de LPS était plus importante chez les rats STZ et qu'elle était associée à des œdèmes, à des augmentations de perméabilité vasculaire et à des lésions au niveau des poumons et des reins avec présence d'indices d'agrégation plaquettaire. Un traitement avec l'antagoniste du RB1, le SSR240612, a diminué l'apparition de ces anomalies et a normalisé la glycémie chez les rats STZ en plus de l'hyperthermie induite par le LPS. De même, le SSR240612 a inhibé complètement l'augmentation de l'expression du RB1 et a amélioré la survie des animaux. Ces résultats nous ont fourni la première preuve que le RB1 des kinines joue un rôle primordial dans la thrombose et la létalité dans un modèle animal de choc septique dans le diabète de type 1. Les bénéfices du SSR240612 ont été reproduits par l'inhibition de la iNOS et de la COX-2, suggérant que les médiateurs de ces enzymes pro-inflammatoires agissent en aval du RB1.

Dans le second article, nous avons évalué le rôle du RB1 des kinines dans l'insulite, particulièrement dans le mécanisme impliquant l'infiltration du pancréas par les macrophages et les cellules TCD4⁺. L'hypothèse suggérée est que l'hyperglycémie résultant de l'insulite apparaît lorsque les cellules immunitaires TCD4⁺ et les macrophages expriment le RB1. L'augmentation de l'expression du RB1 sur ces cellules immunitaires contribue à la destruction des cellules β de Langerhans par l'entremise de médiateurs inflammatoires et d'espèces réactives oxygénées impliquant le TNF- α et la iNOS. Une composante sensorielle impliquant le CGRP et le TRPV1 est aussi étudiée comme mécanisme neurogénique. La sévérité des lésions pancréatiques a été évaluée par immunohistochimie et l'expression des biomarqueurs (RB1, iNOS, TNF- α , macrophages, TCD4⁺, CGRP et TRPV1) a été mesurée par qRT-PCR, western blot et immunofluorescence dans le pancréas du rat rendu diabétique avec la STZ. Les résultats ont montré une présence importante de macrophages et de lymphocytes TCD4⁺ dans le pancréas des rats diabétiques mais non dans le pancréas contrôle. Fait important, le RB1 a été induit et régulé à la hausse sur ces cellules immunitaires infiltrant le pancréas des rats diabétiques. En revanche, le RB1 n'était pas exprimé sur les fibres sensorielles de type C, malgré l'augmentation importante de l'expression du TRPV1 et du CGRP dans le pancréas des rats STZ. Un traitement avec l'antagoniste du RB1 des kinines, le SSR240612, a empêché l'infiltration des macrophages et des lymphocytes TCD4⁺ en plus de bloquer l'augmentation de l'expression du RB1, de la iNOS et du TNF- α dans le pancréas des rats diabétiques. Le SSR240612 a réduit significativement l'hyperglycémie et a partiellement restauré les taux d'insuline plasmatiques en empêchant la perte des cellules β des îlots de Langerhans. Ainsi, nos données suggèrent que l'inhibition du RB1 représente une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement du diabète de type 1 en empêchant la destruction des cellules β des îlots de Langerhans causée par l'infiltration des cellules immunitaires.

CHAPITRE 2

ARTICLE 1

Problématique : La survenue du choc septique au cours du DT1 augmente l'incidence de la mortalité par thrombose. Cette complication est connue sous le nom de coagulation intravasculaire disséminée. Le premier article de la thèse porte sur l'étude du rôle du RB1 des kinines dans la létalité induite par le choc septique dans le DT1.

Hypothèse : L'activation endogène du RB1 des kinines surexprimé par le tissu cardiovasculaire et les plaquettes sanguine au cours du diabète et du choc septique entraîne l'agrégation plaquettaire et une plus grande viscosité sanguine qui fait suite à l'augmentation de l'œdème et de la perméabilité vasculaire. Il en résulte la formation de microthrombi pouvant entraîner la mort par atteinte des organes vitaux, dont le rein.

Objectif : Étudier l'expression, les effets inflammatoires et prothrombotiques du RB1 dans un modèle de choc septique chez le rat diabétique.

Méthode expérimentale

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été rendus diabétiques par la streptozotocine (STZ) (65 mg/kg, ip). Quatre jours plus tard, les rats témoins et diabétiques (STZ) ont été injectés avec les lipopolysaccharides (LPS) (2 mg/kg, ip) ou le véhicule. L'antagoniste du RB1 (SSR240612, 10 mg/kg par gavage) a été donné de façon aiguë (12 et 24 h avant euthanasie) et chronique (chaque jour pendant sept jours). De plus, un traitement de sept jours a été administré avec un inhibiteur de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) (acide niflumique, 5 mg/kg, ip), un inhibiteur non sélectif de la COX-1 et COX-2 (indométhacine, 10 mg/kg, ip), un inhibiteur non sélectif du monoxyde d'azote synthase (NOS) (L-NAME, 50 mg/kg par gavage), et enfin un inhibiteur de la iNOS (1400W, 5 mg/kg, ip), ou de l'héparine (100 UI/kg, sc). Les paramètres suivants ont été mesurés: l'œdème et la perméabilité vasculaire dans différents organes périphériques après injection du colorant bleu d'Evans,

l'expression du RB1 par qRT-PCR, western blot et cytométrie en flux, l'agrégation des plaquettes par agrégométrie optique et l'évaluation des dommages tissulaires par histologie.

Contribution

Le Dr J-P. G. a été impliqué dans l'initiation du projet. N.T. a participé activement au développement du projet; elle a effectué les expériences, analysé les résultats et rédigé la première version de l'article. A.H. et Y.Z. ont effectué l'expérience et l'analyse des résultats par cytométrie en flux et ils ont confirmé les données de Western blot sur les plaquettes. L.G., pathologiste, et Y.M., expert en hémostase, ont apporté une contribution intellectuelle de grande valeur dans l'analyse des données. R.C. est le concepteur et responsable du projet; il a contribué à l'interprétation des données et à l'écriture de la version finale du manuscrit. Tous les auteurs ont lu et approuvé le manuscrit final.

Référence

N Tidjane, A Hachem, Y Zaid, Y Merhi, L Gaboury, J-P Girolami and R Couture. A primary role for kinin B1 receptor in inflammation, organ damage, and lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes. Eur. J. Inflammation 1-13 (2015).



Article

A primary role for kinin B1 receptor in inflammation, organ damage, and lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes

N Tidjane,¹ A Hachem,² Y Zaid,² Y Merhi,² L Gaboury,³
J-P Girolami⁴ and R Couture¹

European Journal of Inflammation
1–13
© The Author(s) 2015
Reprints and permissions:
sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav
DOI: 10.1177/1721727X15577736
eji.sagepub.com
 SAGE

Abstract

Diabetes mellitus and septic shock increase the incidence of mortality by thrombosis. Although kinin B1 receptor (B1R) is involved in both pathologies, its role in platelet function and thrombosis remains unknown. This study investigates the expression, the inflammatory, and pro-thrombotic effects of B1R in a model of septic shock in diabetic rats. Sprague-Dawley rats were made diabetic with streptozotocin (STZ) (65 mg/kg, i.p.). Four days later, control and STZ-diabetic rats were injected with lipopolysaccharide (LPS) (2 mg/kg, i.p.) or the vehicle. B1R antagonist (SSR240612, 10 mg/kg by gavage) was given either acutely (12 and 24 h prior to endpoint analysis) or daily for up to 7 days. Moreover, a 7-day treatment was given either with cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor (niflumic acid, 5 mg/kg, i.p.), non-selective COX-1 and COX-2 inhibitor (indomethacin, 10 mg/kg, i.p.), non-selective nitric oxide synthase (NOS) inhibitor (L-NAME, 50 mg/kg by gavage), iNOS inhibitor (1400W, 5 mg/kg, i.p.), or heparin (100 IU/kg, s.c.). The following endpoints were measured: edema and vascular permeability (Evans blue dye), B1R expression (qRT-PCR, western blot, flow cytometry), aggregation in platelet-rich plasma (optical aggregometry), and organ damage (histology). Rats treated with STZ, LPS, and STZ plus LPS showed significant increases in edema and vascular permeability (heart, kidney, lung, and liver) and increased expression of B1R in heart and kidney (mRNA) and platelets (protein). Lethal septic shock induced by LPS was enhanced in STZ-diabetic rats and was associated with lung and kidney damage, including platelet micro-aggregate formation. SSR240612 prevented all these abnormalities as well as STZ-induced hyperglycemia and LPS-induced hyperthermia. Similarly to SSR240612, blockade of iNOS and COX-2 improved survival. Data provide the first evidence that kinin B1R plays a primary role in lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes. Pharmacological rescue was made possible with B1R antagonism or by inhibition of iNOS and COX-2, which may act as downstream mechanisms.

Keywords

diabetes mellitus, disseminated intravascular coagulation, inflammation, kinins, LPS, SSR240612, thrombosis

Date received: 7 August 2014; accepted: 20 February 2015

Disseminated intravascular coagulation (DIC) is an acquired syndrome secondary to excessive activation of coagulation leading to micro-vascular thrombosis, multiple organ failure, and death. In the most severe cases, excessive activation of fibrinolysis is observed. The normal anticoagulant and fibrinolytic systems are overwhelmed and coagulation activation cannot be contained. The pathophysiological phenomenon rapidly becomes systemic, increasing depletion of natural anticoagulants, and consumption of coagulation factors and platelets.¹

¹Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

²Laboratory of Thrombosis and Hemostasis, Research Centre, Montreal Heart Institute, Montréal, QC, Canada

³Department of Pathology and Cellular Biology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁴Institute of Metabolic and Cardiovascular Diseases, INSERM, U 1048, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Corresponding author:

Réjean Couture, Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3J7, Canada.

Email: rejean.couture@umontreal.ca

The biological and clinical expression of DIC is extremely polymorphic, particularly in diabetes mellitus and sepsis.² Diabetes mellitus is associated with a hypercoagulable and pro-thrombotic state³ that amplifies the systemic inflammatory response following infectious insults affecting multiple organs and systems in septic patients.² In addition, diabetes mellitus increases vascular permeability and blood viscosity, which reinforces thrombus formation.⁴ Moreover, diabetic patients display tortuous micro-vessels and large platelets; the extent of tortuosity is an important factor in shear-induced thrombosis in micro-vessels.⁵ Thrombosis accounts for 80% of deaths in patients with diabetes mellitus who have an increased risk of developing sepsis and infection, particularly in intensive care units.^{5,6}

Diabetes mellitus and septic shock increase the production of reactive oxygen species (ROS) and pro-inflammatory cytokines, involving particularly the kallikrein-kinin system.⁷ Kinin B1 receptor (B1R), an important component of this system, is upregulated by endotoxins and may represent a therapeutic target in sepsis, yet its contribution in the acute phase of lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxin shock remains controversial.^{8–12} Hypotension, renal failure, and mortality were increased by LPS in B1R knockout mice as a possible consequence of supra activation of kinin B2 receptor (B2R).⁸ Others showed that the hypotensive response to LPS treatment was markedly reduced in these mice during the first 35 min¹⁰ and completely abolished in double B1R-B2R knockout mice, yet both kinin receptors deficiency did not improve survival.¹¹ Moreover, transgenic rats with selective endothelial overexpression of B1R have an increased susceptibility to endotoxic shock.⁹ Conversely, B1R blockade reversed the beneficial effects of B2R blockade on survival in porcine endotoxin shock.¹² Thus whether or not B2R is salutary and B1R deleterious in septic shock remains uncertain as opposite data were obtained depending on the experimental model. In a preliminary study, we found that B1R blockade reversed the enhanced mortality to LPS-induced septic shock in streptozotocin (STZ)-diabetic rats. B1R is associated with pain neuropathy, nephropathy, retinopathy, and cardio-metabolic complications in various models of type 1 and type 2 diabetes,⁷ but its role in platelet function

and thrombosis in link with diabetes mellitus and septic shock remains poorly defined.

To address the role of kinin B1R in thrombus formation due to DIC encountered in diabetes mellitus with severe infection, we developed a unique model of sepsis in diabetes by combining STZ and LPS treatments in rats. It was hypothesized that kinin B1R expression is enhanced in cardiovascular tissues/platelets and its endogenous activation causes angioedema increasing blood viscosity and also the formation of micro-thrombi and organ damage, thereby increasing the risk of mortality. As mediators generated by cyclooxygenase-1 and -2 (COX-1 and COX-2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) are involved in septic shock and in B1R-induced inflammation, inhibitors of these enzymatic pathways were included in the study design.

Materials and methods

Experimental animals and care

All experimental methods and animal care procedures were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (protocols 09-030, 11-141, and 12-198), in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (200–225 g; Charles River, St-Constant, QC, Canada) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (23°C) and humidity (50%), on a 12 h light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water.

Animal model of septic shock in STZ-diabetic rats

Rats were injected under a low light condition with freshly prepared STZ (65 mg/kg, i.p.; Zanosar, McKesson, QC, Canada). Age-matched controls were injected with vehicle (sterile saline 0.9%, pH 7.0). LPS from *E. coli* (2 mg/kg, i.p. 0111:B4 from Sigma-Aldrich, ON, Canada) was administered 4 days after treatment with STZ or in control rats to provoke the septic shock. Blood glucose was measured with a commercial blood glucose-monitoring kit (Accusoft; Roche Diagnostics, QC, Canada) from a drop of blood obtained from the tail vein. Only STZ-treated rats whose blood glucose concentration was higher than 20 mM at day 4 were used and considered as diabetic.

Acute treatment with the kinin B1R antagonist SSR240612

The impact of B1R antagonism on glycemia, core temperature, edema, vascular permeability, and B1R mRNA expression was measured as follows: SSR240612 (10 mg/kg) was administered by gavage at the same time as LPS and 12 h later in rats made diabetic with STZ 4 days earlier or in control rats. Rats were sacrificed with isoflurane 12 h after the second treatment with SSR240612. In other words, SSR240612 was given 24 h and 12 h prior to sacrifice as defined in figure legends.

Measure of core temperature

Core temperature (°C) was measured with a flexible and lubricated digital thermometer inserted into the rectum (2.5 cm) for 10 s in unanesthetized rats. Readings were taken before (time 0) and at various intervals (3, 4, 6, 8, 12, and 24 h) post-LPS treatment.

Edema measurement

Heart, kidney, lung, and liver edema were measured by subtracting the value of dry weight tissue from that of wet weight tissue at sacrifice. The difference reflecting the amount of water (in grams) retained in tissues was translated into volume (mL) where 1 g corresponds to 1 mL of water. These rats were not used to evaluate vascular permeability.

Vascular permeability measurement

The increased in vascular permeability was measured by quantifying the Evans blue dye (Sigma-Aldrich, ON, Canada) bound to albumin in various tissues (heart, kidney, lung, and liver). Rats were anesthetized with isoflurane to insert a catheter PE-10 into a femoral vein through which 1000 IU of heparin sodium was injected. After 1–2 days recovery from vascular surgery, rats received intravenously Evans blue dye (35 mg/kg) 20 min before decapitation under isoflurane. Then organs were collected, weighted, and placed in 8 mL formamide for 48 h at 60°C. After centrifugation, the optical density of the solution was measured by spectrophotometry at 620 nm. Data were expressed as µg of Evans blue/g of wet weight tissue.

Real-time quantitative PCR

After sacrifice, isolated heart and kidney cortex were put in RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, CA, USA). Total RNA was extracted from about 10 mg of tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). qRT-PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer and signal detected using a Mx3000p device (Stratagene, CA, USA). For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). PCR conditions were: 95°C for 15 min, followed by 46 amplification cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s. The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Platelet isolation for flow cytometry and western blot

Treated rats were anesthetized with isoflurane and blood was collected by left ventricular puncture into syringes containing one-20th blood volume (0.2 mL) of heparin as anticoagulant. Blood was diluted (1:1) with modified Tyrode's buffer (150 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 1 mg/mL BSA, 1 mg/mL dextrose, pH 7.4), containing 0.1 µg/mL PGE₁ and centrifuged at 160 g for 8 min. Platelet-rich plasma (PRP) was then centrifuged at 1000 g for 5 min in the presence of 0.1 µg/mL PGE₁ and the platelet pellet was then resuspended in modified Tyrode's buffer to a final concentration of 250×10^6 /mL.¹³

Platelet isolation for aggregometry

Rats were anesthetized with pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) and a catheter was inserted into the right femoral artery. Arterial blood was collected into 3.8% sodium citrate at a ratio of 1:9 (1 part anticoagulant to 9 parts blood). Whole blood samples were processed within 1 h of collection. PRP was prepared by centrifugation at 150 g for 15 min. Platelet-poor plasma (PPP) was prepared by

Table 1. PCR primer pairs used.

Gene	Sequence	Position	GenBank accession no.
I8S Forward	5'-TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT-3'	363–386	X01117
I8S Reverse	5'-TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT-3'	470–447	
B1R Forward	5'-GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT-3'	367–391	NM_030851
B1R Reverse	5'-CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT-3'	478–454	

further centrifugation of the remaining plasma at 200 g for 15 min, and finally the PRP was transferred to a stoppered plastic tube. All procedures were performed at room temperature.

Western blot on platelets

For protein quantification, platelets were homogenized in Laemmli buffer and lysis buffer. In brief, protein extracts were assayed, loaded (15–30 µg) in 10% SDS-polyacrylamide gels, separated by electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated (1 h) in a blocking buffer containing 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (TBS) + Tween 20 (TBS-T, 0.1%), then blotted overnight at 4°C with either rabbit anti-rat B1R (1:1000), anti-rat B2R (1:500), anti-CD45 (H-230) (SC2-5590, Santa Cruz Biotechnology, 1:500), or anti-dynein (SC-13524, Santa Cruz Biotechnology, 1:25,000). Following washing steps, membranes were labeled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (donkey anti-rabbit # 611-703-127, Rockland, 1:25,000) for 1 h, washed, and bound peroxidase activity was then detected by enhanced chemiluminescence (PerkinElmer Life Sciences, MA, USA). Band intensities were assessed by densitometry quantification. Detection of BK receptor proteins was made with selective anti-B1R and -B2R antibodies raised in rabbits (Biotechnology Research Institute, Montréal, QC, Canada) against a conserved amino acid sequence from B1R and B2R proteins of mouse and rat. The epitopes used contained 15 amino acids localized in the C-terminal region of B1R (VFAGRLLKTRVLGTL) and 15 amino acids localized in the second extracellular domain of B2R (TIANNFDWVFGEVLC). Care was taken to avoid sequences with similarity to related mammalian proteins, including the opposite receptor. One negative control was run for each antibody using the pre-immune serum. Specificity of our anti-B1R and -B2R antibodies was further determined using mouse kidney extracts from

wild-type (WT), B1R and B2R knockout (KO) mice.^{14,15}

Flow cytometry

B1R and B2R expression in isolated platelets was measured by flow cytometry. Briefly, platelets ($250 \times 10^6/\text{mL}$) were fixed with paraformaldehyde for 30 min, washed, and permeabilized with PBS containing 0.01% Triton X-100 and 1% BSA for 10 min. Platelets were then washed and incubated with saturating concentrations of our primary rabbit anti-rat B1R antibody, rabbit anti-rat B2R antibody, or their isotype-matched control IgG for 30 min. Platelets were then fixed for 30 min with paraformaldehyde, washed, and resuspended in PBS. Platelets were incubated with secondary goat anti-rabbit anti-IgG-FITC (SC-2012, Santa Cruz Biotechnology) for 30 min, fixed, and analyzed (5000 events) on an EPICS XL Coulter (Beckman Coulter) after gating for their characteristic forward and side scatter properties. Platelet gating was confirmed by an anti-rat CD61-Phycoerythrin (PE) conjugated antibody (SC-73, Santa Cruz Biotechnology). Thrombin (0.1 U/mL) was also added to induce full activation of platelets.

Pharmacological treatments to prevent endotoxin-induced septic shock

LPS (2 mg/kg, i.p.) dissolved in saline was administered only once either to control rats ($n = 8$) or 4 days after STZ (65 mg/kg, i.p., $n = 56$). Two cohorts composed of STZ plus LPS rats were divided into two groups: the first group ($n = 38$) was treated either with heparin (100 IU/kg, s.c.) (Organon Canada Ltd, ON, Canada), L-NAME (50 mg/kg, by gavage) (Sigma Aldrich, ON, Canada) prepared in saline, or indomethacin (10 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) dissolved in ethanol (70%) or with their vehicle. The second cohort ($n = 18$) received either 1400W (5 mg/kg, i.p.) (Enzo Life

Science, NY, USA) dissolved in saline, niflumic acid (5 mg/kg, i.p.) (Sigma-Aldrich, ON, Canada) dissolved in saline with 2.5% NaOH (6 mol/L), or SSR240612 (10 mg/kg, by gavage) dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.5% v/v), ethanol (5% v/v), and Tween-80 (5% v/v). These treatments with inhibitors or antagonists were given 1 h before LPS administration and daily for up to 7 days post LPS to prevent the lethal septic shock. In all cases, STZ was given 4 days prior to LPS and to all pharmacological treatments with inhibitors. In pilot experiments, the administration of LPS in STZ-diabetic rats caused mortality within 24–48 h. To avoid uncontrolled mortality and suffering, rats were closely monitored three times/day and rectal temperature at 3 h intervals (first 48 h). Rats were humanely sacrificed with isoflurane when they reached the following ethic endpoints (rectal temperature greater than 39°C, respiratory distress, severe diarrhea, tachycardia, loss of locomotor activity and rearing, apathy). Survival rats were those which did not reach lethal septic shock based on these endpoints.

Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma

Platelet aggregation was induced by adding 0.1 M of ADP (Sigma Chemical Co) in PRP and monitored with an optical aggregometer (Chronolog Corp., PA, USA). Platelet aggregation was monitored and analyzed with Aggro-link software (Chronolog Corp) after stabilization of aggregation traces.

Platelet aggregation was first compared between control, 4-day STZ-diabetic rats, LPS, and STZ-LPS treated rats. Then the mechanism of platelet aggregation was studied by measuring the impact of the following pharmacological treatments given at the same time than LPS (2 mg/kg, i.p.): SSR240612 (10 mg/kg, by gavage), des-Arg⁹-BK (2 mg/kg, s.c.), 1400W (5 mg/kg, i.p.), or heparin (100 IU/kg, s.c). Rats were sacrificed 3 h later and platelets collected.

Histological injury evaluation

After sacrifice, kidney and lung were fixed in 1% formalin and blocked in paraffin. Samples were then cut in coronal sections of 2 µm, routinely stained with hematoxylin and eosin and visualized

on a microscope (Olympus, BX 61, digital camera DP71). Microscopic evaluations were done blindly and supervised by a pathologist.

Drugs

The selective non-peptide B1R antagonist SSR240612 ((2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[(2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl]-N-isopropyl-N-methylpropanamide,fumarate) was generously obtained from Sanofi-Aventis R&D (Montpellier, France). All other chemicals and reagents used were purchased from standard commercial suppliers and were of analytical grade.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 5.00, GraphPad Software Inc.). Data are expressed as means ± SEM of values obtained from *n* rats. Statistical significance was determined with Student's *t*-test for unpaired samples or with one-way analysis of variance (ANOVA) or two-way ANOVA (core temperature) followed by the Bonferroni or Dunnett post-test for multiple comparisons. The non-parametric Kruskal-Wallis post-test was used for histological data. Only values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Acute effect of B1R antagonist on blood glucose and core temperature

Blood glucose levels were significantly increased in STZ rats treated or not with LPS compared with control rats. Treatment with LPS alone did not significantly affect blood glucose levels. Hyperglycemia in STZ and STZ-LPS rats was significantly reduced and almost normalized by acute treatment with SSR240612 (Figure 1a).

Rats treated with STZ had resting core temperature similar to control (37°C). LPS produced significant increases of core temperature from 3 h to 24 h post-injection and the pyretic response induced by LPS was somewhat similar in control and STZ-treated rats. Acute treatment with SSR240612 abolished the increase of body temperature in LPS and LPS-STZ treated rats.

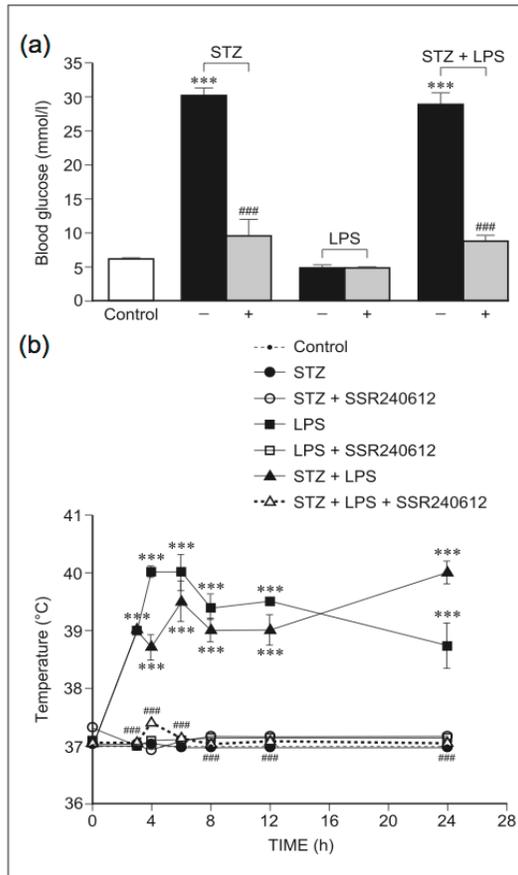


Figure 1. Changes on (a) blood glucose levels (mmol/L) in overnight fasted rats, and (b) rectal temperature ($^{\circ}\text{C}$) in control, 4-day STZ-diabetic rats, LPS-treated rats (2 mg/kg, i.p.) or STZ + LPS-treated rats in the presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg by gavage, 24 h and 12 h earlier) or its vehicle (-). Data represent means \pm SEM of eight rats in each group. In (a) *** $P < 0.001$ vs. control; #### $P < 0.001$ vs. STZ-vehicle or STZ + LPS-vehicle. In (b) *** $P < 0.001$ vs. control; #### $P < 0.001$ vs. LPS-vehicle or STZ + LPS-vehicle.

The same treatment with SSR240612 had no significant effect in control or STZ-treated rats (Figure 1b).

Acute effect of B1R antagonist on edema and vascular permeability

In 4-day STZ rats, significant increases in edema (Figure 2) and vascular permeability (Figure 3) were measured in all tested organs, including heart,

kidney, lung, and liver compared with matched control rats. Treatment with LPS also caused significant increases of edema and vascular permeability in the same organs. These responses were somewhat similar in STZ-diabetic rats treated with LPS. Acute treatment with SSR240612 significantly reduced both edema and vascular permeability in most organs from rats treated with STZ, LPS, or both STZ plus LPS.

Acute effect of B1R antagonist on B1R mRNA expression

B1 receptor mRNA levels were significantly increased in kidney cortex and in the heart of STZ, LPS, and particularly in STZ-LPS treated rats. The increases of B1R mRNA levels were greater in the kidney than in the heart for all treated groups. Acute treatment with the B1R antagonist, SSR240612, prevented the enhanced B1R mRNA levels in both organs to control values in all treated groups (Figure 4).

Flow cytometry and western blot analysis of B1R and B2R in platelets

Flow cytometry technique using permeabilized platelets revealed that both kinin receptors are present in control platelets (Figure 5a). Moreover, data highlighted significant increases in the expression of B1R and B2R in platelets of LPS-treated rats, yet these changes were no longer significant in thrombin-activated platelets. Internalization of kinin receptors or their reduced accessibility to antibodies following platelet aggregation by thrombin may account for their reduced detection by flow cytometry. In contrast, platelets isolated from STZ-treated rats did not show significant changes of B1R and B2R protein expression in the absence or presence of thrombin when compared to control (Figure 5a). Likewise, western blot analysis confirmed the presence of B1R protein expression in control platelets and a marked increase of B1R in platelets isolated from LPS-treated rats with no significant change in platelets of STZ-treated rats (Figure 5b). The enhancing effect of LPS on the expression of B1R was even blunted in STZ-diabetic rats (Figure 5b). Western blot analysis confirmed the presence of B2R protein expression in platelets of control rats with no significant increase in platelets of STZ-diabetic rats (Figure 6).

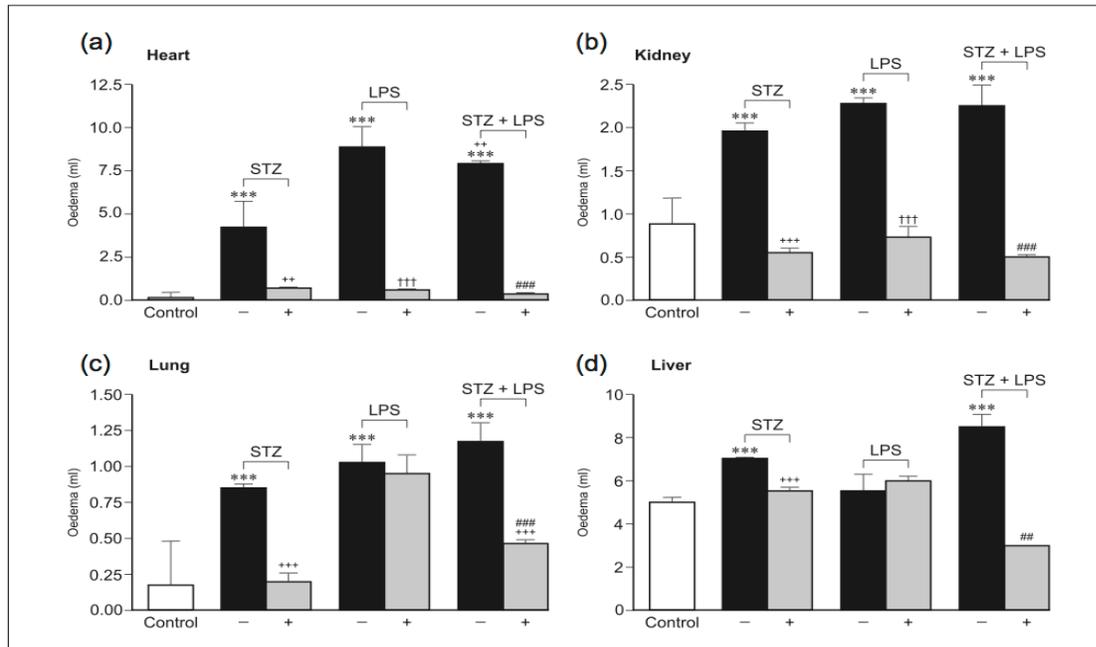


Figure 2. Edema (mL) induced in heart, kidney, lung, and liver of control, 4-day STZ-diabetic rats, LPS-treated rats (2 mg/kg, i.p.), or STZ + LPS-treated rats in the presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg by gavage, 24 h and 12 h earlier) or its vehicle (-). Data represent means \pm SEM of eight rats in each group. ++, ### $P < 0.01$; ***, +++, ####, ††† $P < 0.001$ when compared with control (*), STZ-vehicle (+), LPS-vehicle (†), or STZ + LPS-vehicle (##).

Prolonged effects of B1R antagonist and inhibitors of inflammatory mediators on rat survival

While all rats treated with STZ survived, the septic shock induced by LPS caused high mortality, particularly in STZ-diabetic rats where 0% rats have survived beyond 24–48 h (Figure 7a). Lethality induced by LPS in STZ-diabetic rats was not affected by the B1R agonist des-Arg⁹-BK (2 mg/kg, s.c.) (data not shown) but was significantly prevented by the B1R antagonist when administered 1 h prior to LPS as 90% of the rats had survived after 7 days of daily treatment with the B1R antagonist. The contribution of other mediators of inflammation was assessed on the lethality induced by LPS in STZ-diabetic rats. Treatment with niflumic acid or 1400W completely prevented the lethal effect of LPS in STZ-diabetic rats as 100% of the rats have survived after 7 days, supporting a role for COX-2 and iNOS mediators. In contrast, L-NAME

(a non-selective NOS inhibitor) and indomethacin (a non-selective COX-1/COX-2 inhibitor) did not significantly improve survival. The anticoagulant heparin increased significantly survival to 75% during the 7-day period (Figure 7a).

Impact of treatments on platelet-rich plasma aggregation

Platelet aggregation induced by ADP *ex vivo* was decreased in platelet-rich plasma isolated from STZ but did not reach statistical significance when compared to control. In contrast, it was completely disrupted in platelets isolated from LPS-treated rats, suggesting that platelet aggregation occurred previously *in vivo* in this group. The *ex vivo* platelet aggregation was also completely disrupted in platelet-rich plasma isolated from LPS-STZ treated rats. A 3 h *in vivo* treatment with SSR240612 induced significant greater platelet aggregation *ex vivo*, suggesting prevention of *in vivo* platelet

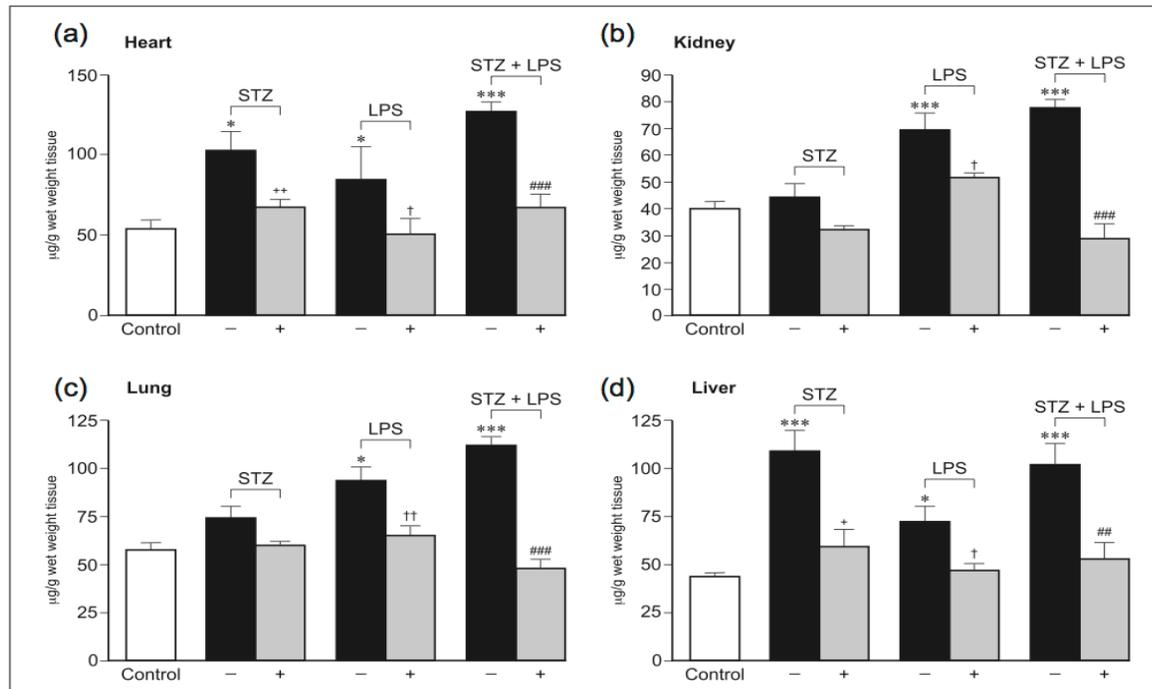


Figure 3. Changes of vascular permeability ($\mu\text{g/g}$ wet weight tissue) in heart, kidney, lung, and liver of control, 4-day STZ-diabetic rats, LPS-treated rats (2 mg/kg, i.p.) or STZ + LPS-treated rats in the presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg by gavage, 24 h and 12 h earlier) or its vehicle (-). Data represent means \pm SEM of eight rats in each group. *, +, † $P < 0.05$; ++, ###, †† $P < 0.01$; ***, #### $P < 0.001$ when compared with control (*), STZ-vehicle (+), LPS-vehicle (†), or STZ + LPS-vehicle (#).

aggregation in this group. Platelet aggregation induced by LPS in STZ-diabetic rats was also significantly improved *ex vivo* following 3 h *in vivo* treatment either with 1400W or heparin, yet this effect was less striking than with SSR240612 (Figure 7b). Treatment with the B1R agonist des-Arg⁹-BK had no significant effect on the complete disruption of platelet aggregation in LPS-STZ treated rats (Figure 7b).

Effect of B1R antagonist on early stage of thrombus formation and histological injury

Early histological lesions were observed in the lung and kidney of LPS and particularly of LPS-STZ-diabetic rats. The lung displayed a significant vascular congestion, pulmonary infarction, interstitial edema and intra-alveolar hemorrhage and multiple thrombi (Figure. 8a and a'). The kidney showed edema of proximal tubules, cortical and

glomerular hemorrhage, glomerular shrinkage and necrosis, hyalin and fibrin deposits (Figure 8b and b'). No pathological changes were seen in control groups (Figure 8). Several histological abnormalities seen in LPS-STZ-treated rats were significantly reduced after the 1-week treatment with the B1R antagonist SSR240612 (10 mg/kg/day), particularly in the kidney.

Discussion

This study provides the first experimental evidence that kinin B1R is a key player in thrombogenesis induced by the septic shock during the course of diabetes and that its antagonism offers a protective effect. Lethality associated with the LPS treatment was significantly enhanced in STZ-diabetic rats and this phenomenon appears to be related to B1R-induced multiple organ damage as a consequence of DIC. This is documented by the reduction with

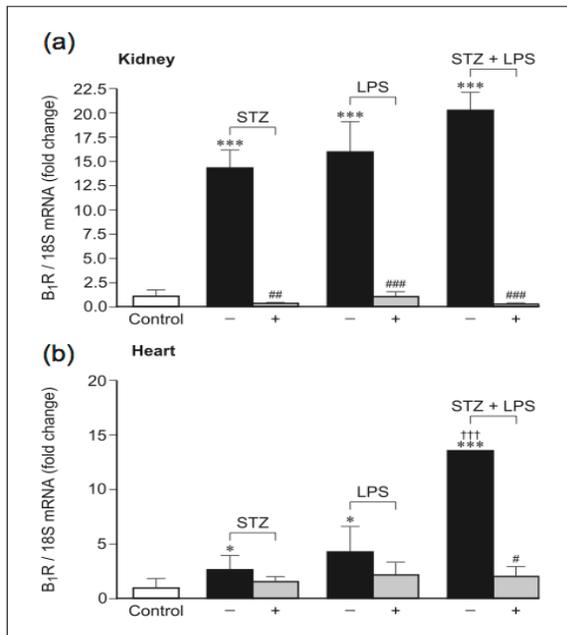


Figure 4. B1R mRNA levels in kidney cortex and heart of control, 4-day STZ-diabetic rats, LPS-treated rats (2 mg/kg, i.p.) or STZ + LPS-treated rats in the presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg by gavage, 24 h and 12 h earlier) or its vehicle (-). Data are means \pm SEM obtained from five rats in each group. *, # $P < 0.05$; ## $P < 0.01$; ***, ###, ††† $P < 0.001$ when compared with control (*) or between SSR240612 (+) and its vehicle (-) in each set of columns (#). The difference between LPS and STZ plus LPS is indicated by (†††).

SSR240612 of histological inflammatory injuries in peripheral organs, together with the inhibition of platelet aggregation leading to almost complete rat survival. Our data also suggest that NO from iNOS and prostaglandins generated by COX-2 are key mediators in this process as specific inhibitors of iNOS (1400W) and COX-2 (niflumic acid) caused complete survival. B1R inhibition was, however, more effective than 1400W or the anticoagulant heparin in preventing platelet aggregation in STZ-LPS rats.

The increased expression of B1R in platelets from LPS-treated rats may predispose platelets to activation and thrombus formation *in vivo*. In addition, B1R activation may also operate through the release of inflammatory mediators from iNOS and COX-2. Indeed, B1R can cause post-translational activation of iNOS via $G_{\alpha i}$ and the ERK/MAP

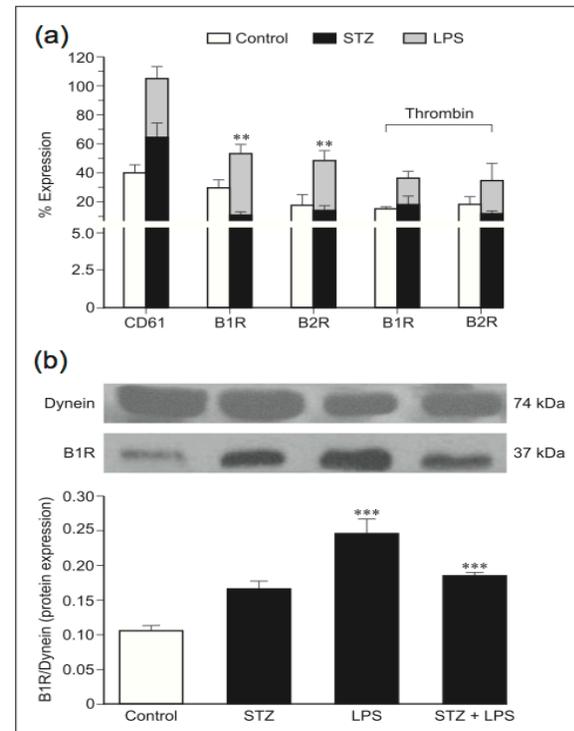


Figure 5. (a) B1R and B2R protein expression measured by flow cytometry on non-activated and thrombin-activated permeabilized platelets ($250 \times 10^6/\text{mL}$) isolated from control, LPS (2 mg/kg, i.p.), and 4-day STZ-diabetic rats. (b) Western blot analysis of B1R expression on platelets ($250 \times 10^6/\text{mL}$) isolated from control, LPS (2 mg/kg, i.p.), and 4-day STZ-diabetic rats treated or not with LPS. Data are means \pm SEM obtained from four rats in each group. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with control.

kinase pathway¹⁶ in addition to inducing the upregulation of iNOS in STZ-diabetic vasculature.¹⁷ The excessive production of NO from iNOS can react rapidly with superoxide anion to cause the formation of the highly reactive peroxynitrite (ONOO⁻), which is involved in the oxidation and nitration of fibrinogen (a key protein in the coagulation cascade) and plasminogen (the main protein of fibrinolysis process).¹⁸ In agreement with this, mutant mice lacking iNOS were resistant to LPS-induced mortality.¹⁹ In contrast, the blockade of all isoforms of NOS with L-NAME did not protect from the lethal septic shock, suggesting that eNOS may counteract the negative effect of iNOS. Other

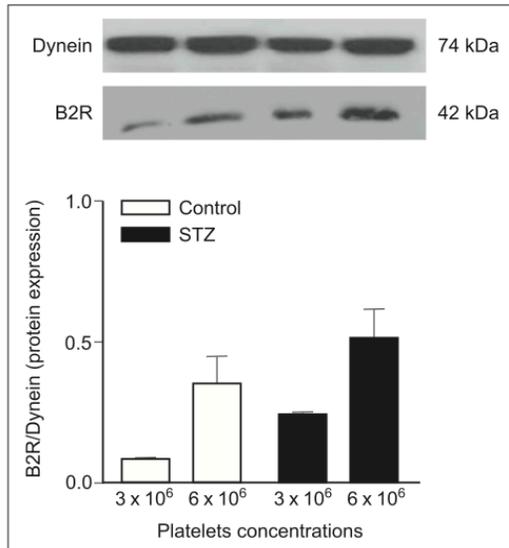


Figure 6. Western blot analysis of B2R protein expression with two concentrations (3 and 6×10^6 /mL) of platelets isolated from control and 4-day STZ-diabetic rats. Data are means \pm SEM obtained from three rats in each group. No statistical significance was found between control and STZ-treated rats.

studies also suggest the regulation of COX-2 by B1R. For instance, B1R is involved in the upregulation of COX-2 and B1R causes COX-2 activation through G_α/G_i G-protein in blood vessels of STZ-diabetic rats.¹⁷ Selective inhibition of COX-2 with nimesulide also protected from arterial thrombosis in LPS-treated dogs, yet selective COX-1 inhibition or non-selective COX inhibition had no influence.²⁰ In our study, indomethacin also failed to protect against the lethal effect of LPS, in agreement with the cytoprotective effect of prostaglandins (PGE_2 and PGI_2) generated by constitutively expressed COX-1. The upregulation of COX-2 by LPS, STZ, and B1R is believed to generate greater amount of inflammatory prostaglandins, which can account for the protective effect of COX-2 inhibitor in septic shock.

Diabetes and LPS-induced increased vascular permeability and edema may also reinforce thrombus formation by increasing blood viscosity. In most tissues, we failed however to demonstrate important differences in the increased vascular permeability and edema between STZ, LPS, and STZ-LPS treated rats, suggesting that the lethal effect

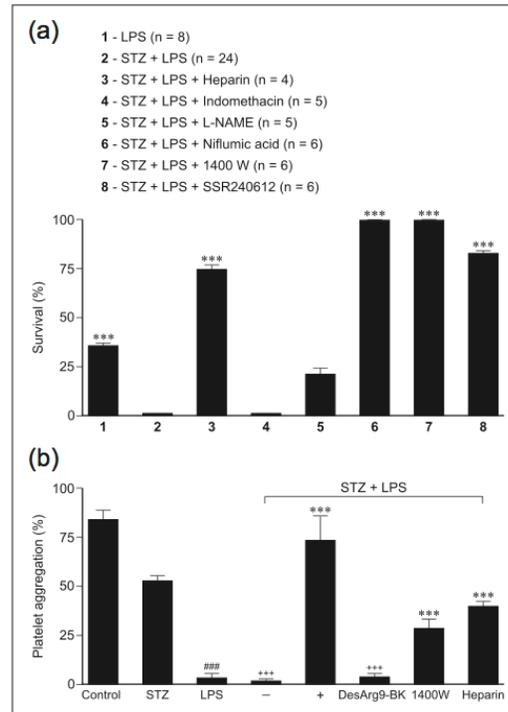


Figure 7. (a) Percentage of rats which survived 7 days after treatment with either LPS (2 mg/kg, i.p.) or LPS in 4-day STZ-diabetic rats treated or not with several inhibitors (n = number of rats per group). Data represent means \pm SEM. *** P < 0.001 when compared with STZ + LPS (group 2). (b) Platelet aggregation (%) assessed by optical aggregometry in platelets isolated from control, LPS (2 mg/kg, i.p.), 4-day STZ-diabetic rats treated or not with LPS in the absence (-) and presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg by gavage) or after treatment either with des-Arg⁹-BK (2 mg/kg, s.c.), 1400W (5 mg/kg, i.p.), or heparin (100 IU/kg, s.c.). Treatments were given at the same time than LPS and rats were sacrificed 3 h later. Data are means \pm SEM obtained from eight rats in each group. ***, +, +, +, ### P < 0.001 when compared with control (# or +) or STZ + LPS without (-) SSR240612 (*).

induced by LPS in STZ-diabetic rats is not primarily due to this phenomenon. The inhibition of increased vascular permeability and edema by SSR240612 is consistent with previous studies using other B1R antagonists in selected peripheral tissues of STZ-diabetic rats.^{17,21} Our study, however, is one of the first showing inhibition of LPS-induced vascular permeability and edema by a B1R antagonist as most studies have documented the effects of exogenous B1R agonists on plasma extravasation and the pharmacological characterization of the

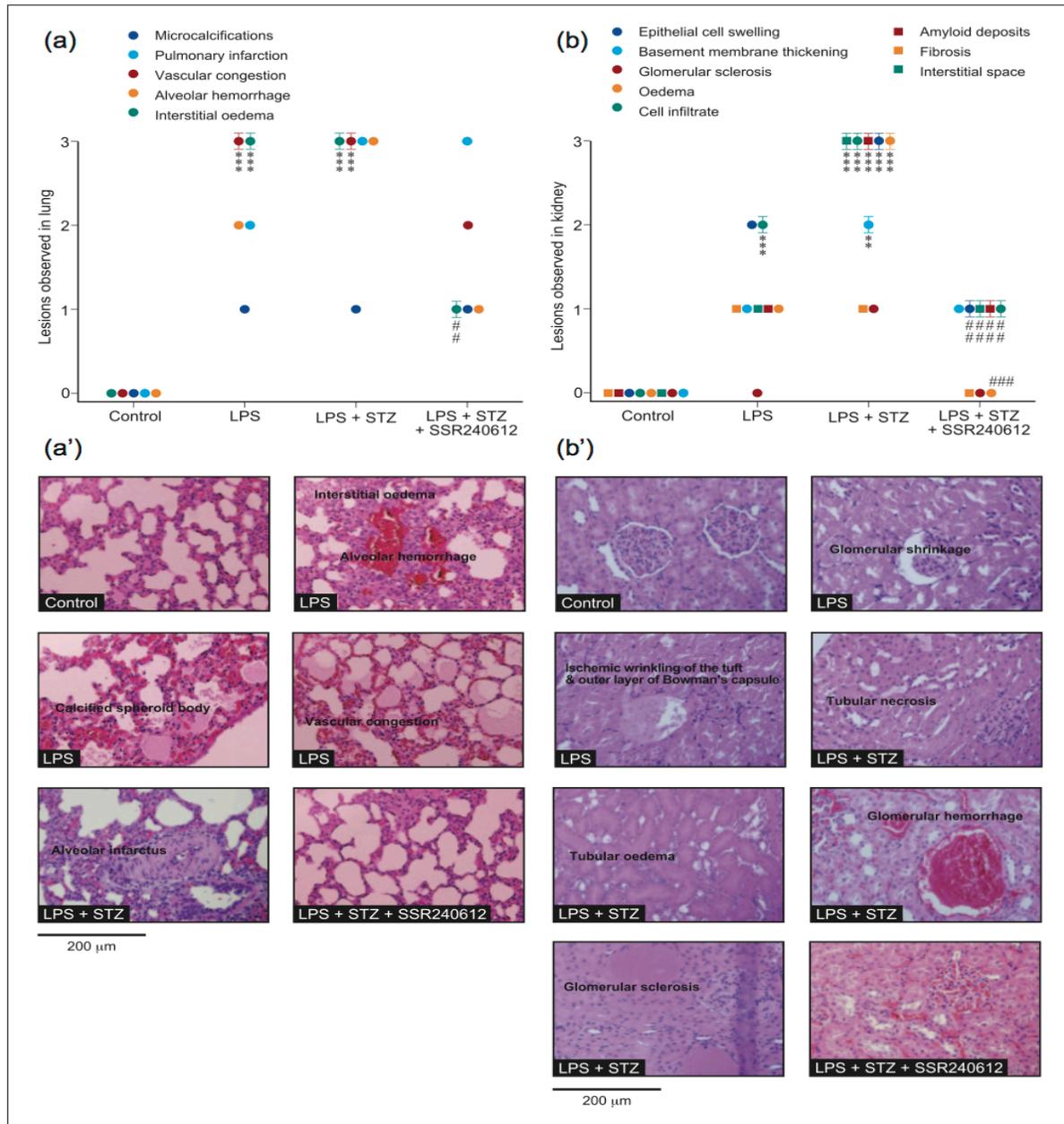


Figure 8. Qualitative representation of histological lesions observed in the lung (a, a') and kidney (b, b') of control, LPS (2 mg/kg. i.p.), and 4-day STZ-diabetic rats treated with LPS receiving or not SSR240612 (10 mg/kg) daily for up to 7 days. Data are means \pm SEM obtained from four sections per rat in four rats for each group. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ when compared with control and ### $P < 0.01$ or #### $P < 0.001$ when compared with LPS + STZ.

response with kinin receptors antagonists in LPS-treated animals.

The inhibition of kinin B1R with SSR240612 reversed hyperglycemia in STZ-diabetic rats. The anti-diabetic effect of B1R antagonism is consistent with the reduction of glycemia in B1R knock-out mice⁸ and was ascribed to an inhibition of insulinitis in STZ-diabetic rats.²² On the other hand, the inhibition of LPS-induced fever by SSR240612 could be partly due to a central mechanism as intracerebroventricular administration of a B1R antagonist inhibited the late phase (4–6 h) of the LPS response.²³ A peripheral mechanism is also likely as SSR240612 inhibited fever induced by intraperitoneally injected B1R agonist, a pyretic response which occurs through a vagal sensory mechanism involving prostaglandins (via COX-2) and NO.²⁴

In addition to blocking B1R, a treatment with two doses of SSR240612 (24 h and 12 h prior to sacrifice) was found to suppress B1R enhanced expression in the kidney and heart of diabetic and LPS treated rats. The latter downregulation of B1R expression in peripheral organs is likely to contribute to the beneficial effects of the antagonist in this study. The suppression of B1R mRNA and protein expression by one-week treatment with SSR240612 was previously shown in a rat model of insulin resistance²⁵ and is believed to derive from different possible mechanisms: (1) Inhibition of homologous upregulation of B1R expression; indeed direct binding of the B1R agonist enhanced expression of B1R (both protein and mRNA) by activating the NF- κ B pathway.²⁶ In turn, the subsequent release and expression of pro-inflammatory cytokines and the formation of ROS aggravate B1R expression;⁷ (2) The infiltration of macrophages and CD4+ T cells in tissues can account for the enhanced expression of B1R as these immune cells express B1R in STZ-diabetic rats (Tidjane and Couture, personal communication). By inhibiting the infiltration of immune cells bearing the B1R, SSR240612 contributes directly to the decrease of B1R expression; (3) Given that B1R activates NADPH oxidase to increase the formation of ROS²⁵ directly involved in the induction of B1R,⁷ the inhibition of the pro-oxidative effect of B1R with SSR240612 should also result in the suppression of B1R expression.

In conclusion, kinin B1R was found upregulated in peripheral organs and platelets in a model of

septic shock induced by LPS in STZ-diabetic rat. This model reproduces several hallmarks of septic complications encountered at intensive care units with diabetic patients who are at higher risk.^{1–4,6} Treatment with the kinin B1 receptor antagonist, SSR240612, provided a protective effect against organ damage by interfering with multiple target functions, including the suppression of B1R-induced inflammation and platelet aggregation. This further highlights a detrimental role for B1R in septic shock. Hence, kinin B1R appears a valuable target to design anti-inflammatory and anti-thrombotic drugs in the treatment of the septic shock in co-morbidity with diabetes mellitus.

Acknowledgements

The authors are thankful to the excellent expertise of Mr. Jacques Sénécal (Physiology of Université de Montréal) and Mrs Julie Hinsinger (Pathology of Université de Montréal), and to Drs Pedro D'Orléans-Juste and Julie Labonté (Pharmacology, Université de Sherbrooke) for technical assistance on the aggregometry.

Declaration of conflicting interests

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119329 to RC) and FRQS-INSERM to RC and J-PG. A studentship from GRUM-Sanofi/Aventis was awarded to NT.

References

1. Dalainas I (2008) Pathogenesis, diagnosis, and management of disseminated intravascular coagulation: A literature review. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 12: 19–31.
2. Koh GC, Peacock SJ, van der Poll T et al. (2012) The impact of diabetes on the pathogenesis of sepsis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 31: 379–388.
3. Vazzana N, Ranalli P, Cuccurullo C et al. (2012) Diabetes mellitus and thrombosis. *Thrombosis Research* 129: 371–377.
4. Mishra N and Singh N (2013) Blood viscosity, lipid profile, and lipid peroxidation in type-1 diabetic patients with good and poor glycemic control. *North American Journal of Medical Sciences* 5: 562–566.
5. Chesnutt JK and Han HC (2013) Platelet size and density affect shear-induced thrombus formation in tortuous arterioles. *Physical Biology* 10: 056003.

6. Cheadle WG, Mercer-Jones M, Heinzelmann M et al. (1996) Sepsis and septic complications in the surgical patient: Who is at risk? *Shock* 6 (Suppl. 1):S6–9.
7. Couture R, Blaes N and Girolami JP (2014) Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Current Vascular Pharmacology* 12: 223–248.
8. Seguin T, Buleon M, Destrube M et al. (2008) Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxin shock in mice. *International Immunopharmacology* 8: 217–221.
9. Merino VF, Todiras M, Campos LA et al. (2008) Increased susceptibility to endotoxin shock in transgenic rats with endothelial overexpression of kinin B(1) receptors. *Journal of Molecular Medicine* 86: 791–798.
10. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA et al. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proceedings of the National Academies of Science of the United States of America* 97: 8140–8145.
11. Cayla C, Todiras M, Iliescu R et al. (2007) Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *FASEB Journal* 21: 1689–1698.
12. Siebeck M, Spannagl E, Schorr M et al. (1996) Effect of combined B1 and B2 kinin receptor blockade in porcine endotoxin shock. *Immunopharmacology* 33: 81–84.
13. Yacoub D, Hachem A, Theoret JF et al. (2010) Enhanced levels of soluble CD40 ligand exacerbate platelet aggregation and thrombus formation through a CD40-dependent tumor necrosis factor receptor-associated factor-2/Rac1/p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30: 2424–2433.
14. Lin JC, Talbot S, Lahjouji K et al. (2010) Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31: 1940–1945.
15. Lacoste B, Tong XK, Lahjouji K et al. (2013) Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *Journal of Neuroinflammation* 10: 57.
16. Brovkovich V, Zhang Y, Brovkovich S et al. (2011) A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 15: 258–269.
17. Pouliot M, Talbot S, Sénécal J et al. (2012) Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22–0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* 7: e33864.
18. Saluk-Juszczak J, Olas B, Wachowicz B et al. (2010) L-carnitine modulates blood platelet oxidative stress. *Cell Biology and Toxicology* 26: 355–365.
19. Wei XQ, Charles IG, Smith A et al. (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 375: 408–411.
20. Hong TT, Huang J, Barrett TD et al. (2008) Effects of cyclooxygenase inhibition on canine coronary artery blood flow and thrombosis. *American Journal of Physiology* 294: H145–155.
21. Lawson SR, Gabra BH, Nantel F et al. (2005) Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: Distinct vasculopathic profile of major key organs. *European Journal of Pharmacology* 514: 69–78.
22. Catanzaro OL, Dziubecki D, Obregon P et al. (2010) Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides* 44: 187–189.
23. Coelho MM, Oliveira CR, Pajolla GP et al. (1997) Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats. *British Journal of Pharmacology* 121: 296–302.
24. Talbot S, De Brito Gariepy H et al. (2012) Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. *Journal of Neuroinflammation* 9: 214.
25. Dias JP, Talbot S, Senecal J et al. (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: e12622.
26. Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME et al. (1998) The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *Journal of Clinical Investigation* 101: 2080–2091.

CHAPITRE 3

ARTICLE 2

Problématique: La principale caractéristique du DT1 est une destruction auto-immune des cellules bêta pancréatiques, conduisant à un état inflammatoire (insulite) et à un manque de production d'insuline. L'insulite serait tributaire d'une infiltration de cellules immunitaires autour ou à l'intérieur des îlots de Langerhans. Cet assaut immun est considéré comme un marqueur d'apparition récente du DT1. Les cellules immunitaires sont principalement constituées de cellules CD8⁺, T-CD3⁺, T-CD4⁺, CD68⁺ macrophages, BCD20 et des cellules NK.

Hypothèse : L'hyperglycémie résultant de l'insulite apparaît lorsque les cellules immunitaires TCD4⁺ et les macrophages infiltrant le pancréas expriment le RB1. L'augmentation de l'expression du RB1 sur ces cellules immunitaires contribue à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans par l'entremise de médiateurs inflammatoires et d'espèces réactives oxygénées impliquant le TNF-α et la iNOS.

Objectif : Étudier le mécanisme par lequel le RB1 des kinines joue un rôle dans l'insulite au cours du DT1 par la recherche de son implication dans l'induction et l'amplification de l'assaut immun contre les cellules β des îlots de Langerhans. Une composante sensorielle impliquant le CGRP et le TRPV1 est aussi étudiée comme mécanisme neurogénique.

Méthode expérimentale

Des rats mâle Sprague-Dawley sont rendus diabétiques avec la streptozotocine (STZ, 65 mg/kg/ip). Au jour 4, ils sont traités pendant 7 jours avec un antagoniste du RB1 (SSR240612, 10 mg/kg/jour par gavage) ou par le véhicule. Le nombre et la taille des îlots de Langerhans sont mesurés par immunohistochimie utilisant un anticorps anti-insuline afin d'évaluer la sévérité de l'atteinte des cellules β. Les taux plasmatiques de glucose et d'insuline sont mesurés avec un glucomètre et un test ELISA, respectivement. L'expression des marqueurs (RB1,

iNOS, TNF- α , TRPV1) a été mesurée dans le pancréas par Western blot et/ou qRT-PCR. Les fibres sensorielles dans le pancréas ont été marquées par un anticorps dirigé contre le CGRP et le TRPV1. La localisation cellulaire du RB1 sur les macrophages, les TCD4⁺, les fibres sensorielles et les îlots du pancréas a été étudiée par immunofluorescence.

Contribution

Le design de l'étude, les expériences, l'analyse des résultats, la rédaction et l'interprétation de l'article ont été faits par N.T. L'immunohistochimie et leurs analyses ont été faites en collaboration avec le Dr Gaboury à la plateforme d'histologie de l'IRIC. Le Dr Couture a supervisé le travail et a apporté une contribution intellectuelle précieuse au projet et à la rédaction de la version finale de l'article. L'approbation de la version finale à soumettre était unanime.

Référence

N. Tidjane, L. Gaboury, R. Couture. Role of Kinin B1 Receptor in Streptozotocin-Induced Insulinitis. PlosOne (Article en révision).

PLOS ONE
Role of Kinin B1 Receptor in Streptozotocin-Induced Insulinitis
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Role of Kinin B1 Receptor in Streptozotocin-Induced Insulinitis
Short Title:	Kinin B1 receptor in insulinitis
Corresponding Author:	Réjean Couture Université de Montréal Montreal, Quebec CANADA
Keywords:	diabetes mellitus; immune cells; insulinitis; kinin B1 receptor; TRPV1
Abstract:	<p>Purpose: To investigate the mechanism by which kinin B1 receptor (B1R) partakes to insulinitis. It is hypothesized that kinin B1R can either initiate the trafficking/infiltration of immune cells into the pancreas or activate primary sensory C-fibers (CGRP and TRPV1 positive fibers) to cause neurogenic inflammation.</p> <p>Methods: Male Sprague-Dawley rats were made diabetic with streptozotocin (STZ, 65 mg/kg/ip). On day 4, they were treated for 7 days with B1R antagonist (SSR240612, 10 mg/kg/day by gavage) or its vehicle. The severity of damaged β-cells was measured by immunoperoxidase staining with insulin antibody. The expression of B1R, iNOS, TNF-α, macrophages, TCD4+, CGRP and TRPV1 was measured in the pancreas by Western blot analysis, qRT-PCR and immunofluorescence.</p> <p>Results: Macrophages and TCD4+ lymphocytes were present abundantly throughout the pancreas of STZ-diabetic rats but absent in control. Importantly, B1R was induced and upregulated on these immune cells infiltrating the diabetic pancreas. B1R was not expressed on primary sensory C-fibers even if the expression of TRPV1 and CGRP was significantly enhanced in the diabetic pancreas. SSR240612 prevented the infiltration of macrophages and TCD4+ lymphocytes in addition to normalizing the upregulation of B1R, iNOS and TNF-α. Concomitantly, SSR240612 reduced significantly hyperglycemia and partially restored plasma insulin levels by preventing the loss of Langerhans islets β-cells.</p> <p>Conclusion: Data suggest that kinin B1R is a key player in insulinitis and its antagonism may offer a new strategy to prevent destruction of Langerhans islets β-cells by immune cells assault in this model of type 1 diabetes.</p>
Order of Authors:	Nejla Tidjane Louis Gaboury Réjean Couture
Suggested Reviewers:	<p>Maria Martha Campos, PhD Dean and Professor, Pontificia Universidade Catolica Do Rio Grande Do Sul, Brasil maria.campos@puocs.br Expert on kinins in health and diseases, diabetic complications, inflammation.</p> <p>Fernand Junior Gobeil, PhD Full Professor in Pharmacology, Sherbrooke University, Canada Fernand.Junior.Gobeil@usherbrooke.ca Expert on pharmacology, chemistry and pathological roles of Kinins receptors</p>
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response
Financial Disclosure	This work was supported by a Grant (MOP-119329 to RC) from the Canadian Institutes of Health Research. The funder had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.
Please describe all sources of funding	

Role of Kinin B1 Receptor in Streptozotocin-Induced Insulinitis

Nejla Tidjane¹, Louis Gaboury², Réjean Couture¹

Departments of Molecular and Integrative Physiology¹ and Pathology and Cellular Biology², Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, Qc, Canada H3C 3J7

Correspondence to: Prof. Réjean Couture, Département de physiologie moléculaire et intégrative, Faculté de médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7.

Phone: 514-343-7060.

Abstract

Purpose: To investigate the mechanism by which kinin B1 receptor (B1R) partakes to insulinitis. It is hypothesized that kinin B1R can initiate the trafficking/infiltration of immune cells into the pancreas and/or activate primary sensory C-fibers (CGRP and TRPV1 positive fibers) to cause neurogenic inflammation.

Methods: Male Sprague-Dawley rats were made diabetic with streptozotocin (STZ, 65 mg/kg/ip). On day 4, they were treated for 7 days with B1R antagonist (SSR240612, 10 mg/kg/day by gavage) or its vehicle. The severity of damaged β -cells was measured by immunoperoxidase staining with insulin antibody. The expression of B1R, iNOS, TNF- α , macrophages, TCD4⁺, CGRP and TRPV1 was measured in the pancreas by Western blot analysis, qRT-PCR and immunofluorescence.

Results: Macrophages and TCD4⁺ lymphocytes were present abundantly throughout the pancreas of STZ-diabetic rats but absent in control. Importantly, B1R was induced and upregulated on these immune cells infiltrating the diabetic rat pancreas. B1R was not expressed on primary sensory C-fibers even if the expression of TRPV1 and CGRP was significantly enhanced in the diabetic pancreas of STZ rats. SSR240612 prevented the infiltration of macrophages and TCD4⁺ lymphocytes in addition to normalizing the upregulation of B1R, iNOS and TNF- α . Concomitantly, SSR240612 reduced significantly hyperglycemia and partially restored plasma insulin levels by preventing the loss of islets of Langerhans β -cells.

Conclusion: Data suggest that kinin B1R is a key player in insulinitis and its antagonism may offer a new strategy to prevent destruction of islets of Langerhans β -cells by immune cells assault in this model of type 1 diabetes.

Introduction

Type 1 diabetes mellitus (T1D) is traditionally considered as a T-cell-mediated autoimmune disease or more recently, as an innate inflammatory disease, which causes pancreatic islet inflammation (insulinitis) resulting in the progressive and permanent selective destruction of insulin secreting β -cells [1-3]. The pathogenicity of T1D is associated with genetic, epigenetic and environmental factors [1, 4, 5] or with infectious agents [2]. Once diagnosed, the main treatment for T1D remains insulin therapy, which was proven effective but not satisfactory at long term to delay the progression of microvascular complications such as nephropathy, neuropathy and retinopathy [6]. Among the numerous inflammatory mediators involved in insulinitis, kinins were suggested to play a primary role, particularly the B1 receptor (B1R), as treatments with B1R antagonists reversed and normalized hyperglycemia, glucose tolerance, the increased diuresis and renal excretion of proteins, nitrites and kallikreins associated with diabetes in streptozotocin (STZ)-treated mice [7-10].

Kinins are known pro-inflammatory peptides, which exert their effects via two distinct G protein-coupled receptors, B2R and B1R. The ubiquitous B2R is expressed constitutively while the B1R is virtually absent under physiological conditions, yet it is induced and upregulated via the activation of the transcriptional nuclear factor NF-kappa B (NF-kB) and mitogen-activated protein (MAP) kinase by pro-inflammatory cytokines such as IL1- β , TNF- α and reactive oxygen species (ROS) [11].

It was suggested that B1R intervenes in the early phase of insulinitis because it was associated with the release of nitric oxide (NO) from peritoneal macrophages prior to the

development of hyperglycemia in STZ-diabetic mice[8]. In that case, NO is perceived as a cytotoxic molecule because it can be produced in high and prolonged amount from iNOS upon B1R activation. The post-translational activation of iNOS by B1R is G α i-mediated and involves beta-arrestin 2 and Src-dependent activation of the ERK/MAP kinase pathway [12, 13]. Importantly, endogenous activation of B1R enhances the expression of iNOS in diabetes[14]. B1R is also pro-oxidant via the activation of NADPH oxidase, which produces superoxide anion in diabetic vessel[15]. Thus B1R stimulation in diabetes initiates a greater production of NO and superoxide anion, which can rapidly react together to form the highly reactive peroxynitrite (ONOO⁻) [13, 16]. This link between ROS, iNOS and B1R highlights a role for B1R in the destruction of pancreatic islet β -cells in T1D.

Previous studies demonstrated that host pro-inflammatory cytokines activate cytotoxic CD4⁺ T-cells that interact specifically with β -cells to mediate their death and activate macrophages, an important source of pro-inflammatory cytokines (IL-1, TNF- α) and ROS, which are highly cytotoxic to islet β -cells [17, 18]. Recent findings suggest that the development of insulinitis is not only linked to immunological events, but also involves a neuronal sensory component [19, 20]. The transient receptor potential vanilloid type1 (TRPV1) receptor expressed in polymodal sensory C-fibers is involved in β -cell stress and islet inflammation by controlling neuropeptides release and insulin secretion[21]. Activation of insulin receptors located on TRPV1-positive sensory nerves innervating the pancreas and β islet cells sensitizes TRPV1. TRPV1 activation causes the release of neuropeptides notably substance P (SP) and calcitonin-gene related peptides (CGRP) from sensory nerves[19, 20]. CGRP in turn inhibits insulin release from islet β -cells [22]

and exerts immunosuppressive activity by releasing anti-inflammatory cytokines from macrophages, T lymphocytes and dendritic cells thereby inhibiting NF- κ B [23]. In contrast, SP enhances the secretion of a variety of cytokines from T lymphocytes, which can further upregulate the expression of NK-1 receptor [24] and B1R [11]. It is worth noting that SP is also produced by macrophages, T cells and dendritic cells and activates them via the NK-1 receptor [25, 26]. Thus multiple interactions occur between immune cells and the sensory system via SP and CGRP, but also with TRPV1 which is expressed on immune cells and primary sensory neurons. Although the endogenous ligand for TRPV1 is unknown in pancreas, this calcium-permeable channel is activated by low pH, eicosanoids such as the endocannabinoid anandamide (arachidonylethanolamide) derived from immune cells [27] and by NO according to a mechanism involving S-nitrosylation of extracellular cysteines Cys616 and Cys621 [28]. TRPV1 is also sensitized by PKC- and PKA-induced phosphorylation following the activation of Gq and Gs in the presence of inflammatory mediators [29, 30].

Hence, activation of TRPV1, NK-1R and possibly B1R on immune cells by endogenous ligands can enhance the generation of NO by iNOS, thereby ROS and the release of cytokines and chemokines to cause the destruction of islet β -cells. Ablation of TRPV1 stops insulinitis and the resultant β -cell destruction in the non-obese diabetic (NOD) mouse despite the persistence of pathogenic T cells [19, 31]. Interestingly, TRPV1 activation enhances the expression of a functional kinin B1R in rat microglial cells, which are acting as resident macrophage-related cells in the CNS [32]. The possibility, however, that B1R contributes to insulinitis via the activation of TRPV1-positive sensory nerves in the pancreas has never been addressed.

Whereas pharmacological studies showed that kinin B1R intervenes in insulinitis, its cellular mechanism, particularly its localisation and interaction with TRPV1 neurons, macrophages, CD4⁺ T-cells and β -cells remain ill defined. This work was undertaken to determine: 1- the cellular localisation of kinin B1R in the above pancreatic immune and neuronal cells; 2- the ability of B1R antagonism to prevent immune cell infiltration causing β -cells destruction and thereby hyperglycemia.

Materials and Methods

Experimental animals and care

All experimental methods and animal care procedures were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (protocols 09-030, 11-141 and 12-198), in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Male Sprague-Dawley rats (200-225 g; Charles River, St-Constant, Qc, Canada) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (23°C) and humidity (50%), on a 12 h light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water.

Streptozotocin (STZ) treatment and blood glucose monitoring

Rats were injected under a low light condition with freshly prepared STZ (65 mg/kg, i.p.; Zanosar, McKesson, Montreal, Qc, Canada). Age-matched controls were injected with STZ vehicle. Blood glucose was measured with a commercial blood glucose-monitoring kit (Accusoft; Roche Diagnostics, Qc, Canada) from a drop of blood obtained from the tail vein.

Free plasma Insulin measurement

Overnight-fasted rats were anaesthetized with isoflurane and blood was quickly collected from sectioned carotid arteries and immediately transferred into a tube of 6 ml containing 10.8 mg EDTA. The plasma was obtained by centrifugation and kept frozen at -20°C for the subsequent measurement of insulin by radioimmunoassay (rat insulin RIA kit, Linco Research, St Charles, Missouri, USA).

Pharmacological treatment with B1 receptor antagonist

Two protocols were tested with the non-peptide B1R antagonist SSR240612[33] to assess its acute and chronic effects in control and 4-day STZ-treated rats. In the acute regimen, SSR240612 was administered by gavage on day 4 at the dose of 10 mg/kg 24h and 12h prior to sacrifice. In the chronic regimen, SSR240612 was administered by gavage daily starting on day 4 for 7 days at the dose of 10 mg/kg. Vehicle was given instead of SSR240612 as control. Rats were sacrificed with isoflurane 12 h (acute regimen) or 24 h (chronic regimen) after the last treatment with SSR240612. Blood was collected and treated as above and pancreas put either in formalin 10% (immunohistochemistry) or frozen in dry ice (gene and protein expression).

Immunofluorescent and immunohistochemistry staining

Pancreas from control, STZ and STZ rats treated with SSR240612 for 7 days were fixed in 10% neutral buffer formalin and embedded in paraffin. Tissue sections (4µm) obtained on a microtome were incubated inside an immunostainer dedicated to research (Discovery XT, Ventana Medical Systems, Roche Group) following FISH procedure and manual titrations and by using proprietary reagents. The following antibodies were applied at room temperature on pancreas sections depending on objectives: mouse anti-insulin (Millipore clone E11D7, 1/50 for 1 h), rabbit anti-B1 receptor developed in Couture's laboratory [34, 35] 1/200 for 1 h), rabbit anti-CGRP (abcam, ab137880, 1/50 for 3 h), mouse anti-Pan Macrophage (abcam, ab15637, 1/25 for 3 h), Anti-CD4 (Millipore, 1/50 for 3 h) and rabbit anti-TRPV1 (Cedarlane Laboratories Limited, PA000547-PA1323, 1/100 for 1 h). Afterwards, the slides were incubated with a FITC-labelled secondary anti-

rabbit antibody to visualize B1 receptor; with a Texas-Red-labelled secondary anti-rabbit antibody to visualize CGRP, TRPV1 and with a labelled secondary Texas-Red anti-mouse antibody to visualize insulin, TCD4⁺ and Pan Macrophage epitopes. The slides were finally washed and mounted using ProLong® Gold Antifade Reagent with DAPI (Invitrogen).

Immunohistochemistry with peroxidase was performed according to manufacturer recommendations on an immunostainer (Discovery XT system, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Anti-CGRP (abcam ab81887, 1/50) was applied for 3h at room temperature. Sections were then incubated with a specific secondary biotinylated antibody and visualized using streptavidin horseradish peroxidase-3,3-diaminobenzidine (DAB map detection kit from Ventana Medical Systems). Finally, sections were counterstained with hematoxylin and read on microscope (Olympus, BX 61, digital camera DP71).

Evaluation of the destruction of the islets of Langerhans β -cells by STZ

The integrity of islets of Langerhans ranging from 10 to 400 μm was determined in control, STZ and STZ rats treated for 7 days with SSR240612. This was achieved by immunoperoxidase detection of insulin in β -cells in pancreatic tissue sections (4 μm). Mouse anti-insulin (Millipore clone E11D7, 1/50) was applied for 1h at room temperature. Sections were incubated with a specific secondary biotinylated antibody and visualized with streptavidin horseradish peroxidase and 3,3-diaminobenzidine (DAB map detection kit from Ventana Medical Systems). Sections were then counterstained with hematoxylin and read on microscope (Olympus, BX 61, digital camera DP71). Data represent the average of islets of Langerhans diameters (μm) calculated from 4 slides per rat in 4 rats per experimental group.

Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction

After sacrifice, approximately 10 mg of tissue (pancreas, n=8) were put in *RNAlater* stabilisation reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA), Total RNAs were extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). qRT-PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer and signal detected using a Mx3000p device (Stratagene, La Jolla, CA, USA). For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). PCR conditions were: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Western blot

For protein quantification (n = 4 to 6 rats/group), pancreas were homogenized in lysis buffer and stabilised in Laemli buffer. In brief, extracts were protein assayed, loaded (15 to 30 µg) in 10% SDS-polyacrylamide gels, separated by electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were incubated (1h) in a blocking buffer containing 5% non-fat milk in Tris-buffered saline (TBS) plus Tween 20 (TBS-T, 0.1%), Thereafter membranes were incubated overnight at 4°C either with rabbit anti-B1R (1:1000) or anti-dynein (1:25000) in TBS-T. Membranes were further incubated (1h) with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1:25000). Membranes

were rinsed adequately between every step with TBS-T and revealed with chemiluminescence detection (ECL Plus kit) followed by densitometric quantification.

Drugs and reagents

The selective non-peptide B1R antagonist SSR240612 [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidiny]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride] was obtained from Sanofi-Aventis R&D (Montpellier, France), SSR240612 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.5% v/v), ethanol (5% v/v) and Tween-80 (5% v/v) were added in this sequence. The solution was completed in distilled water. The drug was administered orally by gavage in a volume of 1 ml per 100 g of body weight. All other chemicals used were purchased from standard commercial suppliers and were of analytical grade.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 5 Windows (San Diego, CA, USA). Data were expressed as means \pm s.e.m. of values obtained from *n* rats. Statistical significance was determined with Student's t-test for unpaired samples or with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferonni post-test for multiple comparisons. Only the value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Effects of SSR240612 on blood glucose levels and body weight

Acute and chronic effects of SSR240612 were determined on blood glucose levels. Glucose levels were 4- to 5-fold higher in 4-day STZ-treated rats compared to controls. Hyperglycemia was normalized by 1-day pre-treatment with SSR240612 (10 mg/kg per gavage 12 and 24 h prior to sacrifice) in STZ-treated rats (Fig. 1A) while it was significantly reduced during the one-week treatment with SSR240612 (10 mg/kg/day) (Fig. 2A). The B2R antagonist (Hoe140) was administered (500 µg/kg, s.c. 24 h earlier) to determine whether the inhibition of hyperglycemia caused by SSR240612 in STZ-diabetic rats was due to B2R-induced hypoglycemia. This possibility was ruled out as Hoe 140 failed to affect STZ-induced hyperglycemia or to prevent the inhibition of hyperglycemia by SSR240612 (Fig. 1A).

Rats treated with STZ displayed a significant loss of body weight compared to control rats. The 1-week treatment with SSR240612 had no significant effect on the loss of body weight in STZ-diabetic rats or on the gain of body weight in control rats (Fig. 2B).

Effect of SSR240612 on insulin levels and islets of Langerhans β -cells viability

Plasma insulin levels were dramatically reduced in 4-day STZ-diabetic rats. The 1-day treatment with SSR240612 enhanced significantly plasma insulin levels in STZ-diabetic rats without causing complete normalization (Fig. 1B). The average of Langerhans islets diameters identified by immunoperoxidase detection of insulin in β -cells from the pancreas of 11-day STZ-diabetic rats was significantly reduced compared to control,

supporting a marked destruction of islets β -cells (Fig. 3). The 1-week treatment with SSR240612 enhanced significantly the average of Langerhans islets diameters close to normal values, thus showing the protective effect of the B1R antagonist against the loss of Langerhans β -cells in STZ-diabetic rat (Fig. 3).

Effect of SSR240612 on B1 receptor expression in the pancreas

A low basal mRNA expression of kinin B1R mRNA was detected in the pancreas of control rats (Fig. 4A). This expression was significantly enhanced (5-fold) in the pancreas of 11-day STZ-diabetic rats. Western-blot analysis performed with the anti-B1R antibody showed a single band at the expected molecular weight (37 kDa), which was relatively small in control pancreas (Fig. 4B). Likewise, protein expression of B1R was significantly enhanced (6-fold) in the pancreas of 11-day STZ-diabetic rats (Fig. 4B). The induction and upregulation of B1R at both mRNA and protein levels were reduced to normal or significantly reduced by the 1-week treatment with SSR240612 in STZ-diabetic rat pancreas.

Effect of SSR240612 on TNF- α , iNOS and TRPV1 expression in the pancreas

A tiny basal mRNA expression of TNF- α and iNOS was detected in the pancreas of control rats, yet TRPV1 expression was more easily detectable (Fig. 5). The expression of these markers was significantly increased for TNF- α (25-fold), iNOS (50-fold), and TRPV1 (2-fold) in the pancreas of STZ-diabetic rats. The 1-week treatment with the B1R antagonist brought back to normal the enhanced expression of these 3 markers in STZ-diabetic rat pancreas.

Distribution of B1R fluorescent labeling in the pancreas

Figure 6 illustrates B1R labeling (green dots) in the pancreas of STZ-treated rats. B1R showed a weak labeling in control pancreas (A), which became stronger throughout the entire parenchyma in the pancreas of STZ-treated rats (B). The colocalization of B1R with insulin in β cells (red dots) was either absent or very subtle (yellow) (D).

Effect of SSR240612 on pan-macrophage and CD4⁺ T cells

A strong immunostaining of pan-macrophage was shown in the STZ-diabetic rat pancreas in contrast to the absence of pan-macrophage immunostaining in control pancreas or in STZ-diabetic rat pancreas exposed to SSR240612 for 1-week (Fig. 7 A-C). Immunostaining of pan-macrophage (red, D) and B1R (green, E) merged together (yellow, F), supporting their colocalisation in STZ-diabetic rat pancreas (Fig. 7). Whereas CD4⁺ T cells (red, A) and B1R (green, D) exhibited weak immunostaining in control pancreas (Fig. 8), the intensity of labeling for both markers was greatly increased in the STZ-diabetic rat pancreas (Fig. 8-B and E) and largely reduced by 1-week treatment with SSR240612 in STZ-diabetic rats (Fig. 8-C and F). Importantly, B1R staining did not show colocalisation with CD4⁺ T cells (red) in control rats (Fig. 8-G). In contrast, B1R and CD4⁺ T cells staining colocalised (yellow) in the pancreas of STZ-diabetic rats (Fig. 8-H). This colocalisation was markedly reduced by SSR240612 after 1-week treatment (Fig. 8-I).

SSR240612 effect on TRPV1 and CGRP immunostaining in the pancreas

TRPV1 immunostaining was relatively weak in the pancreas of control rats (Fig. 9-A) and much more abundant in that of STZ-diabetic rats (Fig. 9-B). Although TRPV1 and B1R were not found to colocalize in STZ-diabetic rat pancreas (Fig. 9-C), a 1-week treatment with SSR240612 curtailed the increased immunostaining of TRPV1 (Fig. 9-D). The immunodetection of CGRP by fluorescence and HRP (Fig. 10-A and A') revealed an increased protein expression of this sensory neuropeptide in the pancreas of STZ-diabetic rats (Fig. 10-B and B'). Yet CGRP (red) and B1R (green) failed to colocalize (no yellow) in the STZ-diabetic rat pancreas (Fig. 10-C).

Discussion

We have provided evidence for the role of kinin B1R in insulinitis through a mechanism involving the infiltration of the pancreas by CD4⁺ T-cells and macrophages on which B1R is expressed and upregulated. Data do not support the possibility that B1R increases the infiltration of immune cells through the release of sensory neuropeptides as B1R did not co-localize with TRPV1 and CGRP-positive neurons. Nevertheless the normalization of CGRP and TRPV1 upregulation by SSR240612 in STZ-diabetic rat pancreas suggests that B1R can intervene indirectly in the sensory component associated with the immune response. We also observed enhanced expression of TNF- α and iNOS in the diabetic rat pancreas. The complete normalization of TNF- α , iNOS and B1R expression concomitantly with the inhibition of CD4⁺ T-cells and macrophages infiltration by SSR240612 further indicate that the induction and expression of B1R is restricted to these immune cells, which control the synthesis of TNF- α and NO by iNOS. Collectively, these immune events triggered by B1R activation can lead to the destruction of pancreatic islet β -cells.

Effects of B1R on hyperglycemia

SSR240612 restored plasma glucose and improved insulin levels in STZ-diabetic rats by preventing the destruction of islets β -cells as confirmed by immunohistochemistry. Since it is known that B2R enhances insulin-dependent glucose transport and its genetic deletion causes insulin resistance[36], we tested the hypothesis that the effect of SSR240612 on hyperglycemia could be due to interference with B2R. However, this possibility is unlikely because the B2R antagonist (Hoe 140) had no effect on hyperglycemia and cotreatment with SSR240612 did not affect the inhibition of

hyperglycemia by SSR240612. Hence, data do not support a contribution of B2R to either STZ-induced hyperglycemia or the inhibition of hyperglycemia under B1R blockade. The same B2R antagonist (Hoe 140) administered daily for 10 or 15 days did not show any effect on hyperglycemia in STZ-diabetic mice [37, 38]. Thus our data are in agreement with previous studies that showed inhibition of hyperglycemia by peptide B1R antagonists in STZ-diabetic mice [9, 10, 37].

Downstream mechanism upon B1R activation in insulinitis

Our data show an upregulation of iNOS in the pancreas of diabetic rats that was completely normalized by SSR240612, supporting a role for B1R in the infiltration of macrophages known to express iNOS [39]. According to this scenario, the endogenous activation of B1R on macrophages can enhance the release of NO from iNOS. Indeed, the B1R agonist des-Arg⁹-bradykinin increases the release of NO from peritoneal macrophages of STZ-treated mice before the development of hyperglycemia [8]. The high production of NO by B1R activation can react with superoxide anion to generate the cytotoxic peroxynitrite [17, 40]. Several studies support the role of activated macrophages and CD4⁺ T-cells coupled to the high levels of cytokines, ROS and reactive nitrogen species (RNS) in insulinitis [41, 42]. B1R can further contribute to the high production of superoxide anion following the direct activation of NADPH oxidase [43]. Beyond the contribution of B1R to the oxidative stress via iNOS and NADPH oxidase, B1R may represent a promising target for cytokine release by immune cells since SSR240612 suppressed the upregulation of TNF- α in STZ-diabetic rat pancreas.

Contribution of sensory neurons in B1R-induced insulinitis

TRPV1 was detected in sensory fibers innervating the pancreas but also in islet β -cells where it can play a role in insulin release [44]. Insulin, in turn, sensitizes TRPV1 on sensory nerve endings, potentiating the release of sensory neuropeptides [45]. TRPV1-expressing neurons not only release CGRP but also possess CGRP receptors [46]. CGRP shown to be present in pancreatic islet cells and nerve fibers, reduces insulin release from β -cells [47, 48]. CGRP-positive nerve fibers do not appear to be affected in the pancreas of STZ-diabetic rats, yet no quantitative study has been performed so far [49]. Ablation of TRPV1-positive neurons by capsaicin improves glucose tolerance in rats made diabetic by STZ [50]. Also destruction of TRPV1-positive neurons innervating the pancreas with neonatal capsaicin prevents insulinitis and β -cell destruction in NOD mice despite the systemic persistence of pathogenic T lymphocytes [31]. Endogenous SP released from TRPV1-positive fibers promotes neurogenic inflammation via activation of the NK-1 receptor in the pancreas [51] that may act as a chemoattractant, contributing to the mononuclear infiltration process in insulinitis. These findings are congruent with the higher levels of TRPV1 and CGRP expression detected in the pancreas of our STZ-diabetic rats. Data suggest the contribution of sensory neuropeptides via a B1R mechanism in insulinitis based on the suppression of insulinitis together with TRPV1 and CGRP upregulation after blockade of B1R.

Putative role of B1R in the physiological control of insulin release

It has been suggested that kinin B2R may play a physiological role in the regulation of insulin release via the phosphatidyl inositol pathway and increased intracellular calcium

in pancreatic β -cells [52-54]. In contrast, B1R was not expressed on β -cells or isolated islets and their stimulation with a B1R agonist failed to induce insulin release in control mice [53, 55]. This is supported by our findings showing the absence of B1R in insulin secreting β -cells in control and STZ-diabetic rats. Nevertheless, mice lacking the B1R have lower fasting glucose and mild hyperglycemia after feeding, as well as hypoinsulinemia, fewer pancreatic islets and a lower insulin content, which leads to reduced insulin release after a glucose load. Also, the release of insulin into the serum in response to i.v. injection of B1R agonist was absent in B1R knockout mice [55]. The effects of B1R on insulin homeostasis were tentatively ascribed to increased vascular permeability in the pancreas [55], an unlikely physiological mechanism. As it is known that kinin B2R is up-regulated and the function and expression of other vasoactive systems, namely ACE and angiotensin AT1R are decreased in B1R knockout mice [11], the role of B1R in insulin homeostasis in non-diabetic physiological state warrants further investigation.

Conclusion

This study suggests a deleterious role for kinin B1R in the early stage of diabetes, commonly called insulinitis. B1R expression was induced in the pancreas of STZ-diabetic rats and its enhanced expression on infiltrating CD4⁺ T-cells and macrophages contributed to the destruction of islet β -cells by key inflammatory mediators and ROS involving TNF- α , iNOS and TRPV1. This could be prevented by a one-week treatment with the B1R antagonist SSR240612, which corrected hyperglycemia and improved plasma insulin levels along with islet β -cells integrity in STZ-diabetic rats.

Acknowledgment

Authors are thankful to Mr Jacques Sénécal, Mrs Julie Hinsinger, Melina Narlis and Micheline Fortin for their valuable technical assistance.

References

1. Stankov K, Benc D, Draskovic D (2013) Genetic and epigenetic factors in etiology of diabetes mellitus type 1. *Pediatrics* 132(6):1112-22.
2. Skog O, Korsgren S, Melhus A, Korsgren O (2013) Revisiting the notion of type 1 diabetes being a T-cell-mediated autoimmune disease. *Cur Opin in Endocrinol, Diabetes, and Obesity* 20(2):118-23.
3. Boitard C (2012) Pancreatic islet autoimmunity. *Presse Medicale* 41(12 P 2):e636-50.
4. Dang MN, Buzzetti R, Pozzilli P (2013) Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* 29(1):8-18.
5. Rakyan VK, Beyan H, Down TA, Hawa MI, Maslau S, Aden D, et al. (2011) Identification of type 1 diabetes-associated DNA methylation variable positions that precede disease diagnosis. *PLoS genetics* 7(9):e1002300.
6. Heller T, Blum M, Spraul M, Wolf G, Muller UA (2014) [Diabetic co-morbidities: prevalences in Germany]. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 139(15):786-91.
7. Zuccollo A, Cueva F, Frontera M, Navarro M, Catanzaro O (1996) The role of the kallikrein-kinin system in type I diabetes (insulinitis). *Immunopharmacol* 33(1-3):349-50.
8. Catanzaro OL, Dziubecki D, Labal E, Sirois P (2010) Activation of peritoneal macrophages during the evolution of type 1 diabetes (insulinitis) in streptozotocin-treated mice. *Peptides* 31(10):1884-7.
9. Zuccollo A, Navarro M, Frontera M, Cueva F, Carattino M, Catanzaro OL (1999) The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis). *Immunopharmacol* 45(1-3):69-74.
10. Catanzaro OL, Dziubecki D, Obregon P, Rodriguez RR, Sirois P (2010) Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides* 44(2):187-9.
11. Couture R, Blaes N, Girolami JP (2014) Kinin Receptors in Vascular Biology and Pathology. *Curr Vasc Pharmacol* 12:223-248.

12. Kuhr FK, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA (2010) Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *FASEB J* 24(7):2475-83.
13. Brovkovich V, Zhang Y, Brovkovich S, Minshall RD, Skidgel RA (2011) A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med* 15(2):258-69.
14. Dias JP, Couture R (2012) Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol* 60(1):61-9.
15. Dias JP, 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.
16. Ascenzi P, di Masi A, Sciorati C, Clementi E (2010) Peroxynitrite-An ugly biofactor? *BioFactors* 36(4):264-73.
17. Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL (1998) Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus. *Biochem Pharmacol* 55(8):1139-49.
18. Kagi D, Ho A, Odermatt B, Zakarian A, Ohashi PS, Mak TW (1999) TNF receptor 1-dependent beta cell toxicity as an effector pathway in autoimmune diabetes. *J Immunol* 162(8):4598-605.
19. Tsui H, Razavi R, Chan Y, Yantha J, Dosch HM (2007) 'Sensing' autoimmunity in type 1 diabetes. *Trends Mol Med* 13(10):405-13.
20. Suri A, Szallasi A (2008) The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci* 29(1):29-36.
21. Uchida K, Tominaga M (2011) The role of thermosensitive TRP (transient receptor potential) channels in insulin secretion. *Endocrine J* 58(12):1021-8.
22. Pettersson M, Ahren B (1990) Calcitonin gene-related peptide inhibits insulin secretion studies on ion fluxes and cyclic AMP in isolated rat islets. *Diab Res* 15(1):9-14.
23. Holzmann B (2013) Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease. *Curr Protein & Peptide Sci* 14(4):268-74.

24. Weinstock JV, Blum A, Metwali A, Elliott D, Bunnett N, Arsenescu R (2003) Substance P regulates Th1-type colitis in IL-10 knockout mice. *J Immunol* 171(7):3762-7.
25. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F (2004) The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 201(2):167-80.
26. Persson-Sjogren S, Lejon K, Holmberg D, Forsgren S (2005) Expression of the NK-1 receptor on islet cells and invading immune cells in the non-obese diabetic mouse. *J Autoimmunity* 24(4):269-79.
27. Pertwee RG (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handbook of Experimental Pharmacol* 168:1-51.
28. Yoshida T, Inoue R, Morii T, Takahashi N, Yamamoto S, Hara Y, et al. (2006) Nitric oxide activates TRP channels by cysteine S-nitrosylation. *Nature Chem Biol* 2(11):596-607.
29. Por ED, Gomez R, Akopian AN, Jeske NA (2013) Phosphorylation regulates TRPV1 association with beta-arrestin-2. *Biochem J* 451(1):101-9.
30. Morales-Lazaro SL, Simon SA, Rosenbaum T (2013) The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *J Physiol* 591(Pt 13):3109-21.
31. Razavi R, Chan Y, Afifiyan FN, Liu XJ, Wan X, Yantha J, et al. (2006) TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* 127(6):1123-35.
32. Talbot S, Dias JP, Lahjouji K, Bogo MR, Campos MM, Gaudreau P, et al. (2012) Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional kinin B(1) receptor in rat spinal cord microglia. *J Neuroinflammation* 9:16.
33. Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, et al. (2004) SSR240612 [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[2R,6S]-2,6-dimethylpiperidinyl)methyl]phenyl)-N-isopropyl -N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309(2):661-9.
34. Lacoste B, Tong XK, Lahjouji K, Couture R, Hamel E (2013) Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 10:57.

35. Lin JC, Talbot S, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Couture R, et al. (2010) Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31(10):1940-5.
36. Duka I, Shenouda S, Johns C, Kintsurashvili E, Gavras I, Gavras H (2001) Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension* 38(6):1355-60.
37. Zuccollo A, Navarro M, Catanzaro O (1996) Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 74(5):586-9.
38. Zuccollo A, Navarro M, Prendes GM, Dominguez A, Catanzaro OL (1996) Effects of HOE 140 on some renal functions in type I diabetic mice. *Arch Physiol Biochem* 104(2):252-4.
39. Wood ER, Berger H, Jr., Sherman PA, Lapetina EG (1993) Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophysical Research Communications* 191(3):767-74.
40. Stadler K (2011) Peroxynitrite-driven mechanisms in diabetes and insulin resistance - the latest advances. *Cur Med Chem* 18(2):280-90.
41. Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE (2012) Oxidative stress and beta cell dysfunction. *Methods in Mol Biol* 900:347-62.
42. Rabinovitch A (1998) An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Reviews* 14(2):129-51.
43. Talbot S, Lin JC, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Morin A, et al. (2011) Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells. *Peptides* 32(7):1447-56.
44. Akiba Y, Kato S, Katsube K, Nakamura M, Takeuchi K, Ishii H, et al. (2004) Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats. *Biochem Biophysical Research Communications* 321(1):219-25.
45. Van Buren JJ, Bhat S, Rotello R, Pauza ME, Premkumar LS (2005) Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain* 1:17.
46. Zhang Z, Winborn CS, Marquez de Prado B, Russo AF (2007) Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion. *J Neuroscience* 27(10):2693-703.

47. Pettersson M, Ahren B, Bottcher G, Sundler F (1986) Calcitonin gene-related peptide: occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse. *Endocrinol* 119(2):865-9.
48. Tanaka H, Kashiwagi R, Koizumi T (2013) Inhibition of calcitonin gene-related peptide (CGRP) has the potential to extend first-phase insulin secretion. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes* 121(5):280-5.
49. Adeghate E (1999) Distribution of calcitonin-gene-related peptide, neuropeptide-Y, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin-8, substance P and islet peptides in the pancreas of normal and diabetic rats. *Neuropeptides* 33(3):227-35.
50. Guillot E, Coste A, Angel I (1996) Involvement of capsaicin-sensitive nerves in the regulation of glucose tolerance in diabetic rats. *Life Sci* 59(12):969-77.
51. Hutter MM, Wick EC, Day AL, Maa J, Zerega EC, Richmond AC, et al. (2005) Transient receptor potential vanilloid (TRPV-1) promotes neurogenic inflammation in the pancreas via activation of the neurokinin-1 receptor (NK-1R). *Pancreas* 30(3):260-5.
52. Yang C, Hsu WH (1995) Stimulatory effect of bradykinin on insulin release from the perfused rat pancreas. *Am J Physiol* 268(5 Pt 1):E1027-30.
53. Saito Y, Kato M, Kubohara Y, Kobayashi I, Tatemoto K (1996) Bradykinin increases intracellular free Ca²⁺ concentration and promotes insulin secretion in the clonal beta-cell line, HIT-T15. *Biochem Biophysical Research Communications* 221(3):577-80.
54. Yang C, Lee B, Chen TH, Hsu WH (1997) Mechanisms of bradykinin-induced insulin secretion in clonal beta cell line RINm5F. *J Pharmacol Exp Ther* 282(3):1247-52.
55. Araujo RC, Mori MA, Merino VF, Bascands JL, Schanstra JP, Zollner RL, et al. (2006) Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biol Chem* 387(4):431-6.

Figure Legends

Figure 1: **A**-Effects of two doses of 10 mg/kg/gavage of SSR240612 (24h and 12h before sacrifice) and 500µg/kg of Hoe140/subcutaneous (24h before sacrifice) on blood glucose levels in control and STZ-diabetic rats. **B**-Effect of two doses of 10 mg/kg/gavage of SSR240612 (24h and 12h before sacrifice) on plasma insulin levels. Data represent means \pm s.e.m. of values from 8 rats in each group. *** P<0.001, ** P<0.01 vs Control, ### P<0.001, ## P<0.01 vs STZ-vehicle. SSR240612 (+) and vehicle (-) treatment. The antagonist was given 4-day post-STZ.

Figure 2: Effects of daily administration of 10 mg/kg/gavage of SSR240612 for 7 days on **(A)** blood glucose levels, and **(B)** body weight in control and STZ-diabetic rats. Data are means \pm s.e.m. of values from 8 rats in each group. ** P<0.01 vs STZ (in A) or vs Control (in B). The antagonist was given 4-day post-STZ.

Figure 3: The average diameters (µm) of islets of Langerhans are shown for control and STZ-diabetic rats treated with SSR240612 (+) or vehicle (-) for 1-week (upper panel). Representative pictures showing Langerhans islets of different sizes in the pancreas of control, STZ and STZ-treated rats with SSR240612 (lower panel). Data represent means \pm s.e.m. of values from 4 rats in each group. *** P<0.001 vs Control, ### P<0.001 vs STZ-vehicle.

Figure 4: Expression of B1R at mRNA **(A)** and protein **(B)** levels in pancreas isolated from control and STZ-treated rats in the presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg/d x 7 days by gavage) or vehicle (-). Data are means \pm s.e.m. of values from 8 rats in each group. ***
P<0.001vs Control, ###P<0.001 vs STZ-vehicle.

Figure 5: mRNA levels of TNF- α **(A)**, iNOS **(B)** and TRPV1 **(C)** in pancreas isolated from control and STZ-diabetic rats in the presence (+) of SSR240612 (10 mg/kg/d x 7 days by gavage) or vehicle (-). Data are means \pm s.e.m. of values from 8 rats in each group. ***
P<0.001vs Control, ###P<0.001 vs STZ-vehicle.

Figure 6: Immunofluorescent detection of B1R (green dots, A-B) and insulin (red, C-D) in the pancreas of control and STZ-diabetic rats. A subtle colocalization of B1R and insulin is seen in the pancreas of STZ-diabetic rats (yellow, D).

Figure 7: Immunofluorescent detection of pan-macrophage (red, A-D) and B1R (green, E) in the pancreas of control, STZ and STZ-diabetic rats treated with SSR240612 for 7 days. Note the colocalization of B1R and pan-macrophage in STZ rats (yellow, F).

Figure 8: Representative images showing the presence of TCD4⁺ lymphocytes (red, A-C), B1 receptor (green, D-F) and the colocalization of TCD4⁺ with B1R (yellow, G-I) in the pancreas of control, STZ and STZ-diabetic rats treated with SSR240612 for 7 days.

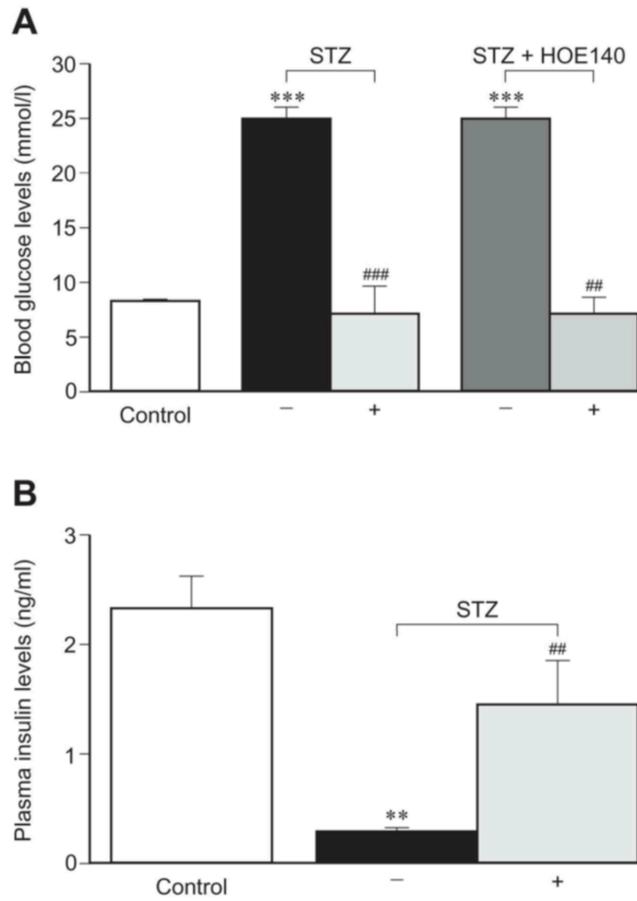
Figure 9: Representative images showing the presence of the transient receptor potential vanilloid1 (TRPV1) receptor in the pancreas of control (A), STZ (B) and STZ treated rats with SSR240612 for 7 days (D). There was no colocalization of B1R with TRPV1 (C).

Figure 10: Upper panels show representative CGRP pictures by immunofluorescence (A,B) and immunoperoxidase (A',B') from control and STZ-diabetic rat pancreas. Lower panels show immunofluorescence for B1 receptor (A), CGRP (B) and their lack of colocalization (C) in the pancreas of STZ-diabetic rats. The staining of nuclei is shown with DAPI in blue (C).

Table 1. PCR primer pairs used

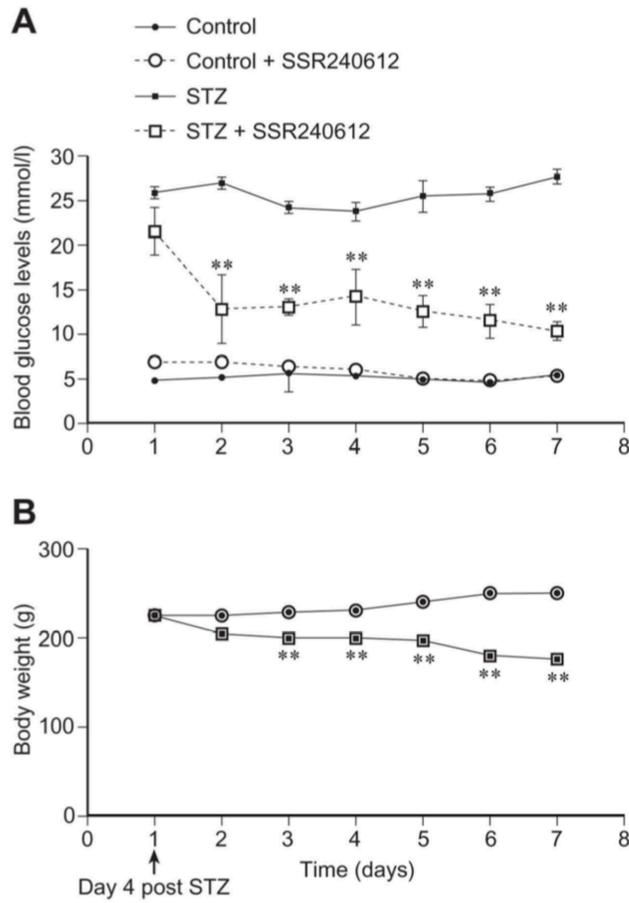
Gene	Sequence	Position	Gene bank
18S Forward 18S Reverse	5' TCA ACT TTCGAT GGT AGT CGCCGT 3' 5' TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT 3'	363 – 386 470 - 447	X-01117
B1R Forward B1R Reverse	5' GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3' 5' CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3'	367 – 391 478 – 454	M-030851
TNF-α Forward TNF-α Reverse	5'ACG GAA AGC ATG ATC CGA GATGTG 3' 5'TTG GGA ACT TCT CCT CCT TGT TGG3'	151-174 340-317	NM-012675.3
TRPV1 Forward TRPV1 Reverse	5' GCA CAA TGG GCA GAA TGA CAC CAT3' 5' GGC ATT GAC AAA CTG CTT CAG GCT3'	575-598 656-633	NM-031982
iNOS Forward iNOS Reverse	5' TGA TCT TGT GCT GGA GGT GAC CAT3' 5' TGT AGC GCT GTG TGT CAC AGA AGT3'	1150-1173 1349-1326	NM-012611

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



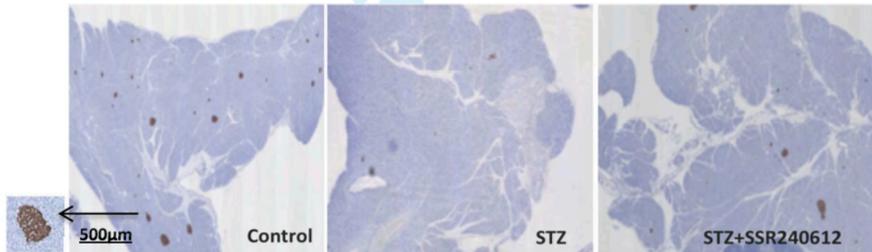
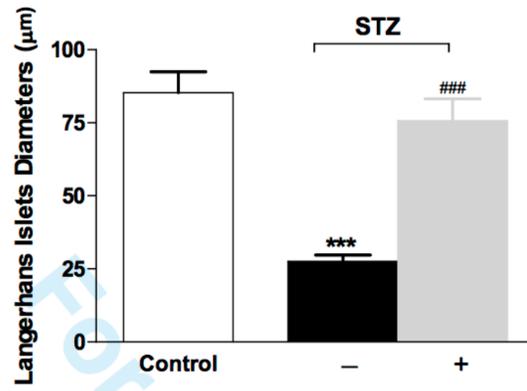
105x144mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



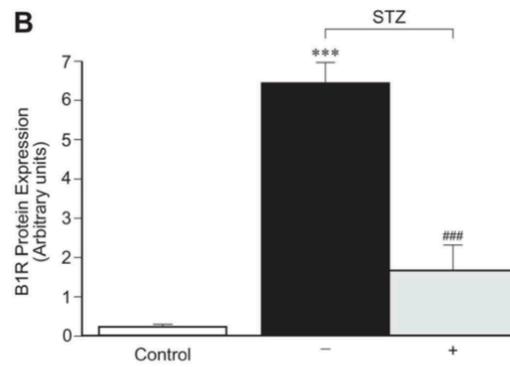
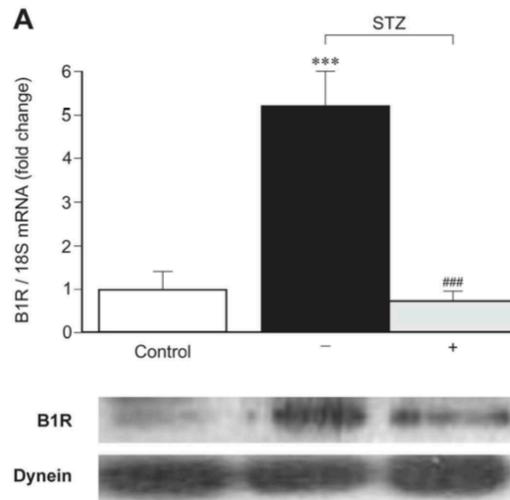
107x146mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



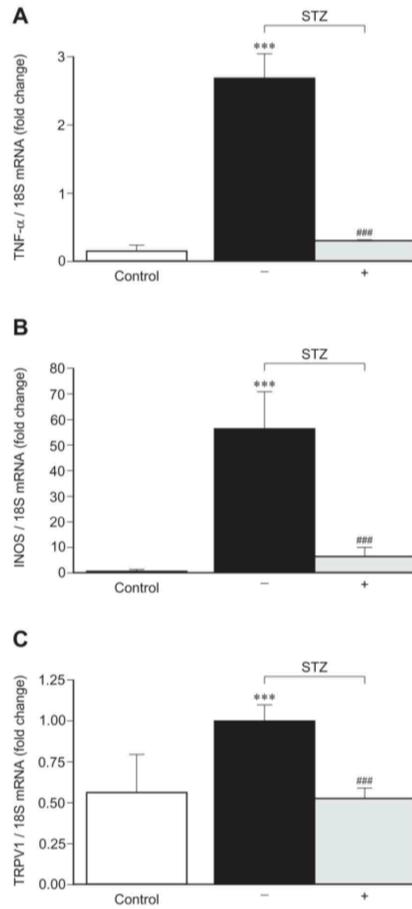
only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



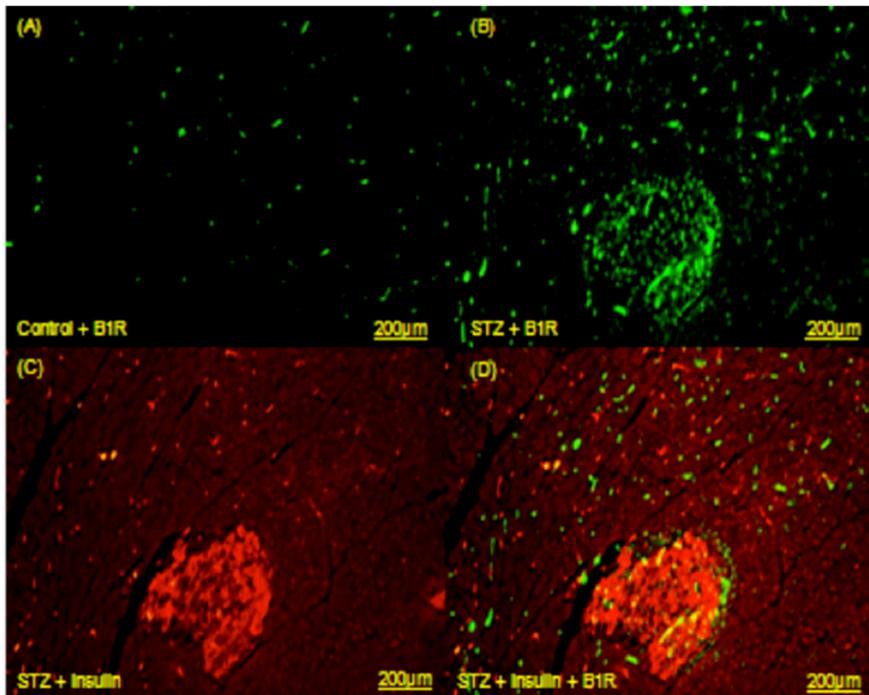
107x181mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



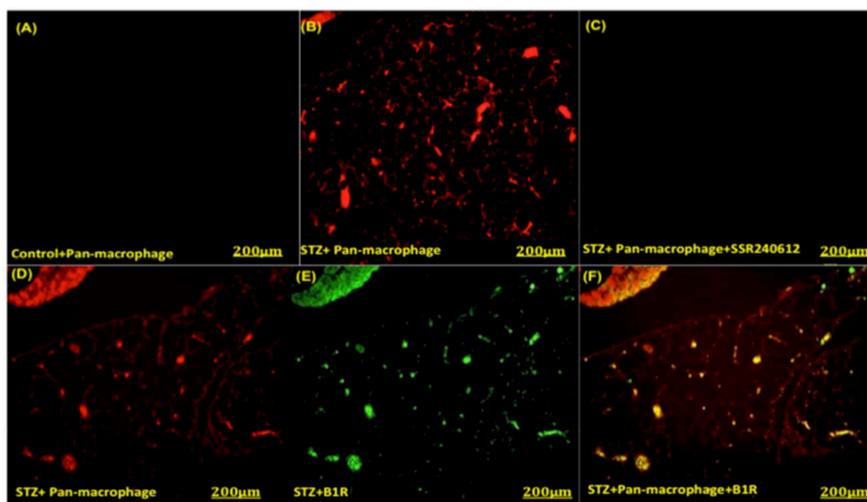
109x231mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

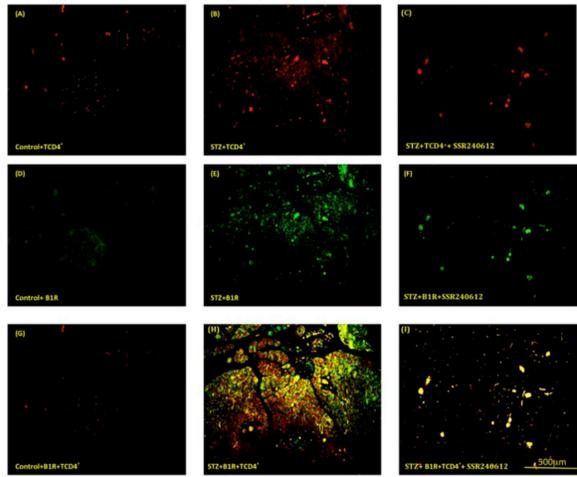


View Only

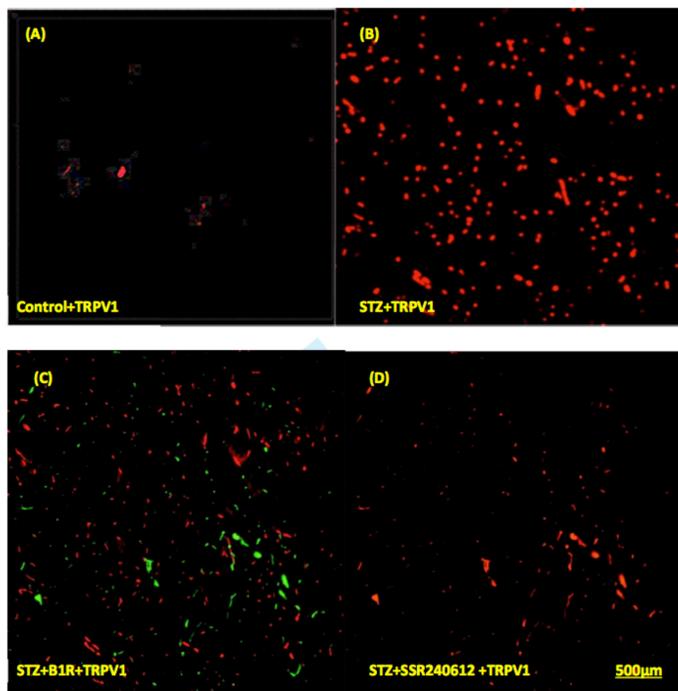
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



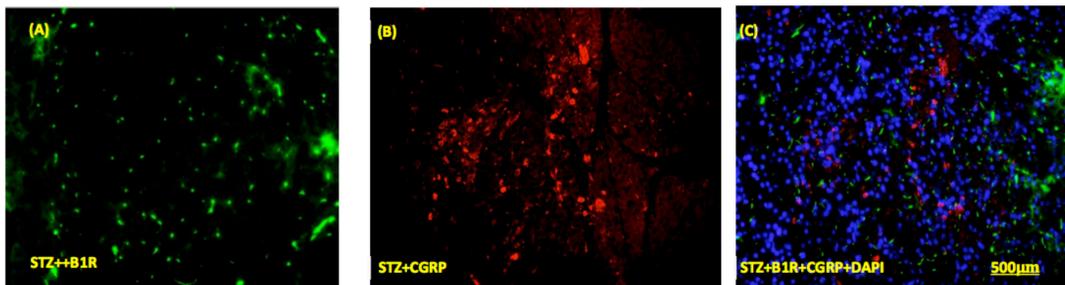
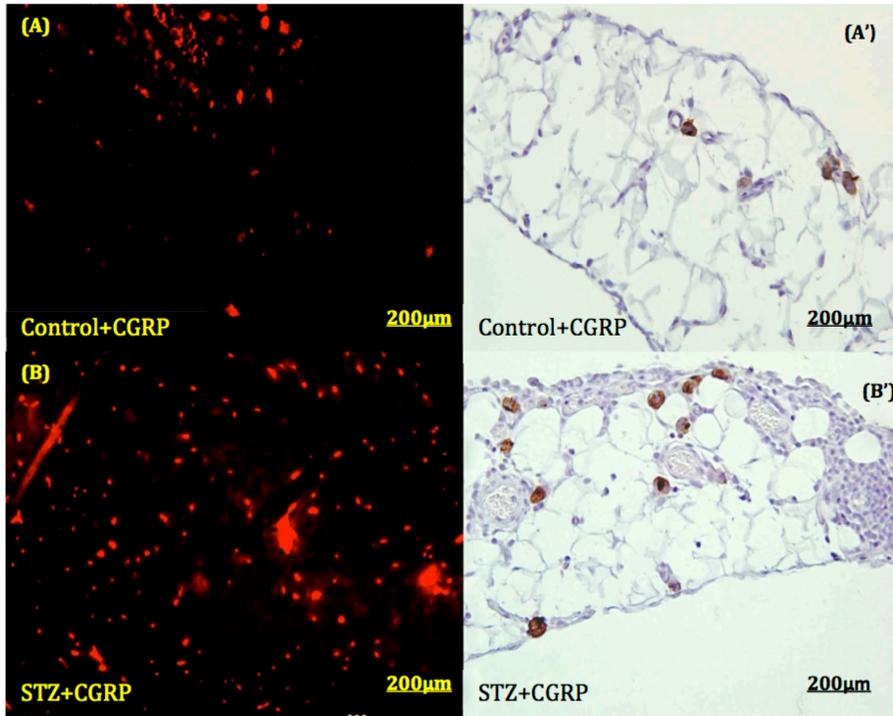
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Chapitre 4

DISCUSSION

Au terme de ces travaux, nous avons démontré un nouveau rôle pour le RB1 des kinines dans l'insulite par un mécanisme impliquant l'infiltration du pancréas par les macrophages et les cellules TCD4⁺ sur lesquelles le RB1 est exprimé et régulé. L'absence de RB1 sur les fibres sensorielles exprimant le TRPV1 et le CGRP n'était pas un rôle direct du RB1 via la libération de médiateurs sensoriels par ces fibres. Néanmoins, le SSR240612 prévient la régulation positive du CGRP et du TRPV1 dans le pancréas des rats STZ, ce qui n'exclut pas que le RB1 puisse intervenir indirectement en changeant le phénotype de ces fibres. Les données indiquent aussi que la réponse immunitaire est associée à la production de TNF- α et de NO car l'augmentation de l'expression de la TNF- α et de la iNOS dans le pancréas des rats diabétiques est rendue normale par l'inhibition du RB1 avec le SSR240612. Or ce même traitement prévient l'infiltration des cellules TCD4⁺ et des macrophages dans le pancréas de pair avec la surexpression du RB1 sur ces cellules. Ceci indique donc que l'expression du RB1 est limitée à ces cellules immunitaires qui contrôlent la synthèse du TNF- α et du NO par la iNOS. La synchronisation de ces événements immunitaires déclenchée par l'activation du RB1 peut conduire à la destruction des cellules- β des îlots de Langerhans.

Les effets relatifs du RB1 et du RB2 sur l'hyperglycémie

L'antagoniste du RB1 a restauré les niveaux de glucose plasmatique et a augmenté significativement ceux de l'insuline chez les rats STZ en empêchant la destruction des îlots tel que confirmé par immunohistochimie. Comme le RB2 est connu pour améliorer le transport du glucose dans le diabète insulino-dépendant et que sa suppression génétique provoque une résistance à l'insuline (Duka, Shenouda et al. 2001), nous avons testé l'hypothèse que l'effet du SSR240612 sur l'hyperglycémie puisse être dû à une interférence avec le RB2. Or, cette possibilité reste peu probable car un

STZ et un co-traitement avec le SSR240612 n'a pas affecté l'inhibition de l'hyperglycémie par l'antagoniste du RB1. Par conséquent, nos données n'étaient pas une contribution du RB2 ni dans l'hyperglycémie induite par STZ ni dans l'inhibition de l'hyperglycémie par l'antagoniste du RB1. En accord avec notre étude, l'antagoniste du RB2 (Hoe 140) administré quotidiennement pendant 10 ou 15 jours n'a montré aucun effet sur l'hyperglycémie chez les souris rendus diabétiques avec la STZ (Zuccollo, Navarro et al. 1996, Zuccollo, Navarro et al. 1996). De plus, les études antérieures ont montré une inhibition de l'hyperglycémie par les antagonistes peptidiques du RB1 dans le diabète induit par la STZ chez la souris (Zuccollo, Navarro et al. 1996, Zuccollo, Navarro et al. 1999, Catanzaro, Dziubecki et al. 2010).

Mécanisme du RB1 dans l'insulite

L'effet anti-diabétique de l'antagonisme du RB1 va dans le sens de la réduction de la glycémie chez les souris knock-out RB1 (Seguin, Buleon et al. 2008). Ces effets sont attribués à une inhibition de l'insulite chez les souris diabétiques (Zuccollo, Cueva et al. 1996, Zuccollo, Navarro et al. 1996, Catanzaro, Dziubecki et al. 2010). Nos données ont montré une surexpression de la iNOS dans le pancréas des rats diabétiques qui a été complètement rendue normale par le SSR240612. Ces résultats soutiennent un rôle pour le RB1 dans l'infiltration des macrophages connues pour exprimer la iNOS (Wood, Berger et al. 1993). Selon ce scénario, l'activation endogène du RB1 exprimé par les macrophages peut augmenter la libération de NO via iNOS. En effet, l'agoniste du RB1, des-Arg⁹-BK, augmente la libération de NO des macrophages péritonéaux de souris STZ avant le développement de l'hyperglycémie (Catanzaro, Dziubecki et al. 2010). La forte production de NO secondaire à l'activation du RB1 et sa liaison spontanée avec l'anion superoxyde peut générer le peroxynitrite, hautement cytotoxique (Rabinovitch and Suarez-Pinzon 1998, Stadler 2011). Plusieurs études confirment le rôle des macrophages activés et les cellules TCD4⁺ couplées à des niveaux

élevés de cytokines, d'espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées (RNS) dans l'insulite (Rabinovitch 1998, Lightfoot, Chen et al. 2012). Le RB1 peut également contribuer à la forte production de l'anion superoxyde à la suite de l'activation directe de la NADPH oxydase (Talbot, Lin et al. 2011). Au-delà de la contribution du RB1 au stress oxydatif via iNOS et la NADPH oxydase, le RB1 peut favoriser la libération des cytokines pro-inflammatoires par les cellules immunitaires tel qu'observé par l'effet inhibiteur du SSR240612 sur l'expression du TNF- α dans le pancréas des rats diabétiques. Le TNF- α est connu pour compromettre l'intégrité de la structure des îlots de Langerhans et provoquer la mort des cellules β par l'intermédiaire du NO (Cirulli, Halban et al. 1993, Arnush, Scarim et al. 1998) au même titre que les cellules TCD4⁺ et les macrophages dans le DT1 (Bendelac, Carnaud et al. 1987, Miller, Appel et al. 1988). Les mécanismes utilisés pour ces cellules passent par la production de cytokines pro-inflammatoires. Donc, on suggère que le stress oxydant et les cytokines pro-inflammatoires dont le TNF- α seraient responsables de la destruction des cellules β par les macrophages et les cellules TCD4⁺ activés par le RB1.

Contribution de la composante neurogénique dans l'insulite

Le TRPV1 a été détecté sur les fibres sensorielles innervant le pancréas, mais aussi dans les cellules β des îlots de Langerhans où il peut jouer un rôle dans la libération d'insuline (Akiba, Kato et al. 2004). L'insuline, à son tour, sensibilise le TRPV1 sur les terminaisons nerveuses sensorielles et potentialise la libération de neuropeptides sensoriels (Van Buren, Bhat et al. 2005). Les neurones exprimant le TRPV1 libèrent non seulement le CGRP mais possèdent aussi des récepteurs au CGRP (Zhang, Winborn et al. 2007). Des études montrent que le CGRP est exprimé dans les cellules des îlots pancréatiques et réduit la libération d'insuline par les cellules β (Pettersson, Ahren et al. 1986, Tanaka, Kashiwagi et al. 2013). Les fibres nerveuses sensorielles exprimant le CGRP ne semblent

pas être affectées dans le pancréas de rats STZ, mais aucune étude quantitative n'a été effectuée (Adeghate 1999). D'autre part, des expériences ont montré que la désensibilisation par la capsaïcine des fibres sensorielles exprimant le TRPV1 améliore la tolérance au glucose chez les rats STZ (Guillot, Coste et al. 1996). De plus, la destruction néonatale de ces fibres par la capsaïcine prévient l'apparition de l'insulite en empêchant la destruction des cellules β chez les souris NOD malgré la persistance systémique de lymphocytes T pathogènes (Razavi, Chan et al. 2006). Notons que la libération endogène de SP à partir des fibres sensorielles exprimant le TRPV1 favorise l'inflammation neurogénique via l'activation du récepteur NK-1 dans le pancréas (Hutter, Wick et al. 2005). La SP peut agir comme un facteur chimio-attractant, amplifiant ainsi le processus d'infiltration mononucléaire observé dans l'insulite. Ces résultats sont en accord avec l'importance des niveaux d'expression de TRPV1 et de CGRP détectés dans le pancréas de nos rats diabétiques. Nos résultats n'excluent pas une contribution des neuropeptides sensoriels dans l'apparition de l'insulite par un mécanisme impliquant le RB1 puisque l'inhibition de ce récepteur avec le SSR240612 prévient l'augmentation de l'expression du TRPV1 et du CGRP, deux importants marqueurs des fibres sensorielles impliquées dans l'inflammation neurogénique. Le mécanisme par lequel le RB1 affecte l'expression du CGRP et du TRPV1 demeure inconnu et semble indirect puisque nous n'avons pas observé de co-localisation entre le RB1 et le TRPV1 ou le CGRP au niveau cellulaire.

Le rôle du RB1 et du RB2 dans le contrôle physiologique de la libération de l'insuline

Des travaux suggèrent que le RB2 des kinines puisse jouer un rôle physiologique dans la régulation de la libération d'insuline par la voie du phosphatidylinositol conduisant à l'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules β pancréatiques (Yang and Hsu 1995, Saito, Kato et al. 1996, Yang, Lee et al. 1997). En revanche, le RB1 n'a pas pu être détecté sur les cellules β des îlots isolés et leur stimulation avec un agoniste du RB1 n'a pas réussi à induire la sécrétion d'insuline chez les souris témoins (Saito, Kato et al. 1996, Araujo, Mori et al. 2006). Ceci est en accord avec nos résultats qui montrent l'absence de RB1 sur les cellules β sécrétant l'insuline chez les rats contrôles et les rats diabétiques. Toutefois, des études montrent que les souris n'exprimant pas le RB1 ont une glycémie à jeun basse et une hyperglycémie après les repas accompagnée d'une hypoinsulinémie. Ces souris déficientes en RB1 ont moins d'îlots pancréatiques et une teneur en insuline plus faible, ce qui conduit à une réduction de la sécrétion d'insuline après une charge de glucose. D'autre part, la libération de l'insuline dans le sérum en réponse à une injection intraveineuse d'agoniste du RB1 était absente chez ces souris comparativement aux souris témoins (Araujo, Mori et al. 2006). Les effets du RB1 sur l'homéostasie de l'insuline dans cette étude ont été provisoirement attribués à une augmentation accrue de la perméabilité vasculaire dans le pancréas (Araujo, Mori et al. 2006) entrant ainsi dans un cadre mécanistique physiologique improbable car l'augmentation de la perméabilité vasculaire est un processus inflammatoire et non une fonction endocrinienne du pancréas. Rappelons que le RB2 est surexprimé chez la souris invalidée pour le RB1 (Couture, Blaes et al. 2014), ce qui remet en question les conclusions de ces études chez la souris déficiente en RB1. Ainsi, les données de la littérature et notre étude n'étaient pas un rôle physiologique du RB1 dans la libération d'insuline.

Le rôle du RB1 dans la réponse inflammatoire associée au choc septique

Le blocage du RB1 avec l'antagoniste SSR240612 a inhibé la réponse inflammatoire systémique (hyperthermie/fièvre, perméabilité vasculaire et œdème) induite par le LPS chez les rats contrôles et STZ. Les effets anti-inflammatoires de l'antagoniste du RB1 surviennent conjointement avec la suppression de son expression dans les organes périphériques. Parmi les mécanismes pouvant expliquer l'inhibition de l'expression du RB1, notons une interaction possible du SSR240612 avec le site d'expression nucléaire du RB1 (inhibiteur de NF- κ B), étant donné sa nature lipophile lui permettant d'entrer dans la cellule. Cette hypothèse n'a jamais été testée. Il serait donc pertinent de vérifier si l'administration prolongée d'un antagoniste peptidique incapable de traverser la membrane cellulaire peut aussi altérer l'expression du RB1. Un deuxième mécanisme serait celui d'empêcher l'auto-induction du RB1 par son agoniste. En effet, sur une lignée de fibroblastes humaine en culture (IMR 90), le RB1 est régulé à la hausse de façon homologue par son agoniste B1 via la voie NF- κ B (Schanstra, Bataille et al. 1998). Sur la base des données obtenues sur l'insulite, nous proposons un troisième mécanisme : le RB1 est exprimé sur des cellules immunitaires qui envahissent le tissu pancréatique. Or, l'inhibition de l'infiltration de ces cellules par l'antagoniste SSR240612 prévient l'expression du RB1 dans le tissu enflammé. Ce mécanisme pourrait s'appliquer à d'autres tissus lors du diabète, et non seulement au pancréas. Dans nos études antérieures, nous avons montré qu'un traitement d'une semaine avec le SSR240612 renversait la surexpression du RB1 dans bon nombre de tissus périphériques dans un modèle de résistance à l'insuline induit par une diète riche en glucose chez le rat (Dias and Couture 2012). La suppression du RB1 par le SSR240612 dans ce modèle était accompagné d'une inhibition de l'expression du CD68 et CD11 (marqueurs des macrophages) dans l'aorte (Dias and Couture 2012).

L'inhibition par le SSR240612 de la fièvre induite par le LPS pourrait être due à un mécanisme central puisque la phase tardive de la fièvre causée par le LPS est inhibée par un antagoniste du RB1 administré par voie intracérébroventriculaire (4 à 6 h) (Coelho, Oliveira et al. 1997). Le SSR240612 pourrait aussi inhiber le RB1 en périphérie puisque la fièvre induite par l'administration intrapéritonéale d'un agoniste B1 chez le rat STZ dérive d'un mécanisme sensoriel vagal impliquant les prostaglandines (via cox-2) et le NO (Talbot, De Brito Gariepy et al. 2012).

Rôle du RB1 dans la létalité induite par le choc septique

Le sepsis et le choc septique font l'objet de nombreuses études, étant les principales causes de la coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD). Les travaux dans ce sens ont démontré que c'est l'induction et le contact entre le facteur tissulaire et le facteur activé (FVIIa) qui représentent l'évènement clé de la CIVD et que la source de sécrétion du FVIIa responsable d'une réponse inflammatoire importante provient des monocytes et des macrophages essentiellement (Levi 2005, Asakura 2011). Dans notre étude, la létalité associée à un traitement au LPS a été significativement accrue chez les rats diabétiques et ce phénomène semble être dû à des atteintes organiques par formation de microthrombi comme conséquence de la CIVD. En effet, nous avons noté des lésions inflammatoires et histologiques dans les organes périphériques (poumon, rein et coeur) chez les rats témoins ou STZ traités au LPS. Un traitement avec le SSR240612 a prévenu ces lésions ainsi que l'agrégation plaquettaire et la mortalité des rats traités au LPS. Nos données indiquent également que la iNOS et les prostaglandines générées par l'action de la cox-2 sur l'acide arachidonique sont impliquées dans ce processus. En effet, l'administration des inhibiteurs spécifiques de la iNOS (1400W) et de la cox-2 (acide niflumique) a garanti une survie complète des rats. La prévention de l'agrégation plaquettaire chez les rats diabétiques STZ traités au LPS s'est révélée plus efficace avec le SSR240612 qu'avec un traitement à l'héparine ou au 1400W. On peut associer cet effet préventif

du SSR240612 à son interaction directe avec le RB1 dont nous avons identifié la présence sur les plaquettes sanguines par western blot et par cytométrie en flux (après perméabilisation des plaquettes sanguines au Triton) ou bien par son effet inhibiteur sur la libération de médiateurs de l'inflammation dérivés de la iNOS et de la cox-2. En effet, le RB1 est connu pour augmenter l'expression des cytokines et molécules pro-inflammatoires dont cox-2 via la voie oxydante (NADPH oxydase) qui active le NF- κ B (Couture, Blaes et al. 2014). Le RB1 peut aussi causer l'activation post-traductionnelle de la iNOS par l'entremise de G α i et ERK/MAP kinase (Brovkovich, Zhang et al. 2011). Une activation soutenue de la iNOS entraîne une production excessive de NO qui en entrant en contact avec l'anion superoxyde aboutit à la formation de peroxynitrite (ONOO⁻), un composé hautement toxique pour les tissus. Ce dernier serait responsable de l'oxydation et de la nitration du fibrinogène et du plasminogène, des protéines clés dans la cascade de coagulation (Nowak, Olas et al. 2010) (Figure 8). La preuve que la nitration du fibrinogène induit des changements dans la cinétique, l'architecture et la rigidité des caillots de fibrine a déjà été fournie et suggère ainsi un risque accru de complications thrombotiques (Parastatidis, Thomson et al. 2008).

Contrairement au RB1, le RB2 joue un rôle protecteur sur le système cardiovasculaire par son action anti-thrombotique dont le mécanisme dépend de la libération de PGI₂ et de NO par l'activation de la eNOS au niveau de l'endothélium vasculaire (Figure 8).

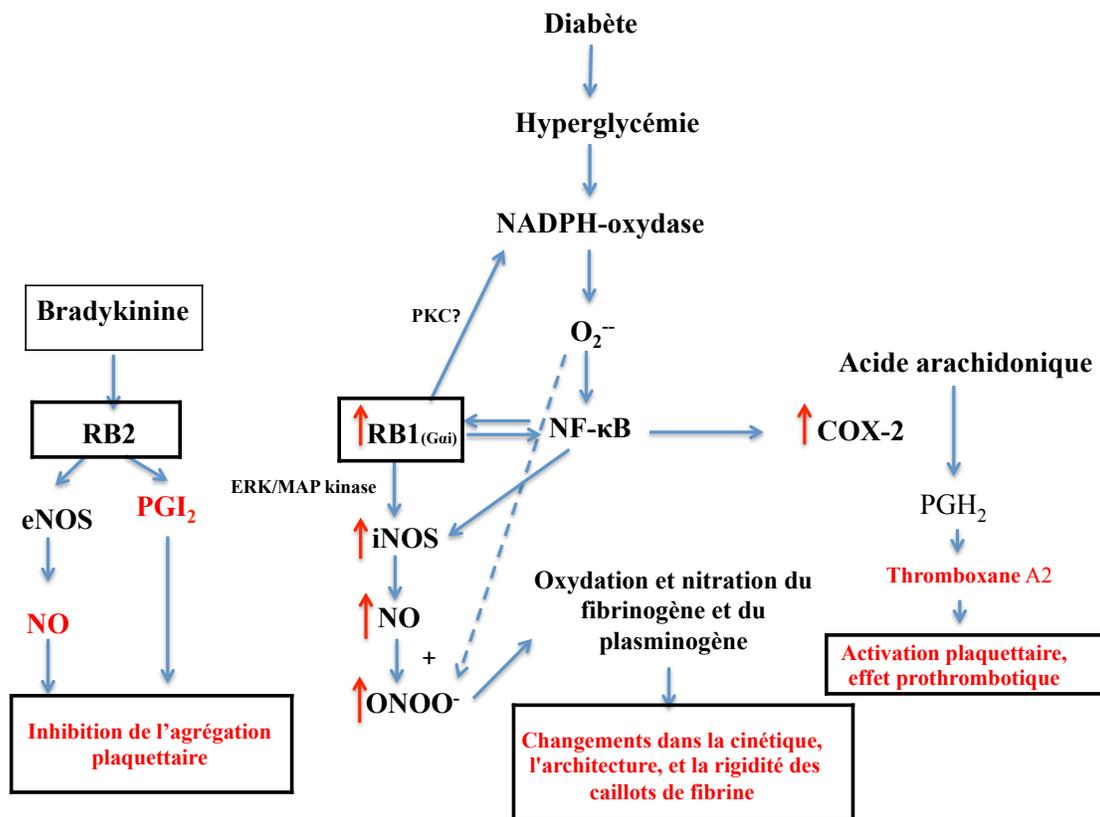


Figure 8. Mécanisme suggéré d'activation (RB1) et d'inhibition (RB2) d'agrégation plaquettaire.

Nous avons observé une dichotomie concernant l'expression du RB1 sur les plaquettes sanguines; en effet, sa présence à la surface des plaquettes sanguines a été confirmée par western blot mais pas par cytométrie en flux. Ceci nous a amené initialement à conclure que le RB1 se trouvait probablement à l'intérieur des thrombocytes. Toutefois, la cytométrie en flux sur des plaquettes perméabilisées au Triton nous a permis de mesurer la présence du RB1. Puisque l'anticorps anti-RB1 est dirigé contre un épitope intracellulaire dans la partie C-terminale du récepteur, il est plausible que l'anticorps ne puisse pas pénétrer la membrane du thrombocyte si celle-ci n'est pas perméabilisée. De la même façon, nous avons mis en évidence la présence du RB2 sur les plaquettes sanguines seulement si elles sont perméabilisées. Il est intéressant de noter que des études sur l'hypertension artérielle et la préclampsie suggèrent que l'hétérodimérisation du RB2 avec le récepteur de l'angiotensine (AT1) augmente la sensibilité de ce dernier à l'angiotensine (Quitterer and AbdAlla 2014). L'activation du récepteur AT1 semble aussi accélérer la thrombose artérielle chez le rat hypertendu (Kaminska, Mogielnicki et al. 2005) et son antagonisme permet d'inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaire par la libération du NO (Kalinowski, Matys et al. 2002). L'hypothèse qu'un cross-talk puisse exister entre le complexe RB1-RB2 et AT1 peut être envisagée comme mécanisme pour justifier l'expression du RB2 et du RB1 sur les plaquettes sanguines. Un cross-talk des récepteurs des kinines a été mis en évidence par l'antagonisme de l'un des récepteurs qui nuit à la capacité de signalisation de l'autre. Par exemple, des études montrent que l'antagonisme d'un récepteur du complexe RB1-RB2 exprimé dans les cellules cancéreuses de la prostate (PC3) interfère avec la capacité de signalisation (inhibition) de l'autre récepteur (Barki-Harrington, Bookout et al. 2003).

De façon schématique, le système des kinines est une cascade enzymatique initiée par une lésion tissulaire entraînant l'activation du facteur de coagulation XII (Hageman) se soldant par la formation

de BK (Bjorkqvist, Jamsa et al. 2013). Tout comme le système des kinines, c'est également l'activation du facteur XII par des fragments tissulaires altérés qui constitue le mode de déclenchement du système de la coagulation au cours de l'inflammation (Kaplan, Meier et al. 1977). L'activation de ce système entraîne la formation de caillots de fibrine permettant ainsi de colmater les saignements et prévenir les hémorragies. Les produits de dégradation de la fibrine ainsi formés participent à la réponse inflammatoire étant donné leur fonction de puissants agents chimiotactiques pour les neutrophiles (Leavell, Peterson et al. 1996). Le système du complément est composé de nombreuses protéines solubles produites au niveau du foie. Ce système contribue aussi à la réponse inflammatoire par la formation d'anaphylatoxines (C3a, C4a, C5a), de petites molécules formées par le clivage de protéines du complément qui induisent la dégranulation des mastocytes et des basophiles libérant l'histamine (Mathern and Heeger 2015). L'histamine ainsi libérée induit la contraction des muscles lisses et l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Colditz 1991). Les molécules C3a et C5a sont des molécules chimioattractantes responsables de l'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Le fragment C5a est libéré essentiellement dans des conditions inflammatoires associées à des infections bactériennes (Nitta, Imamura et al. 2008) (Figure 9).

Bien que le système du complément et le système des kinines puissent agir de façon indépendante, des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent qu'il existe une interférence des différentes composantes des deux systèmes (Bossi, Peerschke et al. 2011). Ces processus déclenchent des interactions enzymatiques qui conduisent à la génération de peptides vasoactifs et qui induisent non seulement une activation des plaquettes qui libèrent des médiateurs solubles tels que les cytokines et les peptides antimicrobiens, mais qui augmentent aussi la perméabilité vasculaire (Bossi, Bulla et al. 2008). Un exemple concret de cette interaction a été révélé dans des études sur l'angioedème où les symptômes sont principalement dus à une accumulation de kinines, en particulier la BK (Couture,

Blaes et al. 2014, Vela Vizcaino, Sola Enrique et al. 2014). L'angioedème associé à la BK est la conséquence d'un déficit héréditaire ou acquis dans le système du complément (Frank 2010), plus précisément un déficit d'une sérine protéase codée par le chromosome 11 et synthétisée par les hépatocytes et les fibroblastes, le C1 inhibiteur (C1-INH), dont le rôle principal est d'éviter l'autoactivation du complexe C1 du complément (Davis 2005) (Figure 10).

Le C1-INH est impliqué dans deux cascades de réactions: l'une concernant la production de kinines et l'autre concernant le complément (Kaplan and Ghebrehiwet 2010, Defendi, Charignon et al. 2015). Dans la cascade des kinines, il inhibe l'action du facteur XII-activé sur la production de BK, via la kallicroïne. Dans la cascade du complément, il inhibe l'action de C1 sur la production des formes activées de C3, C4 et C5 (Kaplan and Ghebrehiwet 2010). Ces deux cascades de réaction, en l'absence de C1-INH fonctionnel, sont responsables des manifestations cliniques tels que la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'œdème (Bossi, Peerschke et al. 2011, Bossi and Tedesco 2013). Des études antérieures ont montré que les patients qui présentent une déficience en C1-INH génèrent des taux augmentés de thrombine pendant les crises d'angioedème (van Geffen, Cugno et al. 2012). Aussi, il est connu que la thrombine augmente la perméabilité vasculaire et peut potentialiser les effets de la BK (Aschner, Lum et al. 1997). Il est donc possible que l'activation de la cascade de coagulation en présence d'un déficit en C1-INH puisse participer à la formation d'œdème par la relâche excessive de kinines.

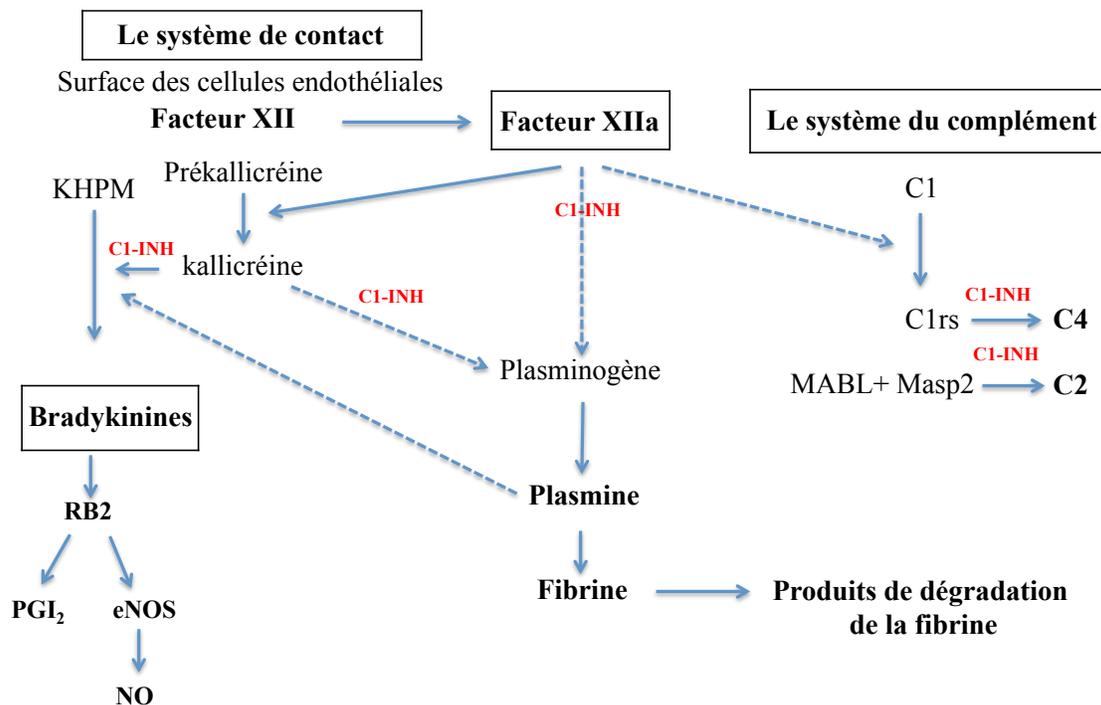


Figure 9. Les interactions entre le système du complément, le système de contact et le système fibrinolytique. Les lignes continues avec des flèches indiquent des réactions de pertinence biologique définies, et les flèches avec des pointillés indiquent des réactions qui ont été démontrées in vitro mais qui sont d'une importance biologique prouvée. KHPM= kinogènes à haut poids moléculaire. C1-INH = C1 inhibiteur; Masp2 = mannane lectine-associé protéase 2; MABL = lectine de liaison au mannane, (schéma inspiré de Kaplan and Ghebrehiwet 2010).

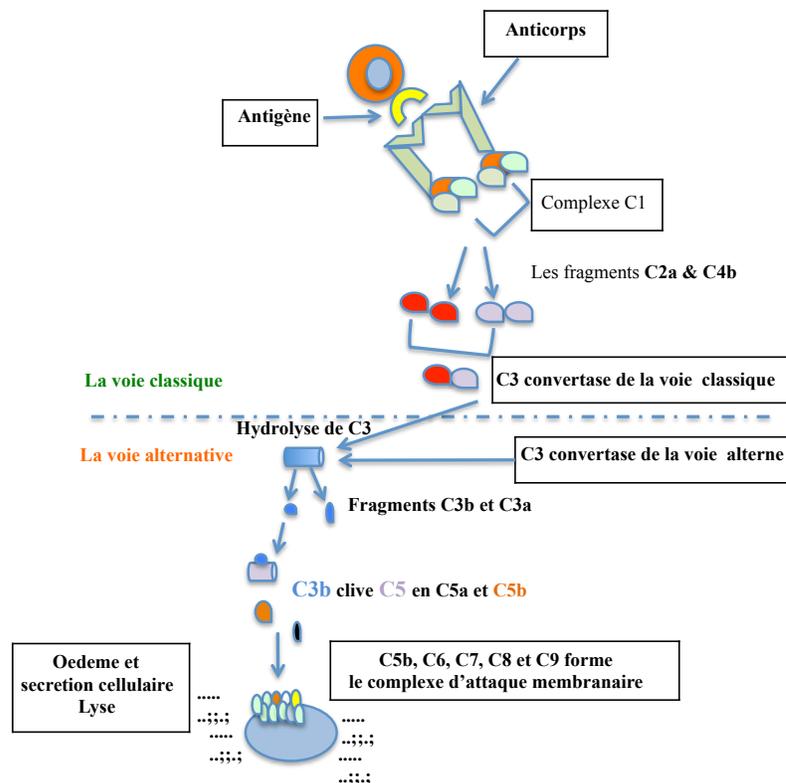


Figure 10. La voie classique du complément est déclenchée par la liaison de C1 au complexe anticorps-antigène. La voie alterne est indépendante de la réaction anticorps-antigène (endotoxine, venin, agrégats d'immunoglobuline). L'activation de ces voies conduit à la formation du complexe d'attaque membranaire (MAC) composé des protéines C5b, C6, C7, C8 et C9 et qui induit la lyse cellulaire. (Figure inspirée de Noris, Mescia et al. 2012).

Dans la CIVD, le système du complément peut être activé par le TNF- α , ce qui entraîne l'hémolyse et une thrombocytopenie (Gando, Kameue et al. 1995). La lyse plaquettaire à son tour génère du matériel procoagulant qui accentue le processus de coagulation. Ainsi, le système du complément, tout comme les kinines, augmente la perméabilité vasculaire qui conduit à l'hypotension et à l'état de choc hémodynamique.

Dans notre étude, nous avons rapporté une augmentation de la perméabilité vasculaire chez les rats STZ et LPS, cette condition étant connue pour renforcer la thrombose en augmentant la viscosité sanguine. Cependant, dans la plupart des tissus périphériques, nous n'avons pas réussi à montrer des différences notables dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et de l'œdème entre les rats diabétiques STZ traités ou pas avec le LPS. Cette observation suggère que l'effet léthal induit par le LPS chez les rats diabétiques n'est pas directement causé par une plus grande augmentation de la perméabilité vasculaire ou de l'œdème mais plutôt par des atteintes organiques liées à la formation de microthrombi tel que le montre l'infarctus et l'hémorragie sur les images de la Figure 8 de l'article 1. L'inhibition de l'augmentation de la perméabilité vasculaire par le SSR240612 va dans le sens des études antérieures utilisant d'autres antagonistes du RB1 chez des rats diabétiques ou après traitement avec le LPS chez le singe (deBlois and Horlick 2001, Calixto, Medeiros et al. 2004, Lawson, Gabra et al. 2005, Pouliot, Talbot et al. 2012). Toutefois, nous montrons pour la première fois que l'inhibition du RB1 avec le SSR240612 réduit significativement l'intensité des lésions histologiques comme les dépôts de fibrine au niveau du rein et du poumon, suggérant un rôle possible pour le RB1 dans la formation initiale des thrombus et de la CIVD.

Le traitement avec le SSR240612 (24 et 12 h avant le sacrifice) a inhibé l'expression du RB1 dans le rein et le cœur des rats diabétiques-STZ traités au LPS. La suppression de l'expression du RB1 par un traitement d'une semaine avec le SSR240612 a déjà été démontrée dans un modèle d'insulino-résistance chez le rat (Dias, Talbot et al. 2010, Dias and Couture 2012) et son mécanisme a été discuté plus haut.

Perspectives

De nouvelles études scientifiques mettent en évidence des interactions entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs et les maladies métaboliques. En effet, les cellules immunitaires comme les macrophages, les lymphocytes T et les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α contribuent directement et de manière significative aux dysfonctions métaboliques et interfèrent avec la sécrétion d'insuline. Par exemple, dans un modèle de DT1, les souris NOD n'expriment pas la fraction C5 du complément (Baxter and Cooke 1993). Des travaux réalisés *in vitro* ont montré que le traitement d'une lignée de cellules β du pancréas de rat avec du sérum provenant de patients nouvellement diagnostiqués d'un DT1 inhibe la capacité de sécrétion de l'insuline par ces cellules, un phénomène dépendant des fractions C1q et C3 du complément (Conroy, Abdel-Wahab et al. 2000). En outre, l'activation du complément est plus élevée chez les patients nouvellement diagnostiqués avec le DT1 que chez les individus normo-glycémiques (Conroy, Abdel-Wahab et al. 2000). De plus, les niveaux plasmatiques de C3 sont plus élevés chez les patients atteints de DT1 comparés aux patients sains. Ces taux élevés de C3 chez les patient diabétiques étaient corrélés avec une hypo-fibrinolyse (pro-thrombotique) suggérant ainsi un lien entre C3 et la formation de fibrine au cours du DT1 (Hess, Alzahrani et al. 2012). Ces observations ont conduit à une hypothèse que les ilots de

Langerhans sont soumis à l'apoptose dans le DT1 qui pourrait être partiellement due à l'activation du complément.

Puisque les systèmes des kinines et du complément fonctionnent en partenariat avec le système de coagulation, l'interaction entre ceux-ci mériterait d'être mieux étudiée dans le contexte du DT1 et de ses complications thrombotiques. L'utilisation d'animaux KO-RB1 pourrait être un modèle intéressant pour déterminer l'impact de l'absence du RB1 sur l'activation du complément et sur le profil sécrétoire de ses protéines, en particulier, la protéine C3 qui est le point de convergence des voies du complément. Ces dernières conduisent à la formation du complexe d'attaque membranaire responsable de la lyse cellulaire et de la sécrétion de substances pro-inflammatoires (Figure 10). D'autre part, le système du complément joue un rôle dans la modulation de la réponse immunitaire des cellules T au cours des troubles de l'hémostase. Il est donc légitime de se demander si le RB1 joue également un rôle dans ce mécanisme.

Dans notre modèle de CIVD, le RB1 et la cox-2 sont tous les deux impliqués dans la formation de thrombus. Cependant, nous n'avons pas déterminé avec certitude si le RB1 présent sur les plaquettes sanguines participe directement à l'effet thrombotique. Et si c'est le cas, par quel mécanisme? Existe-t-il des interactions du RB1 avec d'autres facteurs plaquettaire tel que le complexe CD40-sCD40L connu pour son rôle dans l'agrégation plaquettaire via l'augmentation de la cox-2?

La pertinence clinique de nos travaux demande à être démontrée. Dans un premier temps, il serait approprié de confirmer la présence du RB1 sur des plaquettes sanguines isolées de patients atteints de diabète et de conditions pro-thrombotiques. Par la suite, les voies de

signalisation et les interactions avec le système immunitaire et le complément pourraient être étudiées.

Conclusion

Cette étude met en valeur un rôle délétère pour le RB1 des kinines dans l'insulite et la CIVD. L'originalité de nos travaux réside dans le fait d'avoir démontré son expression sur les cellules TCD4⁺ et les macrophages qui infiltrent le pancréas et qui contribuent à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans par l'entremise du stress oxydant et de médiateurs inflammatoires impliquant le TNF- α et la iNOS. Nous avons également apporté la première preuve de l'expression du RB1 sur les plaquettes sanguines et avons mis en évidence son rôle dans l'agrégation plaquettaire conjointement avec la libération de médiateurs de l'inflammation dérivés de la iNOS et de la cox-2. Ces travaux nous amènent à proposer une nouvelle approche thérapeutique où le blocage du RB1 aurait des effets anti-inflammatoire, anti-diabétique et anti-thrombotique.

CHAPITRE 5

Bibliographie

Abdoun, M., A. Khanjari, N. Abdelazziz, B. Ongali, R. Couture and H. M. Hassessian (2003). "Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat." Br J Pharmacol **140**(1): 33-40.

Abdoun, M., S. Talbot, R. Couture and H. M. Hassessian (2008). "Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors." Br J Pharmacol **154**(1): 136-143.

Adcock, J. J. (2009). "TRPV1 receptors in sensitisation of cough and pain reflexes." Pulm Pharmacol Ther **22**(2): 65-70.

Adeghate, E. (1999). "Distribution of calcitonin-gene-related peptide, neuropeptide-Y, vasoactive intestinal polypeptide, cholecystokinin-8, substance P and islet peptides in the pancreas of normal and diabetic rats." Neuropeptides **33**(3): 227-235.

Akiba, Y., S. Kato, K. Katsube, M. Nakamura, K. Takeuchi, H. Ishii and T. Hibi (2004). "Transient receptor potential vanilloid subfamily 1 expressed in pancreatic islet beta cells modulates insulin secretion in rats." Biochem Biophys Res Commun **321**(1): 219-225.

Alavi, A., R. G. Sibbald, D. Mayer, L. Goodman, M. Botros, D. G. Armstrong, K. Woo, T. Boeni, E. A. Ayello and R. S. Kirsner (2014). "Diabetic foot ulcers: Part I. Pathophysiology and prevention." J Am Acad Dermatol **70**(1): 1 e1-18; quiz 19-20.

Almeida, M. C., A. A. Steiner, L. G. Branco and A. A. Romanovsky (2006). "Cold-seeking behavior as a thermoregulatory strategy in systemic inflammation." Eur J Neurosci **23**(12): 3359-3367.

Amara, S. G., V. Jonas, M. G. Rosenfeld, E. S. Ong and R. M. Evans (1982). "Alternative RNA processing in calcitonin gene expression generates mRNAs encoding different polypeptide products." Nature **298**(5871): 240-244.

Ambalavanar, R., D. Dessem, A. Moutanni, C. Yallampalli, U. Yallampalli, P. Gangula and G. Bai (2006). "Muscle inflammation induces a rapid increase in calcitonin gene-related peptide (CGRP) mRNA that temporally relates to CGRP immunoreactivity and nociceptive behavior." Neuroscience **143**(3): 875-884.

Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo and M. R. Pinsky (2001). "Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care." Crit Care Med **29**(7): 1303-1310.

Annane, D., P. Aegerter, M. C. Jars-Guinestre, B. Guidet and C. U.-R. Network (2003). "Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network." Am J Respir Crit Care Med **168**(2): 165-172.

Annane, D., E. Bellissant and J. M. Cavillon (2005). "Septic shock." Lancet **365**(9453): 63-78.

Apelqvist, J., D. Bergqvist, M. Eneroth and J. Larsson (1999). "[The diabetic foot. Optimal prevention and treatment can halve the risk of amputation]." Lakartidningen **96**(1-2): 37-41.

Araki, S. (2013). "[Diabetic nephropathy]." Nihon Rinsho **71**(11): 2010-2014.

Araujo, R. C., M. A. Mori, V. F. Merino, J. L. Bascands, J. P. Schanstra, R. L. Zollner, C. A. Villela, C. R. Nakaie, A. C. Paiva, J. L. Pesquero, M. Bader and J. B. Pesquero (2006). "Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function." Biol Chem **387**(4): 431-436.

Armstrong, D. G. and L. A. Lavery (1998). "Diabetic foot ulcers: prevention, diagnosis and classification." Am Fam Physician **57**(6): 1325-1332, 1337-1328.

Arnush, M., A. L. Scarim, M. R. Heitmeier, C. B. Kelly and J. A. Corbett (1998). "Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes." J Immunol **160**(6): 2684-2691.

Arolas, J. L., J. Vendrell, F. X. Aviles and L. D. Fricker (2007). "Metalloproteinases: emerging drug targets in biomedicine." Curr Pharm Des **13**(4): 349-366.

Asakura, H. (2011). "[Interpretation of hemostatic and fibrinolytic markers]." Rinsho Byori **59**(10): 970-977.

Aschner, J. L., H. Lum, P. W. Fletcher and A. B. Malik (1997). "Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation." J Cell Physiol **173**(3): 387-396.

Asakura, H. (2011). "[Interpretation of hemostatic and fibrinolytic markers]." Rinsho Byori **59**(10): 970-977.

Asano, M., N. Inamura, C. Hatori, H. Sawai, T. Fujiwara, A. Katayama, H. Kayakiri, S. Satoh, Y. Abe, T. Inoue, Y. Sawada, K. Nakahara, T. Oku and M. Okuhara (1997). "The identification of an orally active, nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657." Br J Pharmacol **120**(4): 617-624.

Aschner, J. L., H. Lum, P. W. Fletcher and A. B. Malik (1997). "Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation." J Cell Physiol **173**(3): 387-396.

Auinger, M., R. Edlinger, F. Prischl, A. Kautzky-Willer, R. Prager, A. R. Rosenkranz, M. Roden, M. Saemann, M. Clodi and G. Schernthaner (2012). "[Diabetic nephropathy--update 2012]." Wien Klin Wochenschr **124 Suppl 2**: 42-49.

Austinat, M., S. Braeuninger, J. B. Pesquero, M. Brede, M. Bader, G. Stoll, T. Renne and C. Kleinschnitz (2009). "Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema." Stroke **40**(1): 285-293.

AvRuskin, T. W. and C. S. Juan (2002). "Transient neonatal diabetes mellitus, type 4, type 1 diabetes mellitus, or MODY: which disease is it, anyway?" J Pediatr Endocrinol Metab **15**(5): 629-636.

Ayyobi, A. F. and J. D. Brunzell (2003). "Lipoprotein distribution in the metabolic syndrome, type 2 diabetes mellitus, and familial combined hyperlipidemia." Am J Cardiol **92**(4A): 27J-33J.

Baek, H. S. and J. W. Yoon (1991). "Direct involvement of macrophages in destruction of beta-cells leading to development of diabetes in virus-infected mice." Diabetes **40**(12): 1586-1597.

Baliu-Pique, M., G. Jusek and B. Holzmann (2014). "Neuroimmunological communication via CGRP promotes the development of a regulatory phenotype in TLR4-stimulated macrophages." Eur J Immunol **44**(12): 3708-3716.

Baraban, E., L. McCoy and P. Simon (2008). "Increasing prevalence of gestational diabetes and pregnancy-related hypertension in Los Angeles County, California, 1991-2003." Prev Chronic Dis **5**(3): A77.

Barabe, J. and D. Regoli (1988). "Kinin antagonists." Methods Enzymol **163**: 282-292.

Barki-Harrington, L., A. L. Bookout, G. Wang, M. E. Lamb, L. M. Leeb-Lundberg and Y. Daaka (2003). "Requirement for direct cross-talk between B1 and B2 kinin receptors for the proliferation of androgen-insensitive prostate cancer PC3 cells." Biochem J **371**(Pt 2): 581-587.

Barrett, H. L., M. Dekker Nitert, L. S. Conwell and L. K. Callaway (2014). "Probiotics for preventing gestational diabetes." Cochrane Database Syst Rev **2**: CD009951.

Bastiaans, J., J. C. van Meurs, C. van Holten-Neelen, M. S. Nijenhuis, M. J. Kolijn-Couwenberg, P. M. van Hagen, R. W. Kuijpers, H. Hooijkaas and W. A. Dik (2013). "Factor Xa and thrombin stimulate proinflammatory and profibrotic mediator production by retinal pigment epithelial cells: a role in vitreoretinal disorders?" Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **251**(7): 1723-1733.

Baxter, A. G. and A. Cooke (1993). "Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice." Diabetes **42**(11): 1574-1578.

Baxter, A. G. and A. Cooke (1993). "Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice." Diabetes **42**(11): 1574-1578.

Belanger, S., V. Bovenzi, J. Cote, W. Neugebauer, M. Amblard, J. Martinez, B. Lammek, M. Savard and F. Gobeil, Jr. (2009). "Structure-activity relationships of novel peptide agonists of the human bradykinin B2 receptor." Peptides **30**(4): 777-787.

Bendelac, A., C. Carnaud, C. Boitard and J. F. Bach (1987). "Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells." J Exp Med **166**(4): 823-832.

Berg, R. M., K. Moller and D. M. Bailey (2011). "Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis." J Cereb Blood Flow Metab **31**(7): 1532-1544.

Bernsmeier, C., D. Calabrese, M. H. Heim and H. T. Duong (2014). "Hepatitis C virus dysregulates glucose homeostasis by a dual mechanism involving induction of PGC1alpha and dephosphorylation of FoxO1." J Viral Hepat **21**(1): 9-18.

Bertin, S., Y. Aoki-Nonaka, P. R. de Jong, L. L. Nohara, H. Xu, S. R. Stanwood, S. Srikanth, J. Lee, K. To, L. Abramson, T. Yu, T. Han, R. Touma, X. Li, J. M. Gonzalez-Navajas, S. Herdman, M. Corr, G. Fu, H. Dong, Y. Gwack, A. Franco, W. A. Jefferies and E. Raz (2014). "The ion channel TRPV1 regulates the activation and proinflammatory properties of CD4(+) T cells." Nat Immunol **15**(11): 1055-1063.

Bertin, S., P. R. de Jong, W. A. Jefferies and E. Raz (2014). "Novel immune function for the TRPV1 channel in T lymphocytes." Channels (Austin): 0.

Bhoola, K. D., C. J. Elson and P. A. Dieppe (1992). "Kinins--key mediators in inflammatory arthritis?" Br J Rheumatol **31**(8): 509-518.

Bhoola, K. D., C. D. Figueroa and K. Worthy (1992). "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases." Pharmacol Rev **44**(1): 1-80.

Bjorkqvist, J., A. Jamsa and T. Renne (2013). "Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme." Thromb Haemost **110**(3): 399-407.

Bledsoe, G., L. Chao and J. Chao (2003). "Kallikrein gene delivery attenuates cardiac remodeling and promotes neovascularization in spontaneously hypertensive rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(4): H1479-1488.

Bossi, F., R. Bulla and F. Tedesco (2008). "Endothelial cells are a target of both complement and kinin system." Int Immunopharmacol **8**(2): 143-147.

Bossi, F., E. I. Peerschke, B. Ghebrehiwet and F. Tedesco (2011). "Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability." Immunol Lett **140**(1-2): 7-13.

Bossi, F. and F. Tedesco (2013). "Role of the B1 bradykinin receptor and gC1qR/p33 in angioedema." Immunol Allergy Clin North Am **33**(4): 535-544.

Brovkovich, V., Y. Zhang, S. Brovkovich, R. D. Minshall and R. A. Skidgel (2011). "A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase." J Cell Mol Med **15**(2): 258-269.

Boni-Schnetzler, M., J. A. Ehses, M. Faulenbach and M. Y. Donath (2008). "Insulinitis in type 2 diabetes." Diabetes Obes Metab **10 Suppl 4**: 201-204.

Bonnycastle, L. L., P. S. Chines, T. Hara, J. R. Huyghe, A. J. Swift, P. Heikinheimo, J. Mahadevan, S. Peltonen, H. Huopio, P. Nuutila, N. Narisu, R. L. Goldfeder, M. L. Stitzel, S. Lu, M. Boehnke, F. Urano, F. S. Collins and M. Laakso (2013). "Autosomal dominant diabetes arising from a Wolfram syndrome 1 mutation." Diabetes **62**(11): 3943-3950.

Bossi, F., R. Bulla and F. Tedesco (2008). "Endothelial cells are a target of both complement and kinin system." Int Immunopharmacol **8**(2): 143-147.

Bossi, F., E. I. Peerschke, B. Ghebrehiwet and F. Tedesco (2011). "Cross-talk between the complement and the kinin system in vascular permeability." Immunol Lett **140**(1-2): 7-13.

Bossi, F. and F. Tedesco (2013). "Role of the B1 bradykinin receptor and gC1qR/p33 in angioedema." Immunol Allergy Clin North Am **33**(4): 535-544.

Bras, G., O. Bochenska, M. Rapala-Kozik, I. Guevara-Lora, A. Faussner, W. Kamysz and A. Kozik (2013). "Release of biologically active kinin peptides, Met-Lys-bradykinin and Leu-Met-Lys-bradykinin from human kininogens by two major secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*." Peptides **48**: 114-123.

Brissova, M., M. J. Fowler, W. E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D. M. Harlan and A. C. Powers (2005). "Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy." J Histochem Cytochem **53**(9): 1087-1097.

Brogard, J. M., T. Vetter and J. F. Blicke (1992). "[Discovery of pancreatic diabetes in Strasbourg]." Diabete Metab **18**(2): 104-114.

Brovkovich, V., Y. Zhang, S. Brovkovich, R. D. Minshall and R. A. Skidgel (2011). "A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase." J Cell Mol Med **15**(2): 258-269.

Brown, T. E., A. M. Chirila, B. R. Schrank and J. A. Kauer (2013). "Loss of interneuron LTD and attenuated pyramidal cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO mice." Hippocampus **23**(8): 662-671.

Bryant, P., M. Shumate, G. Yumet, C. H. Lang, T. C. Vary and R. N. Cooney (2003). "Capsaicin-sensitive nerves regulate the metabolic response to abdominal sepsis." J Surg Res **112**(2): 152-161.

Bukowska, A., I. Zacharias, S. Weinert, K. Skopp, C. Hartmann, C. Huth and A. Goette (2013). "Coagulation factor Xa induces an inflammatory signalling by activation of protease-activated receptors in human atrial tissue." Eur J Pharmacol **718**(1-3): 114-123.

Busch, G., I. Seitz, B. Steppich, S. Hess, R. Eckl, A. Schomig and I. Ott (2005). "Coagulation factor Xa stimulates interleukin-8 release in endothelial cells and mononuclear leukocytes: implications in acute myocardial infarction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(2): 461-466.

Byrne, M. M., J. Sturis, S. Menzel, K. Yamagata, S. S. Fajans, M. J. Dronsfield, S. C. Bain, A. T. Hattersley, G. Velho, P. Froguel, G. I. Bell and K. S. Polonsky (1996). "Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12." Diabetes **45**(11): 1503-1510.

Cabrera, O., D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P. O. Berggren and A. Caicedo (2006). "The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(7): 2334-2339.

Callea, M., F. Radovich, M. Cappa and G. Clarich (2013). "Turner's syndrome with mental retardation, microcephaly and type 1 diabetes in a 6 year old child. Case report and literature review." Minerva Pediatr **65**(2): 251-252.

Calixto, J. B., R. Medeiros, E. S. Fernandes, J. Ferreira, D. A. Cabrini and M. M. Campos (2004). "Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes." Br J Pharmacol **143**(7): 803-818.

Camarda, V., A. Rizzi, G. Calo, K. Wirth and D. Regoli (2002). "Pharmacological characterisation of novel kinin B2 receptor ligands." Can J Physiol Pharmacol **80**(4): 281-286.

Campana, M., A. Serra and G. Neri (1986). "Role of chromosome aberrations in recurrent abortion: a study of 269 balanced translocations." Am J Med Genet **24**(2): 341-356.

Campbell-Thompson, M. L., M. A. Atkinson, A. E. Butler, N. M. Chapman, G. Frisk, R. Gianani, B. N. Giepmans, M. G. von Herrath, H. Hyoty, T. W. Kay, O. Korsgren, N. G. Morgan, A. C. Powers, A. Pugliese, S. J. Richardson, P. A. Rowe, S. Tracy and P. A. In't Veld (2013). "The diagnosis of insulinitis in human type 1 diabetes." Diabetologia **56**(11): 2541-2543.

Canivell, S. and R. Gomis (2014). "Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus." Autoimmun Rev.

Caous, C. A., J. Koepp, R. Couture, A. C. Balan and C. J. Lindsey (2008). "The role of the paratrigeminal nucleus in the pressor response to sciatic nerve stimulation in the rat." Auton Neurosci **140**(1-2): 72-79.

Casqueiro, J., J. Casqueiro and C. Alves (2012). "Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis." Indian J Endocrinol Metab **16 Suppl 1**: S27-36.

Castro, P. G., A. M. de Leon, J. G. Trancon, P. A. Martinez, J. A. Alvarez Perez, J. C. Fernandez Fernandez, C. M. Garcia Bernardo, L. B. Serra and J. J. Gonzalez Gonzalez (2011). "Glucagonoma syndrome: a case report." J Med Case Rep **5**: 402.

Cataldo, L. R., P. Olmos, S. Valerie Smalley, A. Diez, A. Parada, R. Gejman, R. Fadic and J. L. Santos (2013). "[Mitochondrial DNA heteroplasmy of the m.3243A>G mutation in maternally inherited diabetes and deafness]." Rev Med Chil **141**(3): 305-312.

Catanzaro, O. L., D. Dziubecki, E. Labal and P. Sirois (2010). "Activation of peritoneal macrophages during the evolution of type 1 diabetes (insulitis) in streptozotocin-treated mice." Peptides **31**(10): 1884-1887.

Catanzaro, O. L., D. Dziubecki, P. Obregon, R. R. Rodriguez and P. Sirois (2010). "Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice." Neuropeptides **44**(2): 187-189.

Catanzaro, O. L., D. Dziubecki, E. Labal and P. Sirois (2010). "Activation of peritoneal macrophages during the evolution of type 1 diabetes (insulitis) in streptozotocin-treated mice." Peptides **31**(10): 1884-1887.

Catanzaro, O. L., D. Dziubecki, P. Obregon, R. R. Rodriguez and P. Sirois (2010). "Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice." Neuropeptides **44**(2): 187-189.

Ceriello, A., R. Giacomello, G. Stel, E. Motz, C. Taboga, L. Tonutti, M. Pirisi, E. Falletti and E. Bartoli (1995). "Hyperglycemia-induced thrombin formation in diabetes. The possible role of oxidative stress." Diabetes **44**(8): 924-928.

Chadha, A. S., E. Kocak-Uzel, P. Das, B. D. Minsky, M. E. Delclos, U. Mahmood, S. Guha, M. Ahmad, G. R. Varadhachary, M. Javle, M. H. Katz, J. B. Fleming, R. A. Wolff, C. H. Crane and S. Krishnan (2015). "Paraneoplastic thrombocytosis independently predicts poor prognosis in patients with locally advanced pancreatic cancer." Acta Oncol: 1-8.

Chebane, L., N. Tavassoli, H. Bagheri, J. L. Montastruc and F. Centres Regionaux de Pharmacovigilance (2010). "[Drug-induced hyperglycemia: a study in the French pharmacovigilance database]." Therapie **65**(5): 447-458.

Chessa, M., G. Butera, G. A. Lanza, E. Bossone, A. Delogu, G. De Rosa, G. Marietti, L. Rosti and M. Carminati (2002). "Role of heart rate variability in the early diagnosis of diabetic autonomic neuropathy in children." Herz **27**(8): 785-790.

Cilia La Corte, A. L., A. M. Carter, A. J. Turner, P. J. Grant and N. M. Hooper (2008). "The bradykinin-degrading aminopeptidase P is increased in women taking the oral contraceptive pill." J Renin Angiotensin Aldosterone Syst **9**(4): 221-225.

Cirulli, V., P. A. Halban and D. G. Rouiller (1993). "Tumor necrosis factor-alpha modifies adhesion properties of rat islet B cells." J Clin Invest **91**(5): 1868-1876.

Clark, N., J. Keeble, E. S. Fernandes, A. Starr, L. Liang, D. Sugden, P. de Winter and S. D. Brain (2007). "The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin." FASEB J **21**(13): 3747-3755.

Coelho, M. M., C. R. Oliveira, G. P. Pajolla, J. B. Calixto and I. R. Pela (1997). "Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats." Br J Pharmacol **121**(2): 296-302.

Coelho, M. M., C. R. Oliveira, G. P. Pajolla, J. B. Calixto and I. R. Pela (1997). "Central involvement of kinin B1 and B2 receptors in the febrile response induced by endotoxin in rats." Br J Pharmacol **121**(2): 296-302.

Colditz, I. G. (1991). "The induction of plasma leakage in skin by histamine, bradykinin, activated complement, platelet-activating factor and serotonin." Immunol Cell Biol **69 (Pt 3)**: 215-219.

Conroy, S. J., Y. H. Abdel-Wahab, E. M. Caraher, P. M. Byrne, E. Murphy, J. Nolan, P. R. Flatt and P. Newsholme (2000). "Evidence for complement-dependent and -independent inhibition of insulin secretion from clonal beta-cells incubated in the presence of sera of newly diagnosed IDDM patients." J Endocrinol **164**(2): 139-147.

Couture, R., N. Blaes and J. P. Girolami (2014). "Kinin receptors in vascular biology and pathology." Curr Vasc Pharmacol **12**(2): 223-248.

Costa, R., E. S. Fernandes, O. Menezes-de-Lima, Jr., M. M. Campos and J. B. Calixto (2006). "Effect of novel selective non-peptide kinin B(1) receptor antagonists on mouse pleurisy induced by carrageenan." Peptides **27**(11): 2967-2975.

Couture, R., M. Harrisson, R. M. Vianna and F. Cloutier (2001). "Kinin receptors in pain and inflammation." Eur J Pharmacol **429**(1-3): 161-176.

Cote, J., M. Savard, W. Neugebauer, D. Fortin, M. Lepage and F. Gobeil (2013). "Dual kinin B1 and B2 receptor activation provides enhanced blood-brain barrier permeability and anticancer drug delivery into brain tumors." Cancer Biol Ther **14**(9): 806-811.

Craighead, J. E. and M. F. McLane (1968). "Diabetes mellitus: induction in mice by encephalomyocarditis virus." Science **162**(3856): 913-914.

Cyr, M., Y. Lepage, C. Blais, Jr., N. Gervais, M. Cugno, J. L. Rouleau and A. Adam (2001). "Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(1): H275-283.

Dabek, J., T. Wilczok, Z. Gasior, S. Kucia-Kuzma, R. Twardowski and A. Kulach (2007). "Gene expression of kinin receptors B1 and B2 in PBMC from patients with cardiac syndrome X." Scand Cardiovasc J **41**(6): 391-396.

Dai, J., T. J. Cho, S. Unger, E. Lausch, G. Nishimura, O. H. Kim, A. Superti-Furga and S. Ikegawa (2010). "TRPV4-pathway, a novel channelopathy affecting diverse systems." J Hum Genet **55**(7): 400-402.

Dan, A., K. Chakraborty, M. Mondal, R. Neogi, S. Chatterjee and M. Makhil (2014). "Erectile dysfunction in patients with diabetes mellitus: Its magnitude, predictors and their bio-psychosocial interaction: A study from a developing country." Asian J Psychiatr **7**(1): 58-65.

Dandamudi, S., J. Slusser, D. W. Mahoney, M. M. Redfield, R. J. Rodeheffer and H. H. Chen (2014). "The Prevalence of Diabetic Cardiomyopathy: A Population Based Study in Olmsted County, MN." J Card Fail.

Davis, A. E., 3rd (2005). "The pathophysiology of hereditary angioedema." Clin Immunol **114**(1): 3-9.

Davis, A. E., 3rd (2005). "The pathophysiology of hereditary angioedema." Clin Immunol **114**(1): 3-9.

Dawn, B., Y. T. Xuan, M. Marian, M. P. Flaherty, S. S. Murphree, T. L. Smith, R. Bolli and W. K. Jones (2001). "Cardiac-specific abrogation of NF- kappa B activation in mice by transdominant expression of a mutant I kappa B alpha." J Mol Cell Cardiol **33**(1): 161-173.

DeBlois, D. and R. A. Horlick (2001). "Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects." Br J Pharmacol **132**(1): 327-335.

Defendi, F., D. Charignon, A. Ghannam, D. Ponard and C. Drouet (2015). "[Biological investigation of kinin-mediated angioedema]." Ann Dermatol Venereol **142**(3): 163-169.

Dias, J. P. and R. Couture (2012). "Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance." J Cardiovasc Pharmacol **60**(1): 61-69.

Dias, J. P., S. Talbot, J. Senecal, P. Carayon and R. Couture (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.

Dias, J. P. and R. Couture (2012). "Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance." Diabetes Obes Metab **14**(3): 244-253.

Dias, J. P., M. A. Ismael, M. Pilon, J. de Champlain, B. Ferrari, P. Carayon and R. Couture (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.

De Blois, D. and R. A. Horlick (2001). "Endotoxin sensitization to kinin B(1) receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects." Br J Pharmacol **132**(1): 327-335.

De Brito Garipey, H., P. Carayon, B. Ferrari and R. Couture (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.

De Felice, F. G., M. V. Lourenco and S. T. Ferreira (2014). "How does brain insulin resistance develop in Alzheimer's disease?" Alzheimers Dement **10**(1 Suppl): S26-32.

Defendi, F., D. Charignon, A. Ghannam, D. Ponard and C. Drouet (2015). "[Biological investigation of kinin-mediated angioedema]." Ann Dermatol Venereol **142**(3): 163-169.

Dehan, C., D. Tran Van, H. Delacour, G. Deroudilhe, N. Fritsch, J. Chiappini, E. Dardare and V. Gardet (2008). "[Diabetic ketoacidosis with a fatal issue: is it a MODY3 (maturity-onset diabetes of the young type 3)?]." Ann Biol Clin (Paris) **66**(2): 189-193.

De la Monte, S. M., M. Tong, N. Lester-Coll, M. Plater, Jr. and J. R. Wands (2006). "Therapeutic rescue of neurodegeneration in experimental type 3 diabetes: relevance to Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **10**(1): 89-109.

De la Monte, S. M. and J. R. Wands (2005). "Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **7**(1): 45-61.

Disa, J., N. Parameswaran, P. Nambi and N. Aiyar (2000). "Involvement of cAMP-dependent protein kinase and pertussis toxin-sensitive G-proteins in CGRP mediated JNK activation in human neuroblastoma cell line." Neuropeptides **34**(3-4): 229-233.

Doctrow, S. R., S. M. Abelleira, L. A. Curry, R. Heller-Harrison, J. W. Kozarich, B. Malfroy, L. A. McCarroll, K. G. Morgan, A. R. Morrow, G. F. Musso and et al. (1994). "The bradykinin analog RMP-7 increases intracellular free calcium levels in rat brain microvascular endothelial cells." J Pharmacol Exp Ther **271**(1): 229-237.

Domenico, R. (2004). "Pharmacology of nitric oxide: molecular mechanisms and therapeutic strategies." Curr Pharm Des **10**(14): 1667-1676.

Dominguez-Garcia, A., R. Martinez, I. Urrutia, I. Garin and L. Castano (2014). "Identification of a novel insulin receptor gene heterozygous mutation in a patient with type A insulin resistance syndrome." J Pediatr Endocrinol Metab: 1-4.

Dong, Y. L., D. M. Reddy, K. E. Green, M. S. Chauhan, H. Q. Wang, M. Nagamani, G. D. Hankins and C. Yallampalli (2007). "Calcitonin gene-related peptide (CALCA) is a proangiogenic growth factor in the human placental development." Biol Reprod **76**(5): 892-899.

Dotta, F., S. Censini, A. G. van Halteren, L. Marselli, M. Masini, S. Dionisi, F. Mosca, U. Boggi, A. O. Muda, S. Del Prato, J. F. Elliott, A. Covacci, R. Rappuoli, B. O. Roep and P. Marchetti (2007). "Coxsackie B4 virus infection of beta cells and natural killer cell insulinitis in recent-onset type 1 diabetic patients." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(12): 5115-5120.

Dougnac, A. L., M. F. Mercado, R. R. Cornejo, M. V. Cariaga, G. P. Hernandez, M. H. Andresen, G. T. Bugeo, L. F. Castillo and S. Grupo Chileno del Estudio de la (2007). "[Prevalence of severe sepsis in intensive care units. A national multicentric study]." Rev Med Chil **135**(5): 620-630.

Drapeau, G., D. deBlois and F. Marceau (1991). "Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins." J Pharmacol Exp Ther **259**(3): 997-1003.

Drouin, J. N., P. Gaudreau, S. A. St-Pierre and D. Regoli (1979). "Structure-activity studies of [des-Arg9]-bradykinin on the B1 receptor of the rabbit aorta." Can J Physiol Pharmacol **57**(6): 562-566.

Drummond, K., M. Mauer and G. International Diabetic Nephropathy Study (2002). "The early natural history of nephropathy in type 1 diabetes: II. Early renal structural changes in type 1 diabetes." Diabetes **51**(5): 1580-1587.

Duguay, D., S. Der Sarkissian, R. Kouz, B. Ongali, R. Couture and D. deBlois (2004). "Kinin B2 receptor is not involved in enalapril-induced apoptosis and regression of hypertrophy in spontaneously hypertensive rat aorta: possible role of B1 receptor." Br J Pharmacol **141**(4): 728-736.

Duka, I., A. Duka, E. Kintsurashvili, C. Johns, I. Gavras and H. Gavras (2003). "Mechanisms mediating the vasoactive effects of the B1 receptors of bradykinin." Hypertension **42**(5): 1021-1025.

Duka, I., S. Shenouda, C. Johns, E. Kintsurashvili, I. Gavras and H. Gavras (2001). "Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity." Hypertension **38**(6): 1355-1360.

Dutra, R. C., A. F. Bento, D. F. Leite, M. N. Manjavachi, R. Marcon, M. A. Bicca, J. B. Pesquero and J. B. Calixto (2013). "The role of kinin B1 and B2 receptors in the persistent pain induced by experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice: evidence for the involvement of astrocytes." Neurobiol Dis **54**: 82-93.

Edwards, R. M., W. Trizna, E. Stack and N. Aiyar (1996). "Effect of adrenomedullin on cAMP levels along the rat nephron: comparison with CGRP." Am J Physiol **271**(4 Pt 2): F895-899.

Eleazu, C. O., K. C. Eleazu, S. Chukwuma and U. N. Essien (2013). "Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans." J Diabetes Metab Disord **12**(1): 60.

El Midaoui, A., C. Lungu, H. Wang, L. Wu, C. Robillard, D. Deblois and R. Couture (2011). "Impact of alpha-lipoic acid on liver peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, vascular remodeling, and oxidative stress in insulin-resistant rats." Can J Physiol Pharmacol **89**(10): 743-751.

El Midaoui, A., B. Ongali, M. Petcu, D. Rodi, J. de Champlain, W. Neugebauer and R. Couture (2005). "Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance." Peptides **26**(8): 1323-1330.

Emerich, D. F., R. L. Dean, C. Osborn and R. T. Bartus (2001). "The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation." Clin Pharmacokinet **40**(2): 105-123.

Enquist, J., C. Sanden, C. Skroder, S. A. Mathis and L. M. Leeb-Lundberg (2014). "Kinin-stimulated B1 receptor signaling depends on receptor endocytosis whereas B2 receptor signaling does not." Neurochem Res **39**(6): 1037-1047.

Erdos, E. G. and B. M. Marcic (2001). "Kinins, receptors, kininases and inhibitors--where did they lead us?" Biol Chem **382**(1): 43-47.

Esmon, C. T. (2001). "Role of coagulation inhibitors in inflammation." Thromb Haemost **86**(1): 51-56.

Fadini, G. P., S. V. de Kreutzenberg, M. Rigato, S. Brocco, M. Marchesan, A. Tiengo and A. Avogaro (2011). "Characteristics and outcomes of the hyperglycemic hyperosmolar non-ketotic syndrome in a cohort of 51 consecutive cases at a single center." Diabetes Res Clin Pract **94**(2): 172-179.

Fagher, K., A. Nilsson and M. Londahl (2013). "[Ketoacidosis in adult diabetes]." Lakartidningen **110**(51-52): 2309-2312.

Fajans, S. S., M. C. Cloutier and R. L. Crowther (1979). "Clinical and etiological heterogeneity of idiopathic diabetes mellitus. The banting memorial lecture." Schweiz Med Wochenschr **109**(46): 1774-1785.

Fang, C., E. Stavrou, A. A. Schmaier, N. Grobe, M. Morris, A. Chen, M. T. Nieman, G. N. Adams, G. LaRusch, Y. Zhou, M. L. Bilodeau, F. Mahdi, M. Warnock and A. H. Schmaier (2013). "Angiotensin

1-7 and Mas decrease thrombosis in Bdkrb2-/- mice by increasing NO and prostacyclin to reduce platelet spreading and glycoprotein VI activation." Blood **121**(15): 3023-3032.

Fante, R. J., V. D. Durairaj and S. C. Oliver (2010). "Diabetic retinopathy: An update on treatment." Am J Med **123**(3): 213-216.

Fava, E., J. Dehghany, J. Ouwendijk, A. Muller, A. Niederlein, P. Verkade, M. Meyer-Hermann and M. Solimena (2012). "Novel standards in the measurement of rat insulin granules combining electron microscopy, high-content image analysis and in silico modelling." Diabetologia **55**(4): 1013-1023.

Fernandes, E. S., M. A. Fernandes and J. E. Keeble (2012). "The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves." Br J Pharmacol **166**(2): 510-521.

Flanagan, S. E., A. M. Patch, D. J. Mackay, E. L. Edghill, A. L. Gloyn, D. Robinson, J. P. Shield, K. Temple, S. Ellard and A. T. Hattersley (2007). "Mutations in ATP-sensitive K⁺ channel genes cause transient neonatal diabetes and permanent diabetes in childhood or adulthood." Diabetes **56**(7): 1930-1937.

Flechtner, I., M. Vaxillaire, H. Cave, R. Scharfmann, P. Froguel and M. Polak (2007). "Diabetes in very young children and mutations in the insulin-secreting cell potassium channel genes: therapeutic consequences." Endocr Dev **12**: 86-98.

Fonseca, R. G., V. M. Sales, E. Ropelle, C. C. Barros, L. Oyama, S. S. Ihara, M. J. Saad, R. C. Araujo and J. B. Pesquero (2013). "Lack of kinin B(1) receptor potentiates leptin action in the liver." J Mol Med (Berl) **91**(7): 851-860.

Foulis, A. K., C. N. Liddle, M. A. Farquharson, J. A. Richmond and R. S. Weir (1986). "The histopathology of the pancreas in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: a 25-year review of deaths in patients under 20 years of age in the United Kingdom." Diabetologia **29**(5): 267-274.

Frank, M. M. (2010). "Complement disorders and hereditary angioedema." J Allergy Clin Immunol **125**(2 Suppl 2): S262-271.

Furie, B. and B. C. Furie (2008). "Mechanisms of thrombus formation." N Engl J Med **359**(9): 938-949.

Furuto-Kato, S., A. Matsumoto, N. Kitamura and S. Nakanishi (1985). "Primary structures of the mRNAs encoding the rat precursors for bradykinin and T-kinin. Structural relationship of kininogens with major acute phase protein and alpha 1-cysteine proteinase inhibitor." J Biol Chem **260**(22): 12054-12059.

Gabra, B. H., R. Couture and P. Sirois (2003). "[Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]." Med Sci (Paris) **19**(11): 1101-1110.

Gabra, B. H. and P. Sirois (2003). "Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice." Neuropeptides **37**(1): 36-44.

Gando, S. (2013). "Role of fibrinolysis in sepsis." Semin Thromb Hemost **39**(4): 392-399.

Gando, S., T. Kameue, S. Nanzaki and Y. Nakanishi (1995). "Cytokines, soluble thrombomodulin and disseminated intravascular coagulation in patients with systemic inflammatory response syndrome." Thromb Res **80**(6): 519-526.

Gando, S., T. Kameue, S. Nanzaki and Y. Nakanishi (1995). "Cytokines, soluble thrombomodulin and disseminated intravascular coagulation in patients with systemic inflammatory response syndrome." Thromb Res **80**(6): 519-526.

Guillot, E., A. Coste and I. Angel (1996). "Involvement of capsaicin-sensitive nerves in the regulation of glucose tolerance in diabetic rats." Life Sci **59**(12): 969-977.

Gao, F. and Z. M. Zheng (2014). "Animal models of diabetic neuropathic pain." Exp Clin Endocrinol Diabetes **122**(2): 100-106.

Gasparyan, A. Y., L. Ayvazyan, E. Pretorius and G. D. Kitas (2014). "Platelets in rheumatic diseases: friend or foe?" Curr Pharm Des **20**(4): 552-566.

Gepts, W. (1965). "Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus." Diabetes **14**(10): 619-633.

Gera, L., C. Roy, M. T. Bawolak, J. Bouthillier, A. Adam and F. Marceau (2011). "Met-Lys-bradykinin-Ser-Ser, a peptide produced by the neutrophil from kininogen, is metabolically activated by angiotensin converting enzyme in vascular tissue." Pharmacol Res **64**(5): 528-534.

Gera, L., J. M. Stewart, J. P. Fortin, G. Morissette and F. Marceau (2008). "Structural modification of the highly potent peptide bradykinin B1 receptor antagonist B9958." Int Immunopharmacol **8**(2): 289-292.

Ghazi, A. and J. A. Grant (2013). "Hereditary angioedema: epidemiology, management, and role of icatibant." Biologics **7**: 103-113.

Gobeil, F., W. Neugebauer, X. K. Nguyen-Le, S. Nea Allogho, L. H. Pheng, D. Blouin, E. T. Whalley and D. Regoli (1997). "Pharmacological profiles of the human and rabbit B1 receptors." Can J Physiol Pharmacol **75**(6): 591-595.

Gobeil, F., W. Neugebauer, C. Filteau, D. Jukic, S. N. Allogho, L. H. Pheng, X. K. Nguyen-Le, D. Blouin and D. Regoli (1996). "Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists." Hypertension **28**(5): 833-839.

Gobeil, F., Jr., P. Sirois and D. Regoli (2014). "Preclinical pharmacology, metabolic stability, pharmacokinetics and toxicology of the peptidic kinin B1 receptor antagonist R-954." Peptides **52**: 82-89.

Gobeil, F., L. H. Pheng, I. Badini, X. K. Nguyen-Le, A. Pizard, A. Rizzi, D. Blouin and D. Regoli (1996). "Receptors for kinins in the human isolated umbilical vein." Br J Pharmacol **118**(2): 289-294.

Giordano, C., V. Guarnotta, R. Pivonello, M. C. Amato, C. Simeoli, A. Ciresi, A. Cozzolino and A. Colao (2014). "Is diabetes in Cushing's syndrome only a consequence of hypercortisolism?" Eur J Endocrinol **170**(2): 311-319.

Gougat, J., B. Ferrari, L. Sarran, C. Planchenault, M. Poncelet, J. Maruani, R. Alonso, A. Cudennec, T. Croci, F. Guagnini, K. Urban-Szabo, J. P. Martinolle, P. Soubrie, O. Finance and G. Le Fur (2004). "SSR240612[(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl) sulfonyl] amino] propanoyl]amino] -3- (4-[[2R,6S)-2,6-dimethyl piperidiny] methyl]phenyl)-N-isopropyl-N- methyl propanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization." J Pharmacol Exp Ther **309**(2): 661-669.

Gourdy, P. (2013). "Diabetes and oral contraception." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **27**(1): 67-76.

Granstein, R. D., J. A. Wagner, L. L. Stohl and W. Ding (2014). "Calcitonin Gene-Related Peptide: Key Regulator of Cutaneous Immunity." Acta Physiol (Oxf).

Gratacap, M. P., B. Payraastre, B. Nieswandt and S. Offermanns (2001). "Differential regulation of Rho and Rac through heterotrimeric G-proteins and cyclic nucleotides." J Biol Chem **276**(51): 47906-47913.

Gros, A., V. Ollivier and B. Ho-Tin-Noe (2014). "Platelets in inflammation: regulation of leukocyte activities and vascular repair." Front Immunol **5**: 678.

Grundy, S. M., I. J. Neeland, A. T. Turer and G. L. Vega (2014). "Ethnic and gender susceptibility to metabolic risk." Metab Syndr Relat Disord **12**(2): 110-116.

Guillot, E., A. Coste and I. Angel (1996). "Involvement of capsaicin-sensitive nerves in the regulation of glucose tolerance in diabetic rats." Life Sci **59**(12): 969-977.

Guptill, V., X. Cui, A. Khaibullina, J. M. Keller, N. Spornick, A. Mannes, M. Iadarola and Z. M. Quezado (2011). "Disruption of the transient receptor potential vanilloid 1 can affect survival, bacterial clearance, and cytokine gene expression during murine sepsis." Anesthesiology **114**(5): 1190-1199.

Hara, N., A. K. Alkanani, C. A. Dinarello and D. Zipris (2013). "Modulation of virus-induced innate immunity and type 1 diabetes by IL-1 blockade." Innate Immun.

Hardt, P. D. and N. Ewald (2011). "Exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus: a complication of diabetic neuropathy or a different type of diabetes?" Exp Diabetes Res **2011**: 761950.

Harper, M. T. and A. W. Poole (2007). "Isoform-specific functions of protein kinase C: the platelet paradigm." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1005-1008.

Hartling, L., D. M. Dryden, A. Guthrie, M. Muise, B. Vandermeer, W. M. Aktary, D. Pasichnyk, J. C. Seida and L. Donovan (2012). "Screening and diagnosing gestational diabetes mellitus." Evid Rep Technol Assess (Full Rep)(210): 1-327.

Hartman, J. M., A. Berger, K. Baker, J. Bolle, D. Handel, A. Mannes, D. Pereira, D. St Germain, D. Ronsaville, N. Sonbolian, S. Torvik, K. A. Calis, T. M. Phillips, G. Cizza and P. O. W. E. R. S. Group (2006). "Quality of life and pain in premenopausal women with major depressive disorder: the POWER Study." Health Qual Life Outcomes **4**: 2.

Haudek, S. B., E. Spencer, D. D. Bryant, D. J. White, D. Maass, J. W. Horton, Z. J. Chen and B. P. Giroir (2001). "Overexpression of cardiac I-kappaBalpha prevents endotoxin-induced myocardial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **280**(3): H962-968.

He, S., Y. Chen, L. Wei, X. Jin, L. Zeng, Y. Ren, J. Zhang, L. Wang, H. Li, Y. Lu and J. Cheng (2011). "Treatment and risk factor analysis of hypoglycemia in diabetic rhesus monkeys." Exp Biol Med (Maywood) **236**(2): 212-218.

Heissmeyer, V. and A. Rao (2008). "Itching to end NF-kappaB." Nat Immunol **9**(3): 227-229.

Hess, K., S. H. Alzahrani, M. Mathai, V. Schroeder, A. M. Carter, G. Howell, T. Koko, M. W. Strachan, J. F. Price, K. A. Smith, P. J. Grant and R. A. Ajjan (2012). "A novel mechanism for hypofibrinolysis in diabetes: the role of complement C3." Diabetologia **55**(4): 1103-1113.

Heumann, D. and T. Roger (2002). "Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria." Clin Chim Acta **323**(1-2): 59-72.

Hivert, M. F., J. L. Vassy and J. B. Meigs (2014). "Susceptibility to type 2 diabetes mellitus-from genes to prevention." Nat Rev Endocrinol.

Hock, F. J., K. Wirth, U. Albus, W. Linz, H. J. Gerhards, G. Wiemer, S. Henke, G. Breipohl, W. Konig, J. Knolle and et al. (1991). "Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies." Br J Pharmacol **102**(3): 769-773.

Holzmann, B. (2013). "Antiinflammatory activities of CGRP modulating innate immune responses in health and disease." Curr Protein Pept Sci **14**(4): 268-274.

Horwitz, M. S., A. Ilic, C. Fine, E. Rodriguez and N. Sarvetnick (2002). "Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes." J Clin Invest **109**(1): 79-87.

Hotamisligil, G. S. (2005). "Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes." Diabetes **54 Suppl 2**: S73-78.

Hutter, M. M., E. C. Wick, A. L. Day, J. Maa, E. C. Zerega, A. C. Richmond, T. H. Jordan, E. F. Grady, S. J. Mulvihill, N. W. Bunnett and K. S. Kirkwood (2005). "Transient receptor potential vanilloid (TRPV-1) promotes neurogenic inflammation in the pancreas via activation of the neurokinin-1 receptor (NK-1R)." Pancreas **30**(3): 260-265.

Ihara, A., K. Yamagata, T. Nammo, A. Miura, M. Yuan, T. Tanaka, F. M. Sladek, Y. Matsuzawa, J. Miyagawa and I. Shimomura (2005). "Functional characterization of the HNF4alpha isoform (HNF4alpha8) expressed in pancreatic beta-cells." Biochem Biophys Res Commun **329**(3): 984-990.

In't Veld, P. (2011). "Insulinitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion." Islets **3**(4): 131-138.

In't Veld, P. and M. Marichal (2010). "Microscopic anatomy of the human islet of Langerhans." Adv Exp Med Biol **654**: 1-19.

Ismael, M. A., S. Talbot, C. L. Carbonneau, C. M. Beausejour and R. Couture (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.

Jaidane, H., F. Sane, J. Gharbi, M. Aouni, M. B. Romond and D. Hober (2009). "Coxsackievirus B4 and type 1 diabetes pathogenesis: contribution of animal models." Diabetes Metab Res Rev **25**(7): 591-603.

Jayakrishnan, B., D. E. Hoke, C. G. Langendorf, A. M. Buckle and M. J. Rowley (2011). "An analysis of the cross-reactivity of autoantibodies to GAD65 and GAD67 in diabetes." PLoS One **6**(4): e18411.

Kahn, R., T. Hellmark, L. M. Leeb-Lundberg, N. Akbari, M. Todiras, T. Olofsson, J. Wieslander, A. Christensson, K. Westman, M. Bader, W. Muller-Esterl and D. Karpman (2009). "Neutrophil-derived proteinase 3 induces kallikrein-independent release of a novel vasoactive kinin." J Immunol **182**(12): 7906-7915.

Kahn, S. E., R. L. Hull and K. M. Utzschneider (2006). "Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes." Nature **444**(7121): 840-846.

Kakoki, M., K. A. Sullivan, C. Backus, J. M. Hayes, S. S. Oh, K. Hua, A. M. Gasim, H. Tomita, R. Grant, S. B. Nossou, H. S. Kim, J. C. Jennette, E. L. Feldman and O. Smithies (2010). "Lack of both

bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(22): 10190-10195.

Kalinowski, L., T. Matys, E. Chabielska, W. Buczko and T. Malinski (2002). "Angiotensin II AT1 receptor antagonists inhibit platelet adhesion and aggregation by nitric oxide release." Hypertension **40**(4): 521-527.

Kaminska, M., A. Mogielnicki, A. Stankiewicz, K. Kramkowski, T. Domaniewski, W. Buczko and E. Chabielska (2005). "Angiotensin II via AT1 receptor accelerates arterial thrombosis in renovascular hypertensive rats." J Physiol Pharmacol **56**(4): 571-585.

Kaplan, A. P. and B. Ghebrehiwet (2010). "The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement." Mol Immunol **47**(13): 2161-2169.

Kang, S. M., H. Y. Jin, K. A. Lee, J. H. Park, H. S. Baek and T. S. Park (2013). "Type B insulin-resistance syndrome presenting as autoimmune hypoglycemia, associated with systemic lupus erythematosus and interstitial lung disease." Korean J Intern Med **28**(1): 98-102.

Kang, Y., N. K. Chatterjee, M. J. Nodwell and J. W. Yoon (1994). "Complete nucleotide sequence of a strain of coxsackie B4 virus of human origin that induces diabetes in mice and its comparison with nondiabetogenic coxsackie B4 JBV strain." J Med Virol **44**(4): 353-361.

Kaplan, A. P., H. L. Meier and R. J. Mandle, Jr. (1977). "The role of Hageman factor, prekallifrein, and high molecular weight kininogen in the generation of bradykinin and the initiation of coagulation and fibrinolysis." Monogr Allergy **12**: 120-130.

Kaplan, A. P. and B. Ghebrehiwet (2010). "The plasma bradykinin-forming pathways and its interrelationships with complement." Mol Immunol **47**(13): 2161-2169.

Kar, S., J. Poirier, J. Guevara, D. Dea, C. Hawkes, Y. Robitaille and R. Quirion (2006). "Cellular distribution of insulin-like growth factor-II/mannose-6-phosphate receptor in normal human brain and its alteration in Alzheimer's disease pathology." Neurobiol Aging **27**(2): 199-210.

Karamitsos, D. T. (2011). "The story of insulin discovery." Diabetes Res Clin Pract **93 Suppl 1**: S2-8.

Kasayama, S., M. Otsuki, M. Takagi, H. Saito, S. Sumitani, H. Kouhara, M. Koga, Y. Saitoh, T. Ohnishi and N. Arita (2000). "Impaired beta-cell function in the presence of reduced insulin sensitivity determines glucose tolerance status in acromegalic patients." Clin Endocrinol (Oxf) **52**(5): 549-555.

Keil, C., K. Maskos, M. Than, J. T. Hoopes, R. Huber, F. Tan, P. A. Deddish, E. G. Erdos, R. A. Skidgel and W. Bode (2007). "Crystal structure of the human carboxypeptidase N (kininase I) catalytic domain." J Mol Biol **366**(2): 504-516.

Kempler, P., G. Amarenco, R. Freeman, S. Frontoni, M. Horowitz, M. Stevens, P. Low, R. Pop-Busui, A. A. Tahrani, S. Tesfaye, T. Varkonyi, D. Ziegler, P. Valensi and N. Toronto Consensus Panel on Diabetic (2011). "Management strategies for gastrointestinal, erectile, bladder, and sudomotor dysfunction in patients with diabetes." Diabetes Metab Res Rev **27**(7): 665-677.

Kim, C., K. M. Newton and R. H. Knopp (2002). "Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review." Diabetes Care **25**(10): 1862-1868.

Kim, E. J., S. J. Yoon, M. W. Jo and H. J. Kim (2013). "Measuring the burden of chronic diseases in Korea in 2007." Public Health **127**(9): 806-813.

Kim, J. M., T. H. Lee, M. C. Lee, J. D. Moon, J. S. Lee, H. S. Kim and C. H. Suh (2002). "Endoneurial microangiopathy of sural nerve in experimental vacor-induced diabetes." Ultrastruct Pathol **26**(6): 393-401.

Kimura, S., H. Tsuji, H. Nishimura, H. Kato, N. Ukimura, S. Yano, Y. Kunieda, H. Kawano, K. Nakagawa and M. Nakagawa (2002). "Bradykinin enhances in vitro procoagulant and antifibrinolytic properties of rat vascular endothelial cells." Thromb Res **106**(1): 41-50.

Klages, B., U. Brandt, M. I. Simon, G. Schultz and S. Offermanns (1999). "Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets." J Cell Biol **144**(4): 745-754.

Klinke, D. J., 2nd (2008). "Extent of beta cell destruction is important but insufficient to predict the onset of type 1 diabetes mellitus." PLoS One **3**(1): e1374.

Klinke, D. J., 2nd (2011). "Age-corrected beta cell mass following onset of type 1 diabetes mellitus correlates with plasma C-peptide in humans." PLoS One **6**(11): e26873.

Kobayashi, K., N. Kobayashi, T. Okitsu, C. Yong, T. Fukazawa, H. Ikeda, Y. Kosaka, M. Narushima, T. Arata and N. Tanaka (2004). "Development of a porcine model of type 1 diabetes by total Pancreatectomy and establishment of a glucose tolerance evaluation method." Artif Organs **28**(11): 1035-1042.

Kobayashi, T. (2013). "[Comparative study of the time period between the initiation of various interferon therapies and the onset of suicide- or diabetes-related side effect]." Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku(131): 45-49.

Koc, E. R., E. Uzar, Y. Cirak, Y. Parlak Demir and A. Ilhan (2014). "The increase of mean platelet volume in patients with Alzheimer disease." Turk J Med Sci **44**(6): 1060-1066.

Kokkonen, J. O., K. A. Lindstedt, A. Kuoppala and P. T. Kovanen (2000). "Kinin-degrading pathways in the human heart." Trends Cardiovasc Med **10**(1): 42-45.

Konno, M., H. Shirakawa, S. Iida, S. Sakimoto, I. Matsutani, T. Miyake, K. Kageyama, T. Nakagawa, K. Shibasaki and S. Kaneko (2012). "Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide." *Glia* **60**(5): 761-770.

Kota, S. K., L. K. Meher, S. Jammula, S. K. Kota and K. D. Modi (2012). "Clinical profile of coexisting conditions in type 1 diabetes mellitus patients." *Diabetes Metab Syndr* **6**(2): 70-76.

Kota, S. K., P. R. Tripathy, S. K. Kota and S. Jammula (2013). "Type 2 diabetes mellitus: An unusual association with Down's syndrome." *Indian J Hum Genet* **19**(3): 358-359.

Kruithof, E. K. and S. Dunoyer-Geindre (2014). "Human tissue-type plasminogen activator." *Thromb Haemost* **112**(2): 243-254.

Kuhr, F. K., Y. Zhang, V. Brovkovich and R. A. Skidgel (2010). "Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase." *FASEB J* **24**(7): 2475-2483.

Kuzuya, T., S. Nakagawa, J. Satoh, Y. Kanazawa, Y. Iwamoto, M. Kobayashi, K. Nanjo, A. Sasaki, Y. Seino, C. Ito, K. Shima, K. Nonaka, T. Kadowaki and m. Committee of the Japan Diabetes Society on the diagnostic criteria of diabetes (2002). "Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus." *Diabetes Res Clin Pract* **55**(1): 65-85.

Labonte, J., I. Brochu, J. C. Honore and P. D'Orleans-Juste (2001). "Role of ETB and B2 receptors in the ex vivo platelet inhibitory properties of endothelin and bradykinin in the mouse." *Br J Pharmacol* **132**(4): 934-940.

Lacoste, B., X. K. Tong, K. Lahjouji, R. Couture and E. Hamel (2013). "Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice." *J Neuroinflammation* **10**: 57.

Larger, E., M. F. Philippe, L. Barbot-Trystram, A. Radu, M. Rotariu, E. Nobecourt and C. Boitard (2012). "Pancreatic exocrine function in patients with diabetes." *Diabet Med* **29**(8): 1047-1054.

Larrivee, J. F., D. R. Bachvarov, F. Houle, J. Landry, J. Huot and F. Marceau (1998). "Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury." *J Immunol* **160**(3): 1419-1426.

Lastra, G., S. Syed, L. R. Kurukulasuriya, C. Manrique and J. R. Sowers (2014). "Type 2 Diabetes Mellitus and Hypertension: An Update." *Endocrinol Metab Clin North Am* **43**(1): 103-122.

Laustsen, P. G., M. D. Michael, B. E. Crute, S. E. Cohen, K. Ueki, R. N. Kulkarni, S. R. Keller, G. E. Lienhard and C. R. Kahn (2002). "Lipoatrophic diabetes in *Irs1(-/-)/Irs3(-/-)* double knockout mice." *Genes Dev* **16**(24): 3213-3222.

Lawson, S. R., B. H. Gabra, F. Nantel, B. Battistini and P. Sirois (2005). "Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs." Eur J Pharmacol **514**(1): 69-78.

Leavell, K. J., M. W. Peterson and T. J. Gross (1996). "The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(1): 53-60.

Levi, M. (2005). "Disseminated intravascular coagulation: What's new?" Crit Care Clin **21**(3): 449-467.

Le Bars, D. and F. Adam (2002). "[Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain]." Ann Fr Anesth Reanim **21**(4): 315-335.

Leavell, K. J., M. W. Peterson and T. J. Gross (1996). "The role of fibrin degradation products in neutrophil recruitment to the lung." Am J Respir Cell Mol Biol **14**(1): 53-60.

Lee, H. R., H. K. Shin, S. Y. Park, H. Y. Kim, W. S. Lee, B. Y. Rhim, K. W. Hong and C. D. Kim (2014). "Attenuation of beta-amyloid-induced tauopathy via activation of CK2alpha/SIRT1: targeting for cilostazol." J Neurosci Res **92**(2): 206-217.

Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, W. Muller-Esterl, D. J. Pettibone and B. L. Zuraw (2005). "International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences." Pharmacol Rev **57**(1): 27-77.

Leeds, J. S., A. D. Hopper, M. Hadjivassiliou, S. Tesfaye and D. S. Sanders (2014). "Potential coeliac disease in Type 1 diabetes mellitus: does a positive antibody lead to increased complications?" Nutr Metab Cardiovasc Dis **24**(4): 378-383.

Lenzen, S., M. Tiedge, M. Elsner, S. Lortz, H. Weiss, A. Jorns, G. Kloppel, D. Wedekind, C. M. Prokop and H. J. Hedrich (2001). "The LEW.1AR1/Ztm-iddm rat: a new model of spontaneous insulin-dependent diabetes mellitus." Diabetologia **44**(9): 1189-1196.

Leslie, M. (2010). "Cell biology. Beyond clotting: the powers of platelets." Science **328**(5978): 562-564.

Lester-Coll, N., E. J. Rivera, S. J. Soscia, K. Doiron, J. R. Wands and S. M. de la Monte (2006). "Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease." J Alzheimers Dis **9**(1): 13-33.

Levesque, L., N. Harvey, F. Rioux, G. Drapeau and F. Marceau (1995). "Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins." Immunopharmacology **29**(2): 141-147.

Levi, M. (2005). "Disseminated intravascular coagulation: What's new?" Crit Care Clin **21**(3): 449-467.

- Levi, M. (2014). "Diagnosis and treatment of disseminated intravascular coagulation." Int J Lab Hematol **36**(3): 228-236.
- Levite, M. (2008). "Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors." Curr Opin Pharmacol **8**(4): 460-471.
- Lightfoot, Y. L., J. Chen and C. E. Mathews (2012). "Oxidative stress and beta cell dysfunction." Methods Mol Biol **900**: 347-362.
- Like, A. A. and A. A. Rossini (1976). "Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus." Science **193**(4251): 415-417.
- Lin, J. C., S. Talbot, K. Lahjouji, J. P. Roy, J. Senecal, R. Couture and A. Morin (2010). "Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways." Peptides **31**(10): 1940-1945.
- Liu, J. and E. P. Feener (2013). "Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy." Biol Chem **394**(3): 319-328.
- Liu, L., H. Furuta, A. Minami, T. Zheng, W. Jia, K. Nanjo and K. Xiang (2007). "A novel mutation, Ser159Pro in the NeuroD1/BETA2 gene contributes to the development of diabetes in a Chinese potential MODY family." Mol Cell Biochem **303**(1-2): 115-120.
- Liu, M., I. Hodish, L. Haataja, R. Lara-Lemus, G. Rajpal, J. Wright and P. Arvan (2010). "Proinsulin misfolding and diabetes: mutant INS gene-induced diabetes of youth." Trends Endocrinol Metab **21**(11): 652-659.
- Loison, F., H. Zhu, K. Karatepe, A. Kasorn, P. Liu, K. Ye, J. Zhou, S. Cao, H. Gong, D. E. Jenne, E. Remold-O'Donnell, Y. Xu and H. R. Luo (2014). "Proteinase 3-dependent caspase-3 cleavage modulates neutrophil death and inflammation." J Clin Invest **124**(10): 4445-4458.
- Longhurst, H. J. (2010). "Management of acute attacks of hereditary angioedema: potential role of icatibant." Vasc Health Risk Manag **6**: 795-802.
- Losche, W. (2005). "Platelets and tissue factor." Platelets **16**(6): 313-319.
- Lotti, T., A. M. D'Erme and J. Hercogova (2014). "The role of neuropeptides in the control of regional immunity." Clin Dermatol **32**(5): 633-645.
- Lova, P., S. Paganini, E. Hirsch, L. Barberis, M. Wymann, F. Sinigaglia, C. Balduini and M. Torti (2003). "A selective role for phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in the Gi-dependent activation of platelet Rap1B." J Biol Chem **278**(1): 131-138.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh and P. S. Ohashi (2008). "LPS/TLR4 signal transduction pathway." Cytokine **42**(2): 145-151.

Lukic, M. L., S. Stosic-Grujicic and A. Shahin (1998). "Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes." Dev Immunol **6**(1-2): 119-128.

Lungu, C., J. P. Dias, C. E. Franca, B. Ongali, D. Regoli, F. Moldovan and R. Couture (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.

Lutty, G. A. (2013). "Effects of diabetes on the eye." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(14): ORSF81-87.

Lynn, W. A. (1998). "Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis." J Antimicrob Chemother **41 Suppl A**: 71-80.

Ma, C. Y., G. Y. Shi, C. S. Shi, Y. C. Kao, S. W. Lin and H. L. Wu (2012). "Monocytic thrombomodulin triggers LPS- and gram-negative bacteria-induced inflammatory response." J Immunol **188**(12): 6328-6337.

Ma, L., J. Wang and Y. X. Fang (2013). "[A case of Rabson-Mendenhall syndrome]." Zhonghua Er Ke Za Zhi **51**(7): 545-547.

Maestri, R., A. F. Milia, M. B. Salis, G. Graiani, C. Lagrasta, M. Monica, D. Corradi, C. Emanuelli and P. Madeddu (2003). "Cardiac hypertrophy and microvascular deficit in kinin B2 receptor knockout mice." Hypertension **41**(5): 1151-1155.

Mage, M., C. Pecher, E. Neau, E. Cellier, M. L. Dos Reiss, J. P. Schanstra, R. Couture, J. L. Bascands and J. P. Girolami (2002). "Induction of B1 receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation." Can J Physiol Pharmacol **80**(4): 328-333.

Malisiewicz, B., S. Boehncke, V. Lang, W. H. Boehncke and C. Burger (2014). "Epidermal Insulin Resistance as a Therapeutic Target in Acanthosis nigricans?" Acta Derm Venereol.

Manolov, D. (1984). "[Digestive system and bladder manifestations in diabetic autonomic neuropathy]." Vutr Boles **23**(2): 38-43.

Marceau, F. and D. R. Bachvarov (1998). "Kinin receptors." Clin Rev Allergy Immunol **16**(4): 385-401.

Marceau, F., J. F. Hess and D. R. Bachvarov (1998). "The B1 receptors for kinins." Pharmacol Rev **50**(3): 357-386.

Marceau, F. and D. Regoli (2004). "Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives." Nat Rev Drug Discov **3**(10): 845-852.

Marin-Castano, M. E., J. P. Schanstra, E. Neau, F. Praddaude, C. Pecher, J. L. Ader, J. P. Girolami and J. L. Bascands (2002). "Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment." Circulation **105**(5): 627-632.

Marrero, M. B., V. J. Venema, H. Ju, H. He, H. Liang, R. B. Caldwell and R. C. Venema (1999). "Endothelial nitric oxide synthase interactions with G-protein-coupled receptors." Biochem J **343 Pt 2**: 335-340.

Martin, B. C., J. H. Warram, A. S. Krolewski, R. N. Bergman, J. S. Soeldner and C. R. Kahn (1992). "Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study." Lancet **340**(8825): 925-929.

Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton and M. Moss (2003). "The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000." N Engl J Med **348**(16): 1546-1554.

Masini, M., L. Marselli, M. Bugliani, L. Martino, P. Masiello, P. Marchetti and V. De Tata (2012). "Ultrastructural morphometric analysis of insulin secretory granules in human type 2 diabetes." Acta Diabetol **49 Suppl 1**: S247-252.

Mathern, D. R. and P. S. Heeger (2015). "Molecules Great and Small: The Complement System." Clin J Am Soc Nephrol.

Mathews, C. E., S. H. Langley and E. H. Leiter (2002). "New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus." Transplantation **73**(8): 1333-1336.

Medeiros, R., D. A. Cabrini, J. Ferreira, E. S. Fernandes, M. A. Mori, J. B. Pesquero, M. Bader, M. C. Avellar, M. M. Campos and J. B. Calixto (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-kappaB signaling pathways." Circ Res **94**(10): 1375-1382.

Meigs, J. B. (2003). "Epidemiology of the insulin resistance syndrome." Curr Diab Rep **3**(1): 73-79.

Menke, J. G., J. A. Borkowski, K. K. Bierilo, T. MacNeil, A. W. Derrick, K. A. Schneck, R. W. Ransom, C. D. Strader, D. L. Linemeyer and J. F. Hess (1994). "Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor." J Biol Chem **269**(34): 21583-21586.

Merger, S. R., R. D. Leslie and B. O. Boehm (2013). "The broad clinical phenotype of Type 1 diabetes at presentation." Diabet Med **30**(2): 170-178.

Metelko, Z. and N. Brkljacic Crkvencic (2013). "[Prevention of diabetic foot]." Acta Med Croatica **67 Suppl 1**: 35-44.

Miller, B. J., M. C. Appel, J. J. O'Neil and L. S. Wicker (1988). "Both the Lyt-2+ and L3T4+ T cell subsets are required for the transfer of diabetes in nonobese diabetic mice." J Immunol **140**(1): 52-58.

Minkowski, O. and R. G. Bretzel (2002). "Further reports on diabetes mellitus after the extirpation of the pancreas." J Mol Med (Berl) **80**(1): 3; discussion 3-4.

Misra, K. B., S. W. Endemann and M. Ayer (2006). "Measures of obesity and metabolic syndrome in Indian Americans in northern California." Ethn Dis **16**(2): 331-337.

Mitanchez, D. (2010). "[Fetal and neonatal complications of gestational diabetes: perinatal mortality, congenital malformations, macrosomia, shoulder dystocia, birth injuries, neonatal outcomes]." J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris) **39**(8 Suppl 2): S189-199.

Miyake, K. (2004). "Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2." Trends Microbiol **12**(4): 186-192.

Mizumura, K., T. Sugiur, H. Koda, K. Katanosaka, B. R. Kumar, R. Giron and M. Tominaga (2005). "[Pain and Bradykinin Receptors--sensory transduction mechanism in the nociceptor terminals and expression change of bradykinin receptors in inflamed condition]." Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi **25**(1): 33-38.

Mokdad, A. H., E. S. Ford, B. A. Bowman, W. H. Dietz, F. Vinicor, V. S. Bales and J. S. Marks (2003). "Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001." JAMA **289**(1): 76-79.

Molinaro, G., N. Gervais and A. Adam (2002). "Biochemical basis of angioedema associated with recombinant tissue plasminogen activator treatment: an in vitro experimental approach." Stroke **33**(6): 1712-1716.

Moniwa, N., J. Agata, M. Hagiwara, N. Ura and K. Shimamoto (2006). "The role of bradykinin B1 receptor on cardiac remodeling in stroke-prone spontaneously hypertensive rats (SHR-SP)." Biol Chem **387**(2): 203-209.

Montane, J., L. Cadavez and A. Novials (2014). "Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes." Diabetes Metab Syndr Obes **7**: 25-34.

Morand-Contant, M., M. B. Anand-Srivastava and R. Couture (2010). "Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms." Am J Physiol Heart Circ Physiol **299**(5): H1625-1632.

Moreau, M. E., P. Dubreuil, G. Molinaro, M. Chagnon, W. Muller-Esterl, Y. Lepage, F. Marceau and A. Adam (2005). "Expression of metallopeptidases and kinin receptors in swine oropharyngeal tissues: effects of angiotensin I-converting enzyme inhibition and inflammation." J Pharmacol Exp Ther **315**(3): 1065-1074.

Mori, M. A., R. C. Araujo, F. C. Reis, D. G. Sgai, R. G. Fonseca, C. C. Barros, V. F. Merino, M. Passadore, A. M. Barbosa, B. Ferrari, P. Carayon, C. H. Castro, S. I. Shimuta, J. Luz, J. L. Bascands, J. P. Schanstra, P. C. Even, S. M. Oliveira, M. Bader and J. B. Pesquero (2008). "Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity." Diabetes **57**(6): 1491-1500.

Motataianu, A., R. Balasa, S. Voidazan and Z. Bajko (2013). "Cardiovascular autonomic neuropathy in context of other complications of type 2 diabetes mellitus." Biomed Res Int **2013**: 507216.

Murphy, K., S. B. Haudek, M. Thompson and B. P. Giroir (1998). "Molecular biology of septic shock." New Horiz **6**(2): 181-193.

Nagler, D. K., S. Kraus, J. Feierler, R. Mentele, F. Lottspeich, M. Jochum and A. Faussner (2010). "A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists." Int Immunopharmacol **10**(1): 134-139.

Naitoh, K., Y. Hosaka, M. Honda, K. Ogawa, K. Shirakawa and S. Furusako (2014). "Properties of soluble glycoprotein VI, a potential platelet activation biomarker." Platelets: 1-6.

Nan, H. L., Y. Zhang and Z. Chen (2013). "A case of Klinefelter's syndrome with refractory asthma, diabetes mellitus and rib fracture." Chin Med J (Engl) **126**(1): 196.

Neunaber, C., C. Zeckey, H. Andruszkow, M. Frink, P. Mommsen, C. Krettek and F. Hildebrand (2011). "Immunomodulation in polytrauma and polymicrobial sepsis - where do we stand?" Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov **5**(1): 17-25.

Nitta, H., T. Imamura, Y. Wada, A. Irie, H. Kobayashi, K. Okamoto and H. Baba (2008). "Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*." J Immunol **181**(5): 3602-3608.

Nitta, H., T. Imamura, Y. Wada, A. Irie, H. Kobayashi, K. Okamoto and H. Baba (2008). "Production of C5a by ASP, a serine protease released from *Aeromonas sobria*." J Immunol **181**(5): 3602-3608.

Noris, M., F. Mescia and G. Remuzzi (2012). "STEC-HUS, atypical HUS and TTP are all diseases of complement activation." Nat Rev Nephrol **8**(11): 622-633.

Nowak, P., B. Olas and B. Wachowicz (2010). "[Oxidative stress in haemostasis]." Postepy Biochem **56**(3): 239-247.

Nowak, P., B. Olas and B. Wachowicz (2010). "[Oxidative stress in haemostasis]." Postepy Biochem **56**(3): 239-247.

Offermanns, S. (2006). "Activation of platelet function through G protein-coupled receptors." Circ Res **99**(12): 1293-1304.

Ogle, C. (2013). "Gestational diabetes: real risks beyond the controversy." Midwifery Today Int Midwife(108): 57-58.

Ongali, B., M. M. Campos, G. Bregola, D. Rodi, D. Regoli, G. Thibault, M. Simonato and R. Couture (2003). "Autoradiographic analysis of rat brain kinin B1 and B2 receptors: normal distribution and alterations induced by epilepsy." J Comp Neurol **461**(4): 506-519.

Ongali, B., F. Hellal, D. Rodi, M. Plotkine, C. Marchand-Verrecchia, D. Pruneau and R. Couture (2006). "Autoradiographic analysis of mouse brain kinin B1 and B2 receptors after closed head trauma and ability of Anatibant mesylate to cross the blood-brain barrier." J Neurotrauma **23**(5): 696-707.

Palmer, J. P., M. K. Cooney, J. R. Crossley, P. H. Hollander and C. M. Asplin (1981). "Antibodies to viruses and to pancreatic islets in nondiabetic and insulin-dependent diabetic patients." Diabetes Care **4**(5): 525-528.

Parastatidis, I., L. Thomson, A. Burke, I. Chernysh, C. Nagaswami, J. Visser, S. Stamer, D. C. Liebler, G. Koliakos, H. F. Heijnen, G. A. Fitzgerald, J. W. Weisel and H. Ischiropoulos (2008). "Fibrinogen beta-chain tyrosine nitration is a prothrombotic risk factor." J Biol Chem **283**(49): 33846-33853.

Pettersson, M., B. Ahren, G. Bottcher and F. Sundler (1986). "Calcitonin gene-related peptide: occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse." Endocrinology **119**(2): 865-869.

Perichart Perera, O., P. Alonso de la Vega and C. Ortega Gonzalez (2006). "[Physiopathology and nutritional care of patients with gestational diabetes]." Ginecol Obstet Mex **74**(4): 218-223.

Perreault, M. and A. Marette (2001). "Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle." Nat Med **7**(10): 1138-1143.

Petcu, M., J. P. Dias, B. Ongali, G. Thibault, W. Neugebauer and R. Couture (2008). "Role of kinin B1 and B2 receptors in a rat model of neuropathic pain." Int Immunopharmacol **8**(2): 188-196.

Petrovic, I. N., G. Mandic, M. Svetel, N. Dragasevic, V. Lackovic and V. S. Kostic (2012). "[Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactate acidosis with stroke-like episodes syndrome (MELAS): a case report]." Srp Arh Celok Lek **140**(5-6): 355-358.

Pettersson, M. and B. Ahren (1990). "Calcitonin gene-related peptide inhibits insulin secretion studies on ion fluxes and cyclic AMP in isolated rat islets." Diabetes Res **15**(1): 9-14.

Pettersson, M., B. Ahren, G. Bottcher and F. Sundler (1986). "Calcitonin gene-related peptide: occurrence in pancreatic islets in the mouse and the rat and inhibition of insulin secretion in the mouse." Endocrinology **119**(2): 865-869.

Pietrovski, E. F., M. F. Otuki, D. Regoli, M. Bader, J. B. Pesquero, D. A. Cabrini and A. R. Zampronio (2009). "The non-peptide kinin receptor antagonists FR 173657 and SSR 240612: preclinical evidence for the treatment of skin inflammation." Regul Pept **152**(1-3): 67-72.

Pinto, A. L., J. R. Dantas, D. Araujo, B. Barone, J. A. de Souza Papi, J. E. de Oliveira, L. Zajdenverg and M. Rodacki (2013). "Anti-parietal cell antibodies and pernicious anemia in patients with type 1 diabetes mellitus and multiethnic background." Diabetes Res Clin Pract **102**(2): e41-43.

Pivonello, R., M. De Leo, P. Vitale, A. Cozzolino, C. Simeoli, M. C. De Martino, G. Lombardi and A. Colao (2010). "Pathophysiology of diabetes mellitus in Cushing's syndrome." Neuroendocrinology **92 Suppl 1**: 77-81.

Planchenault, D., D. Martin-Coignard, D. Rugemintwaza, A. G. Bah, L. Cosson, F. Labarthe, A. Chantepie and E. Saliba (2014). "[Donohue syndrome or leprechaunism]." Arch Pediatr **21**(2): 206-210.

Plesnila, N., J. Schulz, M. Stoffel, J. Eriskat, D. Pruneau and A. Baethmann (2001). "Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats." J Neurotrauma **18**(10): 1049-1058.

Polak, M. and H. Cave (2007). "Neonatal diabetes mellitus: a disease linked to multiple mechanisms." Orphanet J Rare Dis **2**: 12.

Popescu, C., G. A. Popescu and V. Arama (2013). "Type 1 diabetes mellitus with dual autoimmune mechanism related to pegylated interferon and ribavirin treatment for chronic HCV hepatitis." J Gastrointestin Liver Dis **22**(1): 101-104.

Porreca, F., T. W. Vanderah, W. Guo, M. Barth, P. Dodey, V. Peyrou, J. M. Luccarini, J. L. Junien and D. Pruneau (2006). "Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[[(4-methoxy-2,6-dimethyl phenyl) sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist." J Pharmacol Exp Ther **318**(1): 195-205.

Potier, L., L. Waeckel, M. P. Vincent, C. Chollet, F. Gobeil, Jr., M. Marre, P. Bruneval, C. Richer, R. Roussel, F. Alhenc-Gelas and N. Bouby (2013). "Selective kinin receptor agonists as cardioprotective agents in myocardial ischemia and diabetes." J Pharmacol Exp Ther **346**(1): 23-30.

Pouliot, M., S. Talbot, J. Senecal, F. Dotigny, E. Vaucher and R. Couture (2012). "Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats." PLoS One **7**(3): e33864.

Prados, M. D., S. J. S. Schold, H. A. Fine, K. Jaekle, F. Hochberg, L. Mechtler, M. R. Fetell, S. Phuphanich, L. Feun, T. J. Janus, K. Ford and W. Graney (2003). "A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma." Neuro Oncol **5**(2): 96-103.

Prat, A., K. Biernacki, S. Pouly, J. Nalbantoglu, R. Couture and J. P. Antel (2000). "Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells." J Neuropathol Exp Neurol **59**(10): 896-906.

Prieto Tenreiro, A. M. and P. Diaz Guardiola (2011). "[Diabetic ketoacidosis as first manifestation of a metastatic somatostatinoma]." Med Clin (Barc) **136**(1): 39-40.

Pruneau, D., J. L. Paquet, J. M. Luccarini, E. Defrene, C. Fouchet, R. M. Franck, B. Loillier, C. Robert, P. Belichard, H. Duclos, B. Cremers and P. Dodey (1999). "Pharmacological profile of LF 16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist." Immunopharmacology **43**(2-3): 187-194.

Qin, J. and E. F. Plow (2013). "A new view of integrin α IIb β 3 bound to membrane." Blood **122**(26): 4157-4159.

Queiroz, M. S. (2008). "[Type 1 diabetes and autoimmune polyendocrine syndromes]." Arq Bras Endocrinol Metabol **52**(2): 198-204.

Quitterer, U. and S. AbdAlla (2014). "Vasopressor meets vasodepressor: The AT1-B2 receptor heterodimer." Biochem Pharmacol **88**(3): 284-290.

Rabbani, A., F. Abbasi, M. Taghvaei, B. Rabbani, B. Moradi, Y. Shakiba, N. Rezaei and A. Amirzargar (2013). "HLA-DRB, -DQA, and DQB alleles and haplotypes in Iranian patients with diabetes mellitus type I." Pediatr Diabetes **14**(5): 366-371.

Rabinovitch, A. (1998). "An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus." Diabetes Metab Rev **14**(2): 129-151.

Rabinovitch, A. and W. L. Suarez-Pinzon (1998). "Cytokines and their roles in pancreatic islet beta-cell destruction and insulin-dependent diabetes mellitus." Biochem Pharmacol **55**(8): 1139-1149.

Rabinovitch, A. (1998). "An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus." Diabetes Metab Rev **14**(2): 129-151.

Radomski, M. W., R. M. Palmer and S. Moncada (1987). "The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide." Br J Pharmacol **92**(3): 639-646.

Ramanand, S. J., B. B. Ghongane, J. B. Ramanand, M. H. Patwardhan, R. R. Ghanghas and S. S. Jain (2013). "Clinical characteristics of polycystic ovary syndrome in Indian women." Indian J Endocrinol Metab **17**(1): 138-145.

Rao, A. K., V. Chouhan, X. Chen, L. Sun and G. Boden (1999). "Activation of the tissue factor pathway of blood coagulation during prolonged hyperglycemia in young healthy men." Diabetes **48**(5): 1156-1161.

Rayamajhi, S., T. Contractor and D. H. Wang (2009). "The potential of TRPV1 agonists for treating ischemia/reperfusion-induced renal injuries." Curr Opin Investig Drugs **10**(9): 963-970.

Razavi, R., Y. Chan, F. N. Afifyan, X. J. Liu, X. Wan, J. Yantha, H. Tsui, L. Tang, S. Tsai, P. Santamaria, J. P. Driver, D. Serreze, M. W. Salter and H. M. Dosch (2006). "TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes." Cell **127**(6): 1123-1135.

Regoli, D. and J. Barabe (1980). "Pharmacology of bradykinin and related kinins." Pharmacol Rev **32**(1): 1-46.

Regoli, D., F. Gobeil, Q. T. Nguyen, D. Jukic, P. R. Seoane, J. M. Salvino and D. G. Sawutz (1994). "Bradykinin receptor types and B2 subtypes." Life Sci **55**(10): 735-749.

Regoli, D., D. Jukic, F. Gobeil and N. E. Rhaleb (1993). "Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis." Can J Physiol Pharmacol **71**(8): 556-567.

Regoli, D., A. Rizzi, S. I. Perron and F. Gobeil, Jr. (2001). "Classification of kinin receptors." Biol Chem **382**(1): 31-35.

Rehman, R., Y. A. Bhat, L. Panda and U. Mabalirajan (2013). "TRPV1 inhibition attenuates IL-13 mediated asthma features in mice by reducing airway epithelial injury." Int Immunopharmacol **15**(3): 597-605.

Reverter, D., K. Maskos, F. Tan, R. A. Skidgel and W. Bode (2004). "Crystal structure of human carboxypeptidase M, a membrane-bound enzyme that regulates peptide hormone activity." J Mol Biol **338**(2): 257-269.

Ribatti, D. and E. Crivellato (2007). "Giulio Bizzozzero and the discovery of platelets." Leuk Res **31**(10): 1339-1341.

Richardson, S. J., A. Willcox, A. J. Bone, N. G. Morgan and A. K. Foulis (2011). "Immunopathology of the human pancreas in type-I diabetes." Semin Immunopathol **33**(1): 9-21.

Rigoli, L. and C. Di Bella (2012). "Wolfram syndrome 1 and Wolfram syndrome 2." Curr Opin Pediatr **24**(4): 512-517.

Roberts, W., R. Riba, S. Homer-Vanniasinkam, R. W. Farndale and K. M. Naseem (2008). "Nitric oxide specifically inhibits integrin-mediated platelet adhesion and spreading on collagen." J Thromb Haemost **6**(12): 2175-2185.

Roep, B. O., M. Atkinson and M. von Herrath (2004). "Satisfaction (not) guaranteed: re-evaluating the use of animal models of type 1 diabetes." Nat Rev Immunol **4**(12): 989-997.

Romanovsky, A. A. (2004). "Signaling the brain in the early sickness syndrome: are sensory nerves involved?" Front Biosci **9**: 494-504.

Rosenfeld, C. R. (2013). "Insulin therapy in type 2 diabetes mellitus: history drives patient care toward a better future." J Am Osteopath Assoc **113**(4 Suppl 2): S4-5.

Rotimi-Samuel, A., F. B. Akinsola, O. T. Aribaba and A. O. Onakoya (2013). "A ten year review of diabetic retinopathy at the Guinness Eye Centre, Lagos University Teaching Hospital (LUTH), Idi-Araba, Lagos." Nig Q J Hosp Med **23**(2): 90-93.

Russell, F. A., R. King, S. J. Smillie, X. Kodji and S. D. Brain (2014). "Calcitonin gene-related peptide: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **94**(4): 1099-1142.

Sabir, I., K. Khavandi, J. Brownrigg and A. J. Camm (2014). "Oral anticoagulants for Asian patients with atrial fibrillation." Nat Rev Cardiol **11**(5): 290-303.

Saito, Y., M. Kato, Y. Kubohara, I. Kobayashi and K. Tatemoto (1996). "Bradykinin increases intracellular free Ca²⁺ concentration and promotes insulin secretion in the clonal beta-cell line, HIT-T15." Biochem Biophys Res Commun **221**(3): 577-580.

Salgin, B., T. Meissner, P. Beyer, H. Haberland, M. Borkenstein, J. Fussenegger, U. Brand, B. P. Hauffa, A. Hungele and R. W. Holl (2013). "Lipoatrophy is associated with an increased risk of Hashimoto's thyroiditis and coeliac disease in female patients with type 1 diabetes." Horm Res Paediatr **79**(6): 368-372.

Saluk, J., M. Bijak, M. B. Ponczek and B. Wachowicz (2014). "[The formation, metabolism and the evolution of blood platelets]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **68**: 384-391.

Salvino, J. M., P. R. Seoane, B. D. Douty, M. M. Awad, R. E. Dolle, W. T. Houck, D. M. Faunce and D. G. Sawutz (1993). "Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin B2 receptor." J Med Chem **36**(17): 2583-2584.

Samson, S. L. and A. J. Garber (2014). "Metabolic Syndrome." Endocrinol Metab Clin North Am **43**(1): 1-23.

Sanden, C., J. Enquist, S. H. Bengtson, H. Herwald and L. M. Leeb-Lundberg (2008). "Kinin B2 receptor-mediated bradykinin internalization and metalloendopeptidase EP24.15-dependent intracellular bradykinin degradation." J Pharmacol Exp Ther **326**(1): 24-32.

Saruhan-Direskeneli, G., F. A. Uyar, F. Bas, H. Gunoz, R. Bundak, N. Saka and F. Darendeliler (2000). "HLA-DR and -DQ associations with insulin-dependent diabetes mellitus in a population of Turkey." Hum Immunol **61**(3): 296-302.

Saruki, H., N. Ogata, T. Kawasaki, Y. Oka, I. Koga, S. Fujimori and T. Teramoto (2009). "[Type 2 diabetes mellitus with hemoptysis suspiciously caused by infectious pulmonary artery aneurysm associated with pneumonia]." Nihon Naika Gakkai Zasshi **98**(11): 2885-2887.

Savard, M., J. Labonte, C. Dubuc, W. Neugebauer, P. D'Orleans-Juste and F. Gobeil, Jr. (2013). "Further pharmacological evaluation of a novel synthetic peptide bradykinin B2 receptor agonist." Biol Chem **394**(3): 353-360.

Scalera, A. and C. Loguercio (2012). "Focus on irritable bowel syndrome." Eur Rev Med Pharmacol Sci **16**(9): 1155-1171.

Schaible, H. G., G. S. von Banchet, M. K. Boettger, R. Brauer, M. Gajda, F. Richter, S. Hensellek, D. Brenn and G. Natura (2010). "The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain." Ann N Y Acad Sci **1193**: 60-69.

Schanstra, J. P., E. Bataille, M. E. Marin Castano, Y. Barascud, C. Hirtz, J. B. Pesquero, C. Pecher, F. Gauthier, J. P. Girolami and J. L. Bascands (1998). "The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts." J Clin Invest **101**(10): 2080-2091.

Schnalke, T. (1989). "[Paul Langerhans (1847-1888)]." Pathologie **10**(1): 70-71.

Schwartz, M. S. and A. Chadha (2008). "Type 2 diabetes mellitus in childhood: obesity and insulin resistance." J Am Osteopath Assoc **108**(9): 518-524.

Seguin, T., M. Buleon, M. Destrube, M. T. Ranera, R. Couture, J. P. Girolami and I. Tack (2008). "Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxin shock in mice." Int Immunopharmacol **8**(2): 217-221.

Schanstra, J. P., E. Bataille, M. E. Marin Castano, Y. Barascud, C. Hirtz, J. B. Pesquero, C. Pecher, F. Gauthier, J. P. Girolami and J. L. Bascands (1998). "The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts." J Clin Invest **101**(10): 2080-2091.

Stadler, K. (2011). "Peroxy-nitrite-driven mechanisms in diabetes and insulin resistance - the latest advances." Curr Med Chem **18**(2): 280-290.

Senden, N. H., T. M. Jeunhomme, J. W. Heemskerk, R. Wagenvoort, C. van't Veer, H. C. Hemker and W. A. Buurman (1998). "Factor Xa induces cytokine production and expression of adhesion molecules by human umbilical vein endothelial cells." J Immunol **161**(8): 4318-4324.

Shafqat, J., E. Melles, K. Sigmundsson, B. L. Johansson, K. Ekberg, G. Alvelius, M. Henriksson, J. Johansson, J. Wahren and H. Jornvall (2006). "Proinsulin C-peptide elicits disaggregation of insulin resulting in enhanced physiological insulin effects." Cell Mol Life Sci **63**(15): 1805-1811.

Shampo, M. A. and R. A. Kyle (2006). "John J. R. Macleod--Nobel prize for discovery of insulin." Mayo Clin Proc **81**(8): 1006.

Shankar, R. R., Y. Wu, H. Q. Shen, J. S. Zhu and A. D. Baron (2000). "Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance." Diabetes **49**(5): 684-687.

Shariat-Madar, Z., F. Mahdi, M. Warnock, J. W. Homeister, S. Srikanth, Y. Krijanovski, L. J. Murphey, A. A. Jaffa and A. H. Schmaier (2006). "Bradykinin B2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin." Blood **108**(1): 192-199.

Sharif, N. A., P. Katoli, D. Scott, L. Li, C. Kelly, S. Xu, S. Husain, C. Toris and C. Crosson (2014). "FR-190997, a nonpeptide bradykinin B2-receptor partial agonist, is a potent and efficacious intraocular pressure lowering agent in ocular hypertensive cynomolgus monkeys." Drug Dev Res **75**(4): 211-223.

Sharma, J. N. and P. Narayanan (2014). "The kallikrein-kinin pathways in hypertension and diabetes." Prog Drug Res **69**: 15-36.

Shattil, S. J., H. Kashiwagi and N. Pampori (1998). "Integrin signaling: the platelet paradigm." Blood **91**(8): 2645-2657.

Shimada, A. and T. Maruyama (2004). "Encephalomyocarditis-virus-induced diabetes model resembles "fulminant" type 1 diabetes in humans." Diabetologia **47**(10): 1854-1855.

Shin, H. S. and U. H. Ha (2011). "Up-regulation of human bradykinin B1 receptor by secreted components of *Pseudomonas aeruginosa* via a NF-kappaB pathway in epithelial cells." FEMS Immunol Med Microbiol **63**(3): 418-426.

Shyam, S., F. Arshad, R. Abdul Ghani, N. A. Wahab, N. S. Safii, M. Y. Nisak, K. Chinna and N. A. Kamaruddin (2013). "Low glycaemic index diets improve glucose tolerance and body weight in women with previous history of gestational diabetes: a six months randomized trial." Nutr J **12**: 68.

Simard, B., B. H. Gabra and P. Sirois (2002). "Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice." Can J Physiol Pharmacol **80**(12): 1203-1207.

Skidgel, R. A. (1992). "Bradykinin-degrading enzymes: structure, function, distribution, and potential roles in cardiovascular pharmacology." J Cardiovasc Pharmacol **20 Suppl 9**: S4-9.

Spruijt-Metz, D., G. A. O'Reilly, L. Cook, K. A. Page and C. Quinn (2014). "Behavioral contributions to the pathogenesis of type 2 diabetes." Curr Diab Rep **14**(4): 475.

Stadler, K. (2011). "Peroxynitrite-driven mechanisms in diabetes and insulin resistance - the latest advances." Curr Med Chem **18**(2): 280-290.

Stadnicki, A., D. Gil, U. Mazurek and M. Latocha (2005). "[Intestinal tissue kallikrein-kinin system in patients with ulcerative colitis during treatment with cyclosporine A]." Wiad Lek **58**(5-6): 295-298.

Stadnicki, A., E. Pastucha, G. Nowaczyk, U. Mazurek, D. Plewka, G. Machnik, T. Wilczok and R. W. Colman (2005). "Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(2): G361-366.

Steen, E., B. M. Terry, E. J. Rivera, J. L. Cannon, T. R. Neely, R. Tavares, X. J. Xu, J. R. Wands and S. M. de la Monte (2005). "Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes?" J Alzheimers Dis **7**(1): 63-80.

Stegenga, M. E., S. N. van der Crabben, M. Levi, A. F. de Vos, M. W. Tanck, H. P. Sauerwein and T. van der Poll (2006). "Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans." Diabetes **55**(6): 1807-1812.

Sternini, C., R. De Giorgio, K. Anderson, P. C. Watt, F. C. Brunicardi, A. L. Widdison, H. Wong, H. A. Reber, J. H. Walsh and V. L. Go (1992). "Species differences in the immunoreactive patterns of calcitonin gene-related peptide in the pancreas." Cell Tissue Res **269**(3): 447-458.

Stipancic, G., L. La Grasta Sabolic and Z. Jurcic (2006). "Growth disorders in children with type 1 diabetes mellitus." Coll Antropol **30**(2): 297-304.

Sumner, A. E. and C. C. Cowie (2008). "Ethnic differences in the ability of triglyceride levels to identify insulin resistance." Atherosclerosis **196**(2): 696-703.

Suzuki, C., Y. Hirai, K. Terui, A. Kohsaka, T. Akagi and T. Suda (2004). "Slowly progressive type 1 diabetes mellitus associated with vitiligo vulgaris, chronic thyroiditis, and pernicious anemia." Intern Med **43**(12): 1183-1185.

Szkudelski, T. (2001). "The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas." Physiol Res **50**(6): 537-546.

Szuskiewicz-Garcia, M. M. and J. A. Davidson (2014). "Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus: Risk Factors and Medical Therapy." Endocrinol Metab Clin North Am **43**(1): 25-40.

Szypowska, A. and A. Skorka (2011). "The risk factors of ketoacidosis in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus." Pediatr Diabetes **12**(4 Pt 1): 302-306.

Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." Int Immunol **17**(1): 1-14.

Talbot, S., E. Chahmi, J. P. Dias and R. Couture (2010). "Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy." J Neuroinflammation **7**(1): 36.

Talbot, S. and R. Couture (2012). "Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy." Exp Neurol **234**(2): 373-381.

Talbot, S., H. De Brito Garipey, J. Saint-Denis and R. Couture (2012). "Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat." J Neuroinflammation **9**: 214.

Talbot, S., J. C. Lin, K. Lahjouji, J. P. Roy, J. Senecal, A. Morin and R. Couture (2011). "Cigarette smoke-induced kinin B1 receptor promotes NADPH oxidase activity in cultured human alveolar epithelial cells." Peptides **32**(7): 1447-1456.

Talme, T., Z. Liu and K. G. Sundqvist (2008). "The neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) stimulates T cell migration into collagen matrices." J Neuroimmunol **196**(1-2): 60-66.

Tanaka, H., R. Kashiwagi and T. Koizumi (2013). "Inhibition of calcitonin gene-related peptide (CGRP) has the potential to extend first-phase insulin secretion." Exp Clin Endocrinol Diabetes **121**(5): 280-285.

Tamagawa-Mineoka, R. (2014). "Important roles of platelets as immune cells in the skin." J Dermatol Sci.

Tanaka, H., R. Kashiwagi and T. Koizumi (2013). "Inhibition of calcitonin gene-related peptide (CGRP) has the potential to extend first-phase insulin secretion." Exp Clin Endocrinol Diabetes **121**(5): 280-285.

Tipton, C. M. (2008). "Susruta of India, an unrecognized contributor to the history of exercise physiology." J Appl Physiol (1985) **104**(6): 1553-1556.

Tjora, E., G. Wathle, F. Erchinger, T. Engjom, A. Molven, L. Aksnes, I. S. Haldorsen, G. Dimcevski, H. Raeder and P. R. Njolstad (2013). "Exocrine pancreatic function in hepatocyte nuclear factor 1beta-maturity-onset diabetes of the young (HNF1B-MODY) is only moderately reduced: compensatory hypersecretion from a hypoplastic pancreas." Diabet Med **30**(8): 946-955.

Tomita, H., R. B. Sanford, O. Smithies and M. Kakoki (2012). "The kallikrein-kinin system in diabetic nephropathy." Kidney Int **81**(8): 733-744.

Trachtenbarg, D. E. (2005). "Diabetic ketoacidosis." Am Fam Physician **71**(9): 1705-1714.

Tsui, H., R. Razavi, Y. Chan, J. Yantha and H. M. Dosch (2007). "'Sensing' autoimmunity in type 1 diabetes." Trends Mol Med **13**(10): 405-413.

- Umamahesh, K., A. Vigneswari, G. Surya Thejaswi, K. Satyavani and V. Viswanathan (2014). "Incidence of cardiovascular diseases and associated risk factors among subjects with type 2 diabetes - An 11-year follow up study." Indian Heart J **66**(1): 5-10.
- Van Buren, J. J., S. Bhat, R. Rotello, M. E. Pauza and L. S. Premkumar (2005). "Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I." Mol Pain **1**: 17.
- Van Geffen, M., M. Cugno, P. Lap, A. Loof, M. Cicardi and W. van Heerde (2012). "Alterations of coagulation and fibrinolysis in patients with angioedema due to C1-inhibitor deficiency." Clin Exp Immunol **167**(3): 472-478.
- Van Rossum, D., D. P. Menard and R. Quirion (1993). "Effect of guanine nucleotides and temperature on calcitonin gene-related peptide receptor binding sites in brain and peripheral tissues." Brain Res **617**(2): 249-257.
- Varga-Szabo, D., I. Pleines and B. Nieswandt (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(3): 403-412.
- Vela Vizcaino, C., L. Sola Enrique, S. Chugo Gordillo, M. T. Lizaso Bacaicoa, T. Caballero Molina and B. E. Garcia Figueroa (2014). "Bradykinin-mediated hereditary angioedema (non-estrogen-dependent) without C1 inhibitor deficiency." J Investig Allergol Clin Immunol **24**(4): 280-281.
- Venema, R. C. (2002). "Post-translational mechanisms of endothelial nitric oxide synthase regulation by bradykinin." Int Immunopharmacol **2**(13-14): 1755-1762.
- Verma, P., A. Kumar and C. Goswami (2010). "TRPV4-mediated channelopathies." Channels (Austin) **4**(4): 319-328.
- Vianna, R. M., B. Ongali, D. Regoli, J. B. Calixto and R. Couture (2003). "Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence." Br J Pharmacol **138**(1): 13-22.
- Villa, I., E. Mrak, A. Rubinacci, F. Ravasi and F. Guidobono (2006). "CGRP inhibits osteoprotegerin production in human osteoblast-like cells via cAMP/PKA-dependent pathway." Am J Physiol Cell Physiol **291**(3): C529-537.
- Vinik, A. I., R. E. Maser, B. D. Mitchell and R. Freeman (2003). "Diabetic autonomic neuropathy." Diabetes Care **26**(5): 1553-1579.
- Wada, T., S. Gando, A. Mizugaki, Y. Yanagida, S. Jesmin, H. Yokota and M. Ieko (2013). "Coagulofibrinolytic changes in patients with disseminated intravascular coagulation associated with post-cardiac arrest syndrome--fibrinolytic shutdown and insufficient activation of fibrinolysis lead to organ dysfunction." Thromb Res **132**(1): e64-69.
- Walenciak, L., W. Fendler and W. Mlynarski (2007). "[Proinsulin C-peptide -- the bioactive peptide with a huge promise]." Pediatr Endocrinol Diabetes Metab **13**(2): 95-98.

Wang, P. H., M. A. Cenedeze, G. Campanholle, D. M. Malheiros, H. A. Torres, J. B. Pesquero, A. Pacheco-Silva and N. O. Camara (2009). "Deletion of bradykinin B1 receptor reduces renal fibrosis." Int Immunopharmacol **9**(6): 653-657.

Wang, X., S. Yu, J. P. Hu, C. Y. Wang, Y. Wang, H. X. Liu and Y. L. Liu (2014). "Streptozotocin-induced diabetes increases amyloid plaque deposition in AD transgenic mice through modulating AGEs/RAGE/NF-kappaB pathway." Int J Neurosci **124**(8): 601-608.

Ward, W. K., C. L. Johnston, J. C. Beard, T. J. Benedetti, J. B. Halter and D. Porte, Jr. (1985). "Insulin resistance and impaired insulin secretion in subjects with histories of gestational diabetes mellitus." Diabetes **34**(9): 861-869.

Washington, R. E., R. M. Andrews and R. Mutter (2006). Emergency Department Visits for Adults with Diabetes, 2010: Statistical Brief #167. Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Rockville (MD).

Weiss, M. A. (2009). "Proinsulin and the genetics of diabetes mellitus." J Biol Chem **284**(29): 19159-19163.

Westerberg, D. P. (2013). "Diabetic ketoacidosis: evaluation and treatment." Am Fam Physician **87**(5): 337-346.

Widimsky, J., Jr., B. Strauch, G. Sindelka and J. Skrha (2001). "Can primary hyperaldosteronism be considered as a specific form of diabetes mellitus?" Physiol Res **50**(6): 603-607.

Wierup, N., H. Svensson, H. Mulder and F. Sundler (2002). "The ghrelin cell: a novel developmentally regulated islet cell in the human pancreas." Regul Pept **107**(1-3): 63-69.

Wild, S., G. Roglic, A. Green, R. Sicree and H. King (2004). "Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030." Diabetes Care **27**(5): 1047-1053.

Wimalawansa, S. J. (1997). "Amylin, calcitonin gene-related peptide, calcitonin, and adrenomedullin: a peptide superfamily." Crit Rev Neurobiol **11**(2-3): 167-239.

Wink, D. A. and J. B. Mitchell (1998). "Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide." Free Radic Biol Med **25**(4-5): 434-456.

Wollert, K. C. and H. Drexler (1997). "The kallikrein-kinin system in post-myocardial infarction cardiac remodeling." Am J Cardiol **80**(3A): 158A-161A.

Wood, E. R., H. Berger, Jr., P. A. Sherman and E. G. Lapetina (1993). "Hepatocytes and macrophages express an identical cytokine inducible nitric oxide synthase gene." Biochem Biophys Res Commun **191**(3): 767-774.

Woulfe, D., H. Jiang, R. Mortensen, J. Yang and L. F. Brass (2002). "Activation of Rap1B by G(i) family members in platelets." J Biol Chem **277**(26): 23382-23390.

Xiao, N., Z. Wang, Y. Huang, F. Daneshgari and G. Liu (2013). "Roles of polyuria and hyperglycemia in bladder dysfunction in diabetes." J Urol **189**(3): 1130-1136.

Yamagata, K. (2014). "Roles of HNF1alpha and HNF4alpha in Pancreatic beta-Cells: Lessons from a Monogenic Form of Diabetes (MODY)." Vitam Horm **95**: 407-423.

Yang, C. and W. H. Hsu (1995). "Stimulatory effect of bradykinin on insulin release from the perfused rat pancreas." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): E1027-1030.

Yang, C., B. Lee, T. H. Chen and W. H. Hsu (1997). "Mechanisms of bradykinin-induced insulin secretion in clonal beta cell line RINm5F." J Pharmacol Exp Ther **282**(3): 1247-1252.

Yang, J., J. Kang and Y. Guan (2013). "The mechanisms linking adiposopathy to type 2 diabetes." Front Med **7**(4): 433-444.

Yang, C. and W. H. Hsu (1995). "Stimulatory effect of bradykinin on insulin release from the perfused rat pancreas." Am J Physiol **268**(5 Pt 1): E1027-1030.

Yang, C., B. Lee, T. H. Chen and W. H. Hsu (1997). "Mechanisms of bradykinin-induced insulin secretion in clonal beta cell line RINm5F." J Pharmacol Exp Ther **282**(3): 1247-1252.

Yang, Y. and P. Santamaria (2006). "Lessons on autoimmune diabetes from animal models." Clin Sci (Lond) **110**(6): 627-639.

Yasuda, H. (2013). "[Diabetic neuropathy]." Nihon Rinsho **71**(11): 2015-2019.

Yisahak, S. F., J. Beagley, I. R. Hambleton, K. M. Narayan and I. D. F. D. Atlas (2014). "Diabetes in North America and the Caribbean: an update." Diabetes Res Clin Pract **103**(2): 223-230.

Yoon, J. W. and H. S. Jun (2001). "Cellular and molecular pathogenic mechanisms of insulin-dependent diabetes mellitus." Ann N Y Acad Sci **928**: 200-211.

Yoon, J. W., W. T. London, B. L. Curfman, R. L. Brown and A. L. Notkins (1986). "Coxsackie virus B4 produces transient diabetes in nonhuman primates." Diabetes **35**(6): 712-716.

Zaridoust, A., A. Rabbani, F. Sayarifard, C. T. Thiel and N. Rezaei (2013). "Acanthosis nigricans, Abnormal Facial Appearance and Dentition in an Insulin Resistance Syndrome." Iran J Pediatr **23**(3): 363-365.

Zeerleder, S., C. E. Hack and W. A. Wuillemin (2005). "Disseminated intravascular coagulation in sepsis." Chest **128**(4): 2864-2875.

Zhang, X., V. Brovkovich, Y. Zhang, F. Tan and R. A. Skidgel (2015). "Downregulation of kinin B1 receptor function by B2 receptor heterodimerization and signaling." Cell Signal **27**(1): 90-103.

Zhang, X., F. Tan and R. A. Skidgel (2013). "Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor." J Biol Chem **288**(46): 33226-33240.

Zhang, Z., C. S. Winborn, B. Marquez de Prado and A. F. Russo (2007). "Sensitization of calcitonin gene-related peptide receptors by receptor activity-modifying protein-1 in the trigeminal ganglion." J Neurosci **27**(10): 2693-2703.

Zhou, C., B. Pridgen, N. King, J. Xu and J. L. Breslow (2011). "Hyperglycemic Ins2AkitaLdlr(-)/(-) mice show severely elevated lipid levels and increased atherosclerosis: a model of type 1 diabetic macrovascular disease." J Lipid Res **52**(8): 1483-1493.

Zielinska, M., A. Jarmuz, A. Wasilewski, M. Salaga and J. Fichna (2015). "Role of transient receptor potential channels in intestinal inflammation and visceral pain: novel targets in inflammatory bowel diseases." Inflamm Bowel Dis **21**(2): 419-427.

Zmyslowska, A., M. Borowiec, P. Fichna, B. Iwaniszewska, L. Majkowska, I. Pietrzak, M. Szalecki, A. Szybowska and W. Mlynarski (2014). "Delayed recognition of Wolfram syndrome frequently misdiagnosed as type 1 diabetes with early chronic complications." Exp Clin Endocrinol Diabetes **122**(1): 35-38.

Zschenderlein, C., C. Gebhardt, O. von Bohlen Und Halbach, C. Kulisch and D. Albrecht (2011). "Capsaicin-induced changes in LTP in the lateral amygdala are mediated by TRPV1." PLoS One **6**(1): e16116.

Zuccollo, A., F. Cueva, M. Frontera, M. Navarro and O. Catanzaro (1996). "The role of the kallikrein-kinin system in type I diabetes (insulinitis)." Immunopharmacology **33**(1-3): 349-350.

Zuccollo, A., M. Navarro and O. Catanzaro (1996). "Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice." Can J Physiol Pharmacol **74**(5): 586-589.

Zuccollo, A., M. Navarro, M. Frontera, F. Cueva, M. Carattino and O. L. Catanzaro (1999). "The involvement of kallikrein-kinin system in diabetes type I (insulinitis)." Immunopharmacology **45**(1-3): 69-74.

Zuccollo, A., M. Navarro, G. M. Prendes, A. Dominguez and O. L. Catanzaro (1996). "Effects of HOE 140 on some renal functions in type I diabetic mice." Arch Physiol Biochem **104**(2): 252-254.

Zuccollo, A., D. Dziubecki, I. Villareal, R. Rodriguez and O. Catanzaro (2002). "The development of insulinitis and the kallikrein-kinin system." Int Immunopharmacol **2**(13-14): 1941-1947.

Zychowska, M., E. Rojewska, B. Przewlocka and J. Mika (2013). "Mechanisms and pharmacology of diabetic neuropathy - experimental and clinical studies." Pharmacol Rep **65**(6): 1601-161