

Université de Montréal

**Fonction, expression et localisation cellulaire du récepteur
B₁ des kinines chez le rat diabétique**

Par Youssef Haddad

Département de pharmacologie et physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de **Philosophiae Doctor (Ph.D)**
en physiologie moléculaire, cellulaire et intégrative

Décembre, 2017

© Youssef Haddad, 2017

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Fonction, expression et localisation cellulaire du récepteur B₁ des kinines chez le rat diabétique

Présentée par

Youssef Haddad

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Jean-Louis Schwartz Ph.D., Président- rapporteur

Réjean Couture Ph.D., Directeur de recherche

Madhu Anand-Srivastava Ph.D., Membre du jury

Fernand Gobeil Jr Ph.D., Membre du jury externe

Florina Moldovan Ph.D., Représentante de la doyenne

J'ai toujours pensé que l'amour était en forme de cœur mais en vérité, il était en forme d'une croix.

« C'est dans l'ordinaire du quotidien de chaque jour que je croise l'extraordinaire de Dieu ».

Père Pierre Bouzaiden – Monastère St-Antoine – Montréal.

« Et il en a toujours été ainsi de l'amour, il ne connaît sa véritable profondeur qu'à l'instant de la séparation ».

Le Prophète (1923) de Khalil Gibran.

En mémoire de mon père et de mon frère jumeau Fadi

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Dr Réjean Couture, mon directeur de recherche, avec qui j'ai eu l'honneur et la chance de travailler. J'ai adoré rencontrer un homme passionné par son travail, persévérant et à la recherche des nouvelles percées scientifiques. J'admire sa disponibilité, sa patience, son encadrement et la confiance qu'il m'a témoignée au cours de mes études. Je tiens à souligner son professionnalisme, ses qualités et son engouement pour l'excellence qui sont un exemple et une référence pour moi. Je ne pouvais pas souhaiter rien de mieux pour mes études.

Je tiens à remercier Dr Jean-Louis Schwartz et Dre Madhu Anand-Srivastava pour leurs conseils et leurs collaborations scientifiques.

J'aimerais remercier Jacques Sénécal, pour son aide, son savoir-faire et son apport technique. En plus de l'aide apportée, tu faisais partie de mon aimable quotidien. Je penserai toujours à toi.

Je tiens à remercier mes collègues du laboratoire : Rahmeh et Véronica pour leur présence et leur soutien.

À ma mère pour son amour, sa prière et son infaillible soutien.

À ma conjointe et épouse Aline pour sa présence, son support et surtout sa patience tout au long de mes études, à mes deux enfants champions Carl et Téo.

Une pensée très spéciale à Mme Lucie Couture, pour son encouragement et sa fine présence.

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

Table des matières

Résumé	vii
Abstract	ix
Liste des figures	xi
Liste des abréviations	xiii
Préambule	xvi
Chapitre 1	1
1. Introduction	2
1.1 Le Diabète.....	2
1.1.1 Types de diabètes.....	2
1.1.1.1 Diabète de type I.....	3
1.1.1.2 Diabète de type 2.....	5
1.1.1.3 Diabète gestationnel.....	9
1.1.1.4 MODY.....	9
1.2 Le stress oxydatif et son lien avec le diabète.....	10
1.2.1 Les antioxydants.....	11
1.2.2 Sources du stress oxydatif dans le diabète.....	13
1.2.2.1 L'origine non enzymatique.....	13
1.2.2.2 L'origine enzymatique.....	16
1.2.2.2.1 La NADPH oxydase et ses isoformes.....	17
1.2.2.2.1.1 Induction des NOXs.....	21
1.2.2.2.1.2 Les inhibiteurs de NOX.....	23
1.2.2.3 Autre source d'origine enzymatique.....	26
1.3 Les NOS – Monoxyde d'azote synthases.....	26
1.3.1 nNOS.....	27
1.3.2 eNOS.....	28
1.3.3 iNOS.....	28
1.4 Le système kallibréine – kinine.....	32
1.4.1 Les kinines et leur dégradation.....	32
1.4.2 Les récepteurs des kinines.....	35
1.4.2.1 Le récepteur B ₂	35
1.4.2.1.1 Le mécanisme de signalisation du RB ₂	36
1.4.2.2 Le récepteur B ₁	38

1.4.2.2.1 Le mécanisme de signalisation du RB ₁	39
1.4.2.2.2 Quelques antagonistes du RB ₁	40
1.5 Les modèles animaux de diabète.....	41
1.5.1 Le modèle de diabète de type 1.....	41
1.5.2 Les modèles animaux de diabète de type 2.....	42
1.5.2.1 Les diètes riches en gras ou HFD (high fat diet).....	43
1.5.2.2 Modèles génétiquement modifiés.....	43
1.6 L'anatomie des vaisseaux sanguins.....	44
Chapitre 2	47
2.1 Premier article	48
2.1.1 Hypothèse.....	48
2.2.2 Objectifs.....	48
2.2.3 Approches expérimentales.....	48
2.2.4 Publication.....	48
Chapitre 3	62
3.1 Deuxième article	63
3.1.1 Hypothèse.....	63
3.1.2 Objectifs.....	63
3.1.3 Approches expérimentales.....	63
3.1.4 Publication.....	63
Chapitre 4	76
4.1 Troisième article	77
4.1.1 Hypothèse.....	77
4.1.2 Objectifs.....	77
4.1.3 Approches expérimentales.....	77
4.1.4 Publication.....	77
Chapitre 5	91
5.1 Discussion	92
Chapitre 6	101
6.1 Conclusions et perspectives	102
Liste des références	106
Annexes	127

Résumé

Les kinines sont des peptides vasoactifs et pro-inflammatoires impliqués dans un bon nombre de processus biologiques et inflammatoires. Elles agissent sur deux types de récepteurs couplés aux protéines G, appelés récepteurs B₁ et B₂ (RB₁ et RB₂). Le RB₂ joue un rôle protecteur sur le système cardiovasculaire par l'activation de la monoxyde d'azote synthase endothéliale (eNOS). Par contre, le RB₁ est associé à la résistance à l'insuline, un événement précoce dans le diabète de type 2, à travers la régulation et l'activation de la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) et l'augmentation de la production de l'anion superoxyde (O₂^{•-}) impliquant la NADPH oxydase dans le système vasculaire de rats diabétiques.

Dans deux études menées en parallèle, nous avons considéré les hypothèses que l'inhibition : a) de la iNOS (article 1), ou b) de la kininase 1 (carboxypeptidase M, CPM), l'enzyme clé impliquée dans la synthèse des agonistes endogènes du RB₁ (article 2), exerce les mêmes effets bénéfiques que l'antagonisme du RB₁ (SSR240612) dans la résistance à l'insuline. Des rats mâles Sprague-Dawley ont été rendus résistants à l'insuline avec une eau de boisson contenant 10% de D-glucose pendant une période de 9 semaines. Les rats témoins ont reçu l'eau du robinet. Nous avons donc évalué les effets d'un traitement prolongé d'une semaine soit avec le 1400W, un inhibiteur sélectif de la iNOS, ou avec le Mergetpa, un inhibiteur non sélectif de la CPM. Les rats soumis à une diète riche en glucose présentent une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline, un gain de poids corporel et une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de l'inflammation (RB₁, CPM, iNOS et IL-1 β) dans le cortex rénal, l'aorte et le foie. Les marqueurs du stress oxydatif (anion superoxyde et nitrotyrosine) ont également augmenté dans divers tissus y compris le système vasculaire. Le 1400W et le Mergetpa ont renversé et normalisé la plupart de ces altérations. Ces données montrent que le blocage pharmacologique de la iNOS ou de la kininase1(CPM) exerce des effets bénéfiques similaires à ceux d'un traitement de 1 semaine avec un antagoniste du RB₁ (SSR240612).

Dans le modèle des rats insulino-résistants, la surexpression du RB₁ augmente la production de l'O₂^{•-} par l'activation de la NADPH oxydase, tandis l'antagonisme du RB₁

empêche cette production dans l'aorte (Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 b). Cette dernière observation nous a amené à émettre l'hypothèse que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH oxydase, qui a fait l'objet d'une 3^e étude (article 3) dans laquelle nous avons démontré que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH et son activation augmente la production de l'O₂^{•-} via la protéine kinase C. Des rats mâles ont été rendus diabétiques avec une dose unique de streptozotocine (STZ), un modèle de diabète de type 1. Deux semaines plus tard, la production d'O₂^{•-} a été mesurée dans les anneaux d'aorte en réponse à l'agoniste du RB₁, par la méthode de la chimioluminescence par la lucigénine. De nombreux inhibiteurs ont été ajoutés pour bloquer la PKC totale (Ro-31-8220), la PKCβ1/2 (LY333531) ou la NADPH oxydase (DPI). La localisation cellulaire du RB₁ avec la NADPH oxydase a été étudiée dans l'aorte, l'artère poplitée, le glomérule et les artères rénales par immunofluorescence et microscopie confocale avec des marqueurs des cellules endothéliales, des macrophages et des cellules musculaires lisses vasculaires. Bien que le RB₁ ait été largement retrouvé dans tous ces types cellulaires, il a été rarement retrouvé dans l'endothélium de l'aorte. La réponse maximale à l'agoniste du RB₁ sur la production de l'O₂^{•-} a été inhibée par tous les inhibiteurs. Enfin, les intensités en immunofluorescence du RB₁, de la NOX1 et de la NOX2 (isoformes de la NADPH oxydase) étaient significativement augmentées dans les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires et les macrophages dans l'aorte diabétique où ils montraient une colocalisation cellulaire.

Les résultats de cette dernière étude ont montré que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH oxydase sur le même type cellulaire et qu'il augmente la production d'O₂^{•-} via la PKC β1/2 (isoforme de la PKC). Ceci suggère que le rôle préjudiciable du RB₁ se manifeste en partie par une augmentation du stress oxydatif à partir de cellules immunitaires infiltrantes dans le diabète. Par conséquent, le RB₁ représente une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du diabète.

Mots-clés : diabète de type 1 et 2, inflammation, récepteurs des kinines, résistance à l'insuline, iNOS, CPM, NADPH oxydase, PKC.

Abstract

Kinins are vasoactive and pro-inflammatory peptides involved in a number of biological and inflammatory processes. They act on two types of receptors coupled to G proteins, GPCR, called B₁ and B₂ receptors. Although B₂R plays a protective role in the cardiovascular system through the activation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), B₁R is associated to insulin resistance, an early event in type 2 diabetes. This is mediated through the regulation and activation of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and increased production of superoxide anion (O₂^{•-}) involving NADPH oxidase in the vascular system of diabetic rats.

In two studies conducted in parallel, we considered the hypothesis that the inhibition of: a) iNOS (article 1), or b) kininase 1 (carboxypeptidase M, CPM), the key enzyme involved in the synthesis of endogenous B₁R agonists (article 2), exerts the same beneficial effects as the B₁R antagonist (SSR240612) in insulin resistance. Male Sprague-Dawley rats were made insulin resistant with a drinking solution containing 10% D-glucose for a period of 9 weeks. Control rats received tap water. We therefore evaluated the effects of a one-week treatment with 1400W, a selective inhibitor of iNOS, or with Mergetpa, a non-selective inhibitor of CPM. Rats fed a high glucose diet displayed hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance, body weight gain and increased expression of inflammatory markers (B₁R, CPM, iNOS and IL-1β) in the renal cortex, the aorta and the liver. Markers of oxidative stress (superoxide anion and nitrotyrosine) also increased in various tissues including the vascular system. Both treatments with 1400W and Mergetpa reversed and normalized most of these alterations. These data showed that the pharmacological blockade of iNOS or kininase1 (CPM) has similar beneficial effects to a 1-week treatment with a B₁R antagonist (SSR240612).

In the model of insulin resistant rats, overexpression of B₁R increases O₂^{•-} production by activation of NADPH oxidase, whereas antagonism of B₁R prevents this production in the aorta (Dias et al., 2010; Dias et al., 2012 b). This last observation led us to hypothesize that B₁R is colocalised with NADPH oxidase, which was the subject of a third study (article 3) in which we demonstrated that B₁R is colocalised with NADPH oxidase and its activation increases the production of O₂^{•-} via protein kinase C. Male rats were made diabetic with a single dose of streptozotocin (STZ), a model of type 1

diabetes. Two weeks later, $O_2^{\bullet-}$ production was measured in the aorta rings in response to the B_1R agonist, by the lucigenin chemiluminescence method. Many inhibitors have been added to block total PKC (Ro-31-8220), PKC β 1/2 (LY333531) or NADPH oxidase (diphenyleneiodonium). The cellular localization of B_1R with NADPH oxidase was studied in the aorta, popliteal artery, glomerulus and renal arteries by immunofluorescence and confocal microscopy with markers of endothelial cells, macrophages and vascular smooth muscle cells. Although B_1R has been widely found in all these cell types, it has rarely been found in the endothelium of the aorta. The maximal response to the B_1R agonist to enhance $O_2^{\bullet-}$ was inhibited by all inhibitors. Finally, the immunofluorescent intensity of labelling of B_1R , NOX1 and NOX2 (isoforms of NADPH oxidase) was significantly increased in endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and macrophages in the diabetic aorta where they displayed cellular colocalization. .

The results of this last study show that B_1R colocalizes with NADPH oxidase on the same cell type and increases the production of $O_2^{\bullet-}$ via PKC β 1/2 (isoform of PKC). This suggests that the detrimental role of B_1R manifest itself in part by an increase in oxidative stress from invasive immune cells in diabetes. Therefore, B_1R represents a potential therapeutic target in the treatment of diabetes.

Keywords: GPCR, diabetes type 1 and 2, inflammation, kinin receptors, insulin resistance, iNOS, CPM, NADPH oxidase, PKC.

Liste des figures

Figure 1 : Exocytose de l'insuline dans une cellule β du pancréas.....	6
Figure 2 : La régulation du GLUT4 par l'insuline.....	6
Figure 3 : Signalisation du récepteur à l'insuline.....	7
Figure 4 : Pathogenèse des complications vasculaires chez les diabétiques.....	9
Figure 5 : Types actuels de MODY.....	10
Figure 6 : Le stress oxydatif.....	11
Figure 7 : Isoformes de SOD.....	12
Figure 8 : Les radicaux libres dans le diabète.....	13
Figure 9 : Chaîne respiratoire mitochondriale.....	14
Figure 10 : Chaîne de transport d' e^- mitochondrial.....	14
Figure 11 : Les produits glyqués et les ERO dans le diabète.....	15
Figure 12 : Présentation schématique de la formation des ERO.....	15
Figure 13 : Mécanisme de formation des produits finaux glyqués.....	16
Figure 14 : Le stress dans le diabète.....	16
Figure 15 : Les radicaux libres dans le diabète.....	17
Figure 16 : NADPH oxidase.....	18
Figure 17 : Activation de NOX1 et 2.....	19
Figure 18 : NOX 3.....	20
Figure 19 : NOX 4 et 5.....	21
Figure 20 : Activation de NOX.....	22
Figure 21 : Xanthine oxydase.....	26
Figure 22 : Sources de NO.....	27
Figure 23 : Distribution des trois isoformes de la NOS.....	29
Figure 24 : Les NOS.....	30
Figure 25 : Guanylate cyclase soluble.....	31
Figure 26 : Effets de la PKG.....	31
Figure 27 : Le système kalllicréine-kinine (KKS).....	33
Figure 28 : Actions des principales peptidases sur la bradykinine.....	34
Figure 29 : Mécanisme de signalisation du RB_2 couplé à une protéine G.....	37
Figure 30 : Activation de la iNOS et la eNOS par RB_1 et RB_2 via $G_{\alpha q}$ et $G_{\alpha i}$	39

Figure 31: Antagonistes RB_1 de <i>NCT, National Clinical Trial</i>	41
Figure 32: Structure des artères, des veines et des capillaires.....	44

Liste des abréviations

ADMA :	Asymmetric dimethylarginine
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AGE :	Produits terminaux de glycation
Akt :	Protéine kinase B (PKB), sérine/thréonine protéine kinase
AMPc :	Adénosine monophosphate cyclique
ANP :	Peptide natriurétique A
ARNm :	Messenger de l'acide ribonucléique
ATP :	Adénosine triphosphate
BH4 :	Tétrahydrobioptérine
BK :	Bradykinine
BNP :	Peptide natriurétique B
CAMK :	Calmoduline kinase
CMLV :	Cellules musculaires lisses vasculaires
CNP :	Peptide natriurétique C
COX-2 :	Cyclooxygénase 2
CPM :	Carboxypeptidase membranaire
CPN :	Carboxypeptidase plasmatique
CYP :	Cytochrome P
DAG :	Diacylglycérol
DPI :	Diphenyleiodonium
DT1 :	Diabète de type 1
DT2 :	Diabète de type 2
ECA :	Enzyme de conversion de l'angiotensine I
EGF :	Facteur de croissance endothélial
eNOS :	Monoxyde d'azote synthase endothéliale
ERK :	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERN :	Espèces réactives d'azote
ERO :	Espèces réactives oxygénées
FAD :	Flavine adénine dinucléotide
FMN :	Flavine mononucléotide
FXII :	Facteur Hageman ou facteur XII
GCs :	Guanylate cyclase soluble

GLUT1 :	Protéine de transport de type 1 du glucose
GLUT2 :	Protéine de transport de type 2 du glucose
GLUT4 :	Protéine de transport de type 4 du glucose
GMPc :	Guanosine monophosphate cyclique
GPI :	Glycosyl phosphatidylinositol
GPX :	Glutathione peroxydase
GSHPX :	Glutathione peroxydase
GTP :	Guanosine triphosphate
H ₂ O ₂ :	Peroxyde d'hydrogène
HbA1C :	Hémoglobine glyquée ou glycosylée
ICAM :	Molécule d'adhésion intracellulaire
I-KB :	Inhibiteur du facteur nucléaire kappa B
IL-10 :	Interleukine-10
IL-1β :	Interleukine-1 Beta
IL-6 :	Interleukine-6
IL-7 :	Interleukine-7
INF-γ :	Interféron gamma
iNOS :	Monoxyde d'azote synthase inductible
I.p. :	Intrapéritonéal
IP3 :	Inositol-1,4,5-triphosphate
IPGTT :	Test de tolérance au glucose par voie intrapéritonéale
IPIST :	Test de sensibilité à l'insuline par voie intrapéritonéale
IRS :	Substrat du récepteur à l'insuline
KD :	Kallidine
MAPK :	Protéines kinases activées par les mitogènes
MEK :	<i>Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase</i>
NADPH :	<i>Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate oxydase</i>
NF-κB :	Facteur de transcription nucléaire kappa B
nNOS :	Monoxyde d'azote synthase neuronale
NO :	Monoxyde d'azote
O ₂ ^{•-} :	Anion superoxyde
OGTT :	Test de tolérance au glucose par voie orale
OH ⁻ :	Hydroxyle
ONOO ⁻ :	Peroxynitrite
PDE :	Phosphodiesterase

PDGF :	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K :	Phosphatidylinositol-3 kinase
PIP2 :	Phosphoinositide-4,5-biphosphate
PKA :	Protéine kinase A
PKC :	Protéine kinase C
PKC β 1/2 :	Protéine kinase bêta 1/2
PKG :	Protéine kinase G
PLA2 :	Phospholipase A2
PLC :	Phospholipase C
PLC β :	Phospholipase C β
PPAR :	Récepteur activé par les proliférateurs de peroxyosomes
PTP1B :	Protéine tyrosine phosphatase 1B
Raf :	Protéine kinase à sérine / thréonine proto-oncogène
RAGE :	Récepteur des AGE
Ras :	Petite GTPase
RB1 :	Récepteur B1 des kinines
RB2 :	Récepteur B2 des kinines
S.c. :	Sous-cutané
SOD :	Superoxyde dismutase
SSR :	SSR240612
STZ :	Streptozotocine
TGF- β :	Facteur de croissance transformant bêta
TNF- α :	Facteur de nécrose tumorale alpha
TZD :	Thiazolidinediones
VCAM :	Molécule d'adhésion des cellules vasculaires
VEGF :	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Préambule

Les kinines sont des peptides vasoactifs et des neuromédiateurs du système nerveux central impliqués dans un bon nombre des processus biologiques et inflammatoires (hyperthermie, douleur, œdème) (Couture *et al.*, 2001; Talbot *et al.*, 2012). Ces peptides agissent sur deux types de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) nommés RB₁ et RB₂. Le récepteur B₂, activé par la bradykinine (BK) et la kallidine (KD), est un récepteur constitutif exprimé dans la plupart des tissus qui joue un rôle protecteur dans le système cardiovasculaire par l'activation de la NOS endothéliale. La BK et la KD peuvent être métabolisées par la carboxypeptidase plasmatique (CPN) ou membranaire (CPM) pour générer la des-Arg⁹-BK ou la des-Arg¹⁰-KD, des métabolites actifs agissant comme agonistes du RB₁. Le RB₁, absent ou faiblement exprimé dans un état physiologique, est induit lors de l'inflammation, la résistance à l'insuline et le diabète (Kashuba *et al.*, 2013; Couture *et al.*, 2014).

Dans un modèle de résistance à l'insuline induit par une eau de boisson contenant 10% de D-glucose, on observe une surexpression du RB₁ (Lungu *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008) et d'autres marqueurs inflammatoires (iNOS, macrophages, Cox-2, IL-1 β , etc.) (Dias *et al.*, 2012 b). Une semaine de traitement avec un antagoniste du RB₁ (SSR240612) renverse l'hypertension, la résistance à l'insuline, le stress oxydatif et l'inflammation vasculaire dans ce modèle (Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 b).

En outre, l'activation du RB₁ a permis d'augmenter la production d'anion superoxyde (O₂^{•-}) à travers la NADPH oxydase dans l'aorte des rats glucosés et dans les cellules épithéliales humaines (Talbot *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2010). La stimulation du RB₁ augmente l'expression et l'activité de la iNOS via la voie de la protéine kinase activée par mitogène (MAPK) (Kuhr *et al.*, 2010). Cette surproduction de NO est nocive parce qu'elle se lie à l'anion superoxyde, elle forme le peroxynitrite (ONOO⁻), une molécule hautement toxique (Nagareddy *et al.*, 2005) qui provoque des dommages à l'ADN (modification de l'expression génique), la peroxydation des lipides (membranes) et la nitration des protéines (enzymes, transporteurs, canaux ioniques) (Johansen *et al.*, 2005).

Étant donné que le RB₁ est un puissant activateur de la iNOS, ceci nous a amené à aborder le rôle de la iNOS dans les effets délétères du RB₁ dans la résistance à l'insuline. Cette hypothèse a été vérifiée dans le modèle des rats traités avec une eau de boisson contenant 10% de D-glucose ou l'eau du robinet (control) pendant 9 semaines. Durant la dernière semaine, un inhibiteur sélectif de la iNOS (1400W, 1 mg.kg⁻¹ deux fois par jour) ou son véhicule ont été administrés par voie sous-cutané. Le traitement prolongé du glucose a provoqué une résistance à l'insuline et plusieurs caractéristiques du diabète de type 2. Le traitement avec le 1400W a considérablement bloqué ou atténué la majorité des complications liées à l'insulinorésistance et a empêché la formation du peroxy-nitrite (ONNO⁻) qui amplifie les effets pro-inflammatoires du RB₁. Cette étude a fait l'objet d'une 1^{ère} publication (Haddad *et al.*, 2016) (**Haddad, Y., Couture, R. Interplay between kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. Br J Pharmacol 2016; 173(12) : 1988-2000**) dans laquelle on a reproduit avec le 1400W les effets bénéfiques de l'antagoniste du récepteur B₁ sur la résistance à l'insuline, l'inflammation vasculaire et le stress oxydatif.

La CPM (kininase I) est constitutivement exprimée dans une grande variété de types cellulaires, y compris les cellules rénales, vasculaires, neuronales, pulmonaires et immunitaires. Les cytokines inflammatoires augmentent l'expression de la CPM, responsable de la génération des agonistes endogènes du RB₁ (Salgado *et al.*, 1986; Ishida *et al.*, 1989; Sivieri *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2011; Charest-Morin *et al.*, 2014).

Dans une 2^{ème} étude publiée (Haddad *et al.*, 2017a) (**Haddad, Y., Couture, R., Kininase 1 as a preclinical therapeutic target for Kinin B1 Receptor in Insulin Resistance. Frontiers in Pharmacology-Inflammation Pharmacology, 2017; 8(509)**), on a démontré que l'inhibition de la CPM reproduit les effets bénéfiques de l'antagoniste du RB₁ dans le modèle des rats soumis à un régime riche en D-glucose pendant 8 semaines et traités pendant la dernière semaine avec un inhibiteur sélectif de la CPM, Mergetpa (DL-2- Mercaptométhyl-3- guanidinoéthyl-thinopropanoic acid) (Charest-Morin *et al.*, 2014).

L'impact du traitement avec le Mergetpa (1 mg.kg⁻¹ deux fois par jour, s.c.) a été déterminé sur la résistance à l'insuline (indice HOMA), les niveaux d'hormones métaboliques, le stress oxydatif et l'expression de plusieurs marqueurs d'inflammation. Le blocage pharmacologique de la kininase 1 (CPM) par le Mergetpa a renversé et normalisé

la plupart des altérations et des complications diabétiques en exerçant des effets bénéfiques similaires à ceux observés à la suite du traitement d'une semaine soit avec l'antagoniste du RB₁ (SSR240612) ou avec l'inhibiteur de la iNOS (1400W).

L'hyperglycémie et l'accumulation de métabolites dans la voie de la glycolyse, notamment les produits glyqués (AGE), activent la NADPH oxydase à travers la protéine kinase C (PKC) et contribuent ainsi à la principale source de ERO dans les cellules vasculaires (He *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2014). Des études antérieures ont montré une augmentation de l'expression du RB₁ (Protéine et ARNm) dans les vaisseaux et les organes périphériques de rats STZ-diabétiques (Pouliot *et al.*, 2011; Pouliot *et al.*, 2012; Tidjane *et al.*, 2015; Tidjane *et al.*, 2016). La surexpression du RB₁, dans le modèle des rats insulino-résistants, augmente la production de l'O₂^{•-} par l'activation de la NADPH oxydase, tandis que l'antagonisme du RB₁ empêche cette production dans l'aorte (Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 b). Cette dernière observation nous a amené à émettre l'hypothèse que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH oxydase sur les mêmes types cellulaires (tels que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) et les macrophages) et qu'un agoniste du RB₁ active cette enzyme via la PKC. Cette étude a fait l'objet d'une 3^{ème} publication (Haddad *et al.*, 2017b) (**Haddad, Y., Couture, R., Localisation and Interaction between Kinin B1 Receptor and NADPH oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats. *Frontiers in Physiology-Vascular Physiology*. 2017 ; 8(861)**) dans laquelle on a montré que l'activation du RB₁ stimule la PKC β1/2 pour augmenter la production d'O₂^{•-} par la NADPH oxydase dans l'aorte thoracique de rats rendus diabétiques par la STZ. De plus, l'hypothèse de la surexpression et de la colocalisation du RB₁ avec la NADPH oxydase est confirmée dans les CMLV et les macrophages infiltrants dans l'aorte des rats STZ. Alors que le RB₁ était fortement exprimé sur les cellules endothéliales dans les petites artères de résistance (artère poplitée et artères afférentes/efférentes rénales), sa présence était faible dans l'artère de conductance (aorte) chez le rat diabétique STZ. Ces résultats appuient davantage l'implication du RB₁ des kinines dans l'inflammation vasculaire, le stress oxydatif, le rendant un cible thérapeutique attrayante dans le traitement des maladies vasculaires et les complications diabétiques.

Chapitre 1

1- Introduction

1.1 Le diabète

1.1.1 Types de diabète

Dans son dernier rapport, l'organisation mondiale de la santé estime à 422 millions le nombre de personnes vivant avec le diabète dans le monde, dont la majorité décède à la suite d'un taux élevé de cholestérol augmentant le risque d'une atteinte cardiaque et d'un accident vasculo-cérébral. La prévalence des décès causés par le diabète est de 80% de plus dans les pays à revenu faible comparativement aux pays à revenu élevé où le diabète pourrait devenir, selon le même rapport, la 7^{ème} cause de décès dans le monde d'ici 2030 (<http://www.who.int/diabetes/global-report/fr/>).

Selon Diabète Canada, la prévalence du diabète au pays est estimée à 3.4 millions de personnes en 2015 et subira une augmentation de 44% pour atteindre 5 millions en 2025. La prévalence de prédiabète atteint 5.7 millions en 2015 et augmentera de 23.2% en 2025 pour atteindre 6.4 millions (<http://www.diabetes.ca/statistiques-sur-le-diabete-au-canada>). Diabète Québec, dans son rapport publié en Décembre 2014, estime à 830 000 (soit 10% de la population) le nombre des diabétiques au Québec. Le diabète, une maladie incurable qui peut être contrôlée par une médication, l'alimentation et l'activité physique, est responsable de 25% des opérations cardiaques, de 40% des insuffisances rénales et de 50% des amputations d'origine non traumatique. Il est la première cause de dialyse (néphropathie) et de cécité (rétinopathie) chez les adultes de moins de 65 ans avec un fardeau économique de 3 milliards de dollars par année (<http://www.diabete.qc.ca/fr/>).

Pour qu'une personne soit diabétique sa glycémie :

- à jeun doit être supérieure ou égale à 7 mmol/L
- supérieure ou égale à 11 mmol/L 2 h après l'ingestion de 75 g de glucose
- supérieure ou égale à 11 mmol/L à tout moment de la journée
- le taux de l'hémoglobine glyquée (HbA1C) doit être supérieur ou égal à 6,5%.

Les symptômes classiques qui accompagnent le diabète sont : la polyurie (urine abondante), la polydipsie (soif excessive) et une perte de poids inexplicée. Une personne non diabétique doit avoir une glycémie à jeun inférieure ou égale à 5,6 mmol/L, inférieure ou égale à 7,8 mmol/L 2 h après l'ingestion de 75 g de glucose, inférieure ou égale à 6.1 mmol/L à tout moment de la journée (<http://www.diabete.qc.ca/fr/>). Entre ces

deux catégories, le prédiabète se caractérise par une glycémie à jeun entre 6,1 et 6,9 mmol/L, HbA1C entre 6,0 et 6,4% et une glycémie entre 7,8 et 11,0 mmol/L 2 heures après l'ingestion de 75 g de glucose ou OGTT (test de tolérance au glucose par voie orale) (<http://www.diabete.qc.ca/fr/>).

On dénombre plusieurs types de diabète :

1. Diabète de type 1 (dû à la destruction auto-immune des cellules bêta des îlots de Langerhans, conduisant habituellement à une carence absolue en insuline).
2. Diabète de type 2 qui peut aller de la résistance à l'insuline prédominante et de la déficience relative en insuline à un défaut de sécrétion prédominant avec une résistance à l'insuline.
3. Diabète sucré gestationnel (diabète diagnostiqué au deuxième ou au troisième trimestre de grossesse où le diabète n'était pas clairement évident avant la gestation).
4. MODY ou le diabète de début de maturité chez les jeunes, un autre type de diabète dû à d'autres causes, par exemple, des syndromes monogéniques.
5. Autres types de diabète comme les maladies du pancréas exocrine (incluant la fibrose kystique) et le diabète induit chimiquement (par exemple avec l'utilisation de glucocorticoïdes, dans le traitement de VIH / SIDA, ou après transplantation d'organe) (*Appendix 1: Etiologic Classification of Diabetes Mellitus. Canadian Journal of Diabetes, 37, S197. doi: 10.1016/j.jcjd.2013.01.047*).

1.1.1.1 Le diabète de type 1

Le diabète sucré de type 1 (DT1) ou diabète auto-immun, malgré que l'étiologie de la maladie ne soit pas complètement comprise, est une maladie chronique caractérisée par une déficience en insuline due à la destruction des cellules β par des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et par des macrophages qui s'infiltrent dans les îlots de langerhans entraînant une insulino-pénie et une hyperglycémie (Rother, 2007; Katsarou *et al.*, 2017). Alors que l'âge de l'apparition symptomatique est habituellement pendant l'enfance ou l'adolescence, les symptômes peuvent parfois se développer beaucoup plus tard (Atkinson *et al.*, 2014).

La plupart des cas de diabète de type 1 représentent un trouble immunitaire, sinon auto-immun, ce qui signifie que les patients présentent souvent des caractéristiques d'une

contribution immunologique à la pathogenèse de la maladie (autoanticorps ou associations génétiques avec des gènes contrôlant les réponses immunitaires). Cependant, tous les patients atteints de diabète de type 1 n'ont pas ces caractéristiques, ce qui entraîne des classifications distinctes : diabète 1A (auto-immun) dont 70 à 90% des patients atteints de la maladie ont des autoanticorps immunologiques auto-réactifs dirigés contre les cellules des îlots pancréatiques (ICAs, *Islet cell antibody*), l'insuline (IAAs, *Insulin Auto Antibody*), l'acide glutamique décarboxylase (GAD65) et la protéine *tyrosine phosphatase-like* IA-2 et IA- α (IA, *Islet cell antigen*), menant à la destruction des cellules β pancréatiques (Eisenbarth, 2007; Atkinson *et al.*, 2014); diabète de type 1B (idiopathique), caractérisé par un faible niveau d'insuline et de peptide-C, représentant le reste des diabétiques dont la pathogenèse spécifique reste incertaine (Gianani *et al.*, 2010). Un remède n'est pas disponible, et les patients dépendent d'injections d'insuline exogène au cours de leur vie. De nouvelles approches pour le traitement telles que les pompes à insuline, la surveillance continue du glucose, la transplantation du pancréas ou des îlots de cellules β sont en développement (Shapiro *et al.*, 2000; Gibly *et al.*, 2011). Cependant la transplantation d'îlots demeure une procédure expérimentale et les recherches en cours sont axées sur de nouvelles méthodes utilisant des biomatériaux (exemple : l'encapsulation), la modulation immunitaire, le site de livraison des îlots en assurant une meilleure vascularisation. Il serait souhaitable qu'une cellule produisant de l'insuline (cellule souche, îlot cadavérique, etc.), combinée à une barrière immunoprotective (encapsulation) puisse offrir une avancée thérapeutique significative (Tekin *et al.*, 2016). Bien qu'un contrôle sévère de la glycémie ait réduit l'incidence des complications micro-vasculaires et macro-vasculaires, la majorité des patients atteints de DT1 développent encore ces complications.

La libération des espèces réactives oxygénées (ERO) à partir de cellules phagocytaires, peut endommager les cellules adjacentes, ce qui entraîne une augmentation de l'inflammation et l'amplification de l'attaque auto-immune contre les cellules β , contribuant ainsi à la progression rapide de la maladie (Nathan *et al.*, 2010; Delmastro *et al.*, 2011). Cette inflammation est associée à une augmentation des cytokines, telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-10, l'IL-17, le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) et l'interféron γ (IFN- γ), générés par des cellules immunitaires activées dans l'îlot de Langerhans. Des études ont montré que l'IL-1 β seule, ou en association avec le TNF- α et l'IFN- γ , sont des

inhibiteurs puissants de la sécrétion d'insuline chez les îlots humain et de rat, favorisant la dysfonction et la mort des cellules β (Cardozo *et al.*, 2003).

1.1.1.2 Le diabète de type 2

Le diabète de type 2 (DT2) ou insulino-résistant, caractérisé par l'incapacité à utiliser l'insuline, représente 90-95% des cas recensés. Les causes du diabète de type 2 sont complexes et aucun facteur de risque ne peut à lui seul expliquer son évolution. Notons cependant qu'il est associé à l'hérédité, au vieillissement, à l'obésité et à l'inactivité physique. Dans le diabète de type 2, la concentration élevée de glucose dans le sang oblige les cellules β des îlots de Langerhans à sécréter plus d'insuline que la normale. Une hyperinsulinémie s'installe accompagnée d'une résistance à l'insuline.

L'insuline est une hormone anabolisante et hypoglycémisante qui intervient dans la captation du glucose par les cellules musculaires et qui augmente le stockage du glucose sous forme de glycogène (Irimia *et al.*, 2017; Ashcroft *et al.*, 2017). Le gène de l'insuline humaine est situé sur le bras court du chromosome 11 à proximité du gène de l'*insulin-like growth factor 2* (IGF-2). Dans le reticulum endoplasmique, la pré-pro-insuline est clivée par des enzymes protéolytiques, formant ainsi la pro-insuline (contenant les chaînes A et B de l'insuline connectées entre elles par le peptide C) qui est transportée dans des vésicules vers l'appareil de Golgi où sous l'action des endopeptidases (les prohormones convertases 2 et 3) et la carboxypeptidase H, la pro-insuline est clivée en peptide C et insuline lesquels sont stockés dans des vésicules en attente à l'exocytose (Melloul *et al.*, 2002) (Fig.1).

Suite à une hyperglycémie, le glucose entre dans les cellules β pancréatiques via le GLUT 2; il sera utilisé principalement par la voie de la glycolyse et la respiration oxydative. Ce métabolisme du glucose est à l'origine de la production de l'ATP qui agit en inactivant les canaux K^+ ATP-dépendant provoquant ainsi une dépolarisation qui aboutira finalement à l'augmentation massive de la concentration cytosolique de Ca^{++} et à la stimulation de l'exocytose des grains de sécrétion d'insuline (Gerber *et al.*, 2002; Henquin, 2004) (Fig.1).

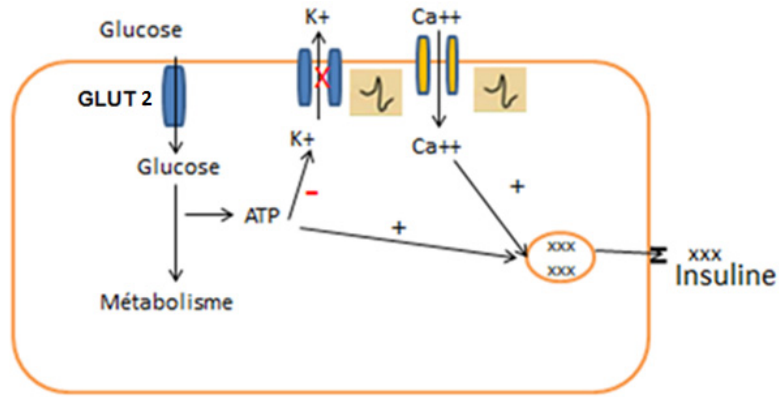


Fig. 1 : Exocytose de l'insuline dans une cellule β du pancréas. Adapté de (Henquin, 2004).

L'insuline par action sur ses récepteurs permet aux vésicules contenant les GLUT4 (transporteurs de glucose 4) dans le cytosol de migrer à la surface membranaire des cellules du muscle squelettique, du muscle lisse, du cœur et du tissu adipeux et cela permet l'entrée de glucose dans la cellule (Thong *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2008) (Fig.2).

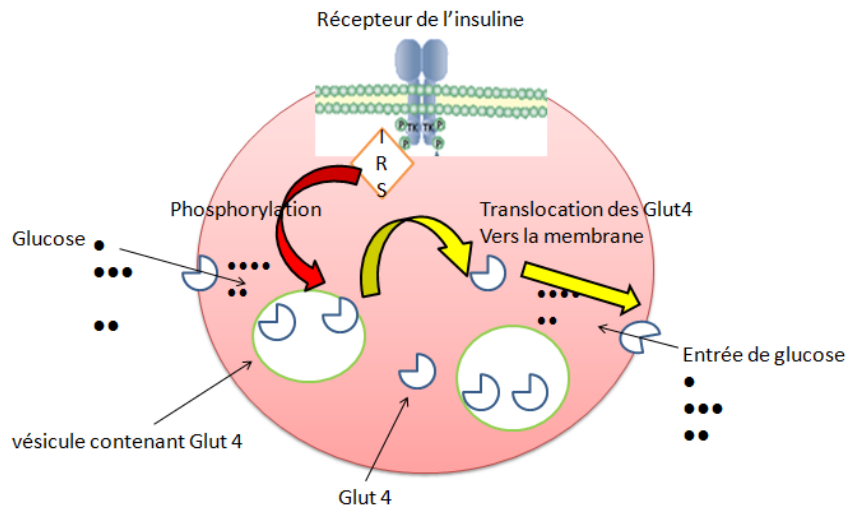


Fig. 2 : La régulation du GLUT4 par l'insuline. Adapté de Thong et al. (2005).

Le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine membranaire, formée de deux sous-unités α extracellulaires et de deux sous-unités β intracellulaires à activité tyrosine kinase. L'insuline se lie aux sous-unités α et cause un changement de conformation du récepteur qui subit une autophosphorylation en activant son récepteur endogène, à tyrosine kinase, l'IRS-1 (insulin receptor substrate) qui, à son tour, phosphoryle d'autres protéines cibles en activant les voies Ras, Raf, ERK, MAPK et la voie du PI3K (phosphatidylinositol-3

kinase), Akt, PKC (Fig.3). L'insuline nécessite une famille de protéines d'échafaudage (protéines IRS) pour intégrer les signaux extracellulaires dans les réponses intracellulaires. Il existe deux principales protéines IRS chez l'homme, IRS-1 et IRS-2, qui sont largement exprimées dans la plupart des tissus humains (et mammifères). L'IRS-1 joue un rôle majeur dans les muscles squelettiques contrairement à l'IRS-2 qui contribue à la régulation hépatique de l'action de l'insuline et à la sécrétion de l'insuline. Une troisième protéine, IRS-4, est principalement exprimée dans l'hypothalamus, les glandes thyroïdes et l'hypophyse. En outre, les humains ne possèdent pas un gène fonctionnel de l'IRS-3 qui est largement limité au tissu adipeux chez les rongeurs (De Meyts, 2000; Sadagurski *et al.*, 2014).

Bien que similaires dans la structure et la séquence, les protéines IRS possèdent des rôles distincts dans la physiologie des mammifères. Les souris mâles dépourvues d'IRS1^{-/-} ont une petite taille et une augmentation de la masse des cellules bêta accompagnée de légers troubles métaboliques. En revanche, les souris mâles IRS2^{-/-} ont une taille normale mais développent un diabète, en raison de la résistance à l'insuline hépatique et périphérique et de l'insuffisance des cellules bêta pancréatiques (Lavin *et al.*, 2016).

La stimulation de ces voies active le métabolisme du glucose par le déplacement des GLUT4 vers la membrane cellulaire, la synthèse des protéines et la différenciation des cellules musculaires (Nieto-Vazquez *et al.*, 2008) (Figs 2 et 3).

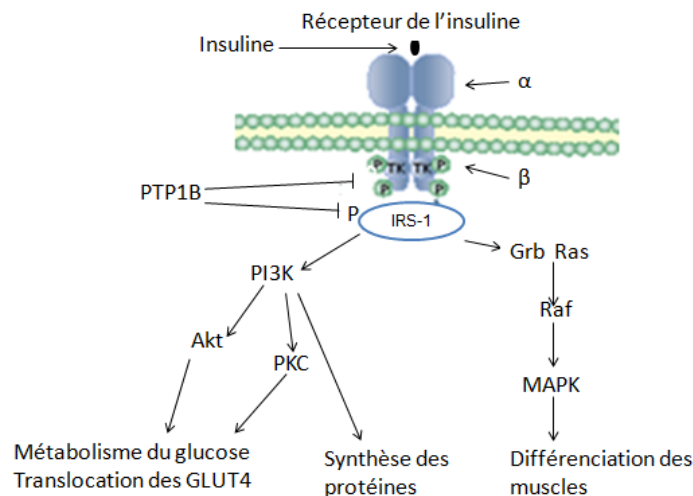


Fig.3 : Signalisation du récepteur à l'insuline. Adapté de Nieto-Vasquez et al. (2008).

En état physiologique, les taux de glucose et d'insuline sont directement reliés, ce qui veut dire que quand le glucose augmente dans le sang, le pancréas libère l'insuline pour y faire face et le ramener à la normale. Mais si le taux de glucose reste élevé dans le sang suite à un régime alimentaire riche en gras ou en hydrates de carbone, une hyperglycémie s'installe suivie d'une hyperinsulinémie.

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

Cet excès de glucose entre dans la cellule grâce au transporteur GLUT1, présent dans les vaisseaux (Camenzind *et al.*, 2010; Barathi *et al.*, 2010) et dans d'autres tissus (le foie, le rein, la rétine, le système nerveux, etc.), et devient toxique puisque le GLUT1 n'est pas régulé par l'insuline. L'entrée exagérée de glucose augmente le stress oxydatif dans la cellule et provoque un état inflammatoire dans les vaisseaux et les nerfs, diminuant la production du NO et sa biodisponibilité et, par conséquent, diminue son action vasodilatatrice et la fonction endothéliale (He *et al.*, 2004). Dans un milieu oxydatif, la formation du peroxynitrite (ONOO^-) cause la nitration de la tyrosine de l'IRS-1—et diminue sa capacité d'être phosphorylé à la tyrosine (Charbonneau *et al.*, 2010).

Dans les conditions d'hyperglycémie, l'accumulation de métabolites dans la voie de la glycolyse, comme le glycéraldéhyde 3-phosphate, conduit à la synthèse du diacylglycérol (Sadagurski *et al.*, 2014) qui, à son tour, recrute la protéine kinase C (PKC) et la rend compétente (Fig. 4). Une fois activée, la PKC augmente le stress oxydatif, déplace le NF- κ B vers le noyau déclenchant la transcription de plusieurs gènes incluant le récepteur B_1 des kinines (RB_1) et les cytokines pro-inflammatoires (Fig. 4). Le TNF- α à son tour active la protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) qui inhibe le récepteur IRS-1 par la déphosphorylation au niveau de la tyrosine (Fig. 4). Ceci empêche le déplacement des GLUT4 et aboutit à la résistance à l'insuline (He *et al.*, 2004; Nieto-Vazquez *et al.*, 2008).

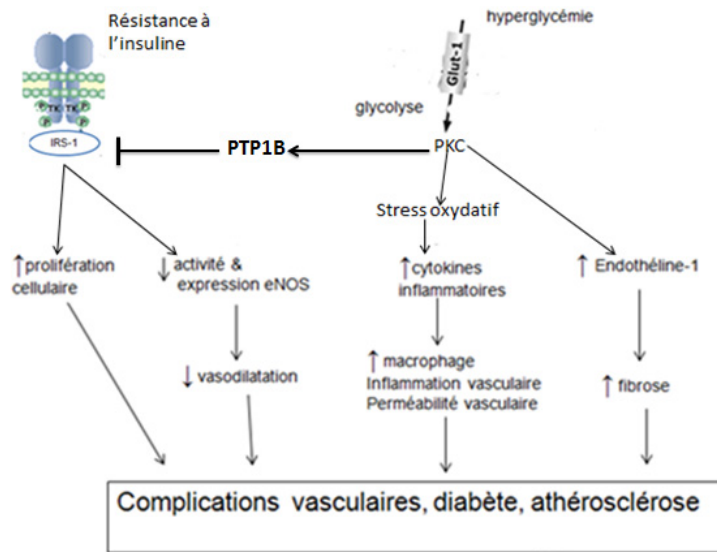


Fig. 4 : Pathogénèse des complications vasculaires chez les diabétiques insulino-résistants. Adapté de He et al. (2004).

1.1.1.3 Diabète gestationnel

Le diabète sucré gestationnel (DMG) est un trouble métabolique défini comme toute réduction du degré de tolérance au glucose qui commence pendant la grossesse. Les facteurs de risque maternel tels que l'obésité et le gain de poids excessif pendant la grossesse peuvent avoir des effets négatifs sur le traitement du diabète et sur les résultats néonataux (Lowe *et al.*, 2012). Le gain de poids total recommandé, basé sur l'indice de masse corporelle avant la grossesse a déjà été rapporté dans la littérature (Marceau *et al.*, 2004) et il varie de 7 kg à 11 kg et de 5 kg à 9 kg pour les patients obèses et en surpoids, respectivement (Metzger *et al.*, 2010). Le traitement du DMG consiste initialement en un régime et l'exercice dans le but de réduire la morbidité maternelle et fœtale. Environ 10% à 20% des patients ont besoin d'une intervention pharmaceutique (Coustan *et al.*, 2010).

1.1.1.4 MODY

Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) est une forme monogénique de diabète chez les patients âgés de moins de 25 ans. C'est un trouble hétérogène dû à des mutations monogéniques hétérozygotes avec une transmission autosomique dominante. Les mutations concernent des gènes directement impliqués dans la fonction de la cellule bêta. Chez les patients atteints de diabète non syndromique, plus de 99% de la MODY résulte

des mutations au niveau du facteur nucléaire 1 de l'hépatocyte (HNF-1-alpha, anciennement MODY 3), de la glucokinase (MODY 2) ou du HNF-4-alpha (MODY 1). Les symptômes se manifestent lentement avec l'absence d'obésité et de cétose dans la plupart des cas. La MODY est généralement traitée par un régime alimentaire, des médicaments oraux pour le diabète ou de l'insuline. Le traitement et le pronostic varient en fonction de la mutation génétique (Heuvel-Borsboom *et al.*, 2016).

La prévalence de la MODY reste inconnue, mais elle est estimée être responsable de 1 à 5% des cas de diabète sucré (Irgens *et al.*, 2013; Antosik *et al.*, 2017). La MODY partage les caractéristiques cliniques avec les formes les plus communes de diabète sucré, la prévalence réelle est probablement sous-estimée. À l'heure actuelle, des mutations dans 13 gènes liés à différents types de MODY ont été identifiées. Les sous-types actuellement connus de MODY sont décrits avec leurs protéines/gènes apparentés et leurs prévalences estimées. En général, GCK-MODY (Bishay *et al.*, 2016) et HNF1A-MODY représentent chacun 20 à 70% de tous les cas (Messaaoui *et al.*, 2016), HNF4A-MODY et HNF1B-MODY représentent chacun environ 5% tandis que les autres formes sont extrêmement rares (Heuvel-Borsboom *et al.*, 2016) (Fig. 5).

MODY type	Protein/ gene	Relative prevalence	Clinical features
1	Hepatocyte nuclear factor-4 alpha (HNF4A)	~ 5 %	Neonatal hyperinsulinaemia and hypoglycaemia with associated macrosomia, gestational diabetes, low serum levels of cholesterol, marked sensitivity to sulfonylurea derivatives
2	Glucokinase (GCK)	20-70%	Mild fasting hyperglycaemia throughout life, often asymptomatic, gestational diabetes, low birth weight (with unaffected mother)
3	Hepatocyte nuclear factor-1 alpha (HNF1A)	20-70%	Diminished renal threshold for glycosuria, marked sensitivity to sulfonylurea derivatives
4	Insulin promoter factor 1 (IPF1) or pancreas/duodenum homeobox protein 1 (PDX1)	Rare: < 1%	Pancreatic agenesis
5	Hepatocyte nuclear factor-1 beta (HNF1B)	~ 5 %	Renal abnormalities and insufficiency at young age, diabetes often diagnosed later, hypomagnesaemia, hyperuricaemia, pancreatic atrophy or partial agenesis, exocrine pancreatic dysfunction, liver test abnormalities, genital abnormalities

Fig. 5 : Types actuels de MODY avec leurs mutations et caractéristiques cliniques adapté de (Heuvel-Borsboom *et al.*, 2016).

1.2 Le stress oxydatif et son lien avec le diabète

Le métabolisme et les fonctions physiologiques de l'organisme génèrent des radicaux libres qui sont compensés par des antioxydants dans l'état physiologique normal. La

pollution, le tabagisme, l'alcool, le vieillissement, une nourriture pauvre en vitamines C et E, en polyphénols (antioxydants) ou encore une baisse dans la défense enzymatique (glutathion peroxydase, catalase, superoxyde dismutase), peuvent faire pencher la balance (radicaux libres vs antioxydants) du côté des radicaux libres, augmentant le stress oxydant et ses effets nocifs sur le métabolisme (Fig. 6).

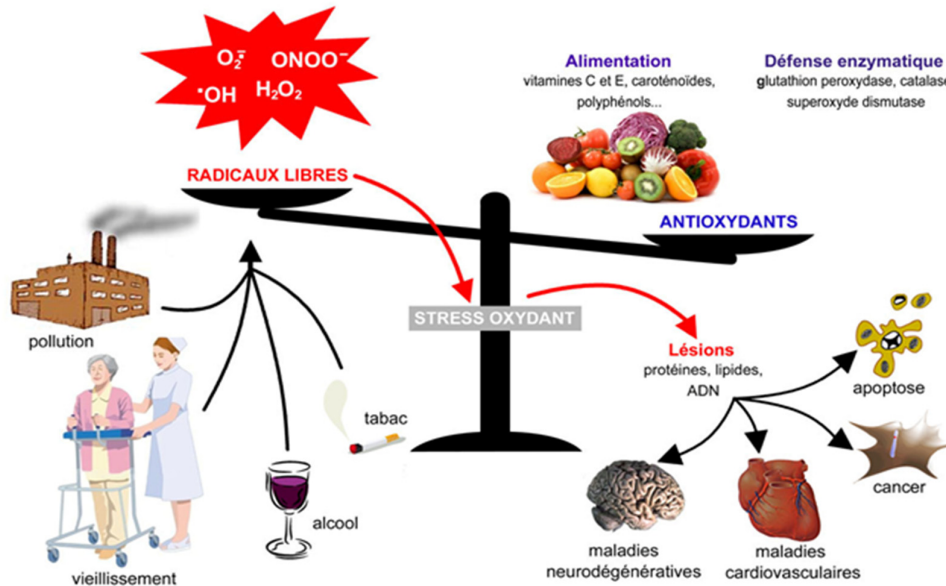


Fig. 6: Le stress oxydatif tiré de : (http://www.nature-algues.com/images/balance_antioxydante2.jpg).

Cet équilibre est rompu en faveur des radicaux libres lorsque le niveau des antioxydants baisse ou lorsque le métabolisme enzymatique est dérégulé, lors d'une hyperglycémie persistante dans le diabète sucré, générant une plus grande formation des espèces réactives d'oxygène (ERO) (Katsarou *et al.*, 2017). Les ERO mieux connus sont : l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (OH^{\bullet}). Les oxydants contenant de l'azote, tels que le monoxyde d'azote (NO^{\bullet}) et le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) sont appelés espèces réactives d'azote (ERN).

1.2.1 Les antioxydants

Parallèlement à la surproduction des ERO et des ERN, une réduction de l'activité et de la concentration des enzymes antioxydantes (glutathion peroxydase, catalase, superoxyde dismutase) est constatée (Polidori *et al.*, 2004). Ceci provoque un dysfonctionnement endothélial, une résistance à l'insuline et des complications du diabète sucré (Bandeira. *et al.*, 2013). Avec ses trois isoformes localisées dans différents endroits subcellulaires, la

superoxyde dismutase, SOD, une enzyme antioxydante, est le mécanisme majeur de défense contre l'augmentation de la production de l'anion superoxyde. En raison de son emplacement cytosolique, la SOD1 joue un rôle important dans la fonction endothéliale en protégeant la libération de NO de l'endothélium. La SOD2 est une enzyme contenant du manganèse (MnSOD), localisée dans la matrice mitochondriale. La SOD extracellulaire sécrétoire contenant du cuivre/zinc (EC-SOD) est localisée dans l'espace extracellulaire vasculaire (Fukai *et al.*, 2011). L'anion superoxyde est converti par la SOD en H₂O₂ qui sera ensuite converti en H₂O soit par la catalase, où la principale fonction attribuée à la catalase est la transformation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et H₂O (2 H₂O₂ → 2 H₂O + O₂) (Heck *et al.*, 2010; Goyal *et al.*, 2010; Glorieux *et al.*, 2015) soit par le glutathion peroxydase (GPx) (Fig.7). Le glutathion peroxydase est une enzyme sélénium-dépendante localisée dans le cytosol, le noyau, les mitochondries du foie, du cerveau, du cœur et des muscles. Il existe plusieurs isoformes (Gpx1-8) : GPx-1 (cellulaire), GPx-2 (gastrointestinal), GPx-3 (extracellulaire) et GPx-4 (hydroperoxide phospholipidique).

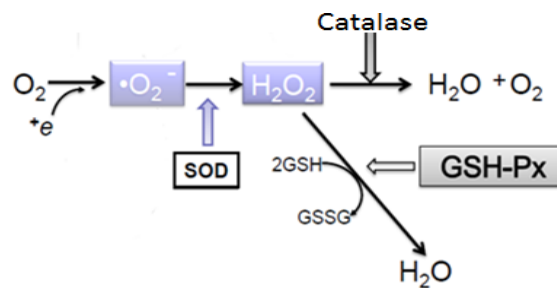


Fig. 7 : Isoformes de SOD. Adapté de (Fukai *et al.*, 2011).

Le glutathion peroxydase 1 (GPx1) est considéré comme la principale enzyme antioxydante de la famille GPx, omniprésent et principalement présent dans le cytosol où il piège les espèces de peroxydes hydrophiles telles que H₂O₂ (Brigelius-Flohe *et al.*, 2013). Le glutathion peroxydase 2 (GPx2) est exprimé dans le système gastro-intestinal et dans le foie des mammifères et de l'homme (Brigelius-Flohe *et al.*, 2013). Le glutathion peroxydase 3 (GPx3) est produit principalement dans les tubules proximaux du rein et dans la plupart des fluides extracellulaires (Brigelius-Flohe *et al.*, 2013). Le glutathion peroxydase 4 (Gpx4) est un antioxydant intracellulaire majeur qui répare la peroxydation lipidique (Conrad *et al.*, 2015). Tous les membres de la famille GPx partagent la même fonction de base dans la réduction des peroxydes aux dépens du glutathion (GSH), ou

d'autres composés contenant du thiol dans le cas des monomères Gpx4, Gpx7 et Gpx8. Le GPx6 s'est révélé être une sélénoprotéine chez l'homme mais pas chez le rat ou la souris et il est exprimé dans l'épithélium olfactif. Les GPx7 et GPx8 sont également des Cystéine-GPx à faible activité GPx (Brigelius-Flohe *et al.*, 2013).

1.2.2 Sources du stress oxydatif dans le diabète

Dans le diabète, le stress oxydatif peut être induit soit par une voie **non enzymatique**, soit par une voie **enzymatique** (Fig. 8).

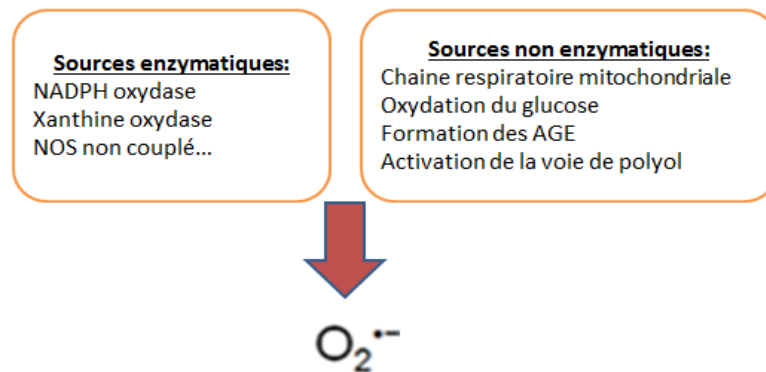


Fig. 8 : Les radicaux libres dans le diabète. Adapté de (Johansen *et al.*, 2005; Dhodi *et al.*, 2014).

1.2.2.1 L'origine non enzymatique des radicaux libres a lieu soit dans la chaîne respiratoire des mitochondries par les cytochromes (CYP) P450, qui oxydent, peroxydent et/ou réduisent le cholestérol, les vitamines, les stéroïdes, les xénobiotiques et de nombreuses substances pharmacologiques d'une manière dépendante de l'oxygène et de la NADPH. La plupart des CYP sont principalement exprimés dans le foie, avec des niveaux d'expression significativement plus faibles dans les tissus extra-hépatiques. Les CYP exprimés dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses peuvent contribuer à la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène dans la paroi vasculaire (CYP2C, CYP2E) (Puntarulo *et al.*, 1998; Andreyev *et al.*, 2005).

La chaîne mitochondriale de transport d'électrons est composée de cinq complexes: la NADH ubiquinone oxydoréductase en complexe I, la succinate-ubiquinone oxydoréductase en complexe II, l'ubiquinone cytochrome-c oxydoréductase en complexe III, la cytochroméoxydase en complexe IV et l'ATP synthase en complexe V. Le complexe I est le point d'entrée pour le transfert d'électrons, acceptant les électrons du

NADH2 qui sont transférés au complexe III via l'ubiquinone puis au complexe IV via le cytochrome c. Le transfert de protons qui accompagne le transport d'électrons crée un gradient qui fournit l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP (Bayir *et al.*, 2008; Vartak *et al.*, 2013) (Fig. 9).

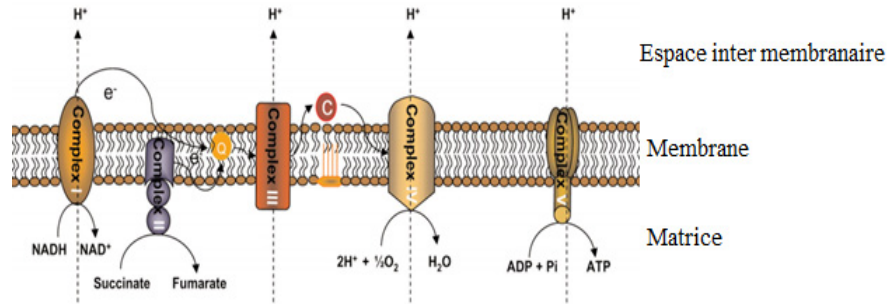


Fig. 9 : Chaîne respiratoire mitochondriale. Adapté de (Vartak *et al.*, 2013).

Dans les mitochondries, l'anion superoxyde peut être produit par des complexes respiratoires et des enzymes individuelles sur la membrane mitochondriale externe, des deux côtés de la membrane mitochondriale interne et dans la matrice (Turrens, 2003). La contribution relative de chaque site à la production globale de l'anion superoxyde est dépendante de l'état tissulaire et respiratoire. Le complexe I dans le cerveau (Barja, 1999; Koopman *et al.*, 2010), le complexe III dans le cœur et le poumon (Turrens, 2003) semblent être les principales sources de production de superoxyde mitochondrial dans des conditions normales et le complexe II dans de faibles conditions de substrat (Quinlan *et al.*, 2012). Lorsque la chaîne de transport des électrons est dérégulée ou perturbée, en particulier au niveau des complexes I et/ou III, la production et la libération de radicaux superoxyde augmentent où l'O₂, qui se trouve dans le complexe IV, est le dernier accepteur d'électrons (Holzerova *et al.*, 2015; Dan Dunn *et al.*, 2015) (Fig. 10).

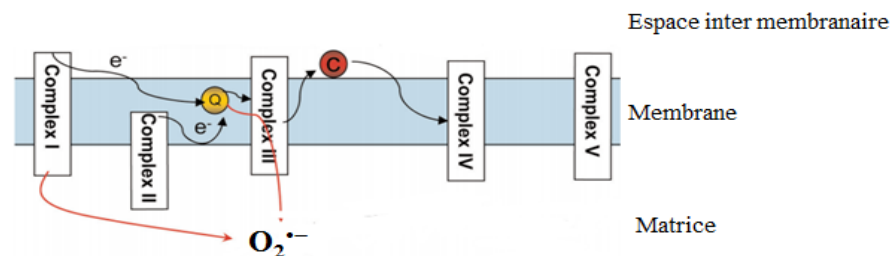


Fig. 10 : Chaîne de transport d'e⁻ mitochondrial. Adapté de (Bayir *et al.*, 2008).

L'auto-oxydation du glucose génère des radicaux OH⁻, des produits terminaux de glycation dans le métabolisme du glucose par la voie du polyol (glucose + aldose réductase → sorbitol) dont l'aldose réductase contribue au stress par la production d'O₂^{•-} en grande quantité (Cellier *et al.*, 2003; Dhodi *et al.*, 2014) (Fig. 11).

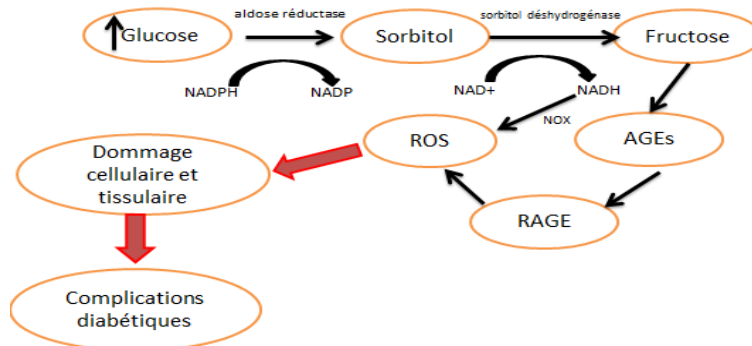


Fig. 11 : Les produits glyqués et les ERO dans le diabète. Adapté de (Dhodi *et al.*, 2014).

Dans le diabète, l'activation de ces voies intracellulaires, y compris la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, l'aldose réductase et l'auto-oxydation du glucose conduit à la formation intracellulaire d'AGEs (des produits terminaux de glycation). De même, le fructose et le sorbitol réagissent de manière non enzymatique avec des protéines, des lipides et des acides nucléiques pour produire des AGEs qui conduisent à l'activation d'un récepteur membranaire spécifique (RAGE). La PKC (activée par la voie du polyol) et l'activation des RAGE contribuent au stress par la production de l'O₂^{•-} via la NADPH oxydase (Couture *et al.*, 2014; Voltan *et al.*, 2016; Aghadavod *et al.*, 2016; Turkmen, 2017) (Fig. 12).

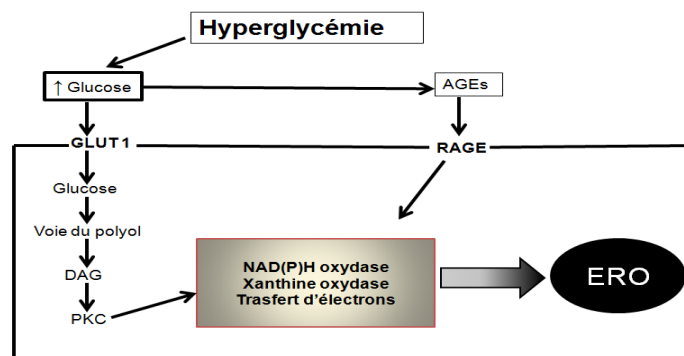


Fig. 12 : Présentation schématique de la formation des ERO induits par l'hyperglycémie. Adapté de Couture *et al.* (2004).

Des réactifs dicarbonylés intracellulaires réagissent avec les groupes amines des protéines intracellulaires pour former des AGEs. Ces réactifs sont produits au niveau intracellulaire par l'auto-oxydation du glucose en glycoxal, de la décomposition des produits Amadori en 3-désoxyglucosone (3-DG) ou par la fragmentation du glycéraldéhyde-3-phosphate pour donner des méthylglycoxals. La 3-DG est aussi issue de la voie du polyol (Brownlee, 2001) (Fig.13).

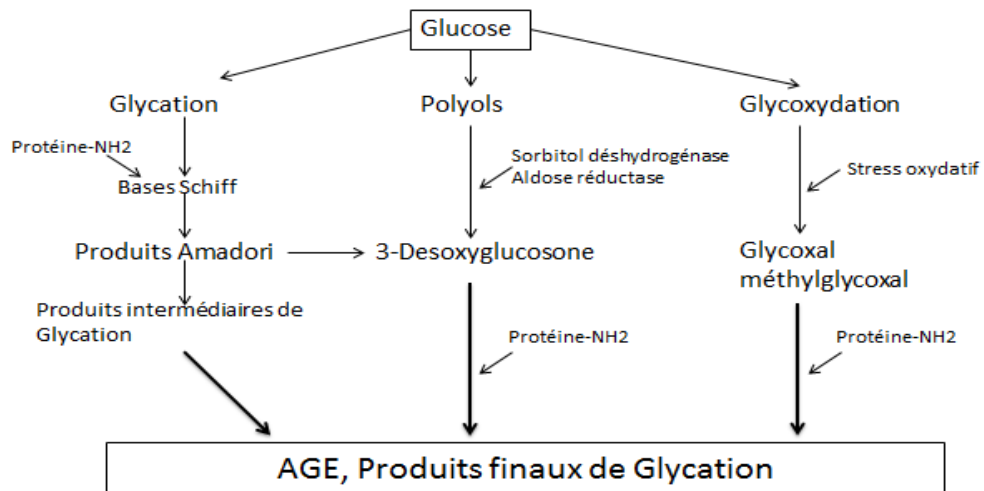


Fig. 13 : Mécanisme de formation des produits finaux glyqués. Adapté de (Brownlee, 2001).

Des résidus de lysine spécifiques dans l'hémoglobine et l'albumine humaine ont été identifiés comme des sites préférentiels de glycation. D'autres protéines riches en lysine, IgG et IgM (immunoglobulines G et M), se sont révélées être glyquées chez les patients atteints de diabète. La glycation peut également avoir lieu sur les résidus d'arginine, d'histidine, de tryptophane et de cystéine (Ansari *et al.*, 2013).

1.2.2.2 L'origine enzymatique réfère à la production des radicaux par la NADPH oxydase, la xanthine oxydase et la eNOS découplée (Fig. 14).

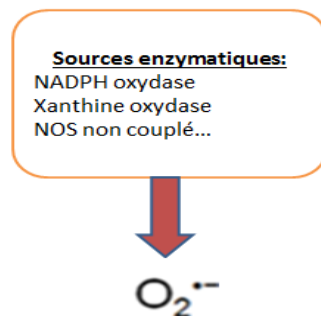


Fig. 14 : Le stress dans le diabète. Adapté de (Johansen *et al.*, 2005; Bayir *et al.*, 2008; Dhodi *et al.*, 2014)

En dehors des mitochondries, la NADPH oxydase, (en particulier dans les neutrophiles polymorphonucléaires, les macrophages et les cellules endothéliales) et la xanthine oxydase sont les principales sources de production de l'anion superoxyde (Bayir *et al.*, 2008).

Le NO, dans un milieu oxydatif, entre en réaction avec l'anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$ pour former le peroxynitrite $ONOO^-$, très délétère par ses effets, incluant : la peroxydation des lipides (membranes), la nitration des protéines (enzymes, transporteurs, canaux ioniques) et l'action dommageable sur l'ADN (modifiant l'expression des gènes) (Johansen *et al.*, 2005) (Fig.15).

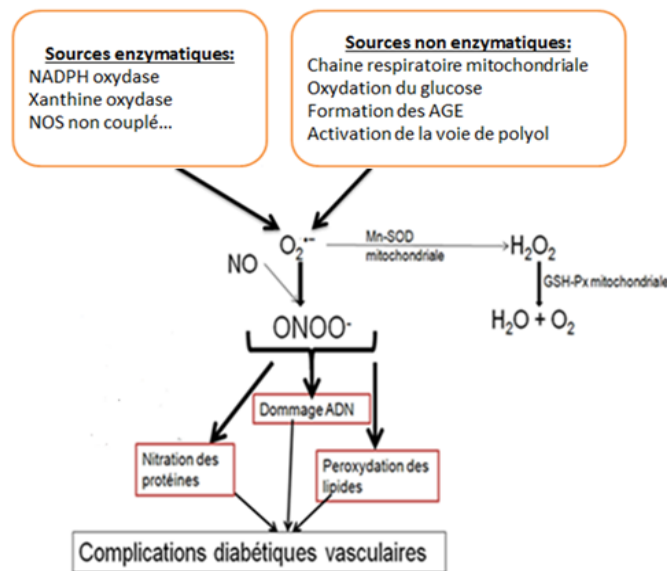


Fig. 15 : Les radicaux libres dans le diabète. Adapté de (Johansen *et al.*, 2005).

1.2.2.2.1 La NADPH oxydase et ses isoformes : Les enzymes NOX sont des complexes d'hétéroprotéines (sauf NOX 5) avec des mécanismes de régulation très spécifiques, des modes d'expression tissulaires et subcellulaires, des cibles et des fonctions en aval. Les NOX se trouvent dans les cellules endothéliales (CE), les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), les macrophages, les myocytes cardiaques et les fibroblastes, les adipocytes, les cellules souches, les neurones, les astrocytes et la microglie (Bedard *et al.*, 2007).

La NADPH oxydase classique, découverte au début dans les neutrophiles, est une enzyme à six domaines transmembranaires qui participe au transfert d'électrons, catalyse la génération de l'anion superoxyde à partir de l'oxygène et la forme réduite de NADPH : $NAD(P)H + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} + NAD(P)^+ + H^+$. Cette enzyme est composée de deux sous-

unités membranaires (p22^{phox}, gp91^{phox}), de trois sous-unités cytosolique (p67^{phox}, p47^{phox} et p40^{phox}) et d'une petite protéine G Rac (Rac1 et Rac2) (Fig. 16).

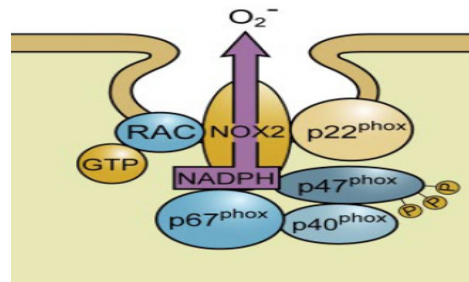


Fig. 16 : NADPH oxidase. Adapté de (Bedard *et al.*, 2007).

Le flux d'électrons et la production d'ERO sont étroitement contrôlés par les interactions des sous-unités NOX avec d'autres protéines, la phosphorylation des sous-unités, ou l'élévation du calcium. Il existe sept isoformes de NADPH oxydases exprimées chez les mammifères: NOX 1, NOX 2, NOX 3, NOX 4, NOX 5, DUOX1 et DUOX2. Quatre (NOX 1, NOX 2, NOX 4 et NOX 5) sont le plus souvent exprimées dans les cellules vasculaires, alors que les autres isoformes n'ont pas été trouvées ou sont exprimées à des niveaux très bas (Kleniewska *et al.*, 2012; Konior *et al.*, 2014).

NOX2 : le premier membre découvert de la famille NADPH oxydase, également connu sous le nom de gp91^{phox}, est la sous-unité catalytique d'un complexe enzymatique qui, lors de son activation, utilise le NADPH pour réduire l'oxygène moléculaire en anion superoxyde. NOX 2 est connu pour être essentiel dans la défense innée de l'hôte, à la fois en produisant des ERO pour attaquer les envahisseurs après la phagocytose et en agissant comme une molécule de signalisation pour initier un certain nombre de réponses inflammatoires et immunoprotectives (Bedard *et al.*, 2007).

Les sous-unités catalytiques du NOX comprennent un domaine N-terminal, un domaine C-terminal déshydrogénase cytosolique, un cofacteur FAD et un site de liaison au substrat NADPH. Lors de l'activation, deux électrons sont transférés du NADPH cytosolique à FAD et successivement à travers la membrane, puis chaque électron réduit une molécule d'oxygène en un radical superoxyde, qui est ensuite libéré à l'extérieur de la cellule ou dans un compartiment équivalent, tel que la lumière d'une vésicule. L'anion superoxyde est la première espèce réactive oxygénée produite dans une cascade de métabolites, y compris le peroxyde d'hydrogène et le peroxyde nitrite (Lassegue *et al.*, 2004).

A l'état de repos, gp91^{phox} et p22^{phox} forment un complexe membranaire inactif appelé cytochrome b558 en raison de son absorption maximale à 558 nm (Wallach *et al.*, 1997), tandis que les autres sous-unités dormantes forment un trimère dans le cytosol avec p67^{phox} liant p47^{phox} et p40^{phox} (Sumimoto, 2008) (Fig. 17).

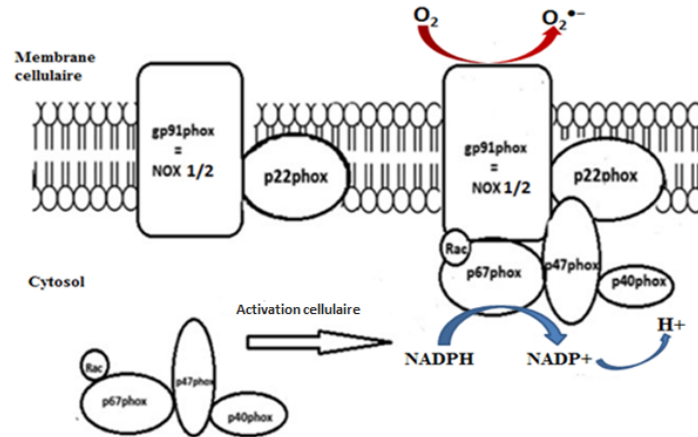


Fig. 17 : Activation de NOX1 et 2. Adapté de (Kleniewska *et al.*, 2012).

Les cascades de signalisation, via la voie de la PKC, activent Rac, p47^{phox} (*NOX organiser protein 1 (NOXO1)* initialement découvert en tant que régulateurs NOX1), p40^{phox} (*NOX activator protein 1 (NOXA1)*) et permettent la translocation des sous-unités cytosoliques à la membrane et l'association avec le cytochrome b558 pour former une enzyme active augmentant la production de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). Cette dernière peut être libérée à l'extérieur de la cellule bien que la NOX 2 située sur la membrane plasmique peut intercepter le NO, dérivé de l'endothélium, avant d'atteindre les cellules musculaires lisses vasculaires (Raad *et al.*, 2009).

NOX 1 : a été identifiée comme première homologue de NOX 2 (Banfi *et al.*, 2004). Elle partage une identité de séquence d'acides aminés de 60% avec NOX 2. Similaire à son homologue phagocytaire, NOX 1 contient six domaines transmembranaires et des motifs conservés correspondant aux sites de liaison de l'hème, de la flavine et du NADPH. NOX 1 est exprimé dans l'épithélium du côlon, les cellules endothéliales, musculaires lisses et adventices du système vasculaire (Fernandes *et al.*, 2009). L'activité NOX 1 nécessite p22^{phox}, p47^{phox}, et p67^{phox}, et la GTPase Rac. Les ERO générés par la NOX 1 jouent un rôle central dans la signalisation cellulaire, la croissance cellulaire, l'angiogenèse, la motilité cellulaire et contribuent à un nombre croissant de maladies vasculaires, comme

l'athérosclérose, l'hypertension, les troubles neurologiques, l'inflammation et le cancer (Cifuentes *et al.*, 2006; Nauseef, 2008).

La p22^{phox} est phosphorylée sur les résidus thréonine par la PKC (Dahan *et al.*, 2002). Tous les NOX à l'exception de NOX 5 semblent avoir un besoin obligatoire de p22^{phox} (Takeya *et al.*, 2006). La p67^{phox} est phosphorylée sur ses résidus sérine et thréonine par des voies PKC agissant comme un lien entre p40^{phox} et p47^{phox} (Dang *et al.*, 2003). La protéine p47^{phox} agit comme un connecteur entre les composants de la membrane et ceux dans le cytoplasme en stabilisant le complexe de p67^{phox}-p47^{phox} phosphorylé par PKC (Babior *et al.*, 2014).

NOX 3 : montre 58% de similarité avec gp91^{phox}. NOX 3 a été détecté dans plusieurs tissus fœtaux, y compris les reins, le foie, les poumons et la rate (Banfi *et al.*, 2004) (Fig. 18).

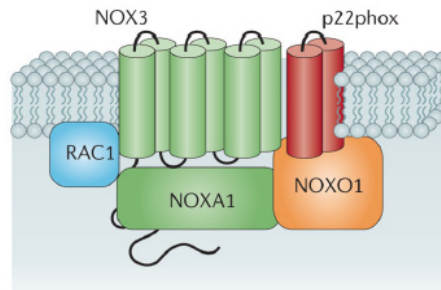


Fig. 18 : NOX 3. Adapté de (Drummond *et al.*, 2011).

NOX 4 : montre 39% homologie avec gp91^{phox}. NOX 4 génère principalement H₂O₂. Il a été décrit comme un homologue de la NADPH oxydase présente dans les cellules endothéliales et musculaires lisses des vaisseaux rénaux, cardiaques et pancréatiques (Clemens *et al.*, 2007). Lors de son activation, la NOX 4 n'a pas besoin de p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} ou Rac pour générer principalement du H₂O₂ (Chen *et al.*, 2008) (Fig. 19).

NOX 5 : La NOX5-Calcium-dépendante, est régulée par des niveaux élevés de Ca²⁺ intracellulaire ce qui peut conduire à une production excessive des ERO. Elle a été identifiée dans les tissus lymphoïdes humains, les testicules, la rate et les cellules endothéliales (Schulz *et al.*, 2008). La NOX 5 participe à la prolifération des cellules endothéliales, la migration et l'angiogenèse, ainsi qu'aux dommages oxydatifs dans l'athérosclérose. La thrombine, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), l'Ang II et l'endothéline-1 sont tous des agents d'activation de NOX 5 (Montezano *et al.*,

2011). Les génomes de souris et de rat n'incluent pas le gène de la NOX 5 présente chez les primates seulement (Drummond *et al.*, 2014) (Fig. 19).

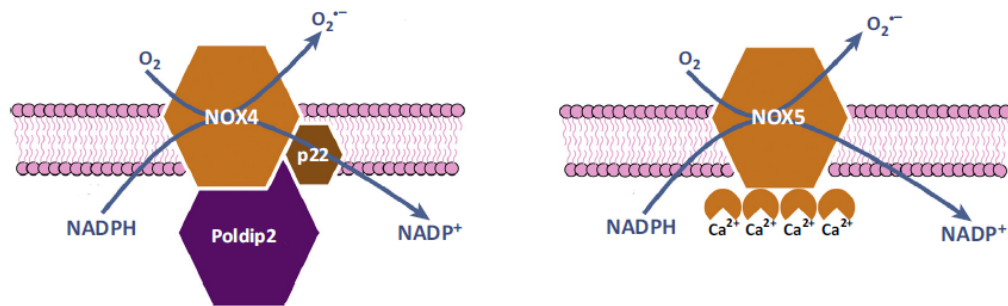


Fig. 19 : NOX 4 et 5. Adapté de (Drummond *et al.*, 2014).

Dans des conditions normales, les DUOX 1 et 2 sont fortement exprimées dans la glande thyroïde, la glande salivaire, le tractus gastro-intestinal, l'épithélium respiratoire et le tissu mammaire (Carvalho *et al.*, 2013). DUOX1 et DUOX2, calcium-dépendant, sont les seules protéines produisant directement H₂O₂ à l'extérieur des cellules au niveau de la membrane plasmique apicale, alors que les autres NOX sont pour la plupart des générateurs de l'anion superoxyde.

L'activité de la DUOX1 se fait via la phosphorylation par la PKA, alors que l'activation de la DUOX2 nécessite la phosphorylation par la PKC (Rigutto *et al.*, 2009). Le *peroxidase-like domain* a été identifié comme essentiel pour la fonction peroxydase des DUOX (Nauseef, 2001).

Tous les membres de la famille NOX possèdent six domaines transmembranaires contenant les deux régions de liaison de l'hème et une longue extrémité C-terminale cytoplasmique qui contient les régions de liaison FAD et NADPH. Ces NOX sont connues pour jouer un rôle important dans les états pathologiques vasculaires les plus courants tels que l'athérosclérose, l'hypertension et le diabète (Carvalho *et al.*, 2013).

1.2.2.2.1.1 Induction des NOXs

Les isoformes de la NADPH oxydase (NOX 1, NOX 2, NOX 4 et NOX 5), détectées dans le tissu vasculaire, jouent un rôle significatif dans la génération des ERO, surtout les NOX 1/2 qui restent la principale source de l'anion superoxyde dans les différents types cellulaires du système vasculaire. Des études ont montré que l'activité et l'expression des

NOXs augmentent chez des rats et des souris diabétiques ou exposés aux AGE (Wendt *et al.*, 2005; Gavazzi *et al.*, 2006; San Martin *et al.*, 2007).

Les NOXs sont induites par des agonistes vasoactifs (Ang II, thrombine), l'hormone thyroïdienne, l'activateur du plasminogène (Lassegue *et al.*, 2001), l'urokinase (Menshikov *et al.*, 2006), des cytokines proinflammatoires (TNF et IL-1 β), des lipoprotéines de basse densité oxydées (ox-LDL) et les AGE, qui augmentent tous la production de l'anion superoxyde (Drummond *et al.*, 2011). En plus, un environnement extracellulaire très oxydé augmente l'expression de NOXs qui conduit à une prolifération de CMLV-NOX-dépendante via la signalisation du récepteur du PDGF (Brigelius-Flohe *et al.*, 2003) (Fig. 20).

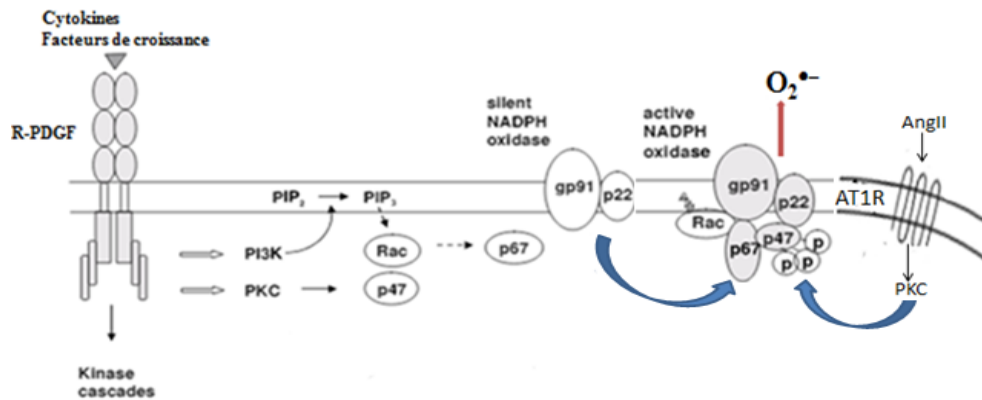


Fig. 20 : Activation de NOX. Adapté de (Brigelius-Flohe *et al.*, 2003) et (Molhnau *et al.*, 2002).

La NADPH oxydase vasculaire réagit à plusieurs facteurs de croissance (PDGF, EGF et TGF- β), à des cytokines (TNF- α , IL-1 β), aux facteurs métaboliques (hyperglycémie, hyperinsulinémie, acides gras libres et AGE), aux agonistes des récepteurs couplés aux protéines G (sérotonine, thrombine, bradykinine, endothéline) et à l'AngII qui est l'un des principaux agonistes augmentant l'expression des NOX1/2 et causant leur activation dans les neutrophiles et les cellules vasculaires (Molhnau *et al.*, 2002; Konior *et al.*, 2014).

L'Ang II, qui fait partie des peptides pro-oxydants, agit via deux récepteurs couplés aux protéines G, AT1 et AT2. Le récepteur AT1 relaye la majorité des actions physiologiques de l'Ang II et il est exprimé dans les tissus adultes normaux, tandis que le récepteur AT2 est fortement exprimé dans les tissus fœtaux, et il diminue rapidement après la naissance où il est exprimé dans un nombre restreint de tissus (Sparks *et al.*, 2014). L'Ang II stimule la synthèse et la libération d'ET-1 (Lin *et al.*, 2014). L'ET-1, un peptide de 21

acides aminés, est principalement produit par les cellules endothéliales, mais d'autres types de cellules tels que les cardiomyocytes et les CMLV peuvent également produire ce peptide. Les effets de l'ET-1 sont similaires à ceux produits par l'Ang II, comme la vasoconstriction, la prolifération cellulaire et la production des ERO. Les effets de l'ET-1 sont relayés par deux récepteurs couplés aux protéines G, ETA et ETB (Pinet, 2004). Dans les vaisseaux sanguins, le récepteur ETA est principalement exprimé dans les CMLV et cause la vasoconstriction, tandis que le récepteur ETB, principalement exprimé dans les cellules endothéliales, provoque une vasodilatation en libérant le NO (Kawanabe *et al.*, 2011). La stimulation des CMLV par l'Ang II ou l'ET-1 provoque des augmentations du calcium intracellulaire et l'activation de la PKC, de la MAPK et des ERO. Ces seconds messagers ont été identifiés dans les complications vasculaires associées à l'Ang II et à l'ET-1, notamment la prolifération cellulaire, l'hypertrophie et l'hyperplasie (Touyz *et al.*, 2000). L'Ang II via les ERO peut activer le facteur de transcription NF- κ B et stimuler la dégradation de son inhibiteur cytosolique, IB, à travers le récepteur AT1 en activant la PI3-kinase d'une manière dose-dépendante *in vivo* et *in vitro* dans les CMLV (Morinelli *et al.*, 2013). Il a été rapporté que l'Ang II augmente la protéine kinase B (Akt) et le facteur de transcription NF- κ B dans les CMLV (Mehta *et al.*, 2007).

L'Ang II par son action sur son récepteur AT1 induit de nombreux effets pro-hypertensifs. De tels effets comprennent la contraction directe des CMLV, la libération d'aldostérone à partir de la zone glomérulaire de la glande surrénale et l'activation des neurones sympathiques. Cependant, en plus de ses actions pro-hypertensives classiques, l'Ang II augmente directement l'activité des NOX dans les cellules endothéliales en favorisant la phosphorylation de la p47^{phox} et donc l'assemblage du complexe d'oxydase NOX 2 et éventuellement NOX 1 (Drummond *et al.*, 2011).

1.2.2.1.2 Les inhibiteurs de NOX

La localisation de la NADPH oxydase dans la majorité des tissus, des types cellulaires et son implication dans plusieurs pathologies et maladies systémiques, a suscité la recherche des inhibiteurs efficaces pour limiter l'ampleur de cette oxydase provoquant la production de l'anion superoxyde et la génération des radicaux libres.

Les inhibiteurs de la NADPH oxydase ont pour rôle de bloquer le transfert d'électrons à travers ses composantes, d'éliminer et/ou d'empêcher l'assemblage de l'oxydase en

interagissant avec leurs sous-unités au niveau moléculaire, de réduire l'expression des gènes et des sous-unités et de modifier les oxydases (Selemidis *et al.*, 2008). Plusieurs études dénombrent des composés qui réduisent le stress oxydatif en inhibant la production des ERO par la NADPH oxydase: Apocynin, chlorure de diphenyleneiodonium (DPI), peptide antimicrobien riche en proline-arginine (PR-39) et de nouveaux inhibiteurs peptidiques développés pour cibler les NADPH oxydases comme le gp91ds-tat et le composé non peptidique VAS-2870. À cela s'ajoutent plusieurs classes de médicaments actuellement utilisés en pratique clinique comme les médicaments affectant le système rénine-angiotensine-aldostérone, les statines, les inhibiteurs calciques, qui diminuent l'activité et/ou l'expression de la NADPH oxydase. De plus, certains polyphénols d'origine naturelle peuvent inhiber efficacement les NADPH oxydases dans le système vasculaire ou les plaquettes sanguines (Drummond *et al.*, 2014).

Voici une liste des inhibiteurs dont l'Apocynin et le DPI qui demeurent les plus couramment utilisés :

Apocynin est dérivé à l'origine de la racine du chanvre canadien (*Apocynum cannabinum*) et de la plante *Picrorhiza kurroa*, une plante médicinale utilisée depuis des siècles par les Chinois et les Sud-Asiatiques pour traiter les maladies inflammatoires. L'apocynin (4'-hydroxy-3'-methoxyacetophenone) a une capacité antioxydante et anti-inflammatoire, elle inhibe l'association de la p47^{phox} avec la membrane et par la suite bloque l'activité de NOX dans de nombreux modèles impliquant des cellules phagocytaires et non phagocytaires (Stolk *et al.*, 1994).

DPI (non peptidique) est un inhibiteur de flavoprotéine : inhibe la quasi-totalité de la famille des Nox. Il inhibe également la NADH ubiquinone oxydoréductase, la NADH déshydrogénase, la xanthine oxydase, le cytochrome P450 oxydoréductase, la NOS, la nicotine oxydase bactérienne et l'oxLDL (O'Donnell *et al.*, 1994).

AEBSF (non peptidique) est un inhibiteur de l'assemblage d'oxydases: inhibe l'association de NOX 2 avec p47^{phox} (Diatchuk *et al.*, 1997).

Gp91dstat (peptidique) est un inhibiteur de l'assemblage d'oxydases: inhibe l'association de NOX 2 avec p47^{phox} (Rey *et al.*, 2001).

Statines (non peptidique) diminuent la production de superoxyde en inhibant la synthèse de farnésyl pyrophosphate et de géranyl pyrophosphate essentielles pour la fixation membranaire de Rac et l'assemblage de la NADPH oxydase (Wassmann *et al.*, 2002).

Antagoniste du récepteur AT1 (non peptidique) diminue l'activation de la NADPH oxydase induite par l'Ang II via son récepteur AT1 (Rajagopalan *et al.*, 1996).

Nebivolol (non peptidique) inhibe l'association membranaire et aussi l'interaction de p67^{phox} et Rac et diminue l'expression de l'oxydase (Mason *et al.*, 2005).

Gliotoxine (non peptidique) est un métabolite fongique, une toxine modificateur de thiol qui inhibe la phosphorylation de p47^{phox} en empêchant la colocalisation de la PKC avec p47^{phox} (Comera *et al.*, 2007).

S17834 (non peptidique) est un dérivé de flavonoïde proposé pour inhiber directement l'activité de la NADPH oxydase (Cayatte *et al.*, 2001).

Minocycline (non peptidique) est un dérivé de tétracycline, inhibe la production de superoxyde par la NADPH oxydase dans la microglie et les neurones dopaminergiques en réponse à des stimuli tels que la thrombine en diminuant l'expression de p67^{phox} (Agwuh *et al.*, 2006).

Alpha-tocophérol (non peptidique) diminue la production de superoxyde, inhibe la translocation de p67^{phox}-p47^{phox} et la phosphorylation de p47^{phox} dans les monocytes, les neutrophiles et les microglies (Kanno *et al.*, 1996).

VAS-2870 (non peptidique) inhibe l'activité de la NADPH oxydase dans NOX 2 et NOX 4 (Stielow *et al.*, 2006).

Honokiol a été isolé à partir d'une herbe (*Magnolia officinalis*) et présente un intérêt particulier parce que ce composé semble inhiber la production de superoxyde après l'activation de l'enzyme contrairement à d'autres inhibiteurs (Liou *et al.*, 2003).

Plumbagine (5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphthoquinone) est un pigment jaune naturel qui provient des racines de la plante *Plumbago zeylanica*. La plumbagine inhibe l'activité de la NOX 4 se trouvant dans les cellules musculaires lisses vasculaires et son inhibition pourrait bien expliquer son effet anti-athérosclérotique (Ding *et al.*, 2005).

Ebselen, (2-phényl-1,2-benzisoxazol-3(2H)-one), spécifiquement développé par l'industrie pharmaceutique, est un imitateur de la glutathion peroxydase qui réagit également avec le peroxy-nitrite. Il inhibe une variété d'enzymes telles que les

lipoxygénases, les monoxydes d'azote synthases, NOX et PKC. Ebselen est un inhibiteur non spécifique, mais il est utilisé dans certains centres de santé au Japon pour son efficacité durant les premières 24 h post-AVC dans le traitement des accidents vasculaires cérébraux (Parnham *et al.*, 2000).

1.2.2.3 Autre source d'origine enzymatique est celle de la xanthine oxydase

La xanthine oxydoréductase (XOR) est responsable du catabolisme de la purine, catalysant l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique, qui possède à la fois des activités antioxydantes (principalement dans le plasma) et pro-oxydantes (principalement dans la cellule) (Glantzounis *et al.*, 2005). Chez les mammifères, XOR est présente sous deux formes : la xanthine déshydrogénase (XDH) qui, dans des conditions physiologiques, préfère le NAD^+ comme accepteur d'électrons (Dias-Peixoto *et al.*, 2012). Dans des conditions pathologiques, la xanthine oxydase, par manque de NAD^+ , transfère directement les électrons à l'oxygène moléculaire produisant l'anion superoxyde, des ERO et du peroxyde d'hydrogène (Battelli *et al.*, 2016). Le taux de production de ces ERO dépend de l' O_2 , du pH et de la concentration en purine, tandis que la formation de peroxyde d'hydrogène est favorisée lorsque les niveaux d' O_2 et le pH sont réduits comme dans des conditions ischémiques et/ou hypoxiques. L'activité et l'expression de cette enzyme sont augmentées par l'interféron- γ (Yandza *et al.*, 2012; Cantu-Medellin *et al.*, 2013) (Fig. 21).

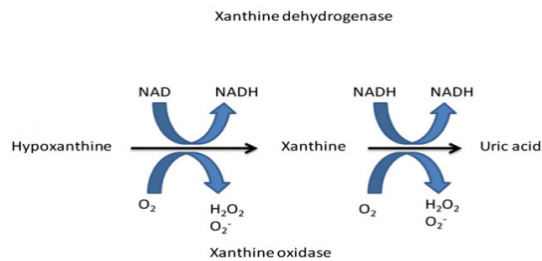


Fig. 21 : Xanthine oxydase. Adapté de (Yandza *et al.*, 2012).

1.3 Les NOS – Monoxyde d'azote synthases

Le stress oxydatif provoque des dommages oxydatifs irréversibles aux macromolécules et perturbe également les processus de signalisation dans la paroi artérielle via l'inactivation du NO à la suite de sa réaction avec l'anion superoxyde. Ceci prévient les fonctions anti-inflammatoires et vasodilatatrices du NO et favorise la formation du peroxynitrite (ONOO^-) qui possède de puissantes propriétés oxydantes, provoquant des dommages

irréversibles aux macromolécules, aux protéines, aux lipides, à l'ADN, en plus d'oxyder des antioxydants tels que le glutathion, la glutathionne réductase, la superoxyde dismutase (Szabo *et al.*, 2007), la cystéine, la tétrahydrobioptérine (BH4) et le guanylyl cyclase soluble (GCs) réduisant l'affinité du NO avec son récepteur (Harrison *et al.*, 2010).

Le NO est une molécule gazeuse, non chargée et perméable qui diffuse à travers les membranes cellulaires ; il est libéré de manière tonique pour contrôler le tonus vasculaire et l'agrégation plaquettaire. Ces propriétés lui permettent de réagir avec d'autres molécules dont l'oxygène, les radicaux libres et des molécules contenant du soufre ou des métaux (Stephan *et al.*, 2017). Le NO peut être généré par une voie non enzymatique par la réduction en deux étapes du nitrate inorganique en nitrite par les bactéries buccales (première étape) et une réduction supplémentaire du nitrite en NO dans l'estomac par le faible pH gastrique ou les vaisseaux périphériques (deuxième étape réductrice) (Kelly *et al.*, 2014) (Fig.22).

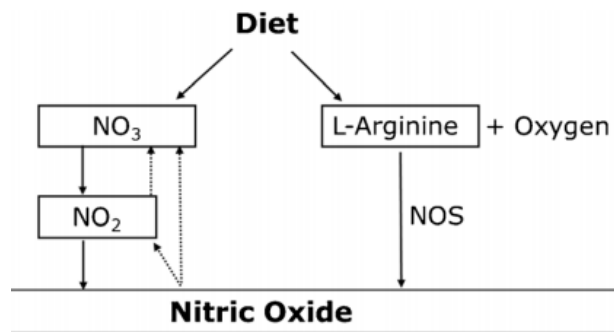


Fig. 22 : Sources de NO. Adapté de (Kelly *et al.*, 2014).

Le NO est généré, par voie enzymatique, par trois isoformes d'une enzyme selon sa localisation cellulaire :

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

1.3.2 eNOS : monoxyde d'azote synthase endothéliale ou NOS III. Le NO dérivé de la eNOS est un vasodilatateur physiologique. Le NO libéré vers la lumière vasculaire est un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire et de leur adhésion à la paroi vasculaire.

L'activité de ces deux isoformes de la NOS est modulée par le calcium libéré des réserves endoplasmiques (activité demi-maximale entre 200 et 400 nM) en réponse à l'activation de certains récepteurs (Lind *et al.*, 2017). Par ce mécanisme, des substances telles que l'acétylcholine, la bradykinine, l'histamine, l'insuline et la substance P stimulent la production de NO. De même, les forces de cisaillement agissant sur l'endothélium sont un autre mécanisme important régulant la libération de NO.

1.3.3 iNOS : monoxyde d'azote synthase inductible ou NOS II. La NOS inductible (iNOS) a été détectée pour la première fois dans les macrophages alvéolaires où son activité a augmenté en réponse aux cytokines pro-inflammatoires et aux endotoxines. C'est une enzyme cytoplasmique présente dans diverses cellules. L'expression de la iNOS est principalement favorisée par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1- β et l'INF- γ , la voie NF- κ B et les endotoxines bactériennes (lipopolysaccharide) (Gochman *et al.*, 2012). L'activation de la iNOS peut avoir lieu par l'intermédiaire des récepteurs couplés aux protéines G, notamment le RB1 des kinines impliquant la voie G α i- Src-MAPKs (Brovkovich *et al.*, 2011). Contrairement à nNOS et eNOS, cette liaison est indépendante et se produit même à très faible quantité de Ca²⁺ (inférieures à 40 nM) (Lind *et al.*, 2017; Antosova *et al.*, 2017). L'activation de la iNOS entraîne une production de NO qui peut être 1000 fois supérieure à celle produite par les autres NOS. C'est un mécanisme important dans la pathogenèse de l'inflammation où le NO agit comme un agent cytotoxique et médiateur dans divers symptômes et complications liés à l'inflammation (Leineweber *et al.*, 2017) (Fig. 23). Le 1400W a été identifié comme un inhibiteur sélectif de la iNOS avec un manque d'effet sur les autres formes constitutives de la NOS. Il est plus de 5000 et 200 fois plus efficace contre la iNOS humaine purifiée que contre la eNOS et la nNOS, respectivement (Garvey *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2007).

Parmi les autres inhibiteurs, l'aminoguanidine est cinquante fois plus efficace dans l'inhibition de l'activité enzymatique de la iNOS que dans celle de la eNOS et de la nNOS (Montezuma *et al.*, 2012; Farhad *et al.*, 2017). La NG-iminoéthyl-L-ornithine (L-NIO) et la LN-iminoéthyl-lysine (L-NIL) comme inhibiteurs de la iNOS (Laszlo *et al.*, 1997). Le PBITU, S,S9-(1,3-phenylenebis(1,2-ethanediyl))bisisothiourée, est 190 fois plus sélectif pour la iNOS humaine que pour la eNOS (Garvey *et al.*, 1997).

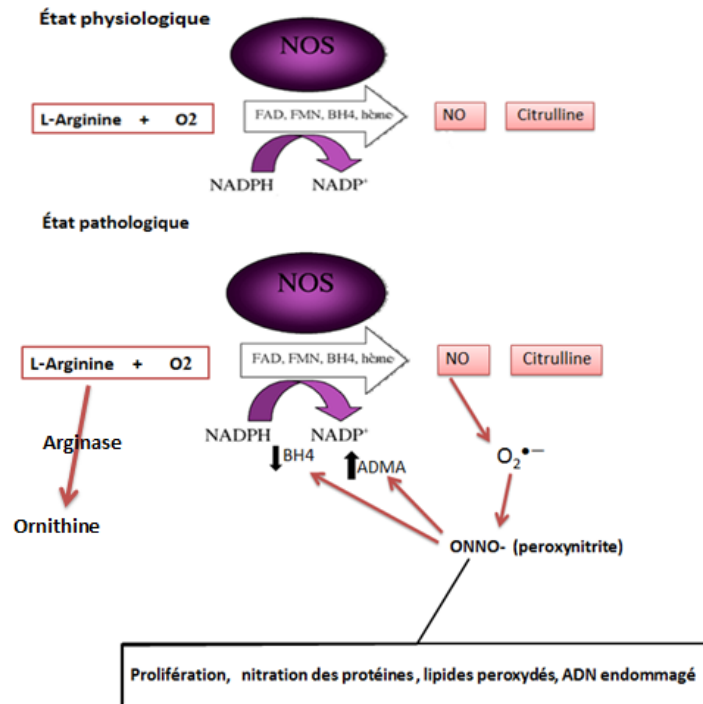


Fig.24 : Le NOS. Adapté de (Leineweber *et al.*, 2017) et de www.snv.jussieu.fr/bmedia/cmlv/Img/fig11.gif.

L'oxydation de la L-arginine comporte plusieurs étapes. La première est la production de N ω hydroxy-L arginine (NOHA), suivie par le clivage oxydatif de la liaison C = N dans NOHA en NO et L-citrulline, qui est ensuite recyclée en L-arginine dans un processus visé comme cycle citrulline/arginine (Antosova *et al.*, 2017).

Le NO est une molécule de signalisation omniprésente dans la plupart des organes et tissus, il active la guanylate cyclase soluble (GCs) pour déclencher la réponse physiologique via le GMPC, lequel agit comme neuromédiateur et vasodilatateur.

Les guanylate cyclases sont une famille d'enzymes qui catalysent la biosynthèse du guanosine 3',5'-monophosphate cyclique (GMPC) à partir du guanosine 5'-triphosphate (GTP) (Wen *et al.*, 2009). La famille se compose de deux isoformes, l'isoforme soluble qui est exprimée dans le cytoplasme (GCs) et la forme particulière ou membranaire (Hoffmann *et al.*, 2009). La guanylate cyclase membranaire est activée par les peptides natriurétique (ANP, BNP, CNP) (Potter *et al.*, 2006) (Fig.25).

La GCs est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α et d'une sous-unité β contenant un hème (sous forme d'ion ferreux, Fe $^{2+}$) qui peut être oxydé (en état ferrique) par des ERO ou avec le peroxynitrite suivi d'une perte de la sensibilité au NO entraînant la perte

de l'activité de la GCs. Par contre, le NO, en présence de Mg^{2+} , augmente l'activité et l'affinité de la liaison de GCs avec le GTP de 100 à 400 fois (Derbyshire *et al.*, 2009).

La stimulation des GCS mène à l'accumulation de GMPc. Le GMPc est un second messenger qui régule les protéines kinases (PKA, PKC, avec une affinité pour la PKG), les phosphodiesterases et les canaux ioniques GMPc-dépendants. La signalisation GMPc joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques et pathophysiologiques comme la relaxation des muscles lisses et la neurotransmission (Kots *et al.*, 2009) (Fig. 25).

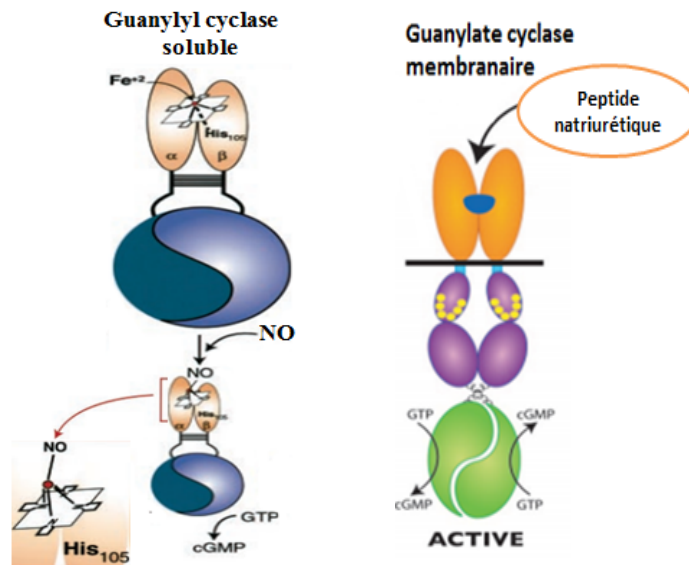


Fig. 25 : Guanylyl cyclase soluble et membranaire. Adapté de (Lucas *et al.*, 2000) et (Potter *et al.*, 2006).

La PKG représente le principal médiateur intracellulaire des signaux du GMPc. La stimulation du GMPc induit une activation de la PKG, conduisant au transfert catalytique du g-phosphate à un résidu de sérine ou de thréonine sur la protéine cible.

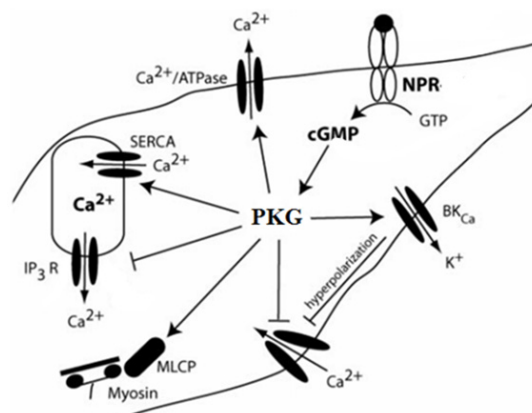


Fig. 26 : Effets de la PKG. Adapté de (Potter *et al.*, 2006).

Ainsi, la PKG inhibe la libération de Ca^{2+} IP3-dépendante et induit la relaxation du muscle lisse vasculaire par action sur le récepteur IP3 et le phospholamban; inhibe l'activation des plaquettes par inhibition du récepteur de la thromboxane A2; régule la sécrétion de chlorure et d'eau dans l'intestin. La PKG agit également sur le canal Ca^{2+} de type L et le canal K^+ activé par Ca^{++} qui, lors de la phosphorylation, contribuent à la régulation du tonus vasculaire et la contractilité cardiaque; elle aussi agit sur la sous-unité de liaison de la phosphatase à chaîne légère de la myosine (MLCP) qui intervient dans la relaxation et la vasodilatation des CML (Potter *et al.*, 2006; Lorenz *et al.*, 2017) (Fig. 26).

Les phosphodiésterases (PDE) inhibent la GMPc et l'activation subséquente de la PKG. Plusieurs isoformes sont disponibles : les PDE5 et PDE9 sont spécifiques à GMPc, tandis que PDE1, PDE2 et PDE3 peuvent hydrolyser GMPc mais également l'AMPc (Schlossmann *et al.*, 2012; Kirk *et al.*, 2016).

1.4 Le système kallibréine-kinine

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

La bradykinine (BK) a été décrite pour la première fois en 1949 par Rocha e Silva et ses collaborateurs comme résultant de l'activité de la kallibréine, dont le précurseur, le bradykininogène, est présent dans la fraction $\alpha 2$ -globuline du plasma normal des mammifères (Rocha *et al.*, 1949). Il a démontré que la BK était un hypotenseur et un stimulant musculaire libéré de la globuline plasmatique par le venin de serpent *Bothrops jararaca* - un serpent typique du Brésil - ou avec de la trypsine, la substance produit des contractions lentes du muscle lisse par rapport à celles obtenues avec l'histamine et l'acétylcholine (Rocha *et al.*, 1949). Ainsi, le nom BK était alors donné pour exprimer cette action lente (brady: lent, et kinin: mouvement en grec).

1.4.1 Les kinines et leur dégradation

Le SKK est une voie d'activation métabolique endogène, impliquée dans plusieurs processus physiologiques et pathophysiologiques. Il comprend la synthèse de peptides

vasoactifs (les kinines) produits par l'action des kallibréines (enzymes) sur les kininogènes (précurseurs) (Moreau *et al.*, 2005; Kashuba *et al.*, 2013).

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

Les kininogènes hépatiques se retrouvent chez l'humain sous deux formes : les kininogènes à haut poids moléculaire (KHPM) de 120 kDa, sont des α -globulines dont la concentration dans le plasma humain (80 $\mu\text{g/ml}$) peut augmenter avec l'âge (Perez *et al.*, 2005), et les kininogènes à faible poids moléculaire (KFPM) de 68-75 kDa dont la concentration dans les tissus est de 60 $\mu\text{g/ml}$ (Adam *et al.*, 1985; Sainz *et al.*, 2007). À celles-ci s'ajoutent les T-kininogènes se trouvant seulement chez les rongeurs (Okamoto, 1983).

Les kallibréines tissulaires clivent les KFPM pour former la kallidine (KD ou Lysyl-BK), un décapeptide: Lys-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH. Les kallibréines plasmatiques (après être activées par le facteur FXIIa) clivent les KHPM pour former la BK, un nonapeptide: Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg-OH) (Regoli *et al.*, 1980). Ces kinines agissent sur des récepteurs transmembranaires couplés aux protéines G, déclenchant une cascade de signalisation cellulaire aboutissant aux réponses physiologiques (Couture *et al.*, 2004; Pathak *et al.*, 2013) (Fig. 27).

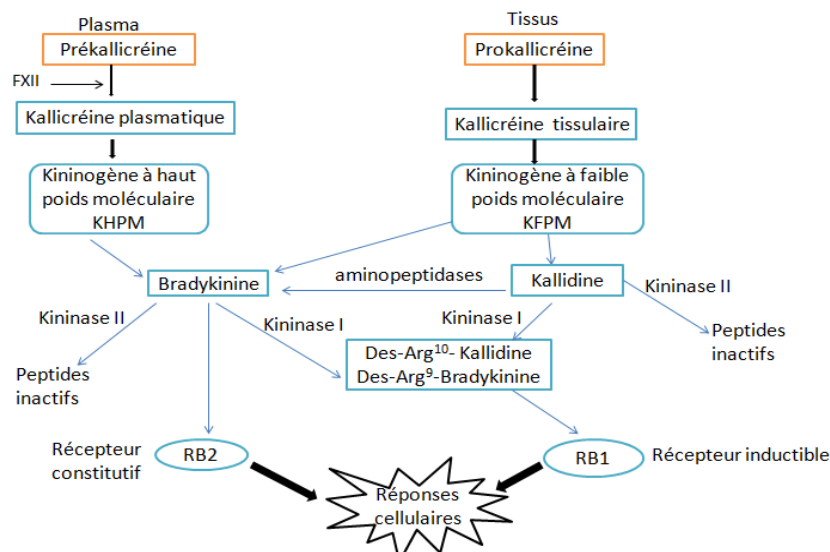


Fig. 27 : Le système kallibréine-kinine (KKS). Schéma adapté de (Pathak *et al.*, 2013).

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

Les kinines subissent une dégradation rapide par les aminopeptidases M et P, les endopeptidases, les carboxypeptidases M ou N (kininase I) et la kininase II (aussi appelée enzyme de conversion de l'angiotensine I) (Regoli *et al.*, 1980). Les aminopeptidases sont des enzymes qui clivent les kinines en position N-terminale. L'aminopeptidase M clive la lysine en position N-terminale sur la KD et la des-Arg¹⁰-KD pour former la BK et la des-Arg⁹-BK (Francois Marceau *et al.*, 1998). Les aminopeptidases M et N clivent l'arginine en position N-terminale de la T-Kinine et de la des-Arg¹¹-T-kinine pour donner la BK et la des-Arg⁹-BK. L'aminopeptidase P hydrolyse la liaison Arg¹-Pro² en position N-terminale de la BK (Chen *et al.*, 1991) (Fig. 28).

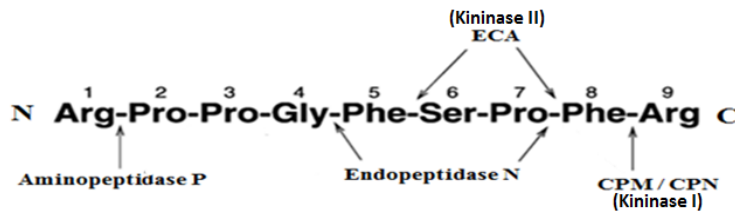


Fig. 28 : Actions des principales peptidases sur la Bradykinine. Adapté de (Gabra *et al.*, 2003).

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

Les endopeptidases/néprilysin /enképhalinases : ces enzymes sont des métallopeptidases zinc-dépendant, impliquées dans le métabolisme de plusieurs peptides. Elles sont présentes dans plusieurs types cellulaires chez l'homme. Leurs substrats sont l'angiotensin I, l'angiotensin II, la BK et l'endothéline; elles coupent le dipeptide Ser⁶-Pro⁷, deux acides aminés en position C-terminale de la bradykinine 1-7 (BK1-7) pour

ensuite produire la bradykinine 1-4 (BK1-4), aboutissant à des métabolites inactifs (Couture *et al.*, 2004; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005) (Fig. 28).

La kininase II / ECA: dans le système rénine-angiotensine, le processus débute par l'action hydrolytique de la rénine (enzyme libérée par le rein) sur l'angiotensinogène (libérée par le foie) pour libérer l'angiotensine I. Au niveau des vaisseaux pulmonaires, l'ECA (enzyme de conversion de l'angiotensine I ou kininase II) agit d'un côté sur l'angiotensine I pour générer l'angiotensine II (un puissant vasoconstricteur) et d'un autre côté clive tour à tour les deux acides aminés (Phe et Arg puis Ser-Pro) en position C-terminale sur la BK, KD, des-Arg⁹-BK, des-Arg¹⁰-kallidine pour former des métabolites inactifs (Tang *et al.*, 2011).

1.4.2 Les récepteurs des kinines

Le clivage protéolytique des kininogènes à haut et à bas poids moléculaire engendre la formation des agonistes sélectifs du récepteur B₂ des kinines (RB₂), soit la BK et la KD. Ceux-ci peuvent être métabolisés par la kininase I (CPM, CPN) menant à la formation des agonistes sélectifs du RB₁ (RB₁), soit la des-Arg⁹-BK et la lysyl-des-Arg⁹-BK (aussi nommé des-Arg¹⁰-kallidine) (Fig. 27). Ces récepteurs (RB₂ et RB₁) font partie de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) (Couture *et al.*, 2014). Contrairement au RB₂ qui est exprimé de manière constitutive, le RB₁ est généralement absent dans les conditions physiologiques et il est induit, dans divers états pathologiques, dans divers types cellulaires incluant les cellules endothéliales, musculaires lisses, les macrophages et les neurones. Par cette induction, le RB₁ a été impliqué dans divers modèles d'inflammation, de diabète sucré, de pathologies vasculaires, dans la douleur chronique, le cancer, l'angiogenèse, la sclérose en plaques, l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer (Gobeil *et al.*, 2014).

1.4.2.1 Le récepteur B₂

Le récepteur B₂ est exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus, les muscles lisses, les neurones, les cellules endothéliales, les cellules immunes et les fibroblastes (Bhoola *et al.*, 1992). Le RB₂ est impliqué dans les quatre signes cardinaux de l'inflammation (calor/chaleur, dolor/douleur, rubor/rougeur, tumor/tuméfaction (œdème)). La vasodilatation (causant la rougeur) est due à la libération du NO et/ou de la prostacycline de l'endothélium vasculaire. L'augmentation de la perméabilité vasculaire

(causant l'œdème) est tributaire de la contraction des cellules endothéliales vasculaires et de l'augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires à la suite de la dilatation des artérioles pré-capillaires et de la constriction des vaisseaux post-capillaires par les kinines (Couture *et al.*, 2004). L'augmentation du débit sanguin cause la chaleur par augmentation des forces de cisaillement alors que la stimulation des fibres sensorielles nociceptives induit la douleur (Couture *et al.*, 2001). Après la stimulation du RB₂ par son agoniste, l'accumulation de calcium intracellulaire via l'IP₃ (inositol triphosphate) conduit au cycle de désensibilisation / endocytose / recyclage à la membrane sur une période d'environ 15 min (Pizard *et al.*, 1999; Kuhr *et al.*, 2010). La phosphorylation du RB₂ par la PKC sur les résidus sérine et thréonine (Ser³³⁹, Ser³⁴⁶, Ser³⁴⁸, Thr³⁴², Thr³⁴⁵) conduit à la désensibilisation et à son internalisation induisant une redistribution cellulaire vers les cavéoles et une complète resensibilisation qui recycle le récepteur à la membrane (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

1.4.2.1.1 Le mécanisme de signalisation du RB₂

La liaison BK au RB₂ active différentes guanines régulatrices Gαq, Gαi0, Gαs, Gαq/11. Le RB₂ couplé aux protéines Gαq et Gα12/13 déclenche l'activation de la PLC (phospholipase C) qui transforme le phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (Sadagurski *et al.*, 2014). L'IP₃ mobilise les réserves de Ca²⁺ dans le réticulum endoplasmique. Le DAG active une protéine tyrosine kinase calcium-dépendante (PKC, PKA, CAMKII). Le calcium libéré dans le cytosol par IP₃ active la PLA₂ (phospholipase A₂) qui permet la production d'acide arachidonique et, sous l'action de la COX (cyclooxygénase), la libération des prostaglandines PGI₂ qui active son récepteur (IP) pour augmenter la concentration d'AMPc disponible dans le muscle lisse (Gabra *et al.*, 2003) (Fig.29).

Les événements mentionnés ci-haut se font par la sous-unité Gαq, tandis que la sous-unité βγ active la voie du PI3K, Akt rejoignant le Ca²⁺ pour activer et phosphoryler la eNOS sur la Ser¹¹⁷⁷, son important site d'activation (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005) (Fig.30). En présence d'une concentration élevée de Ca²⁺ intracellulaire, la calcineurine déphosphoryle la eNOS et aussi la nNOS à leur site inhibiteur sur la Thr⁴⁹⁵ (Harris *et al.*, 2001). Ces deux enzymes sont responsables de la production en petite quantité et à courte durée du NO. Le NO stimule la GCs pour produire le GMPc dans les muscles lisses et s'ajoute à l'AMPc pour produire la vasodilatation (Couture *et al.*, 2014). La eNOS et la

nNOS ont une activité réduite ou arrêtée par le retour de la concentration du Ca^{2+} à la valeur de base par la dissociation du complexe Ca-calmoduline et la déphosphorylation des sites actifs en faveur des sites inhibiteurs (Kuhr *et al.*, 2010). Le RB_2 est couplé à d'autres cascades de signalisation comme la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs des facteurs de croissance incluant EGF, IGF, VEGF et TGF- β . Par exemple, la transactivation du récepteur EGF, par la BK, induit l'activation de la Ras kinase ainsi que l'activation du Raf et la MAP-kinase (Gabra *et al.*, 2003).

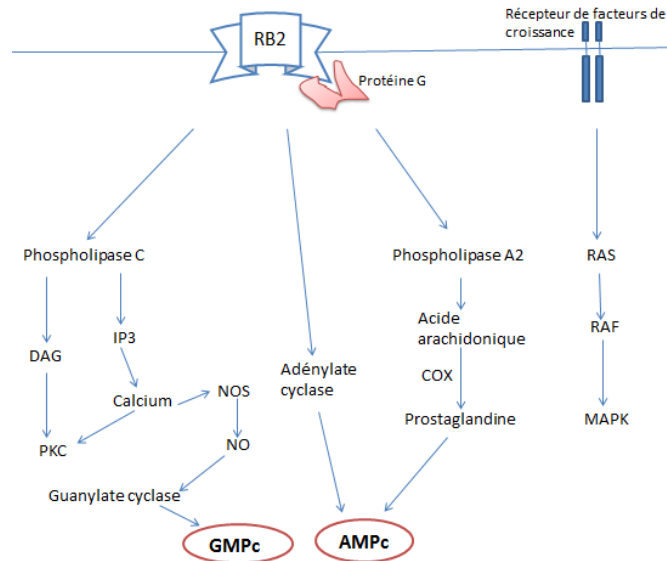


Fig. 29 : Mécanisme de signalisation du RB_2 couplé à une protéine G. Adapté de (Couture *et al.*, 2014).

En plus des effets attribués à la sous-unité α , les sous-unités β et γ , qui sont physiologiquement indissociables ($G\beta\gamma$), peuvent aussi induire des signaux par l'entremise d'une liaison avec une vingtaine d'effecteurs tels que la $\text{PLC}\beta$, la tubuline, la calmoduline, des canaux calciques et la PI3K. La PI3K active, à son tour, une protéine sérine/thréonine kinase (Akt) provoquant la phosphorylation de la Ser^{177} , site d'activation majeur de la eNOS (Kuhr *et al.*, 2010).

Le couplage du RB_2 avec $G_{\alpha 12/13}$ peut activer les petites protéines G, Rho, Rac et affecte ainsi l'organisation du cytosquelette d'actine, la forme cellulaire et la motilité cellulaire (Gohla *et al.*, 1999). L'activation du $G_{\alpha s}$ et du $G_{\alpha i}$ module les niveaux d'AMPc intracellulaires et donc l'activité de la protéine kinase A (PKA). La stimulation de $G_{\alpha i}$ induite par la BK observée dans plusieurs cellules est impliquée dans l'activation de la cascade ERK / MAPK (Liebmann, 2001; Blaukat, 2003). Dans plusieurs types de cellules, la signalisation du RB_2 exige une activation simultanée des protéines $G_{\alpha i}$ et

Gαq. Une légère activation de Ras induite par Gαi est insuffisante pour déclencher la cascade ERK / MAP kinase, mais la stimulation de la PKC par Gαq, active Raf et ensuite la cascade ERK / MAP kinase (Liebmann, 2001; Blaukat, 2003).

1.4.2.2 Le récepteur B₁

Contrairement au RB₂, le RB₁ est quasiment absent en situation physiologique. Il est induit à la suite de maladies métaboliques et inflammatoires, de lésions tissulaires ou en présence d'endotoxines bactériennes ou de cytokines pro-inflammatoires (IL-1β, TNF-α, interféron-γ, IL-6 et IL-8) via la signalisation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF-κB) (da Costa *et al.*, 2014).

Le stress oxydatif augmente l'expression du RB₁ dans le diabète et l'hypertension. Ceci est basé sur l'observation selon laquelle des diètes antioxydantes (acide alpha-lipoïque, N-acetyl-L-cystéine) préviennent l'induction et l'augmentation de l'expression du RB₁ des kinines dans le modèle insulino-résistant induit par une diète riche en glucose (El Midaoui *et al.*, 2002; Ismael *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2010). Les peptides pro-oxydants tels que l'Ang II et l'ET-1 peuvent contribuer à la surexpression du RB₁ dans les maladies cardiovasculaires. L'Ang II et l'ET-1 augmentent l'expression du RB₁ par un mécanisme impliquant la PI3-kinase et le NF-κB dans les CMLV via la génération d'ERO (Morand-Contant *et al.*, 2010).

Le blocage pharmacologique du NF-κB a permis de renverser l'expression du RB₁ (He *et al.*, 2004; Morand-Contant *et al.*, 2010). En fait, les analyses de séquences montrent la présence d'un site régulateur transcriptionnel pour NF-κB dans la région promotrice du RB₁ (Yang *et al.*, 2005). Le NF-κB est retrouvé dans le cytoplasme des cellules non stimulées sous la forme inactive comme complexe ternaire p50 / p65 / IκB ou complexe binaire inactif p65 / p105. La stimulation des cellules avec certaines cytokines, oxydants ou médiateurs inflammatoires entraîne une phosphorylation et une ubiquitination de la sous-unité IκB ou p105 (Siebenlist *et al.*, 1994). Ceci cause la translocation de la sous-unité vers le noyau pour activer la transcription des gènes cibles. L'implication du NF-κB est cohérent avec l'induction de la transcription du gène du RB₁ et avec la surexpression des gènes médiateurs de l'inflammation, y compris ceux des cytokines (IL-1β, IL-6, TNF-α), des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, P-sélectine et E-sélectine) et des enzymes pro-inflammatoires dont la COX-2 et la iNOS (Medeiros *et al.*, 2004; Puja K. Mehta *et al.*, 2007; Yandza *et al.*, 2012). La localisation de la CPM ancrée à la membrane

par le glycosylphosphatidylinositol (GPI), à proximité du RB₁, rend plus efficace la formation et l'accumulation des métabolites sélectifs du RB₁, la desArg⁹-BK et la desArg¹⁰-KD, et la stimulation du récepteur (Kuhr *et al.*, 2010). Contrairement au RB₂, le RB₁ participe à la phase chronique de la réponse inflammatoire et de la douleur (Couture *et al.*, 2001) (Fig.30).

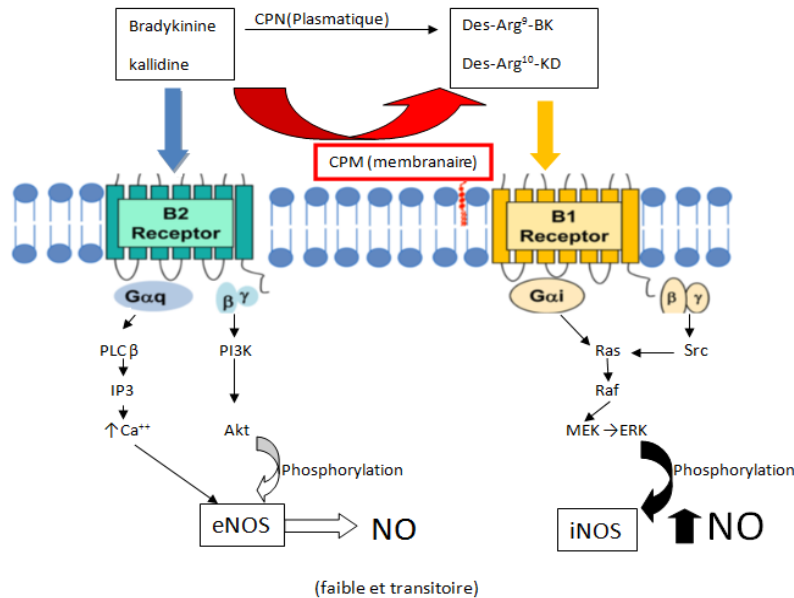


Fig. 30 : Activation de la iNOS et la eNOS par la signalisation du RB₁ et RB₂ couplés à une protéine Gαq et Gαi. Adapté (Kuhr *et al.*, 2010).

1.4.2.2.1 Le mécanisme de signalisation du RB₁

À l'instar du RB₂, le RB₁ interagit avec Gαq, la principale voie d'activation étant la voie de la PLC. Une différence importante existe néanmoins : alors que le RB₂ augmente le pool intracellulaire de Ca²⁺ via IP₃, le RB₁ augmente le Ca²⁺ intracellulaire principalement via un influx extracellulaire à partir d'un canal calcique. La stimulation du RB₁ couplé à la protéine Gαi et Gβγ active Src, Ras, Raf et ERK, qui aboutit à la phosphorylation et à l'activation de la iNOS responsable de synthétiser le NO en quantité et en durée plus importantes que celles produites par la eNOS (Kuhr *et al.*, 2010; Brovkovich *et al.*, 2011) (Fig.30). Le RB₁ est internalisé, dégradé par les lysosomes, de manière constitutive sans stimulation avec son agoniste, probablement en raison de son activité constitutive basale, en résistant à la désensibilisation et à l'internalisation une fois activé avec son ligand (Marceau *et al.*, 2002; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005).

Des différences supplémentaires entre les deux types de récepteurs résident dans le fait que le RB₂ est rapidement internalisé et largement recyclé à la surface cellulaire en

présence de son agoniste, tandis que le RB₁ est surexprimé en présence de son agoniste (Schanstra *et al.*, 1998).

1.4.2.2.2 Quelques antagonistes du RB₁

Les premiers antagonistes du RB₁ étaient des peptides avec une séquence d'acides aminés légèrement modifiée par rapport aux ligands RB₁ naturels, des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-KD. Les exemples les plus marquants sont Leu⁸-des-Arg⁹-BK et Leu⁸-des-Arg¹⁰-KD (Regoli *et al.*, 1980). Un groupe de l'Université de Sherbrooke au Québec a mis au point des antagonistes peptidiques biostables du RB₁, tels que R-715, R-892, R-954 contenant des acides aminés non naturels (Gobeil *et al.*, 2014). Des antagonistes RB₁ non peptidiques ont également été développés en parallèle par diverses compagnies pharmaceutiques (Fig. 31). Ces derniers se subdivisent en deux sous-classes de chémotypes, les sulfonamides et les carboxamides (Qadri *et al.*, 2018). Le SSR 240612 de Sanofi est un sulfonamide disponible par voie orale (Gougat *et al.*, 2004). Il a été utilisé avec succès dans de nombreuses études précliniques mais son développement a été interrompu après un essai de phase II pour des raisons non divulguées. Les Laboratoires Fournier ont développé plusieurs antagonistes du RB₁, dont le LF22-0542 (Porreca *et al.*, 2006) et ils ont publié des données précliniques encourageantes (Pouliot *et al.*, 2012). Sanofi-Aventis a fait l'acquisition de Fovea Pharmaceuticals et le composé LF22-0542 a été renommé FOV-2304 et plus tard Safotibant qui a été testé pour une indication très spécifique, la rétinopathie diabétique. Le développement de ce médicament a également été terminé après un essai clinique de phase II avec un résultat inconnu (da Costa *et al.*, 2014). Merck a développé MK-0686, un carboxamide dont le développement a aussi été arrêté à la suite d'un essai de phase II (Tang *et al.*, 2008; Kuduk *et al.*, 2008). Boehringer Ingelheim a réalisé des essais de phase I sur leur antagoniste, BI-113823, mais le développement a été arrêté (Wu *et al.*, 2012; Schuelert *et al.*, 2015). NVP-SAA164, mis au point par Novartis et testé avec succès sur un modèle de souris transgénique humanisé, a montré une forte affinité contre l'hyperalgésie induite par le RB₁ humain et de primate mais n'a montré aucune affinité pour le RB₁ du rongeur (Fox *et al.*, 2005) (Fig.31).

Les raisons de ces échecs en phase clinique restent obscures car elles n'ont pas été publiées. Puisque plusieurs substances différentes ont échoué, un profil d'effet secondaire défavorable d'un certain médicament est peu susceptible d'être la cause. Peut-être en raison de la différence entre les rongeurs et les humains, l'inhibition du RB₁ humain,

contrairement à la souris et au rat, peut exercer des effets indésirables. Les essais cliniques réalisés à ce jour ont été faits pour la plupart avec de petites molécules antagonistes RB₁ non peptidiques comportant leurs lots d'avantages et d'inconvénients.

Néanmoins, d'autres moyens d'interférer avec le SKK et le RB₁ dans l'inflammation devraient être poursuivis pour évaluer leurs possibilités thérapeutiques. À cause du caractère auto-amplifiant de l'induction du RB₁ aux sites d'inflammation, il peut être plus efficace d'interférer avec la régulation de l'expression de ce récepteur atypique. Les sites possibles d'interférence seraient la régulation transcriptionnelle par NF-κB, la régulation de la stabilité de l'ARNm par phosphorylation, le processus d'oligomérisation avec lui-même, le RB₂ ou la CPM et le trafic vers la surface cellulaire. De plus, la génération de ses ligands, BK et KD, pourrait être arrêtée en inhibant spécifiquement la CPM.

FOV-2304 (Safotibant) B ₁ R antagonist, Phase II, Diabetic macular edema, No results released. It was discontinued in October 2012 NCT01319487.
MK-0686 B ₁ R antagonist, Phase II, Postherpetic neuralgia. The development was halted. No specific reason was disclosed, NCT00292763.
BI-113823 B ₁ R antagonist Phase I Osteoarthritis Phase I clinical study was terminated Postoperative dental pain NCT00533403, Osteoarthritis.
SSR-240612 B ₁ R antagonist, Reported Phase II, The development was halted for an undisclosed reason, No record found.
B9870 (Breceptin) Phase I, Small cell lung cancer, No information found.
NVPSAA164 for human, primate B ₁ R, against inflammatory hyperalgesia. No record found.

Fig. 31: Antagonistes RB₁ de NCT, National Clinical Trial (<http://www.clinicaltrials.gov>). Adapté de (da Costa et al., 2014).

1.5 Les modèles animaux de diabète

Les modèles animaux de diabète de type 1 et 2 utilisés dans cette thèse sont décrits ci-dessous.

1.5.1. Les modèles animaux de diabète de type 1

Le modèle expérimental de DT1 le plus utilisé chez les rongeurs est celui induit par la streptozotocine (STZ) que nous avons aussi utilisé dans cette thèse (article 3). La STZ est un antibiotique produit par la bactérie *Streptomyces achromogens* qui possède un large spectre de propriétés antibactériennes (Wu et al., 2015). La STZ altère l'oxydation du glucose, diminue la biosynthèse et la sécrétion d'insuline et abolit la réponse des cellules β au glucose. La STZ est captée par les cellules β du pancréas via le transporteur de

glucose GLUT2. Une expression réduite de GLUT2 prévient l'action diabétogène de la STZ. L'action intracellulaire de STZ entraîne des changements d'ADN dans les cellules β pancréatiques comprenant sa fragmentation. La STZ induit une insulite suivie de la destruction des cellules β par un mécanisme immunitaire dépendant des cellules T. En outre, le stress oxydant inhibe la sécrétion d'insuline dans les cellules β pancréatiques, diminue le taux d'ATP / ADP et réduit ainsi la réponse insulino-sécrétoire (Roman-Pintos *et al.*, 2016). La mort des cellules β et l'alkylation de l'ADN provoquent une hyperglycémie persistante et irréversible accompagnée d'une polydipsie, d'une polyurie et d'une polyphagie (Szkudelski, 2001).

Un autre produit aussi largement utilisé dans l'induction du diabète de type I est l'alloxane. L'action de l'alloxane sur le pancréas est précédée de son absorption rapide par les lymphocytes B. L'absorption rapide par des cellules sécrétant de l'insuline a été proposée comme l'une des caractéristiques importantes déterminant le caractère diabétogène de l'alloxane. Un autre mécanisme concerne la formation des ERO et des radicaux hydroxyles (OH^\bullet) hautement réactifs accompagnés d'une diminution des enzymes antioxydantes et une augmentation massive simultanée de la concentration de calcium cytosolique provoquant la destruction rapide et la nécrose des cellules β . (Szkudelski, 2001; Lenzen, 2008; Mingueneau *et al.*, 2015). À cela s'ajoute aussi le modèle des souris AKITA induisant génétiquement le diabète par une mutation négative sur le gène responsable de la formation de l'insuline (Mathews *et al.*, 2002).

1.5.2 Les modèles animaux de diabète de type 2

Le modèle de DT2 utilisé dans notre laboratoire est celui du rat rendu insulino-résistant par l'accès libre à l'eau de boisson contenant 10 % de D-glucose. L'équipe du Dr de Champlain a montré que ces rats, après 4 semaines, développent les symptômes du DT2 tels l'hyperglycémie, l'hypertension, l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et une augmentation du stress oxydatif dans les tissus cardiovasculaires (El Midaoui *et al.*, 2002, 2005). Notre équipe a montré la présence de symptômes de douleur neuropathique caractérisés par l'allodynie tactile et au froid (Lungu *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010). Ce modèle de rats traités au glucose développe la majorité des complications retrouvées chez ceux traités au fructose/sucrose (Panchal *et al.*, 2011) sans aucune dysfonction cardiaque ou rénale, sans aucune hypertrophie ou fibrose cardiaque (Pilon *et al.*, 2009).

1.5.2.1 Les diètes riches en gras ou HFD (high fat diet)

Ce modèle de DT2 accompagné du syndrome métabolique a été utilisé dans nos études et a fait l'objet d'une publication (El Akoum *et al.*, 2017). Le syndrome métabolique est un ensemble de plusieurs troubles qui augmentent le risque de développer des atteintes cardiovasculaires dont l'athérosclérose, l'hypertension et le diabète. La perturbation métabolique devient un syndrome si le patient a trois des symptômes suivants: a) tour de taille de plus de 40 po chez les hommes et de 35 po chez les femmes; b) taux de triglycérides supérieur ou égal à 150 mg/dL; c) taux du bon cholestérol ou des lipoprotéines de haute densité (HDL) inférieur à 40 mg/dL chez les hommes et à 50 mg/dL chez les femmes; d) glycémie à jeun supérieure ou égale à 100 mg/dL; e) pression artérielle systolique supérieure à 130 mmHg et / ou diastolique supérieure à 85 mmHg (Swarup *et al.*, 2017). Les régimes riches en graisses, HFD, ont été utilisés pour produire l'obésité, la dyslipidémie et la résistance à l'insuline chez les rongeurs pendant de nombreuses décennies. Les complications développées par les régimes riches en graisses ressemblent au syndrome métabolique humain qui développe l'hypertrophie et la fibrose cardiaque, la nécrose myocardique et la stéatose hépatique. Des souris soumises à un régime riche en gras développent l'hypertension, la dysfonction endothéliale, une albuminurie, une hyperinsulinémie, une hyperléptinémie et une infiltration des macrophages dans la médulla rénale (Panchal *et al.*, 2011).

1.5.2.2 Modèles génétiquement modifiés

Des modèles génétiquement modifiés ont permis de bien étudier le diabète. Ces modèles génétiques de l'obésité et du diabète comprennent les souris db/db, les souris ob/ob, les rats obèses diabétiques Zucker et des rats Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty, tandis que les rats Goto-Kakizaki sont diabétiques mais non obèses (Panchal *et al.*, 2011). **Les souris ob/ob (C57BL/6J-ob/ob)**: ce fut l'un des premiers modèles génétiques utilisés pour l'étude du diabète. Ces souris ont hérité d'une mutation autosomique récessive monogénique du gène de la leptine sur le chromosome 6 et elles ont développé une obésité, une hyperinsulinémie et une hyperglycémie après l'âge de 4 semaines (Zhang *et al.*, 1994). **Les souris db/db (souris C57BL/KsJ-db/db)**: ces souris ont hérité d'une mutation récessive autosomique du gène du récepteur de la leptine présent sur le chromosome 4 entraînant une augmentation excessive du poids corporel (Chen *et al.*, 1996). **Les rats obèses diabétiques Zucker (fa/fa)**: le rat diabétique Zucker (ZDF) est

un modèle d'obésité précoce qui présente une mutation du gène du récepteur de la leptine avec hyperinsulinémie et hypertriglycéridémie ainsi qu'un dysfonctionnement diastolique et systolique (Sparks *et al.*, 1998). **Les rats Otsuka Long-Evans Tokushima:** les rats Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ont été utilisés comme modèle de diabète humain et d'obésité chez le rat (Shima *et al.*, 1999). **Les rats Goto-Kakizaki:** les rats Goto-Kakizaki (GK) sont non obèses et spontanément diabétiques. L'apparition du diabète chez ces rats est une interaction de plusieurs événements, y compris la présence de locus de susceptibilité pour certains traits diabétiques, une altération de la gestation induisant une diminution de la prolifération et une perte de différenciation des cellules β (Yasuda *et al.*, 2002).

1.6 L'anatomie du vaisseau sanguin

Les vaisseaux sanguins se divisent en trois grandes catégories : les artères, les capillaires et les veines. Ces vaisseaux, dans lesquels le sang circule, forment un réseau qui commence et finit au cœur. Les parois des artères et des veines sont composées de trois couches : les tuniques externe, moyenne et interne entourant la lumière. Les capillaires ont une paroi composée d'une seule couche de cellules endothéliales, ce qui leur permet d'assurer les échanges entre le sang et le liquide interstitiel par un contact étroit avec les cellules (Fig.32).

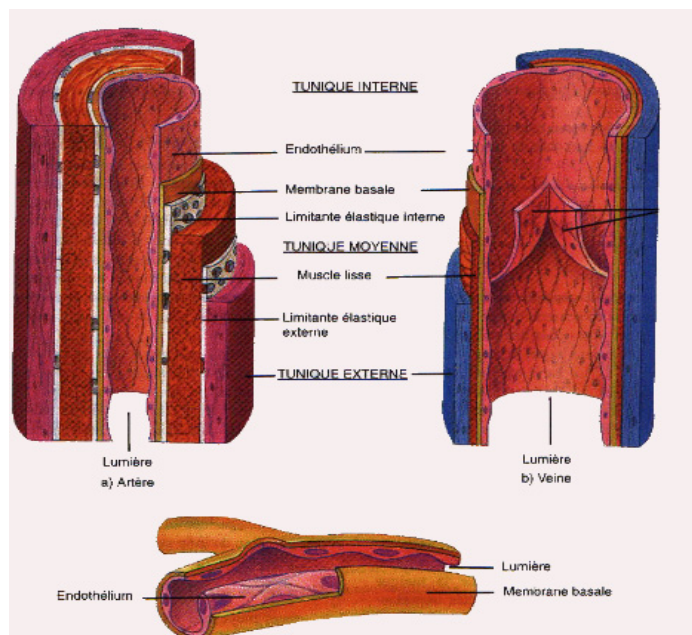


Fig.32: structure des artères, des veines et des capillaires tiré de (<https://pearsonerpi.com/fr/collegial-universitaire/anatomie-physiologie/anatomie-et-physiologie-humaines-5e>).

La structure de l'artère:

La tunique externe ou *externa* : formée essentiellement de fibres de collagènes et d'élastine est parcourue par des vaisseaux lymphatiques et des neurofibres, le tout reposant sur une limitante élastique externe.

La tunique moyenne ou *media* : composée essentiellement de cellules musculaires lisses disposées en anneaux et de feuillettes d'élastine en continue. Elle est parcourue par des fibres nerveuses vasomotrices sympathiques qui peuvent causer en s'associant à d'autres molécules (AngII, ET, NO), soit la vasoconstriction (contraction des muscles lisses) soit la vasodilatation (relâchement des muscles lisses) le tout reposant sur une limitante élastique interne.

La tunique interne ou *intima* : composée des cellules endothéliales reposant sur une fine lame basale. L'endothélium tapisse la lumière de tous les vaisseaux et constitue une surface lisse qui réduit la friction entre le sang et la surface des vaisseaux.

L'aorte est la plus grosse artère située près du cœur ; elle est élastique et contient plus d'élastine que les autres vaisseaux avec une paroi épaisse qui la rend comme un conduit à faible résistance d'où l'appellation artère de conduction. Par contre, les artérioles qui ont leur tunique moyenne formée essentiellement de muscle lisse sont appelées artères périphériques ou de résistance dans lesquelles la friction du sang contre la paroi se manifeste (forces de cisaillement).

La structure de la veine :

Les veines sont formées de trois couches dont les limites sont moins nettes que celles des artères. Leurs parois sont plus minces que celles des artères. La tunique externe est formée de fibres de collagène et d'élastine disposées en faisceaux longitudinaux. La tunique moyenne est mince et contient moins de muscle lisse et d'élastine. Les veines peuvent contenir des valvules veineuses, plus abondantes dans les veines des membres, qui sont des replis de la tunique interne.

La structure du capillaire :

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins. Leurs parois sont composées de cellules endothéliales et ils n'ont donc que la tunique interne. Les capillaires sont organisés en réseaux arborescents dits *lits capillaires*. Selon la structure, les capillaires se divisent en trois types : les capillaires continus forment un revêtement uni et continu et

sont abondants dans les muscles et la peau. Les capillaires fenestrés, très perméables aux liquides avec un endothélium percé de *pores ovales ou fenestrations*, se trouvent dans l'intestin grêle et les glandes endocrines. Les capillaires sinusoides ou discontinus sont présents dans le foie, la rate, les os et présentent une paroi inégale avec des espaces importants entre les cellules endothéliales favorisant la perméabilité aux liquides et aux macromolécules (Fig.32).

L'endothélium vasculaire représente une interface physique et fonctionnelle entre le corpuscule sanguin circulant, les composants sanguins fluides (par exemple les nutriments) et les processus métaboliques tissulaires. Les dommages à l'endothélium vasculaire sont considérés comme un élément pathogène clé dans le déclenchement de l'athérosclérose et des maladies cardiovasculaires (Stephan *et al.*, 2017).

Chapitre 2

Premier article

2.1. Hypothèse :

Les kinines sont des peptides vasoactifs et pro-inflammatoires dont les effets biologiques sont relayés par l'activation de deux récepteurs couplés aux protéines G, appelés récepteurs B₁ et B₂ (RB₁ et RB₂). Alors que le RB₂ joue un rôle protecteur sur le système cardiovasculaire via l'activation de la eNOS, le RB₁ est associé à l'inflammation vasculaire et à la résistance à l'insuline à travers la régulation et l'activation de la iNOS, des cytokines pro-inflammatoires et du stress oxydatif. Cette étude aborde l'hypothèse que l'inhibition de la iNOS peut exercer les mêmes effets bénéfiques que l'antagonisme du RB₁ dans la résistance à l'insuline.

2.2. Objectifs :

Démontrer que le blocage pharmacologique de la iNOS par le 1400W exerce des effets similaires à ceux d'un traitement d'une semaine avec un antagoniste RB₁ (SSR240612).

2.3. Résumé de l'étude :

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été rendus résistants à l'insuline avec un accès libre à l'eau de boisson contenant 10% de D-glucose pendant une période de 9 semaines. Les rats témoins ont reçu l'eau du robinet. Au cours de la dernière semaine, un inhibiteur sélectif de la iNOS, le 1400W (1 mg.kg⁻¹ deux fois par jour) ou son véhicule ont été administrés par voie sous-cutanée. Alors que le traitement avec le 1400W n'a eu aucun impact sur la pression artérielle systolique et la leptine chez les rats nourris au glucose, il a significativement renversé ou atténué l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'insulinorésistance (indice HOMA), le gain de poids pondéral, la formation de peroxy-nitrite (expression de la nitrotyrosine) et la régulation positive des biomarqueurs de l'inflammation (RB₁, carboxypeptidase M, iNOS et IL-1 β) dans le cortex rénal et l'aorte et, dans une certaine mesure, dans le foie.

2.4. Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication: **Haddad, Y., & Couture, R. (2016). Interplay between the kinin B₁ receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. *Br J Pharmacol*, 173(12), 1988-2000. doi: 10.1111/bph.13491.**

RESEARCH PAPER

Interplay between the kinin B₁ receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance

Correspondence Réjean Couture, Department of Molecular and Integrative Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montreal, QC H3C 3J7, Canada. E-mail: rejean.couture@umontreal.ca

Received 11 November 2015; **Revised** 23 February 2016; **Accepted** 26 March 2016

Youssef Haddad and Réjean Couture

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

BACKGROUND AND PURPOSE

Kinins are vasoactive and pro-inflammatory peptides whose biological effects are mediated by two GPCRs, named B₁ and B₂ receptors. While the B₂ receptor plays a protective role in the cardiovascular system via the activation of endothelial NOS, the B₁ receptor is associated with vascular inflammation, insulin resistance and diabetic complications. Because the B₁ receptor is a potent activator of the inducible form of NOS (iNOS), this study has addressed the role of iNOS in the deleterious effects of B₁ receptors in insulin resistance.

EXPERIMENTAL APPROACH

Male Sprague–Dawley rats (50–75 g) had free access to a drinking solution containing 10% D-glucose or tap water (control) for 9 weeks. During the last week, a selective iNOS inhibitor (1400W, 1 mg·kg⁻¹ twice daily) or its vehicle was administered s.c.

KEY RESULTS

Prolonged glucose treatment caused insulin resistance and several hallmarks of type 2 diabetes. Whereas the treatment with 1400W had no impact on the elevated systolic blood pressure and leptin levels in glucose-fed rats, it significantly reversed or attenuated hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, insulin resistance (HOMA index), body weight gain, peroxynitrite formation (nitrotyrosine expression) and the up-regulation of biomarkers of inflammation (B₁ receptor, carboxypeptidase M, iNOS and IL-1β) in renal cortex and aorta and to some extent in the liver.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Pharmacological blockade of iNOS prevents the formation of peroxynitrite, which amplifies the pro-inflammatory effects of B₁ receptors through a positive feedback mechanism. Hence, targeting iNOS can prevent the deleterious effects of B₁ receptors in insulin resistance and peripheral inflammation.

Abbreviations

1400W, *N*-(3-(aminomethyl)benzyl)acetamide; BK, bradykinin; CPM, carboxypeptidase M; HOMA, homeostasis model assessment index; iNOS, inducible NOS; O₂^{•-}, superoxide anion; ONOO⁻, peroxynitrite; qRT-PCR, real-time quantitative RT-PCR; SSR240612, [(2*R*)-2-[[[(3*R*)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2*R*,6*S*]-2,6-dimethylpiperidinyl)methyl]phenyl]-*N*-isopropyl-*N*-methylpropanamide hydrochloride]

Tables of Links

TARGETS		
GPCRs ^a	Catalytic receptors ^b	Enzymes ^c
B ₁ receptor	IRS-1	Carboxypeptidase M
B ₂ receptor		ERK
		Inducible NOS

LIGANDS	
1400W	Leptin
Bradykinin	NO
Diphenylethylidone (DPI)	SSR240612
IL-1 β	

These Tables list key protein targets and ligands in this article which are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Pawson *et al.*, 2014) and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16 (^{a,b,c}Alexander *et al.*, 2015a,b,c).

Introduction

Insulin resistance is considered as an early event in the development of type 2 diabetes mellitus in which mild vascular inflammation is a predictive factor. Vascular inflammation can be initiated by sustained hyperglycaemia-induced oxidative stress, which activates a series of receptors and transcriptional factors leading to increased levels of cellular adhesion molecules, macrophages and leukocyte infiltration in the vasculature and to endothelial dysfunction (He and King, 2004; de Vries *et al.*, 2015; Gleissner, 2015). Recently, we reported that the kinin B₁ receptor is involved in low-grade vascular inflammation and contributes to amplify and perpetuate the vascular oxidative stress in a rat model of insulin resistance induced by prolonged glucose feeding (Dias *et al.*, 2010; Dias and Couture, 2012b; Couture *et al.*, 2014). In this model, oral treatment with the non-peptide B₁ receptor antagonist SSR240612 for 1 week reversed the enhanced expression of B₁ receptors, inducible nitric oxide synthase (iNOS) and other inflammatory key biomarkers (IL-1 β , macrophage migration inhibitory factor, adhesion molecules and macrophages) in the vascular bed (Dias and Couture, 2012b). The same prolonged blockade of B₁ receptors reversed hypertension, metabolic abnormalities (hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and insulin resistance), the enhanced NADPH oxidase activity and the basal production of vascular superoxide anion (O₂^{•-}) (Dias *et al.*, 2010). Moreover, B₁ receptor activation was shown to enhance the production of O₂^{•-} through NADPH oxidase in the aorta of glucose-fed rats and in human epithelial cells (Dias *et al.*, 2010; Talbot *et al.*, 2011). NADPH oxidase is known to produce the predominant source of reactive oxygen species in the vasculature that leads to diabetic complications and cardiovascular diseases (Cai *et al.*, 2003; Taniyama and Griendling, 2003; Griendling and FitzGerald, 2003a; Griendling and FitzGerald, 2003b).

B₁ receptors can also generate high output and prolonged NO production from endothelial cells following the activation of iNOS via G α i and the Src-dependent activation of the ERK/MAPK pathway (Kuhr *et al.*, 2010; Brovkovych *et al.*, 2011). In an oxidative stress environment, the high concentration of NO can rapidly react with O₂^{•-} to form the highly reactive peroxynitrite (ONOO⁻), which causes DNA damage (altering gene expression), inflammation and oxidative stress, notably lipid peroxidation (membranes) and nitration of proteins (enzymes, transporters and ion

channels) (Johansen *et al.*, 2005). Importantly, the genetic deletion of iNOS prevents the development of insulin resistance in mice exposed to a high-fat diet (Perreault and Marette, 2001) and that of age-associated insulin resistance (Ropelle *et al.*, 2013). Mice lacking iNOS were protected against endotoxaemia-induced skeletal muscle insulin resistance and from lipid-induced hepatic insulin resistance through the iNOS/NO/ONOO⁻ pathway that causes tyrosine nitration (the covalent addition of NO₂ to the tyrosine residues) of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and thereby reduces its subsequent insulin-dependent tyrosine phosphorylation (Charbonneau and Marette, 2010; Pilon *et al.*, 2010).

Hence, B₁ receptor-mediated iNOS activation and enhanced expression can be detrimental in cardiometabolic diseases as highlighted in a model of insulin resistance associated with hypertension (Dias and Couture, 2012b). The latter hypothesis was directly tested in the present study by determining whether a 1 week pharmacological treatment with the selective inhibitor of iNOS 1400W (Garvey *et al.*, 1997) could reproduce the beneficial effects of the B₁ receptor antagonist on insulin resistance, vascular and non-vascular inflammation and oxidative stress in the model of glucose-fed rat. The impact of 1400W was also determined on the expression of B₁ receptors and carboxypeptidase M (CPM), a key enzyme involved in the generation of B₁ receptor ligands. This study highlights a partnership between B₁ receptors and iNOS in insulin resistance.

Methods

Animal care and treatments

Male Sprague–Dawley rats (24–30 days old), weighing 50–75 g, were purchased from Charles River Laboratories (Saint-Constant, QC, Canada). Rats were housed two per cage, under standard conditions (22.5°C and 42.5% humidity, on a 12 h/12 h light–dark cycle, using heated wood chip litter as bedding material) in a pathogen-free environment, and allowed free access to a standard chow diet (Teklad Global 18% Protein Rodent Diet) and to a drinking solution containing 10% D-glucose (querySigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) or tap water (control) for a period of 9 weeks.

A total of 24 rats were used in the experiments described here. During the last week (week 9), rats fed with glucose (G) or tap water (C) were randomly divided into four groups

of six rats: group 1 (G + 1400W), group 2 (G + Vehicle), group 3 (C + 1400W) and group 4 (C + Vehicle). 1400W (Focus Biomolecules, Plymouth Meeting, PA, USA), a selective inhibitor of iNOS (Garvey *et al.*, 1997), was given s.c. twice daily at 12 h intervals at the dose of 1 mg·kg⁻¹ in a volume of 1 mL·kg⁻¹ for 7 days. The vehicle (saline) was given in groups 2 and 4. Rats were subjected to several measurements, including systolic blood pressure, blood glucose and body weight during the treatment with 1400W. The dose of 1400W was selected on the basis of studies showing complete inhibition of endotoxin-induced vascular leakage in various rat tissues at the dose of 1 mg·kg⁻¹. When given i.v., rats tolerated a dose of 120 mg·kg⁻¹ of 1400W for a 7 day period, and no apparent haemodynamic effect was seen up to 25 mg·kg⁻¹ (Garvey *et al.*, 1997).

All animal care and experimental procedures complied with the Use of Laboratory Animals and were approved by the Université de Montréal's Committee on Ethics in the Care and Use of Laboratory Animals (protocol 11–140) <http://www.cdea.umontreal.ca> in accordance with the guiding principles as enunciated by the Canadian Council on Animal Care. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath and Lilley, 2015).

Experimental procedures

At the end of the ninth week, the blood was collected by cardiac puncture in overnight-fasted rats under isoflurane anesthesia. Blood samples were collected in tubes containing anticoagulant (Heparin; Sandoz, Boucherville, QC, Canada), and the plasma was separated by centrifugation at 600×g for 15 min at 4°C and stored at –20°C.

Three peripheral tissues (aorta, renal cortex and liver) were removed and kept frozen at –80°C. The thoracic aorta was the sentinel tissue to assess the anti-inflammatory and anti-oxidative effects of B₁ receptor blockade in our previous studies (Dias *et al.*, 2010; Dias and Couture, 2012b). The renal cortex and the liver were selected because diabetes induces glomerulosclerosis and nephropathy and the liver is the organ of glucose metabolism. Proteins, DNA and RNA of these organs were extracted to measure the expression of several inflammatory biomarkers [western blotting and quantitative RT-PCR (qRT-PCR)]. O₂^{•-} was measured in the thoracic aorta by a chemiluminescence technique using lucigenin.

Measurement of systolic blood pressure

Systolic blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography (ADI Instruments Inc., Colorado, CO, USA) using a pad heated at 37°C, and registered with the ADI Instruments software (Lab Chart Pro7.Ink). Each measurement corresponds to the average of 5–7 blood pressure readings taken at 1–2 min intervals.

Biochemical analysis

Blood glucose concentration was determined with a glucometer (Accu-Chek Aviva; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Plasma insulin and leptin concentrations were determined by RIA using the double antibody/polyethylene glycol technique (rat insulin RIA kit and rat leptin RIA kit) from Millipore (St. Charles, MO, USA). The homeostasis model assessment (HOMA) index was used as an index of insulin resistance and calculated with the following formula: [insulin (μU·mL⁻¹) × glucose (mmol·L⁻¹)/22.5] (Matthews *et al.*, 1985).

Measurement of O₂^{•-}

The production of O₂^{•-} was measured in the thoracic aorta according to the lucigenin-enhanced chemiluminescence method (Munzel *et al.*, 1995). The frozen aortic slices (2–5 mg) were pre-incubated in a Krebs-HEPES buffer (saturated with 95% O₂ and 5% CO₂ at room temperature) for 30 min and transferred to a glass scintillation vial containing 5 μM of lucigenin (200 μL in 2 mL Krebs-HEPES) to determine the O₂^{•-} basal level. The chemiluminescence was recorded every minute for 10 min in a dark room using a liquid scintillation counter (Wallac 1409, Turku, Finland). To ascertain the contribution of NADPH oxidase in the basal production of O₂^{•-} in the aorta of control and glucose-fed rats treated or not with 1400W, diphenyleneiodonium (DPI, 10 μmol·L⁻¹), a selective inhibitor of NADPH oxidase, was added to the medium 30 min prior to O₂^{•-} measurement in two additional slices of aortas in each group. The background was counted using a vial with no tissue solution. The final value expressed as cpm·mg⁻¹ of dry weight tissue was calculated as follows: (tissue value – background value) ÷ tissue dry weight.

Western blot analysis

The western blot was performed according to a previous method (Dias *et al.*, 2010; Pouliot *et al.*, 2011). Total proteins

Table 1

List of primer pairs designed by Vector NTI software and used in qRT-PCR analysis

Gene			Sequence		Position	GenBank accession no.
18S	Forward	5'	TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT	3'	363–386	X01117
18S	Reverse	5'	TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT	3'	470–447	X01117
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	NM_030851
IL-1β	Forward	5'	TGT CAC TCA TTG TGG CTG TGG AGA	3'	247–270	NM_031512
IL-1β	Reverse	5'	TGG GAA CAT CAC ACA CTA GCA GGT	3'	411–388	NM_031513

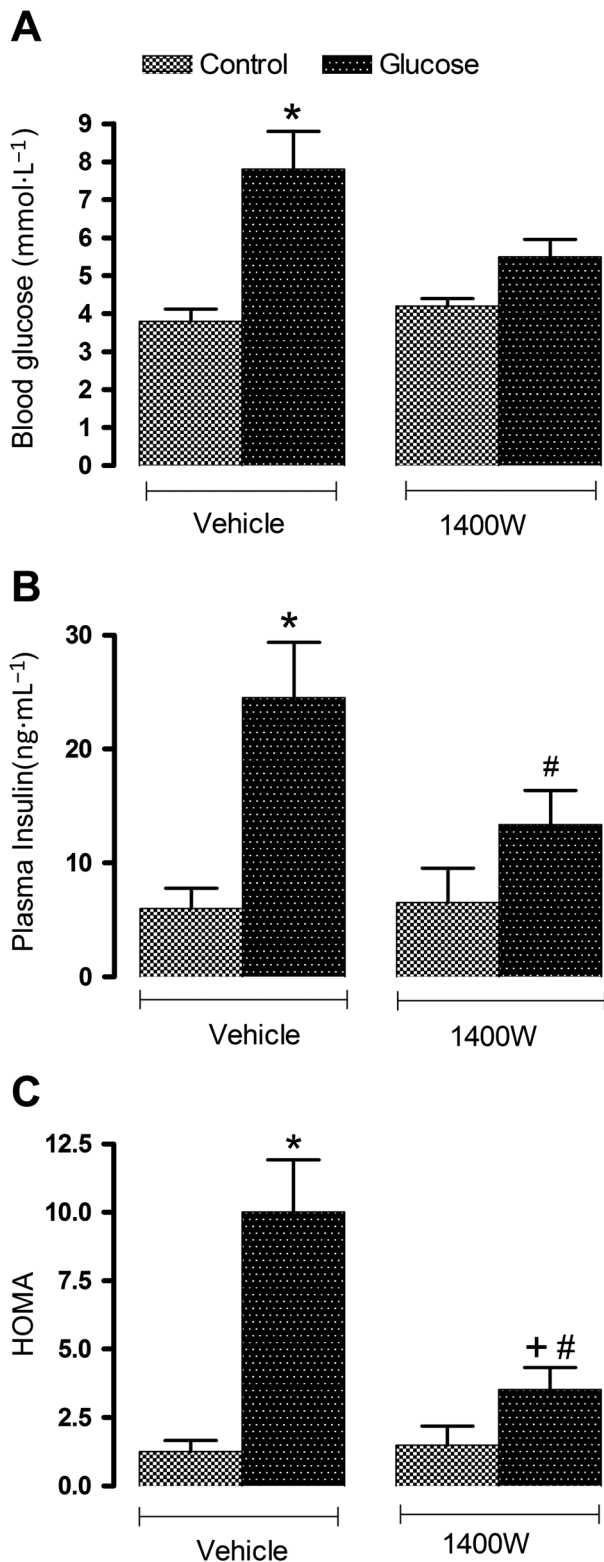


Figure 1

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on (A) blood glucose, (B) plasma insulin and (C) insulin resistance assessed by the HOMA index. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle; #*P* < 0.05 compared with control + 1400W.

were loaded (20–30 µg) in each well of 10% SDS-PAGE. After completion of the migration by electrophoresis, the proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Montreal, QC, Canada) at 100 V for 1 h. The membrane was then washed with PBS-Tween 20 and incubated for 1 h at room temperature in a blocking solution of 5% skimmed milk dissolved in PBS-Tween 20. The membrane was then cut in pieces according to the molecular weight of protein and incubated with specific primary antibodies in PBS-Tween 20 overnight at 4°C. Dynein and β-actin were used as standard proteins. After three sets of 10 min washing with PBS-Tween 20, the membrane was incubated for 1 h at room temperature in PBS-Tween 20 containing 5% skimmed milk with secondary antibodies. The membrane was washed three times (10 min per wash) with PBS-Tween 20 before being subjected to a reaction with a chemiluminescent detection reagent improved for the western blot (Super-Signal®; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A quantitative analysis of proteins was provided by scanning densitometry using the MCID-M1 system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada).

Detection of bradykinin (BK) receptor proteins was made with selective anti-B₁ receptor and anti-B₂ receptor antibodies (1:1000) rose in rabbits (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada) against a conserved amino acid sequence from B₁ and B₂ receptor proteins of mouse and rat. The epitopes used contained 15 amino acids localized in the C-terminal part of the B₁ receptor (VFAGRLKTRVLGTL) and 15 amino acids localized in the second extracellular domain of the B₂ receptor (TIANNFDWVFGVLC). 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 anti-B₁ receptor and anti-B₂ receptor antibodies was further determined using mouse kidney extracts from wild-type, B₁ and B₂ receptor knockout (KO) mice (Lin *et al.*, 2010; Lacoste *et al.*, 2013).

The other primary antibodies were as follows: dynein (1:4000 mouse, SC-13524; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), β-actin (1:5000 mouse, SC-47778; Santa Cruz), IL-1β (1:500 rabbit, SC-7884; Santa Cruz), iNOS (NOS2) (1:1000 rabbit, SC-650; Santa Cruz), nitrotyrosine (1:1500 mouse, 1A6-05233; Millipores, Billerica, MA, USA) and carboxypeptidase M (1:500 rabbit, SC-98698; Santa Cruz). Secondary antibodies were horseradish peroxidase (HRP)-linked goat anti-rabbit SC-2004 and HRP-linked goat anti-mouse SC-2005 (Santa Cruz) used at dilution of 1:25000 (for B₁ and B₂ receptors), 1:5000 (for Dynein, β-actin, IL-1β, iNOS and CPM) and 1:3000 (nitrotyrosine).

qRT-PCR

After the animals had been killed the various organs were removed and around 10 mg of tissue (renal cortex, liver and thoracic aorta) were put in a RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Toronto, ON, Canada) and frozen at -56°C. Total RNA was extracted from the tissue using Qiazol according to the manufacturer's instructions. The single-stranded cDNA was synthesized according to the procedure in the manual supplied by Bio-Rad. qRT-PCR was performed in the SYBR Green Master Mix (QIAGEN) by adding 300 nM of each primer, and the signal was detected by Stratagene Mx3000p

device (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and using rat 18S as standard. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). The PCR conditions were as follows: 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 value represents the number of cycles during which a fluorescent signal increases above the background noise. The relative quantification of gene expression was analysed by the method of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM, and n represents the number of rats. Statistical analysis was performed using Prism™ version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA); data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al.*, 2015). Statistical significance was determined with Student's *t*-test for unpaired samples or with the one-way ANOVA followed by the Bonferroni test for multiple comparisons when *F* achieved $P < 0.05$ and there was no significant variance in homogeneity. Only the value of $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

Effect of 1400W on clinical parameters

Blood glucose level was increased by twofold ($P < 0.05$) in overnight-fasted glucose-fed rats compared with control rats, yet glycaemia was no longer significantly different from control values after 1 week treatment with 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily). Plasma insulin level was significantly increased by fourfold ($P < 0.05$) in glucose-fed rats and was blunted by the treatment with 1400W. The HOMA index of insulin resistance was also significantly enhanced ($P < 0.05$) in glucose-fed rats, yet this value was markedly reduced ($P < 0.05$) but not completely normalized by 1400W. In contrast, the same treatment with 1400W failed to affect glycaemia, insulinaemia and the HOMA index in control rats (Figure 1).

The body weight was not significantly different between glucose-fed and control rats before (8 weeks) and after (9 weeks)

treatment with 1400W (Table 2). Nevertheless, the gain in body weight was significantly higher ($P < 0.05$) in glucose-fed rats after 9 weeks when compared with age-matched controls. The 1 week treatment with 1400W had no impact on the gain in body weight in control rats, but a significant loss in body weight ($P < 0.05$) was measured after treatment with 1400W in glucose-fed rats. As indicated in Table 2, the leptin levels were significantly increased ($P < 0.05$) in the plasma of glucose-fed rats in comparison with control. The 1 week treatment with 1400W had no significant effect on plasma leptin levels in both control and glucose-fed rats, which remained significantly enhanced in the latter group. Systolic blood pressure was significantly enhanced ($P < 0.05$) in 9 week glucose-fed rats compared with control rats, and the high systolic blood pressure value was not significantly affected by the 1 week treatment with 1400W (Table 2).

Effect of 1400W on oxidative stress

The impact of 1400W on oxidative stress was evaluated on the production of O₂^{•-} and the expression of nitrotyrosine, a marker of ONOO⁻. ONOO⁻ can modify tyrosine residue in various proteins to form nitrotyrosine, which could alter protein function and stability. As shown in Figure 2, the basal production of O₂^{•-} was significantly enhanced ($P < 0.05$) in the aorta of glucose-fed rats when compared with control rats. The 1 week treatment with 1400W increased significantly ($P < 0.05$) the basal production of O₂^{•-} in control rats but failed to affect significantly the increased basal production of O₂^{•-} in glucose-fed rats. The basal production of O₂^{•-} in the aorta of control and glucose-fed rats treated or not with 1400W was completely abolished when the tissue was treated for 30 min with DPI (10 μmol·L⁻¹), confirming the involvement of NADPH oxidase in the production of O₂^{•-} (data not shown).

In control renal cortex, nitrotyrosine epitopes were detected in proteins with molecular masses of about 55 and 70–85 kDa. In glucose renal cortex, the intensity of those original nitrotyrosine epitopes increased, and other nitrosylated proteins occurred at about 50 and 60 kDa. Treatment with 1400W significantly reduced the intensity of nitrotyrosine-containing proteins in glucose renal cortex to levels not significantly different from control. Likewise,

Table 2

Body weight, plasma leptin levels and systolic blood pressure

Parameters	Control + Vehicle	Glucose + Vehicle	Control + 1400W	Glucose + 1400W
Body weight at the initiation of protocol (g)	114 \pm 3	110 \pm 3	107 \pm 3	110 \pm 3
Body weight (g) at 8 weeks	587 \pm 25	592 \pm 29	566 \pm 21	571 \pm 37
Body weight (g) at 9 weeks	603 \pm 26	635 \pm 18	573 \pm 20	537 \pm 15
Body weight gain/loss (g)	16 \pm 2	43 \pm 2*	13 \pm 3	(-) 34 \pm 2 ^{##}
Plasma leptin (ng·mL ⁻¹)	3.8 \pm 0.3	10.4 \pm 2.2*	4.6 \pm 0.8	12.7 \pm 2.5 [#]
Systolic blood pressure (mm Hg) at 9 weeks	109 \pm 3	127 \pm 3*	119 \pm 3	127 \pm 3

Values represent the mean \pm SEM of six rats per group. Statistical comparison (*) to control + vehicle rats, (+) to glucose + vehicle and (#) to control + 1400W is indicated by

* $P \leq 0.05$,

† $P \leq 0.05$,

$P \leq 0.05$.

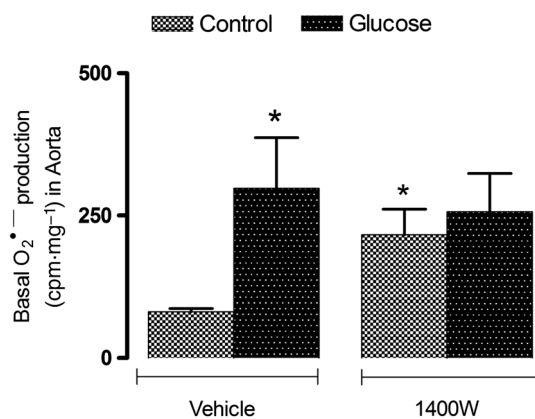


Figure 2

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on basal O₂⁻ production in the thoracic aorta. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle.

nitrosylated proteins with molecular masses of about 70–80 and 90–95 kDa were detected in control aorta, and their intensity was higher in glucose aorta, which also displayed

additional nitrosylated proteins at molecular masses of 110 and 150 kDa. Treatment with 1400W significantly reduced the expression of these nitrosylated proteins in both control and glucose aortas (Figure 3).

Effect of 1400W on B₁ receptors and carboxypeptidase M

Levels of B₁ receptor mRNA and protein were markedly and significantly enhanced in the three tissues (renal cortex, aorta and the liver) of glucose-fed rats (Figure 4). The 1 week treatment with 1400W reduced B₁ receptor expression, particularly at the mRNA level in renal cortex, aorta and liver. While B₁ receptor mRNA levels were completely abolished by 1400W, B₁ receptor protein levels remained significantly increased when compared with control values in aorta and liver. The lack of correlation between B₁ receptor gene and protein expression is unexplained but may indicate that the B₁ receptor remains expressed at the cell membrane beyond the inhibition of its synthesis by 1400W. The treatment with 1400W failed, however, to affect significantly B₁ receptor mRNA and protein expression in the three tissues in control rats (Figure 4).

Protein expression of CPM was also significantly increased (*P* < 0.05) in the renal cortex, aorta and liver of

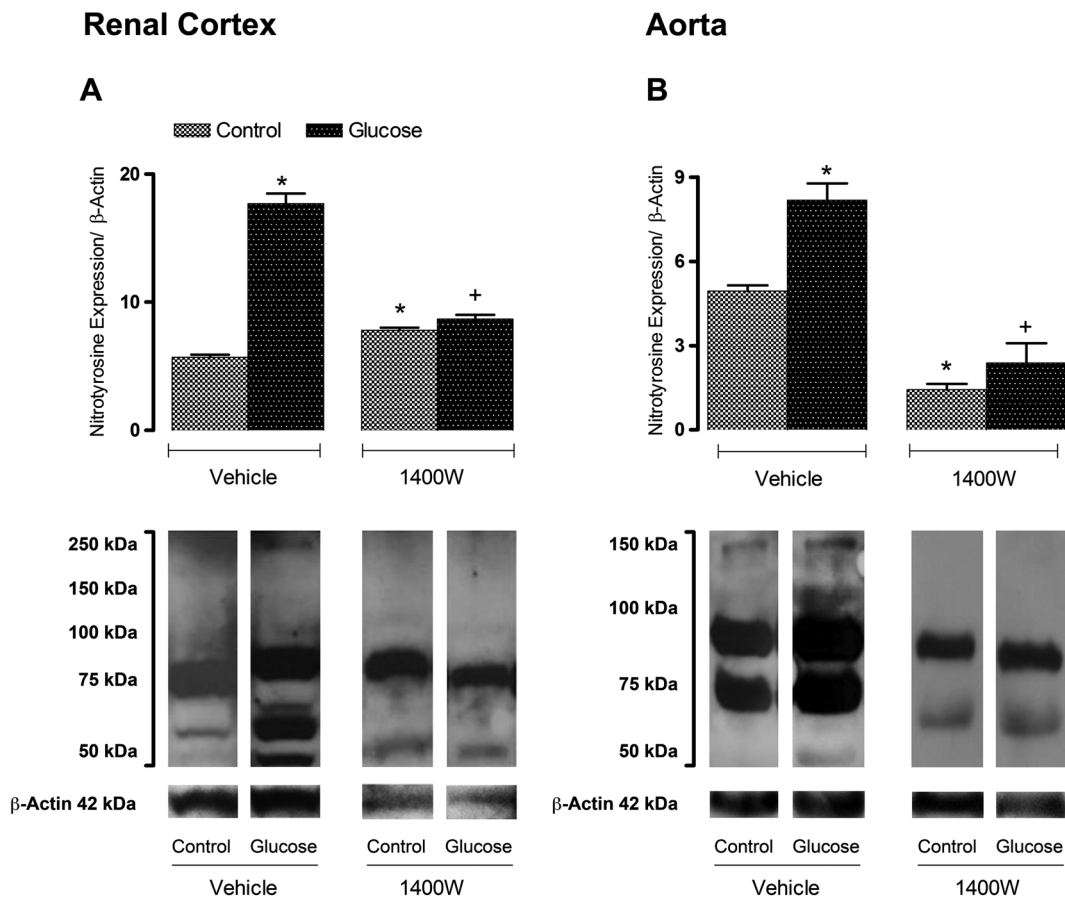
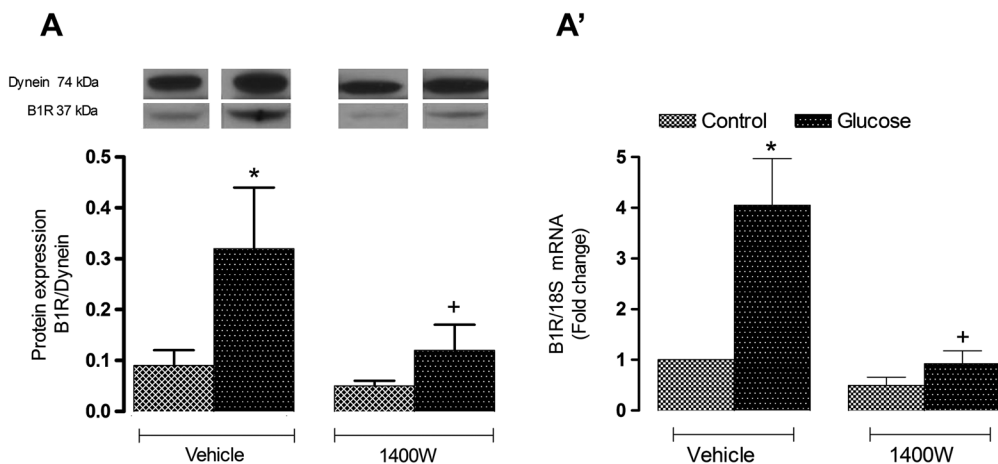


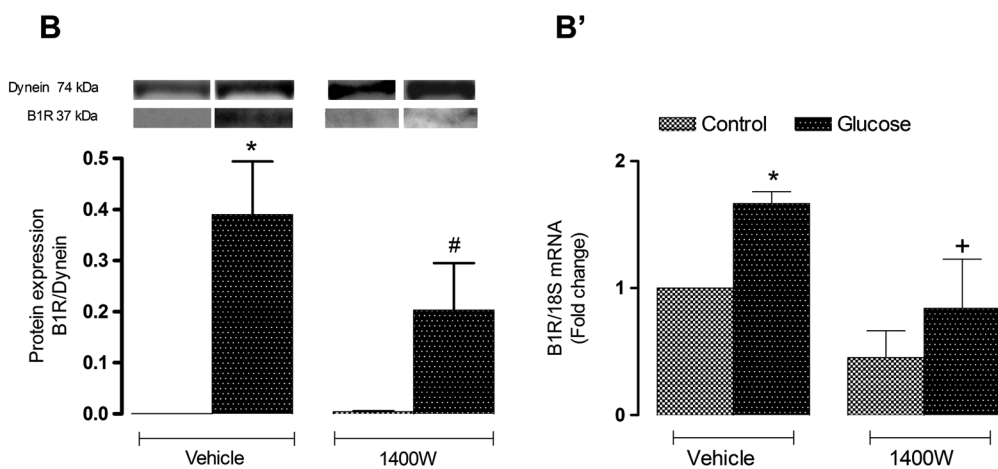
Figure 3

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on nitrotyrosine expression in (A) renal cortex and (B) thoracic aorta. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle.

Renal Cortex



Aorta



Liver

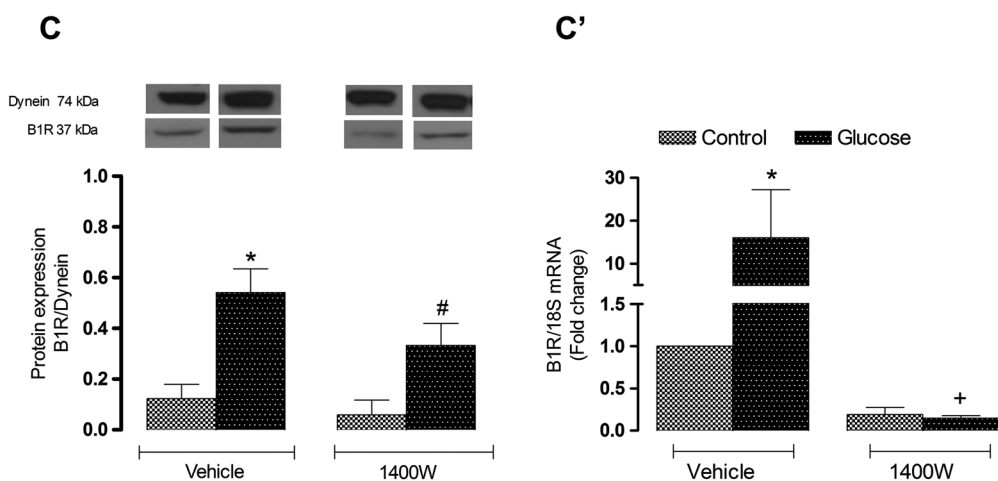
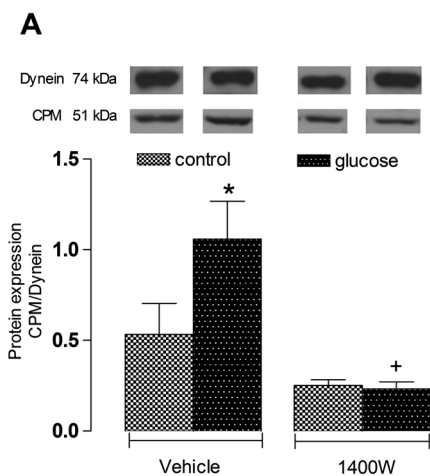


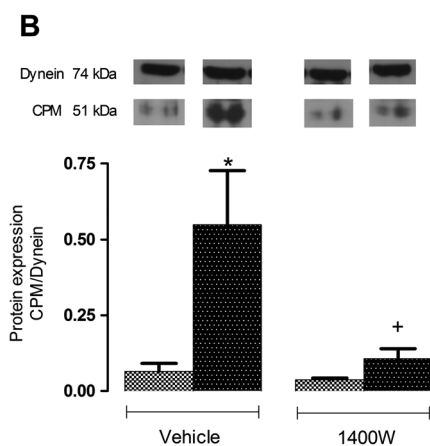
Figure 4

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on B₁ receptor expression in (A, A') renal cortex, (B, B') thoracic aorta and (C, C') liver. The expression of B₁ receptors was measured at the protein level by western blot (A, B, C) and at mRNA level by qRT-PCR (A', B', C'). Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle; #*P* < 0.05 compared with control + 1400W.

Renal Cortex



Aorta



Liver

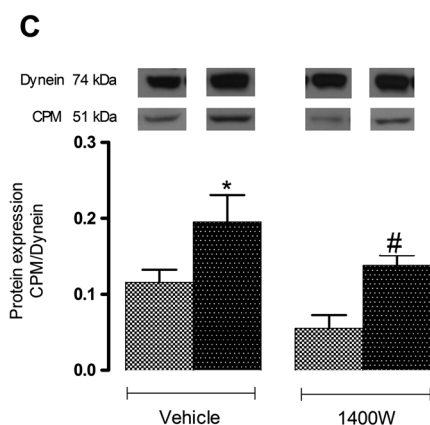
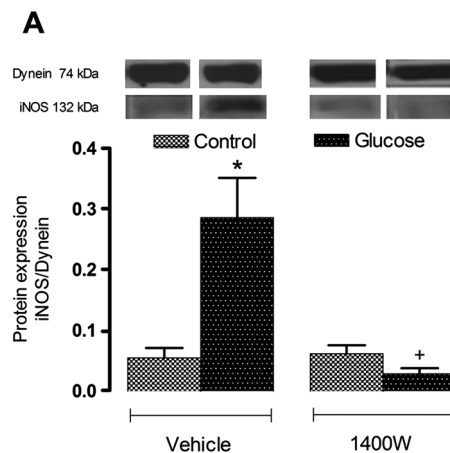


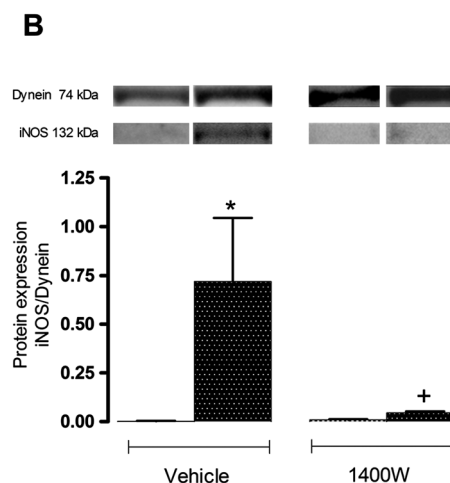
Figure 5

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on membrane CPM expression in (A) renal cortex, (B) thoracic aorta and (C) liver. The expression of CPM was measured at protein level by western blot. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle; #*P* < 0.05 compared with control + 1400W.

Renal Cortex



Aorta



Liver

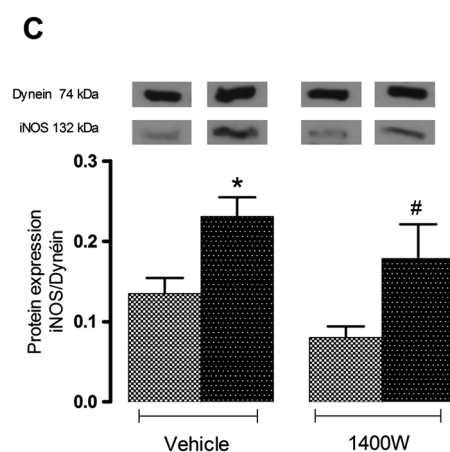
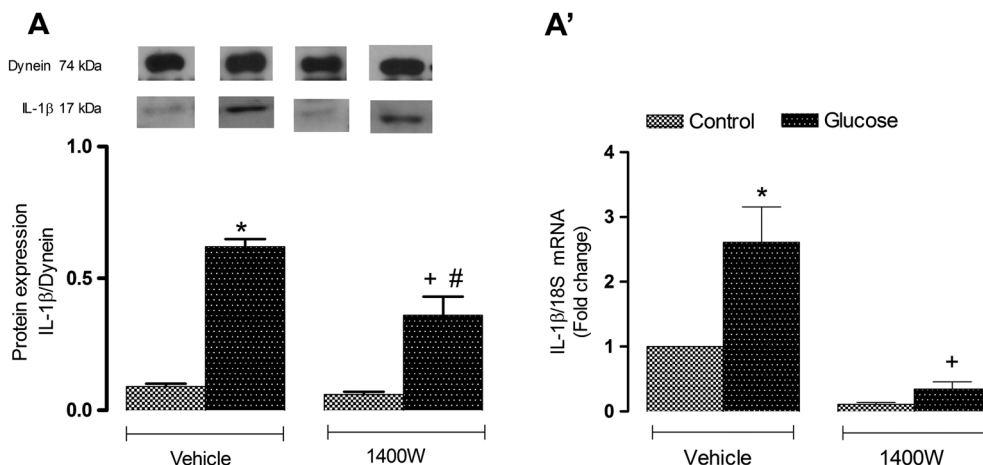


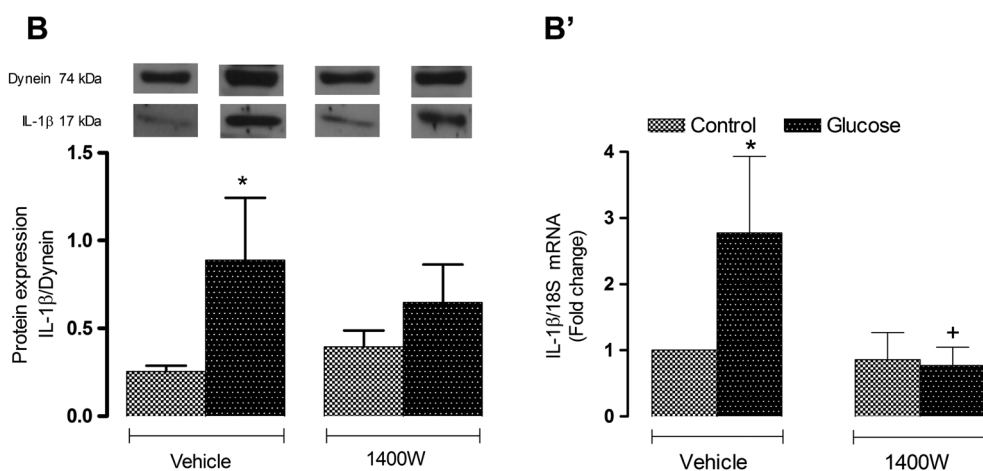
Figure 6

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on the iNOS expression in (A) renal cortex, (B) thoracic aorta and (C) liver. The expression of iNOS was measured at protein level by western blot. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle; #*P* < 0.05 compared with control + 1400W.

Renal Cortex



Aorta



Liver

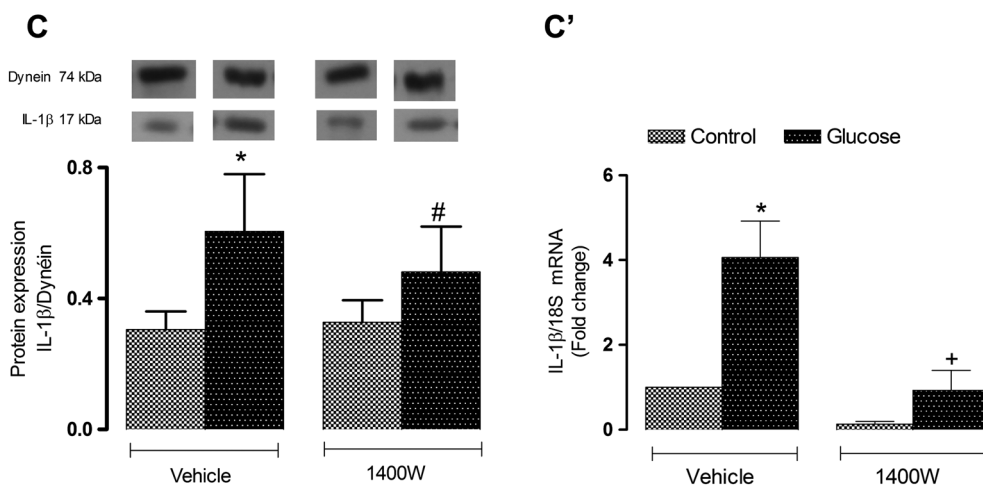


Figure 7

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on IL-1β expression in (A, A') renal cortex, (B, B') thoracic aorta and (C, C') liver. The expression of IL-1β was measured at the protein level by western blot (A, B, C) and at mRNA level by qRT-PCR (A', B', C'). Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle; #*P* < 0.05 compared with control + 1400W.

glucose-fed rats. The 1 week treatment with 1400W abolished the overexpression of CPM in the renal cortex and aorta of glucose-fed rats but failed to affect that in the liver. 1400W had no significant impact in the three control tissues (Figure 5).

Effect of 1400W on iNOS and IL-1 β

Protein expression of iNOS was found to be significantly increased ($P < 0.05$) in the renal cortex, aorta and liver of glucose-fed rats. The 1 week treatment with 1400W abolished the enhanced expression of iNOS in the two former tissues but had no significant effect on iNOS in the liver of glucose-fed rats. Treatment with 1400W had no significant impact in the three control tissues (Figure 6). In glucose-fed rats, the expression of IL-1 β was also significantly enhanced at mRNA and protein levels in the renal cortex, aorta and liver (Figure 7). The 1 week treatment with 1400W abolished the increased mRNA expression in the three tissues in glucose-fed rats without affecting basal expression of IL-1 β in control rats. The impact of 1400W on IL-1 β protein expression was less striking. For instance, it had a reducing effect in the renal cortex and aorta but not in the liver where IL-1 β protein expression remained significantly elevated compared with its control (Figure 7).

Effect of 1400W on B₂ receptor expression

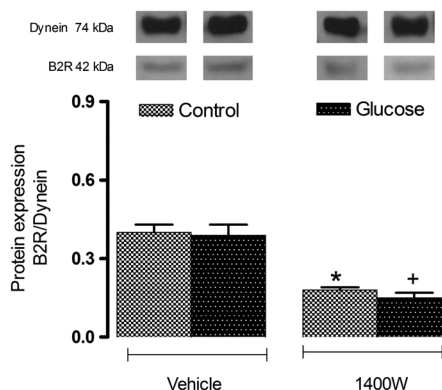
Protein expression of B₂ receptors was not affected in the renal cortex and aorta but was significantly increased ($P < 0.05$) in the liver of glucose-fed rats. Although B₂ receptor expression was not altered by the 1 week treatment with 1400W in the aorta, it was significantly decreased in the control and glucose renal cortex ($P < 0.05$). In contrast, treatment with 1400W increased the expression of B₂ receptors in the control liver ($P < 0.05$) to values measured in glucose-fed rats, showing an absence of inhibition of the upregulated B₂ receptors in the liver of glucose-fed rats (Figure 8).

Discussion

In this study, we demonstrated that 1 week treatment with a selective inhibitor of iNOS (1400W) improved insulin resistance, hyperglycaemia, hyperinsulinaemia and reversed body weight gain without affecting hypertension and hyperleptinaemia in glucose-fed rats. The beneficial effects of 1400W on those metabolic abnormalities were associated with a correction of ONOO⁻ formation and of upregulated biomarkers of inflammation (B₁ receptor, iNOS and IL-1 β) in peripheral tissues. In addition, the up-regulation of CPM (kininase I), a key enzyme involved in the biotransformation of BK and Lys-BK into their active C-terminal metabolites (des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK), the preferred endogenous agonists at B₁ receptors (Regoli and Gobeil, 2015), was reversed by 1400W in glucose-fed rats. These findings strongly suggest that the deleterious effects of iNOS are linked to B₁ receptor activation. The production of ONOO⁻ upon iNOS activation by B₁ receptors may contribute to insulin resistance by blocking tyrosine phosphorylation of IRS-1 subsequently to tyrosine nitration (Pilon *et al.*, 2010). Because the B₁ receptor is virtually absent in physiological situations, this study is the first to suggest that the reactive nitrogen

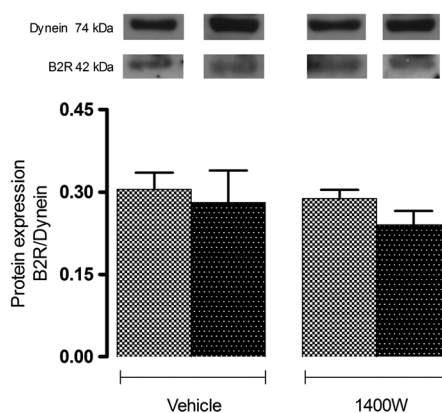
Renal Cortex

A



Aorta

B



Liver

C

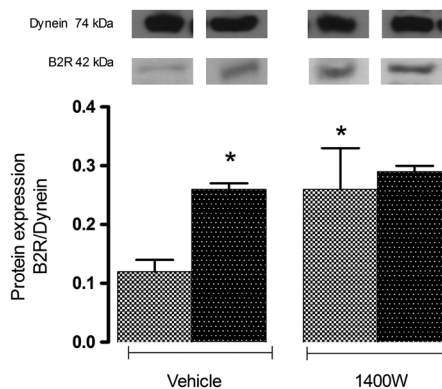


Figure 8

Effect of s.c. administered 1400W (1 mg·kg⁻¹ twice daily) for 7 days on B2R expression in (A) renal cortex, (B) thoracic aorta and (C) liver. The expression of B2R was measured at protein level by western blot. Data are mean \pm SEM obtained from six rats per group. * $P < 0.05$ compared with control + vehicle; + $P < 0.05$ compared with glucose + vehicle.

derivative ONOO^- is more important than $\text{O}_2^{\bullet-}$ in hyperglycaemia-induced up-regulation of B_1 receptors and may act as a positive feedback mechanism (Figure 9).

Impact of 1400W on peripheral cardiometabolic targets and oxidative stress

Levels of $\text{O}_2^{\bullet-}$, a marker of oxidative stress, were significantly enhanced in the aorta of glucose-fed rats and remained unaffected by 1400W. In this model of insulin resistance, basal production of $\text{O}_2^{\bullet-}$ derived mainly from NADPH oxidase (sensitive to DPI), which was also found to be activated by a B_1 receptor agonist to raise the formation of $\text{O}_2^{\bullet-}$ in the aorta of glucose-fed rats (Dias *et al.*, 2010). Thus, the failure of 1400W to prevent the enhanced generation of $\text{O}_2^{\bullet-}$ is logical. Indeed, the inhibition of iNOS prevents the formation of NO and thereby is likely to compromise its binding with $\text{O}_2^{\bullet-}$ to form ONOO^- . This can afford an explanation for the inhibition of ONOO^- in aorta and renal cortex with the consequent accumulation of $\text{O}_2^{\bullet-}$ in the tissue as observed in control aorta under iNOS inhibition.

Previous studies have reported that the B_1 receptor can be upregulated by its own agonist in human fibroblasts (Schanstra *et al.*, 1998) and *in vivo* on blood vessels as the blockade of B_1 receptors with SSR240612 reversed the up-regulation of B_1 receptors in glucose-fed rats (Dias *et al.*, 2010; Dias and Couture, 2012a,b). The enhanced formation of B_1 receptor agonists (des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK) following the overexpressed CPM appears therefore a feasible mechanism for B_1 receptor up-regulation. By reversing the up-regulation of CPM with 1400W, the over activation of

the B_1 receptor by its endogenous agonists is suppressed, leading to a normalisation of B_1 receptor expression at mRNA and protein levels. By this mechanism, iNOS inhibition targets both B_1 receptor ligands and B_1 receptor expression.

In a recent study, we have shown that a 1 week treatment with the B_1 receptor antagonist SSR240612 reversed body weight gain without affecting hyperleptinaemia in glucose-fed rats (Dias and Couture, 2012a), which reinforces a role for the B_1 receptor in obesity that could be mediated by iNOS as the up-regulation of iNOS in retroperitoneal adipose tissue was also reversed by SSR240612 in glucose-fed rats. Obesity is associated with increased iNOS expression in insulin-sensitive tissues in rodents and humans, and inhibition of iNOS ameliorates obesity-induced insulin resistance (Kaneki *et al.*, 2007). However, a primary role for leptin in body weight gain associated with B_1 receptors and iNOS is not supported by our studies using either SSR240612 (Dias and Couture, 2012a) or 1400W. Thus, the B_1 receptor contributes to insulin resistance through a mechanism that is iNOS-dependent and leptin-independent.

Although 1400W prevented insulin resistance, it failed to affect the associated hypertension in chronic glucose-fed rats. This may indicate that hypertension is not related to peripheral iNOS or to the overproduction of vascular oxidative stress ($\text{O}_2^{\bullet-}$ and ONOO^-) or to peripheral B_1 receptor expression and activation. Indeed, it was found that only non-peptide antagonists of B_1 receptors that could pass the blood-brain barrier to inhibit B_1 receptors in the central nervous system can reverse high systolic blood pressure in glucose-fed rats, spontaneously hypertensive rats and angiotensin II-induced hypertension (Lungu *et al.*, 2007; De Brito Garipey *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2010).

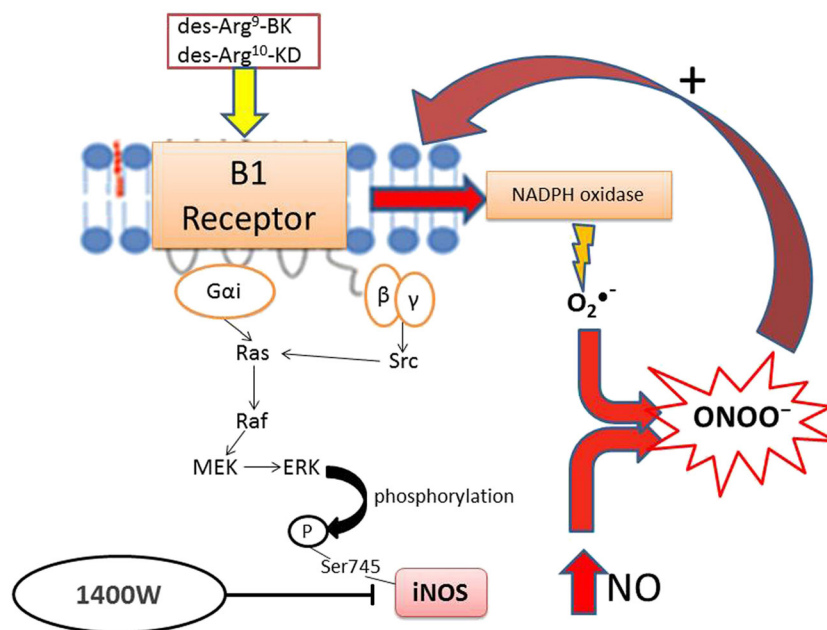


Figure 9

Schematic diagram of the signalling pathway activated by B_1 receptor agonists leading to the formation of ONOO^- upon post-translational activation of iNOS and NADPH oxidase. Activation of the B_1 receptor through $\text{G}\alpha\text{i}$ and $\beta\gamma$ -dependent activation of Src, Ras, Raf and MEK leads to ERK-dependent phosphorylation of iNOS on Ser⁷⁴⁵ that causes high NO output (Brovkovych *et al.*, 2011). Simultaneously, B_1 receptor agonists can activate NADPH oxidase to generate $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Dias *et al.*, 2010) that can rapidly react with NO to form ONOO^- . The latter exerts a positive feedback loop to enhance the expression of B_1 receptors. Blockade of iNOS with 1400W prevents this vicious cycle and the pro-inflammatory effects of B_1 receptors.

Interestingly, increased expression and activity of iNOS were reported in superior mesenteric arteries from 12 to 14 week streptozotocin-induced diabetic rats (Bardell and MacLeod, 2001). In this model of type 1 diabetes, rats are not hypertensive and display a phenotype of cardiovascular depression (depressed mean arterial blood pressure and heart rate resistant to 1400W) associated with enhanced expression of iNOS and nitrotyrosine in cardiovascular tissues and with endothelial dysfunction (Nagareddy *et al.*, 2005). Consistently, iNOS knockout mice are resistant to endothelial dysfunction during diabetes (Gunnnett *et al.*, 2003). Hence, iNOS induction in cardiovascular tissues may not contribute directly to high systemic blood pressure in insulin resistance and to low systemic blood pressure in type 1 diabetes despite impairment of endothelial function.

Impact of 1400W on inflammatory markers

The suppression of the enhanced expression of B₁ receptors and IL-1 β at mRNA levels by 1400W occurred in the three tissues studied (aorta, renal cortex and the liver) of chronic glucose-fed rats, suggesting that the inflammatory process is not restricted to the vasculature. Nevertheless, protein expression of the B₁ receptor, CPM, IL-1 β and iNOS was more resistant to 1400W in the liver, suggesting that the enhanced expression of these markers in the liver may be differently regulated at transcriptional and post-transcriptional levels in this model of insulin resistance. Also, B₂ receptor protein expression was increased in the liver but not in the two other tissues in glucose-fed rats, and again, it was resistant to iNOS blockade. In agreement with this study, 1 week blockade of B₁ receptors with SSR240612 reversed the overexpression of iNOS, B₁ receptors and IL-1 β in the aorta of glucose-fed rats (Dias *et al.*, 2010; Dias and Couture, 2012b). Hence, in addition to being involved in the ERK/MAPK activation of iNOS, the B₁ receptor may control the expression of iNOS through ONOO⁻ formation in blood vessel. In this context, it is worth noting that B₁ receptor-induced activation of iNOS plays a primary role in lethal thrombosis in a rat model of septic shock in diabetes (Tidjane *et al.*, 2015).

Conclusion

Pharmacological blockade of iNOS provides the same beneficial effects as B₁ receptor blockade in insulin resistance and peripheral inflammation in chronic glucose-fed rats. Inhibition of ONOO⁻ formation by the selective iNOS blocker 1400W appears to be a possible downstream target mechanism that prevents the positive feedback up-regulation and activation of the pro-inflammatory B₁ receptor by endogenous ligands under the control of carboxypeptidase M. These findings have clinical relevance in the treatment of insulin resistance and type 2 diabetes where iNOS and the B₁ receptor represent promising therapeutic targets.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant-in-Aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119329) to R. C. Y.H. received a PhD Studentship award from the Department of Molecular and Integrative Physiology of the

Université de Montréal. The authors greatly appreciate the technical assistance of Jacques Sénécal for the pharmacological treatment and RIA studies.

Author contributions

Y.H. and R.C. conceived and designed the experiments. Y.H. performed the experiments, analysed the data and drafted the paper. R.C. supervised the study and edited and wrote the final version of the manuscript. All authors approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organizations engaged with supporting research.

References

- Alexander SPH, Davenport AP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE *et al.* (2015a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 172: 5744–5869.
- Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE *et al.* (2015b). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Catalytic receptors. *Br J Pharmacol* 172: 5979–6023.
- Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE *et al.* (2015c). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Enzymes. *Br J Pharmacol* 172: 6024–6109.
- Bardell AL, Macleod KM (2001). Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 252–259.
- 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: 258–269.
- Cai H, Griendling KK, Harrison DG (2003). The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol Sci* 24: 471–478.
- Charbonneau A, Marette A (2010). Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins. *Diabetes* 59: 861–871.
- Couture R, Blaes N, Girolami JP (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol* 12: 223–248.
- Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA *et al.* (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3461–3471.

- De Brito Garipey H, Carayon P, Ferrari B, Couture R (2010). Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides* 44: 191–198.
- de Vries MA, Alipour A, Klop B, van de Geijn GJ, Janssen HW, Njo TL *et al.* (2015). Glucose-dependent leukocyte activation in patients with type 2 diabetes mellitus, familial combined hyperlipidemia and healthy controls. *Metabolism* 64: 213–217.
- Dias JP, Couture R (2012a). 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: 244–253.
- Dias JP, Couture R (2012b). Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol* 60: 61–69.
- 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: e12622.
- Garvey EP, Oplinger JA, Furfine ES, Kiff RJ, Laszlo F, Whittle BJ *et al.* (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 272: 4959–4963.
- Glæssner CA (2015). The vulnerable vessel. *Vascular disease in diabetes mellitus*. *Hamostaseologie* 35: 267–271.
- Griendling KK, Fitzgerald GA (2003a). Oxidative stress and cardiovascular injury: part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: 1912–1916.
- Griendling KK, Fitzgerald GA (2003b). Oxidative stress and cardiovascular injury: part II: animal and human studies. *Circulation* 108: 2034–2040.
- Gunneth CA, Heistad DD, Faraci FM (2003). Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke* 34: 2970–2974.
- He Z, King GL (2004). Protein kinase C β isoform inhibitors: a new treatment for diabetic cardiovascular diseases. *Circulation* 110: 7–9.
- Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol* 4: 5.
- Kaneki M, Shimizu N, Yamada D, Chang K (2007). Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 9: 319–329.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44: 145–154.
- 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.
- 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: 1940–1945.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2 $^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods* 25: 402–408.
- Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F *et al.* (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: 375–387.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419.
- McGrath JC, Lilley E (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3189–3193.
- Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95: 187–194.
- Nagareddy PR, Xia Z, McNeill JH, Macleod KM (2005). Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H2144–H2152.
- Pawson AJ, Sharman JL, Benson HE, Faccenda E, Alexander SP, Buneman OP *et al.* (2014). The IUPHAR/BPS guide to PHARMACOLOGY: an expert-driven knowledge base of drug targets and their ligands. *Nucleic Acids Res* 42: D11098–D11106.
- Perreault M, Marette A (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 7: 1138–1143.
- Pilon G, Charbonneau A, White PJ, Dallaire P, Perreault M, Kapur S *et al.* (2010). Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO $^-$ induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One* 5: e15912.
- Pouliot M, Hetu S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 92: 482–489.
- Regoli D, Gobeil F Jr (2015). Critical insights into the beneficial and protective actions of the kallikrein-kinin system. *Vascul Pharmacol* 64: 1–10.
- Ropelle ER, Pauli JR, Cintra DE, da Silva AS, De Souza CT, Guadagnini D *et al.* (2013). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against aging, S-nitrosation, and insulin resistance in muscle of male mice. *Diabetes* 62: 466–470.
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB *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. *J Clin Invest* 101: 2080–2091.
- 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: 1447–1456.
- Taniyama Y, Griendling KK (2003). Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42: 1075–1081.
- Tidjane N, Hachem A, Zaid Y, Merhi Y, Gaboury L, Girolami JP *et al.* (2015). 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 Inflamm* 13: 40–52.

Chapitre 3

Deuxième article

3.1. Hypothèse :

Le récepteur B₁ (RB₁) des kinines contribue à la résistance à l'insuline, un événement précoce du diabète de type 2, à travers la régulation et l'activation de la iNOS, des cytokines pro-inflammatoires et du stress oxydatif. Cette étude porte sur l'hypothèse que l'inhibition de la kininase 1 (carboxypeptidase M, CPM), une enzyme clé impliquée dans la biosynthèse des agonistes du RB₁, exerce les mêmes effets bénéfiques que l'antagonisme du RB₁ dans la résistance à l'insuline.

3.2. Objectifs :

Démontrer que le blocage pharmacologique de la kininase 1 (CPM) exerce des effets similaires à ceux d'un traitement d'une semaine avec un antagoniste du RB₁ (SSR240612) ou un inhibiteur de la iNOS (1400W).

3.3. Résumé de l'étude :

Des rats mâles Sprague-Dawley ont été rendus résistants à l'insuline avec un accès libre à l'eau contenant 10% de D-glucose pendant une période de 9 semaines. Les rats témoins ont reçu l'eau du robinet. Au cours de la dernière semaine, la kininase 1 a été bloquée avec le Mergetpa (1mg.kg⁻¹ deux fois par jour, s.c.) et l'impact a été déterminé sur l'insulinorésistance (HOMA index), les niveaux d'hormones métaboliques, le stress oxydatif et l'expression de plusieurs marqueurs d'inflammation par Western blot et qRT-PCR. Les rats nourris au glucose présentaient une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une hyperléptinémie, une résistance à l'insuline, une hypertension, un gain de poids pondéral et une expression accrue de plusieurs marqueurs (RB₁, CPM, iNOS et IL-1β) dans le cortex rénal, l'aorte et le foie. Le Mergetpa a permis de réduire l'hyperglycémie, l'indice HOMA, la surexpression des marqueurs de l'inflammation ainsi que la production basale de l'anion superoxyde. Ce traitement avec le Mergetpa chez les rats glucosés a aussi permis de réduire la surexpression de la CPM contribuant à l'inhibition de la formation des agonistes et de l'induction du RB₁.

3.4. Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication: **Haddad, Y., & Couture, R. (2017). Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B₁ Receptor in Insulin Resistance. *Frontiers in Pharmacology*, 8(509). doi: 10.3389/fphar.2017.00509.**



Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B₁ Receptor in Insulin Resistance

Youssef Haddad and Réjean Couture*

Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

Patrizia Ballerini,
Università degli Studi "G. d'Annunzio"
Chieti - Pescara, Italy

Reviewed by:

Vishal Diwan,
Mater Research, Australia
Martina Montagnana,
University of Verona, Italy
Luigi Brunetti,
Università degli Studi "G. d'Annunzio"
Chieti - Pescara, Italy

*Correspondence:

Réjean Couture
rejean.couture@umontreal.ca

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 08 June 2017

Accepted: 19 July 2017

Published: 02 August 2017

Citation:

Haddad Y and Couture R (2017)
Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic
Target for Kinin B₁ Receptor in Insulin
Resistance. *Front. Pharmacol.* 8:509.
doi: 10.3389/fphar.2017.00509

Kinin B₁ receptor (B₁R) contributes to insulin resistance, an early event in type 2 diabetes, through the upregulation and activation of the inducible form of nitric oxide synthase (iNOS), pro-inflammatory cytokines and the oxidative stress. This study addresses the hypothesis that inhibition of kininase 1 (carboxypeptidase M, CPM), the key enzyme involved in the biosynthesis of B₁R agonists, could exert the same beneficial effects to B₁R antagonism in insulin resistance. Male Sprague-Dawley rats were made insulin resistant with a drinking solution containing 10% D-glucose for a period of 9 weeks. Control rats received tap water. During the last week, kininase 1 was blocked with Mergetpa (1 mg kg⁻¹ twice daily, s.c.) and the impact was determined on insulin resistance (HOMA index), metabolic hormone levels, oxidative stress and the expression of several markers of inflammation by western blot and qRT-PCR. Glucose-fed rats displayed hyperglycemia, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, insulin resistance, hypertension, positive body weight gain, and enhanced expression of B₁R, CPM, iNOS, and IL-1 β in renal cortex, aorta and liver. Markers of oxidative stress (superoxide anion and nitrotyrosine expression) were also enhanced in aorta and renal cortex. Mergetpa reversed and normalized most of those alterations, but failed to affect leptin levels and hypertension. Pharmacological blockade of kininase 1 (CPM) exerted similar beneficial effects to a 1-week treatment with a B₁R antagonist (SSR240612) or an iNOS inhibitor (1,400 W). These data reinforce the detrimental role of B₁R in insulin resistance and recommend CPM as a new therapeutic target.

Keywords: bradykinin, carboxypeptidase M, inducible nitric oxide, inflammatory markers, insulin resistance, Mergetpa, oxidative stress

INTRODUCTION

Kininase I-type carboxypeptidases are key enzymes involved in the biotransformation of native kinin agonists (bradykinin (BK) and Lys-BK or kallidin) acting at the constitutive B₂ receptor (B₂R) into B₁ receptor agonists (des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK) by specifically removing the COOH-terminal Arg residue (Zhang et al., 2013a). An important constitutively active membrane-bound kininase 1 is carboxypeptidase M (CPM, EC 3.4.17.12), an Arg-carboxypeptidase expressed in a wide variety of cell types, including renal, vascular, neural, pulmonary, and immune cells (Deiteren et al., 2009). This enzyme is strategically localized to regulate kinin activity in inflammatory processes as it is upregulated during tissue damage and by pro-inflammatory

cytokines similarly to the B1R (Schremmer-Danninger et al., 1998; Deiteren et al., 2009; Kashuba et al., 2013; Couture et al., 2014). In addition to generating B1R agonists in close proximity to the receptor, biochemical studies in transfected cells suggest that CPM interacts with the B1R to enhance B1R signaling. Kinin (BK or kallidin) binding to the CPM active site causes a conformational activation of the B1R (Zhang et al., 2013a) and basal binding of CPM to extracellular loop 2 of the B1R results in positive allosteric modulation of B1R signaling to its orthosteric agonist (Zhang et al., 2013b). Recently, CPM and B1R were found upregulated along with the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and interleukin-1 β (IL-1 β) in aorta, renal cortex and liver in a rat model of insulin resistance induced by high glucose feeding (Haddad and Couture, 2016). Inhibition of iNOS for 1-week with 1,400 W (N-(3-aminomethyl-benzyl acetamide)) (Haddad and Couture, 2016) or B1R with SSR240612 (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a,b) reversed insulin resistance and its associated metabolic features (hyperglycemia, hyperinsulinemia) through the inhibition of the oxidative stress and the nuclear factor NF- κ B pathway leading thereby to the concomitant suppression of CPM, B1R, iNOS, and IL-1 β overexpression. These studies provided evidence that iNOS and B1R are engaged in a reciprocal upregulation that contributes to insulin resistance and peripheral inflammation.

In addition to upregulating iNOS in insulin resistance, B1R can activate iNOS via G α i and the Src-dependent activation of the ERK/MAPK pathway leading to a large production of nitric oxide (NO) (Kuhr et al., 2010; Brovkovich et al., 2011). Moreover, B1R stimulation was shown to enhance the production of superoxide anion (O $_2^{\bullet-}$) through NADPH oxidase in vessel of glucose-fed rats and in human epithelial cells (Dias et al., 2010; Talbot et al., 2011). B1R-induced overproduction of NO and O $_2^{\bullet-}$ is harmful because both molecules can interact rapidly to form peroxynitrite (ONOO $^-$), a highly toxic molecule, which causes DNA damage that alters gene expression, inflammation and oxidative stress, notably lipid peroxidation of membranes and nitration of various proteins (enzymes, transporters, ionic pumps, ion channels) (Johansen et al., 2005; Ascenzi et al., 2010). We reported that prolonged inhibition of iNOS with 1,400 W (Haddad and Couture, 2016) blunted the production of peroxynitrite in the model of insulin resistance, suggesting that this oxidative pathway contributes to the upregulation of the biomarkers of inflammation (iNOS, CPM, B1R, and IL-1 β) and represents an important mechanism leading to insulin resistance.

The present study was designed to test the hypothesis that inhibition of CPM with Mergetpa also named Plummer's inhibitor (Plummer and Ryan, 1981; Charest-Morin et al., 2014) is a valid strategy to prevent the biosynthesis of B1R agonists

and thereby may offer the same therapeutic effect to B1R antagonists in insulin resistance. Mergetpa can also prevent the biotransformation of plasma kinins by carboxypeptidase N (CPN), the plasma kininase 1 (Erdos and Sloane, 1962; Salgado et al., 1986). However, intriguing reports mentioned that dynorphin A may be an endogenous ligand of BK receptors (Lai et al., 2006, 2008; Lee et al., 2014) while cathepsin X localized at the surface of endothelial cells, in macrophages and monocytes can produce B1R ligands from BK and Lys-BK (Nagler et al., 2010). Thus, the use of Mergetpa should ascertain whether B1R is activated by its classical kinin metabolites des-Arg 9 -BK and Lys-des-Arg 9 -BK derived from kininase 1. Therefore, the impact of a 1-week pharmacological treatment with Mergetpa was determined on insulin resistance, metabolic hormones levels, hypertension, vascular and non-vascular inflammatory markers (iNOS, B1R, CPM, IL-1 β) and oxidative stress (O $_2^{\bullet-}$ and ONOO $^-$) in the model of insulin resistance induced by high glucose feeding. This study tends to support the contribution of kininase I and its active classical B1R metabolites in insulin resistance. Because kininase 1 inhibition reproduces the therapeutic effects of B1R antagonists, CPM may represent a new therapeutic target.

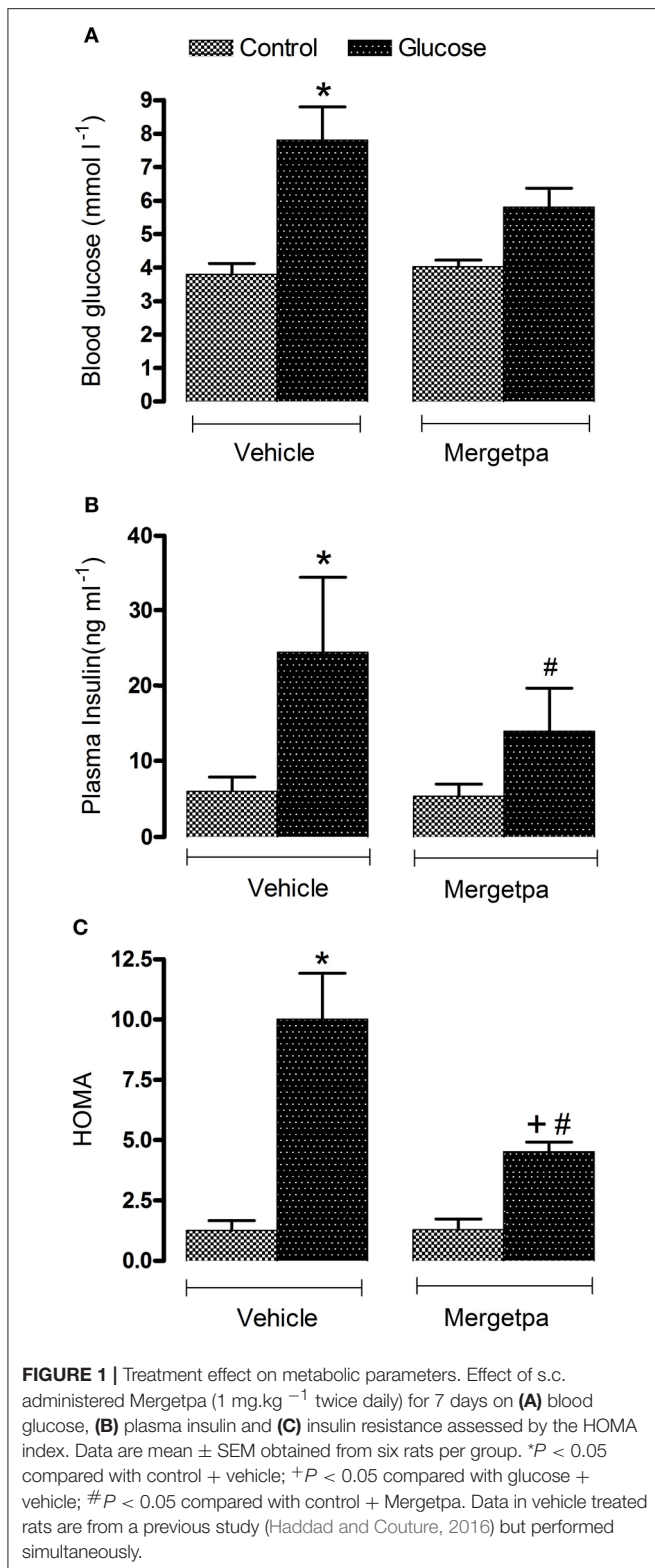
MATERIALS AND METHODS

Animal Care and Experimental Procedures

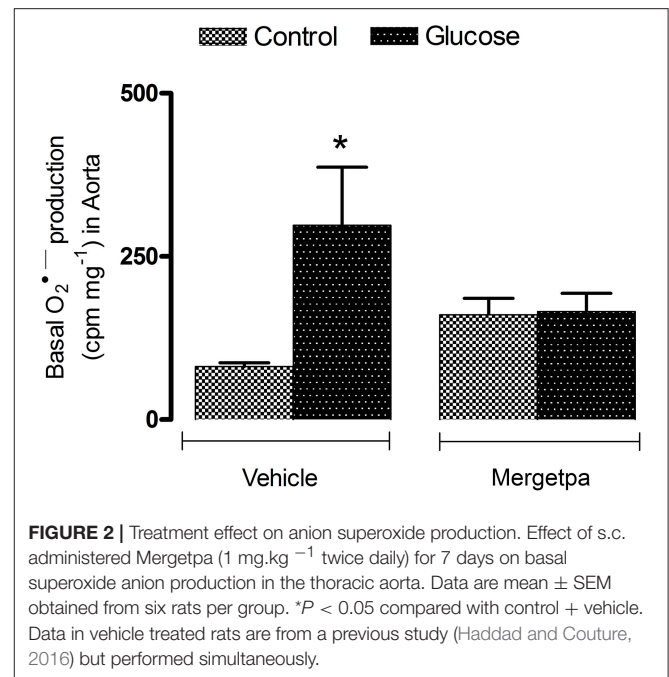
All experimental methods and animal care procedures were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal (protocol 11-140) in accordance with the Canadian Council on Animal Care and in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010; McGrath and Lilley, 2015). Male Sprague-Dawley rats (24–30 days old, 50–75 g) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage, under standard conditions (22.5°C and 42.5% humidity, on a 12 h/12 h light-dark cycle), and allowed free access to a standard chow diet (Charles River Rodent) and to a drinking solution containing 10% D-glucose or tap water (control) for a period of 9 weeks.

On the ninth week, rats fed with glucose (G) or tap water (C) were randomly divided into six groups of six rats: group 1 (G + Mergetpa), group 2 (G + Vehicle), group 3 (C + Mergetpa), group 4 (C + Vehicle), group 5 (G + 1,400 W) and group 6 (C + 1,400 W). Data of groups 5 and 6 were published elsewhere (Haddad and Couture, 2016). New data are presented herein with Mergetpa (groups 1 and 3), yet the control groups 2 and 4 served in both studies as they were run in the same series of experiments. Mergetpa (DL-2-Mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid), a high affinity and reversible inhibitor of Arg-carboxypeptidase (CPM/CPN named kininase I) (Plummer and Ryan, 1981; Charest-Morin et al., 2014) was purchased from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). It was given s.c. twice daily at 12 h intervals at the dose of 1 mg.kg $^{-1}$ in a volume of 1 mL.kg $^{-1}$ for 7 days. The vehicle (saline) was given in groups 2 and 4. The impact of vehicle (saline) itself was not tested in tap water (C) and glucose (G) groups as key data (Figures 1, 2 and B1R expression) were similar to those obtained earlier in C and G groups not treated with vehicle (Dias et al., 2010). Thus, the

Abbreviations: BK, bradykinin; B1R, bradykinin type 1 receptor; B2R, bradykinin type 2 receptor; CPM, carboxypeptidase M (membrane); CPN, carboxypeptidase N (plasmatic); GPCR, G-protein-coupled receptor; HOMA, homeostasis model assessment index; IL-1 β , interleukin-1 β ; Mergetpa, DL-2-Mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; ONOO $^-$, peroxynitrite; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; O $_2^{\bullet-}$, superoxide anion.



effect of Mergetpa was compared to a placebo (vehicle) in both C and G groups. In a rare study using Mergetpa *in vivo*, a bolus dose of $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ followed by $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ per min continuous



infusion potentiated the hypotensive response to intraarterial injection of BK (Salgado et al., 1986). Thus, we selected the minimal dose of $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ twice a day. A treatment of 1-week was used to enable better comparison with our earlier studies using 1-week treatment with the iNOS inhibitor 1,400 W and the B1R antagonist SSR240612 (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a,b; Haddad and Couture, 2016). During the last week, groups 1, 2, 3, and 4 were subjected to several measurements, including systolic blood pressure, blood glucose and body weight.

At the end of the ninth week, the blood was collected by cardiac puncture in overnight-fasted rats under isoflurane anesthesia. Blood samples were collected in tubes containing anticoagulant (Heparin; Sandoz, Boucherville, QC, Canada), and the plasma was separated by centrifugation at $600 \times g$ for 15 min at 4°C and stored at -20°C . Tissues and organs (thoracic aorta, kidneys, liver) were removed and kept frozen at -80°C . The renal cortex was dissected out just prior to experiment. They were selected to enable comparison with our previous studies carried out with the iNOS inhibitor 1,400 W and the B1R antagonist SSR240612 (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a; Haddad and Couture, 2016). Proteins, DNA and RNA of these organs were extracted to measure the expression of several inflammatory biomarkers by western blotting and quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Superoxide anion was measured in the aorta using a chemiluminescence technique and lucigenin.

Measurement of Systolic Blood Pressure

Systolic blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography using a pad heated at 37°C under the tail. The values were registered with the system Instruments ADI (ADI Instruments Inc., Colorado, CO, USA) assisted by the ADI Instruments software (Pro7.Ink Chart Lab). Each value

corresponded to the average of 5–7 measurements taken at 1–2 min intervals. Rats were familiarized with the tail-cuff system once a day for a week before starting the systolic blood pressure measurements.

Plasma Analysis

Blood glucose concentration was determined with a glucometer (Accu-Chek Aviva; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). The plasma insulin and leptin concentrations were determined by RIA (rat insulin RIA kit and rat leptin RIA kit) from Millipore (St. Charles, MO, USA). The homeostasis model assessment (HOMA) index was used to assess insulin resistance by calculating the value of fasting insulin and glucose with the following formula: $[\text{insulin } (\mu\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}) \times \text{glucose } (\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})/22.5]$ (Matthews et al., 1985).

Measurement of Superoxide Anion

Superoxide anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) was measured in the thoracic aorta with the chemiluminescence method using lucigenin (Munzel et al., 1995; Haddad and Couture, 2016). Slices of thoracic aorta (2–5 mg) were pre-incubated in a Krebs-HEPES buffer (saturated with 95% O_2 and 5% CO_2 at room temperature) for 30 min and transferred to a scintillation vial containing 5 μM of lucigenin to determine the basal level of $\text{O}_2^{\bullet-}$. Chemiluminescence was then recorded every minute for 10 min in a dark room using a liquid scintillation counter (Wallac 1409, Turku, Finland). The background was counted using a vial with no tissue solution. The final value was calculated as follows: $(\text{tissue value} - \text{background value}) \div \text{tissue dry weight}$ and was expressed in $\text{cpm}\cdot\text{mg}^{-1}$ of dry weight tissue.

Western Blot Analysis

The western blot was performed as previously described (Pouliot et al., 2011; Haddad and Couture, 2016). Dynein and β -actin were used as standard proteins. A quantitative analysis of proteins was provided by scanning densitometry using the MCID-M1 system (Imaging Research, St. Catharines, ON, Canada).

Detection of B1R was made with a selective antibody (1:1,000) rose in rabbits (Biotechnology Research Institute, Montreal, QC, Canada) against a conserved amino acid sequence from mouse and rat B1R protein. The epitope used contained 15 amino acids localized in the C-terminal part of the B1R (VFAGRLKTRVLGTL). Care was taken to avoid sequences with similarity to related mammalian proteins, including the opposite B2R. One negative control was run using the pre-immune serum. Specificity of anti-B1R antibody was further determined using mouse kidney extracts from wild-type and B1R knockout (KO) mice (Lin et al., 2010; Lacoste et al., 2013).

The other primary antibodies were as follows: dynein (1:4,000 mouse, SC-13524), β -actin (1:5,000 mouse, SC-47778), IL-1 β (1:500 rabbit, SC-7884), iNOS (NOS2) (1:1,000 rabbit, SC-650), carboxypeptidase M (1:500 rabbit, SC 98698) (SC: Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), and nitrotyrosine (1:1,500 mouse, 1A6-05233; Millipore, Billerica, MA, USA). Secondary antibodies were horseradish peroxidase (HRP)-linked goat anti-rabbit SC-2004 and HRP-linked goat anti-mouse SC-2005 (Santa

Cruz) used at dilution of 1:25,000 (for B1), 1:5,000 (for Dynein, β -actin, IL-1 β , iNOS, and CPM) and 1:3,000 (nitrotyrosine).

Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

At sacrifice, around 10 mg of tissue (renal cortex, liver and thoracic aorta) were put in a RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Toronto, ON, Canada) and frozen at -56°C . Total RNA was extracted from the tissue using Qiazol according to the manufacturer's instructions. The single-stranded cDNA was synthesized according to the procedure in the manual supplied by Bio-Rad. qRT-PCR was performed in the SYBR Green Master Mix (QIAGEN) by adding 300 nM of each primer and the signal was detected by the Mx3000p device (Stratagene, La Jolla, CA, USA) and using rat 18S as standard. The primer pairs were designed by Vector NTI software as documented earlier (Haddad and Couture, 2016). The 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 value represents the number of cycles during which a fluorescent signal increases above the background noise. The relative quantification of gene expression was analyzed by the method of $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Statistical Data Analysis

Data are presented as mean \pm SEM, and n represents the number of rats in each group. Statistical analysis was performed using PrismTM version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA); data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2015). Statistical significance was determined with Student's t -test for unpaired samples or with the one-way ANOVA followed by the Bonferroni test for multiple comparisons when F achieved $P < 0.05$ and there was no significant variance in homogeneity. Only the value of $P \leq 0.05$ was considered to be statistically significant.

TABLE 1 | Body weight, plasma leptin levels and systolic blood pressure.

Parameters	Control + vehicle	Glucose + vehicle	Control + mergetpa	Glucose + mergetpa
Body weight at the initiation of protocol (g)	114 \pm 3	110 \pm 3	107 \pm 3	111 \pm 2
Body weight (g) at 8 weeks	587 \pm 25	592 \pm 29	538 \pm 38	622 \pm 29
Body weight (g) at 9 weeks	603 \pm 26	635 \pm 18	554 \pm 38	604 \pm 17
Body weight gain/loss (g)	16 \pm 2	43 \pm 2*	16 \pm 4	(–)18 \pm 2.0 ^{+#}
Plasma leptin (ng·ml ⁻¹)	3.8 \pm 0.3	10.4 \pm 2.2*	4.5 \pm 1.4	11.7 \pm 2.6 [#]
Systolic blood pressure (mm Hg) at 9 weeks	109 \pm 3	127 \pm 3*	119 \pm 4	129 \pm 6

Values represent the mean \pm SEM of six rats per group. Statistical comparison (*) to control + vehicle, (+) to glucose + vehicle and (#) to control + Mergetpa is indicated by * $P < 0.05$, + $P < 0.05$, # $P < 0.05$.

Data in vehicle treated rats are from a previous study (Haddad and Couture, 2016) but performed simultaneously.

RESULTS

Effect of Mergetpa on Clinical Parameters

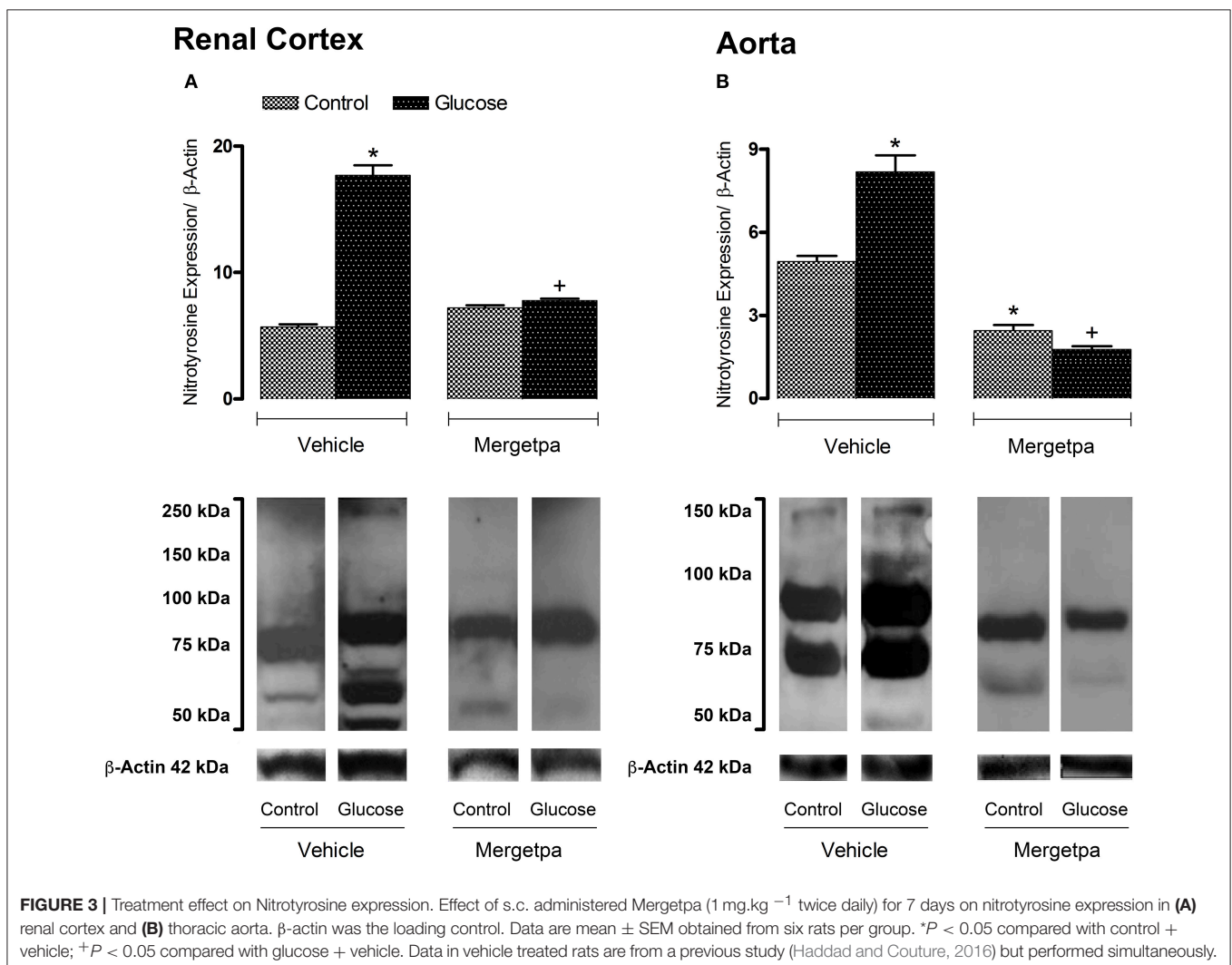
Blood glucose level was significantly increased by two-fold ($P < 0.05$) in overnight-fasted glucose-fed rats compared with control rats, yet after 1-week treatment with Mergetpa (1 mg kg^{-1} twice daily) glycemia was reduced to level that was no longer significantly different from control values. Plasma insulin level was significantly increased by four-fold ($P < 0.05$) in glucose-fed rats and was halved by the treatment with Mergetpa, but this reduction did not reach significance. The HOMA index of insulin resistance was also significantly enhanced ($P < 0.05$) in glucose-fed rats, yet this value was markedly reduced ($P < 0.05$) but not completely normalized by Mergetpa. In contrast, the same treatment with Mergetpa failed to affect glycemia, insulinemia and the HOMA index in control rats (Figure 1).

The body weight was not significantly different between glucose-fed rats and control rats before (8 weeks) and after (9 weeks) treatment with Mergetpa (Table 1). However, the gain in body weight was significantly higher ($P < 0.05$) in glucose-fed rats after 9 weeks when compared with age-matched controls.

The 1-week treatment with Mergetpa had no impact on the gain in body weight in control rats, but a significant loss in body weight gain ($P < 0.05$) was measured after treatment with Mergetpa in glucose-fed rats. The 1-week treatment with Mergetpa had no significant effect on plasma leptin levels in both control and glucose-fed rats, which remained significantly enhanced ($P < 0.05$) in the latter group as compared with control values. Systolic blood pressure was significantly enhanced ($P < 0.05$) in 9-week glucose-fed rats compared with control rats and the high systolic blood pressure value was not significantly affected by the 1-week treatment with Mergetpa (Table 1).

Effect of Mergetpa on Oxidative Stress

The oxidative stress was assessed by the measurement of superoxide anion and the expression of nitrotyrosine, a marker of peroxynitrite (ONOO^-). The latter molecule causes tyrosine nitration by the covalent addition of NO_2 to tyrosine residues in various proteins thereby affecting protein function and stability. Data depicted in Figure 2 show that the basal production of superoxide anion was significantly increased ($P < 0.05$) in the



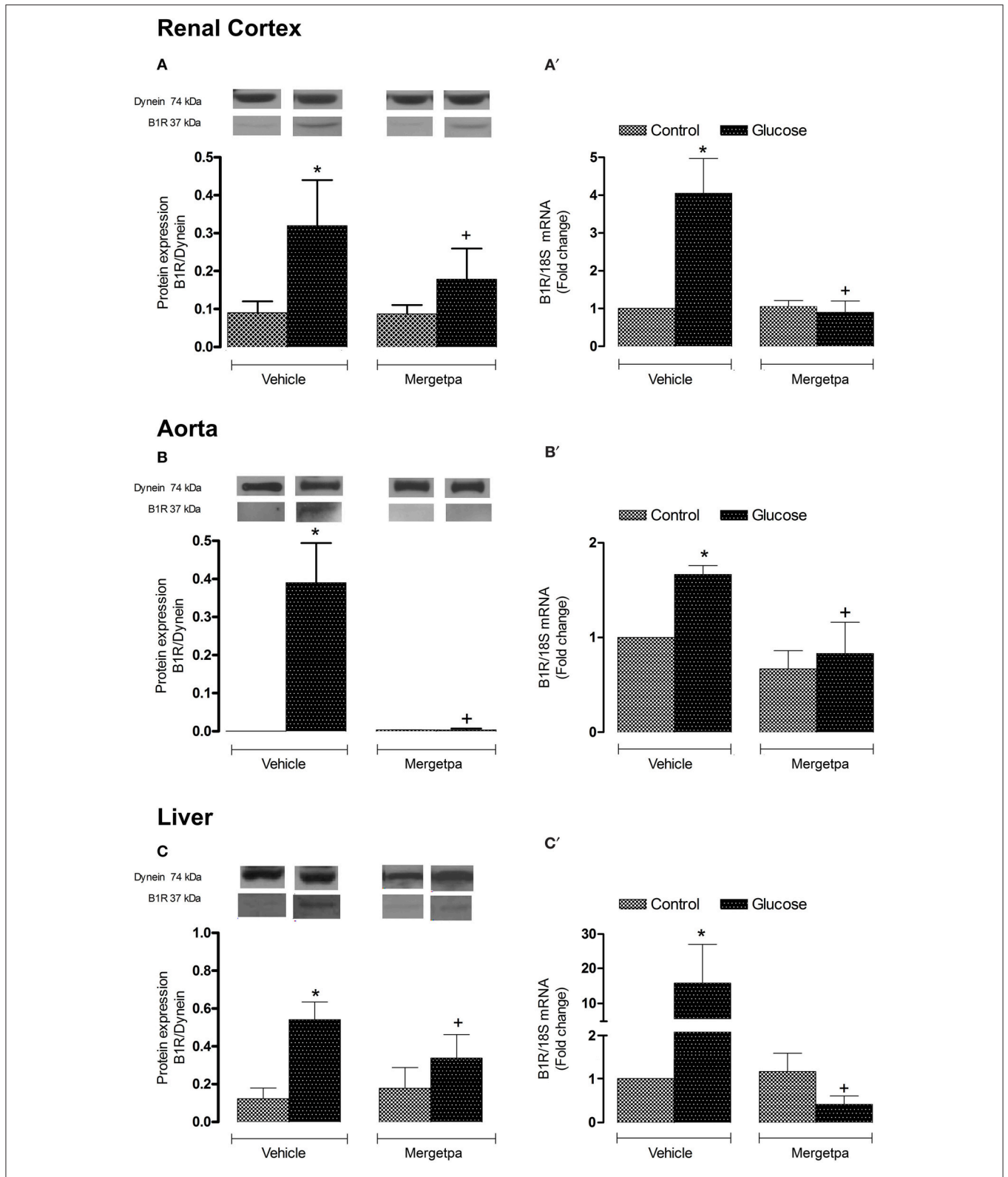


FIGURE 4 | Treatment effect on B1R expression. Effect of s.c. administered Mergetpa (1 mg.kg⁻¹ twice daily) for 7 days on B1R expression in **(A,A')** renal cortex, **(B,B')** thoracic aorta and **(C,C')** liver. The expression of B1R was measured at the protein level by western blot **(A–C)** and at mRNA level by qRT-PCR **(A',B',C')**. Dynein was the loading control. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle. Data in vehicle treated rats are from a previous study (Haddad and Couture, 2016) but performed simultaneously.

aorta of glucose-fed rats when compared with control rats. The 1-week treatment with Mergetpa brought back to control values the enhanced basal production of superoxide anion in the aorta of glucose-fed rats. Mergetpa did not affect significantly the production of superoxide anion in control aorta.

Nitrotyrosine expression was markedly enhanced ($P < 0.05$) in the renal cortex (Figure 3A) and aorta (Figure 3B) of glucose-fed rats as visualized by increases in the intensity of nitrotyrosine epitopes and the occurrence of new tyrosine nitration proteins between 50 and 250 kDa (renal cortex) or 50 and 150 kDa (aorta) when compared to control tissues. Treatment with Mergetpa significantly reduced ($P < 0.05$) the intensity of nitrotyrosine-containing proteins in renal cortex and aorta of glucose-fed rats to levels not significantly different from control values. Nitrotyrosine expression was also significantly reduced in control aorta but not in control renal cortex by Mergetpa (Figure 3).

Effect of Mergetpa on B1R and Carboxypeptidase M Expression

Both B1R protein expression and B1R mRNA levels were significantly enhanced ($P < 0.05$) in renal cortex (Figures 4A,A'), thoracic aorta (Figures 4B,B') and liver (Figures 4C,C') of glucose-fed rats. The 1-week treatment with Mergetpa brought back to control levels B1R protein and mRNA expression in the three tissues of glucose-fed rats, but failed to affect B1R protein and mRNA expression in the same tissues of control rats (Figure 4).

Likewise to B1R, CPM protein expression was significantly enhanced ($P < 0.05$) in renal cortex, thoracic aorta and liver of glucose-fed rats (Figures 5A–C). Whereas the 1-week treatment with Mergetpa failed to modify CPM protein expression in control tissues, this treatment blocked completely ($P < 0.05$) the overexpression of CPM in the three studied tissues of glucose-fed rats (Figure 5).

Effect of Mergetpa on iNOS Expression

As iNOS is activated by B1R and contributes to insulin resistance, its expression was measured in parallel to B1R and CPM in the three tissues of glucose-fed rats. Data presented in Figures 6A–C show that the protein expression of iNOS was markedly and significantly enhanced ($P < 0.05$) in the renal cortex, thoracic aorta and liver of glucose-fed rats. The 1-week treatment with Mergetpa abolished the overexpression of iNOS in the three tissues of glucose-fed rats without affecting its basal expression in control rats (Figure 6).

Effect of Mergetpa on IL-1 β Expression

Because IL-1 β is involved in the induction of B1R (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a; Couture et al., 2014; Haddad and Couture, 2016), it was of interest to measure the expression of this pro-inflammatory cytokine in the three studied tissues. Thus, it was found that IL-1 β protein expression and IL-1 β mRNA levels were significantly enhanced ($P < 0.05$) in renal cortex (Figures 7A,A'), thoracic aorta (Figures 7B,B') and liver (Figures 7C,C') of glucose-fed rats. The 1-week treatment with Mergetpa blocked completely IL-1 β protein and mRNA overexpression in the three tissues of glucose-fed rats. While

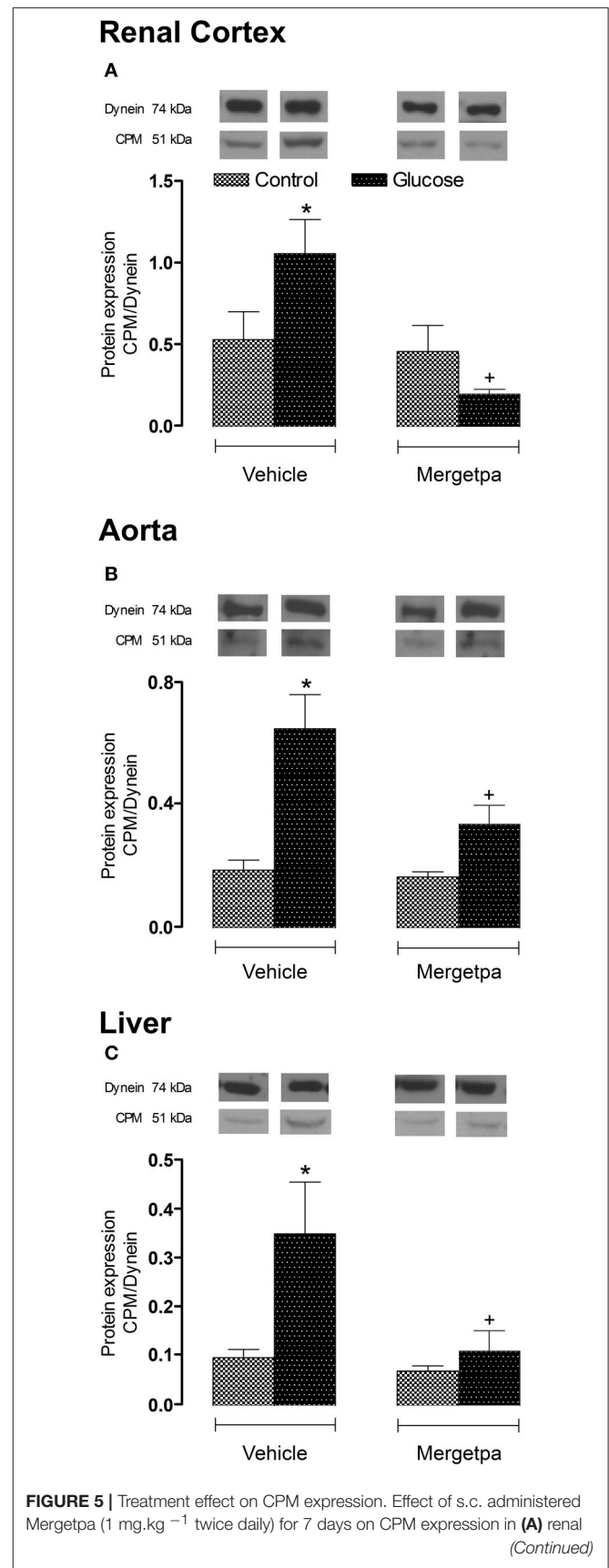


FIGURE 5 | Continued

cortex, **(B)** thoracic aorta, and **(C)** liver. The expression of CPM was measured at the protein level by western blot and dynein was the loading control. Data are mean \pm SEM obtained from six rats per group. * $P < 0.05$ compared with control + vehicle; + $P < 0.05$ compared with glucose + vehicle. Data in vehicle treated rats are from a previous study (Haddad and Couture, 2016) but performed simultaneously.

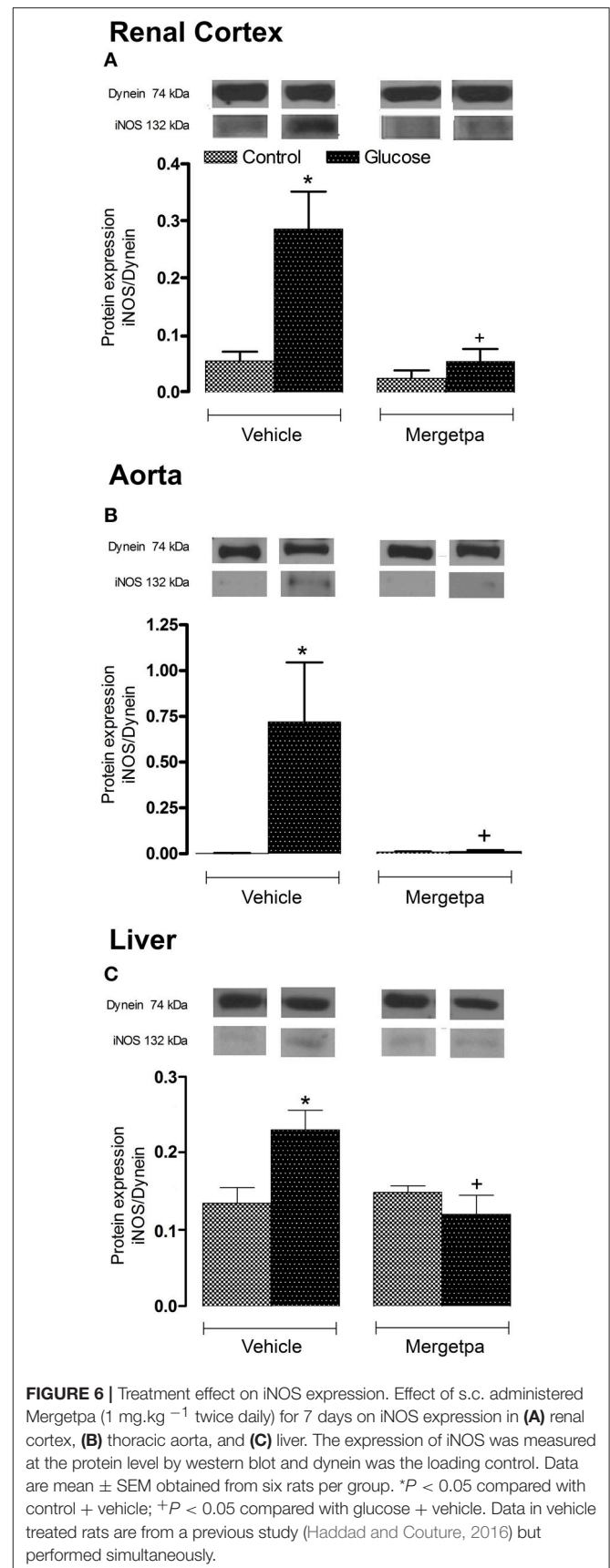
Mergetpa increased significantly IL-1 β protein expression in the renal cortex of control rats, it had no significant impact in the other control tissues (**Figure 7**).

DISCUSSION

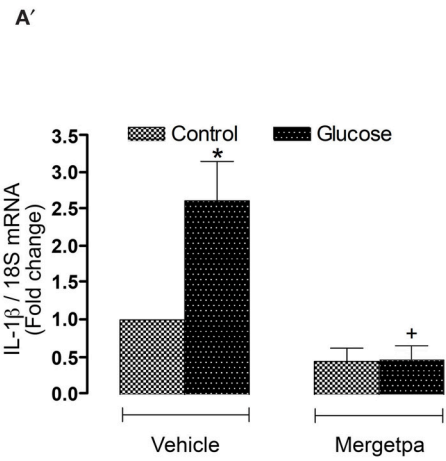
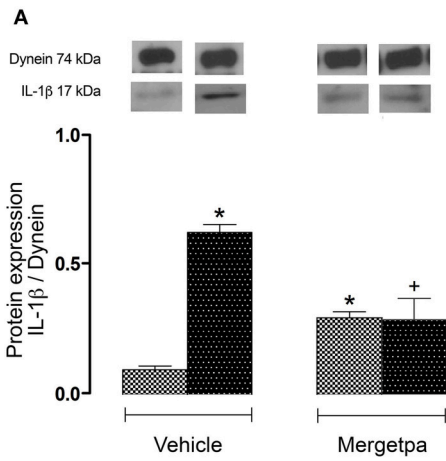
This study reinforces the detrimental role for kinin B1R in insulin resistance because the inhibition of the main enzymes (CPM/CPN) involved in the biosynthesis of the endogenous B1R agonists (des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK) improved hyperglycemia, hyperinsulinemia and the HOMA index of insulin resistance. This was associated with the correction of body weight gain and the reversal and normalization of the enhanced expression of several markers of inflammation (B1R, CPM, iNOS, and IL-1 β in renal cortex, thoracic aorta and liver) and of the oxidative stress (enhanced production of superoxide anion in aorta and nitrotyrosine expression in aorta and renal cortex). Importantly, results obtained with Mergetpa are closely similar to those reported earlier in this model of insulin resistance after 1-week treatment with the B1R antagonist SSR240612 (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a,b) or with the selective inhibitor of iNOS 1,400 W (Haddad and Couture, 2016). It was then suggested that the activation of B1R leads to the formation of peroxynitrite upon post-translational activation of iNOS and NADPH oxidase. In turn, peroxynitrite exerts a positive feedback loop to enhance the expression of B1R. Blockade of iNOS prevented this vicious cycle and the pro-inflammatory effects of B1R (Haddad and Couture, 2016). Herein, we suggest that peroxynitrite can also exert a positive feedback loop to enhance the expression of CPM providing further endogenous agonists to activate B1R. This appears a feasible mechanism for B1R upregulation as B1R can be upregulated by its own agonist (Schanstra et al., 1998; Couture et al., 2014). Blockade of B1R *in vivo* with SSR240612 also reversed the upregulation of B1R in peripheral tissues in glucose-fed rats (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a). Thus, pharmacological blockade of B1R with SSR240612 or the inhibition of the generation of B1R endogenous agonists with Mergetpa yielded the same outcome by suppressing B1R agonists-induced upregulation of B1R and subsequently B1R downstream signaling on iNOS, NADPH oxidase and other markers of inflammation.

Impact of Mergetpa on Cardiometabolic Targets

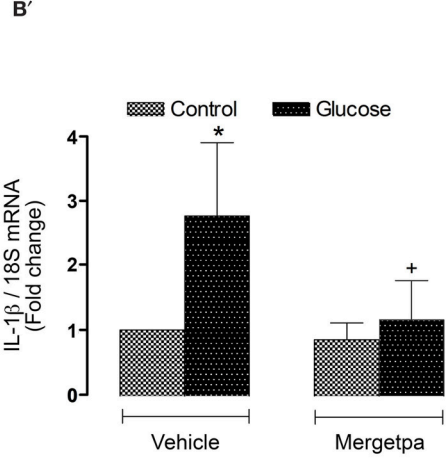
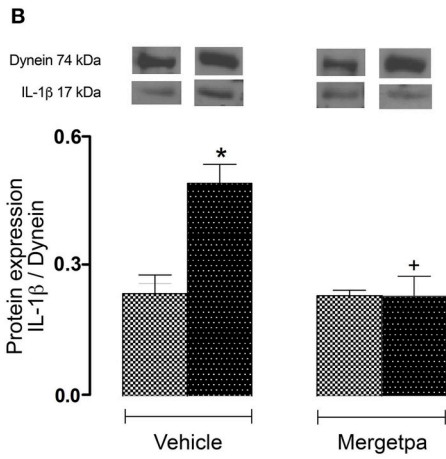
Our data are consistent with previous studies showing that B1R contributes to insulin resistance and obesity through a mechanism independent of leptin. Indeed, hyperleptinemia



Renal Cortex



Aorta



Liver

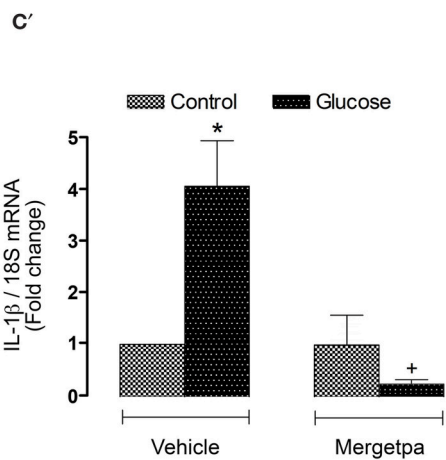
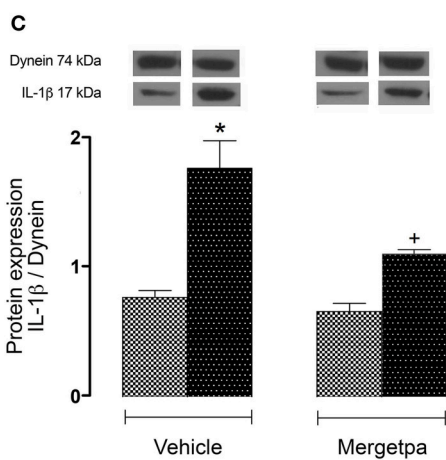


FIGURE 7 | Treatment effect on IL-1β expression. Effect of s.c. administered Mergetpa (1 mg.kg⁻¹ twice daily) for 7 days on IL-1β expression in **(A,A')** renal cortex, **(B,B')** thoracic aorta and **(C,C')** liver. The expression of IL-1β was measured at the protein level by western blot **(A,B,C)** and at mRNA level by qRT-PCR **(A',B',C')**. Dynein was the loading control. Data are mean ± SEM obtained from six rats per group. **P* < 0.05 compared with control + vehicle; +*P* < 0.05 compared with glucose + vehicle. Data in vehicle treated rats are from a previous study (Haddad and Couture, 2016) but performed simultaneously.

found in glucose-fed rats remained unaffected by the prolonged inhibition of B1R with SSR240612 and iNOS with 1,400 W while body weight gain was reversed by both treatments (Dias and Couture, 2012b; Haddad and Couture, 2016). Moreover, a similar 1-week treatment with SSR240612 in obese Zucker diabetic fatty rats (ZDF), a model of type 2 diabetes, reversed body weight gain without affecting hyperleptinemia (Talbot et al., 2016).

Mergetpa failed to reduce high blood pressure associated with high glucose feeding that is not in accord with the anti-hypertensive effect of SSR240612 reported in this model (Dias et al., 2010). This could be explained by the finding that cerebral but not peripheral B1R are involved in the maintenance of high blood pressure as documented in glucose-fed rats, spontaneously hypertensive rats and angiotensin II-induced hypertension using peptide and non-peptide B1R antagonists (Lungu et al., 2007; De Brito Gariépy et al., 2010). At this time, there is no information regarding the possibility that Mergetpa can pass the blood-brain barrier to inhibit brain kininase 1. Further studies will be needed to address this issue. Nevertheless, our data highlight a dissociation regarding the mechanisms underlying insulin resistance and hypertension as previously evidenced with the iNOS inhibitor (Haddad and Couture, 2016), and support the idea that peripheral B1R do not contribute to hypertension as reported in other rat models (De Brito Gariépy et al., 2010; Couture et al., 2014).

Impact of Mergetpa on Inflammatory Markers

The suppression of the enhanced expression of B1R, CPM, iNOS, and IL-1 β by Mergetpa was quite clear in the three studied tissues (renal cortex, thoracic aorta and liver) in glucose-fed rats, suggesting that the inflammatory process was not limited to the vasculature. In agreement with the present findings, 1-week blockade of B1R with SSR240612 reversed the overexpression of vascular and non-vascular B1R, iNOS, and IL-1 β in glucose-fed rats (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a,b).

Chronic activation of B1R is likely to be amplified by the accumulation of des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK at the site of inflammation because the half-life of des-Arg⁹-BK is 4- to 12-fold longer than that of BK (Decarie et al., 1996). Upregulation of CPM may also account for the increasing endogenous levels of des-Arg⁹-kinin metabolites and the subsequent upregulation and activation of B1R in the inflammatory process linked to insulin resistance.

CPM is likely more important than CPN in the metabolic regulation of kinin activity since these vasoactive peptides are primarily considered local hormones (autacoids) playing autocrine and paracrine functions (Carretero and Scicli, 1991). Membrane-bound CPM has been shown to play a critical role in the generation of specific agonists in close proximity to the B1R (Zhang et al., 2013a), which is supported by our *in vivo* data using Mergetpa. However, one cannot exclude the possibility that Mergetpa blocks B1R signaling independently of the enzymatic generation of B1R agonists by CPM. Recent molecular studies in stably transfected cells have shown that bradykinin or kallidin binds to CPM (without generating agonist

to induce a conformational change in the enzyme that is transmitted to the B1R causing its activation. Mergetpa blocks this conformational crosstalk by preventing the binding of kinins to CPM (Zhang et al., 2013a). Importantly, the present study confirms the contribution of CPM and excludes the possibility that cathepsin X could intervene in the formation of B1R ligands (Nagler et al., 2010) or that dynorphin could be an endogenous activator of the B1R (Lai et al., 2006, 2008; Lee et al., 2014) in this pro-inflammatory model of insulin resistance.

Limitations of the Study

CPM is a largely distributed enzyme that cleaves C-terminal lysine or arginine from other peptides and proteins, including anaphylatoxins, chemokines, enkephalins and growth factors (Deiteren et al., 2009) that may question its specificity as a pharmacological target. While the regulatory role of CPM in kinins and B1R activity has been fairly well documented (Erdos and Sloane, 1962; Zhang et al., 2013a,b; Couture et al., 2014; Regoli and Gobeil, 2015), the impact of CPM on the physiological functions of other endogenous substrates, and particularly in insulin resistance, is still unknown and remains to be studied. In the present study, the inhibition of B1R-agonists formation by Mergetpa has not been directly demonstrated and is not an easy task *in vivo* due to the short life of these peptides, but the impact of CPM blockade is in accordance with the beneficial effects of B1R antagonism in insulin resistance and its associated oxidative stress and inflammatory mechanisms (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012b; Haddad and Couture, 2016). Mergetpa had no or little significant effect in control rats, which is consistent with the virtual absence of B1R in control rats (Couture et al., 2014). Hence, findings suggest specificity of action of the drug on CPM and on kinins as the main substrates.

CONCLUSION

Pharmacological blockade of kininase 1 (CPM) for 1-week provided similar beneficial effects to a corresponding treatment with a B1R antagonist in insulin resistance and peripheral inflammation induced by high glucose feeding. These findings have clinical relevance in the treatment of type 2 diabetes and its complications. Hence, inhibiting kininase I to lower B1R agonists generation may provide a novel therapeutic approach as alternative to B1R antagonists, and has the advantage to enhance the cardioprotective and anti-diabetic effects of the B2R (Regoli and Gobeil, 2015) by preventing the cleavage of the COOH-terminal-Arg residue on BK and kallidin. The development of a new generation of kininase 1 inhibitors for pharmacotherapy is appealing and would be an asset.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YH performed the experiments, analyzed the data, made the figures and drafted the manuscript. YH, RC interpreted the data and revised critically the intellectual content. RC designed the study, supervised the work and wrote the final version of the

manuscript. All authors agree to be accountable for the content of the work.

FUNDING

This work was supported by a Grant-in-aids from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119329). YH received a 1-year PhD Studentship award from the Graduate Program in

REFERENCES

- Ascenzi, P., di Masi, A., Sciorati, C., and Clementi, E. (2010). Peroxynitrite-an ugly biofactor? *BioFactors* 36, 264–273. doi: 10.1002/biof.103
- Brovkovych, V., Zhang, Y., Brovkovych, S., Minshall, R. D., and Skidgel, R. A. (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 258–269. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00992.x
- Carretero, O. A., and Scicli, A. G. (1991). Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension* 18(3 Suppl.), I58–69. doi: 10.1161/01.HYP.18.3_Suppl.I58
- Charest-Morin, X., Roy, C., Fortin, E. J., Bouthillier, J., and Marceau, F. (2014). Pharmacological evidence of bradykinin regeneration from extended sequences that behave as peptidase-activated B2 receptor agonists. *Front. Pharmacol.* 5:32. doi: 10.3389/fphar.2014.00032
- Couture, R., Blaes, N., and Girolami, J. P. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 223–248. doi: 10.2174/1570161112666140226121627
- Curtis, M. J., Bond, R. A., Spina, D., Ahluwalia, A., Alexander, S. P., Gienbycz, M. A., et al. (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in *BJP. Br. J. Pharmacol.* 172, 3461–3471. doi: 10.1111/bph.12856
- De Brito Gariépy, H., Carayon, P., Ferrari, B., and Couture, R. (2010). Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides* 44, 191–198. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.011
- Decarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., and Adam, A. (1996). Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹]BK: influence of enalaprilat. *Am. J. Physiol.* 271(4 Pt 2), H1340–H1347.
- Deiters, K., Hendriks, D., Scharpe, S., and Lambeir, A. M. (2009). Carboxypeptidase M: multiple alliances and unknown partners. *Clin. Chim. Acta. Int. J. Clin. Chem.* 399, 24–39. doi: 10.1016/j.cca.2008.10.003
- Dias, J. P., and Couture, R. (2012a). Suppression of vascular inflammation by Kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60, 61–69. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182576277
- Dias, J. P., and Couture, R. (2012b). Blockade of kinin B1 receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 244–253. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x
- Dias, J. P., Talbot, S., Senecal, J., Carayon, P., and 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:e12622. doi: 10.1371/journal.pone.0012622
- Erdos, E. G., and Sloane, E. M. (1962). An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem. Pharmacol.* 11, 585–592. doi: 10.1016/0006-2952(62)90119-3
- Haddad, Y., and Couture, R. (2016). Interplay between the kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. *Br. J. Pharmacol.* 173, 1988–2000. doi: 10.1111/bph.13491
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., and Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* 4:5. doi: 10.1186/1475-2840-4-5
- Kashuba, E., Bailey, J., Allsup, D., and Cawkwell, L. (2013). The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers* 18, 279–296. doi: 10.3109/1354750X.2013.787544

Molecular, Cellular and Integrative Physiology of the Université de Montréal.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors greatly appreciate the technical assistance of Jacques Sénécal for the treatment with Mergetpa and RIA studies.

- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., and Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 1, 94–99. doi: 10.4103/0976-500X.72351
- Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., Brovkovych, V., and Skidgel, R. A. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44, 145–154. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004
- Lacoste, B., Tong, X. K., Lahjouji, K., Couture, R., and Hamel, E. (2013). Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *J. Neuroinflammation* 10:57. doi: 10.1186/1742-2094-10-57
- Lai, J., Luo, M. C., Chen, Q., Ma, S., Gardell, L. R., Ossipov, M. H., et al. (2006). Dynorphin A activates bradykinin receptors to maintain neuropathic pain. *Nat. Neurosci.* 9, 1534–1540. doi: 10.1038/nn1804
- Lai, J., Luo, M. C., Chen, Q., and Porreca, F. (2008). Pronociceptive actions of dynorphin via bradykinin receptors. *Neurosci. Lett.* 437, 175–179. doi: 10.1016/j.neulet.2008.03.088
- Lee, Y. S., Muthu, D., Hall, S. M., Ramos-Colon, C., Rankin, D., Hu, J., et al. (2014). Discovery of amphipathic dynorphin A analogues to inhibit the neuroexcitatory effects of dynorphin through bradykinin receptors in the spinal cord. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 6608–6616. doi: 10.1021/ja501677q
- Lin, J. C., Talbot, S., Lahjouji, K., Roy, J. P., Senecal, J., Couture, R., et al. (2010). Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31, 1940–1945. doi: 10.1016/j.peptides.2010.07.008
- Livak, K., and Schmittgen, T. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lungu, C., Dias, J. P., Franca, C. E., Ongali, B., Regoli, D., Moldovan, F., et al. (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, 375–387. doi: 10.1016/j.npep.2007.09.005
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., and Turner, R. C. (1985). Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28, 412–419. doi: 10.1007/BF00280883
- McGrath, J. C., and Lilley, E. (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP. Br. J. Pharmacol.* 172, 3189–3193. doi: 10.1111/bph.12955
- Munzel, T., Sayegh, H., Freeman, B. A., Tarpey, M. M., and Harrison, D. G. (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance: a novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.* 95, 187–94. doi: 10.1172/JCI117637
- Nagler, D. K., Kraus, S., Feierler, J., Mentele, R., Lottspeich, F., Jochum, M., et al. (2010). A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists. *Int. Immunopharmacol.* 10, 134–139. doi: 10.1016/j.intimp.2009.09.018
- Plummer, T. H. Jr., and Ryan, T. J. (1981). A potent mercapto bi-product analogue inhibitor for human carboxypeptidase N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 98, 448–454. doi: 10.1016/0006-291X(81)90860-3
- Pouliot, M., Hetu, S., Lahjouji, K., Couture, R., and Vaucher, E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 92, 482–489. doi: 10.1016/j.exer.2011.03.007
- Regoli, D., and Gobeil, F. Jr. (2015). Critical insights into the beneficial and protective actions of the kallikrein-kinin system. *Vasc. Pharmacol.* 64, 1–10. doi: 10.1016/j.vph.2014.12.003

- Salgado, H. C., Carretero, O. A., Scicli, A. G., and Murray, R. D (1986). Effect of DL-2-mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid on the blood pressure response to vasoactive substances. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 237, 204–208.
- Schanstra, J. P., Bataille, E., Marin Castano, M. E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J. B., 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. *J. Clin. Invest.* 101, 2080–2091. doi: 10.1172/JCI1359
- Schremmer-Danninger, E., Offner, A., Siebeck, M., and Roscher, A. A (1998). B1 bradykinin receptors and carboxypeptidase M are both upregulated in the aorta of pigs after LPS infusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 246–252. doi: 10.1006/bbrc.1997.7999
- Talbot, S., Dias, J. P., El Midaoui, A., and Couture, R. (2016). Beneficial effects of kinin B1 receptor antagonism on plasma fatty acid alterations and obesity in Zucker diabetic fatty rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94, 752–757. doi: 10.1139/cjpp-2016-0063
- Talbot, S., Lin, J. C., Lahjouji, K., Roy, J. P., 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, 1447–1456. doi: 10.1016/j.peptides.2011.05.005
- Zhang, X., Tan, F., Brovkovich, V., Zhang, Y., Lowry, J. L., and Skidgel, R. A (2013a). Carboxypeptidase M augments kinin B1 receptor signaling by conformational crosstalk and enhances endothelial nitric oxide output. *Biol. Chem.* 394, 335–345. doi: 10.1515/hsz-2012-0290
- Zhang, X., Tan, F., and Skidgel, R. A (2013b). Carboxypeptidase M is a positive allosteric modulator of the kinin B1 receptor. *J. Biol. Chem.* 288, 33226–33240. doi: 10.1074/jbc.M113.520791

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

The reviewer LB and handling Editor declared their shared affiliation, and the handling Editor states that the process met the standards of a fair and objective review

Copyright © 2017 Haddad and Couture. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre 4

Troisième article

4.1. Hypothèse :

Cet article étudie l'induction et la distribution cellulaire du récepteur B₁ (RB₁) des kinines dans les vaisseaux sanguins du rat diabétique et aborde l'hypothèse que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH oxydase (NOX1 et NOX2) et produit son activation via la protéine kinase C (PKC).

4.2. Objectifs :

Démontrer que le RB₁ augmente la production de l'O₂^{•-} par l'activation de la NADPH oxydase via la PKCβ1/2 et qu'il est colocalisé avec NOX1 et NOX2 sur le même type cellulaire dans le système vasculaire des rats diabétiques.

4.3. Résumé de l'étude :

Le diabète de type 1 a été induit chez des rats mâles avec la streptozotocine (STZ 65 mg.kg⁻¹, i.p.). Deux semaines plus tard, la production de O₂^{•-} a été mesurée dans des anneaux d'aorte en réponse à l'agoniste du RB₁ (Sar [D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, 20 μM) par la méthode de chimiluminescence amplifiée par la lucigénine. Différents inhibiteurs ont été ajoutés (10 μM) pour bloquer PKCtotal (Ro-31 8220), PKCβ1/2 (LY333531) ou NADPH oxydase (diphenyleneiodonium). La localisation cellulaire du RB₁ a été étudiée dans l'aorte, l'artère poplitée et les glomérules / artères rénales par immunofluorescence et microscopie confocale avec des marqueurs de cellules endothéliales (anti-RECA-1), de macrophages (anti-CD11), de cellules musculaires lisses vasculaires (anti-SMA), et de la NADPH oxydase (anti-NOX1 et NOX2). L'hypothèse de l'étude a été confirmée.

4.4. Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication: **Haddad, Y., & Couture, R. (2017). Localization and Interaction between Kinin B1 Receptor and NADPH Oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats. *Frontiers in Physiology*, 8(861). doi: 10.3389/fphys.2017.00861**



Localization and Interaction between Kinin B1 Receptor and NADPH Oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats

Youssef Haddad and Réjean Couture*

Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

John D. Imig,
Medical College of Wisconsin,
United States

Reviewed by:

Jan Michael Williams,
University of Mississippi Medical
Center School of Dentistry,
United States
Gayathri Krishnamoorthy,
Nutriflour International Inc. LLC,
United States

*Correspondence:

Réjean Couture
rejean.couture@umontreal.ca

Specialty section:

This article was submitted to
Vascular Physiology,
a section of the journal
Frontiers in Physiology

Received: 13 July 2017

Accepted: 16 October 2017

Published: 31 October 2017

Citation:

Haddad Y and Couture R (2017)
Localization and Interaction between
Kinin B1 Receptor and NADPH
Oxidase in the Vascular System of
Diabetic Rats. *Front. Physiol.* 8:861.
doi: 10.3389/fphys.2017.00861

Kinin B1 receptor (B1R) enhanced superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) production in the vasculature of diabetic rats. This study investigates the induction and distribution of B1R in diabetic blood vessels and addresses the hypothesis that B1R is co-localized with NADPH oxidase (NOX1 and NOX2) and produces its activation via protein kinase C (PKC). Diabetes was induced in rats with streptozotocin (STZ 65 mg.kg⁻¹, i.p.). Two weeks later, the production of $O_2^{\bullet-}$ was measured in aorta rings in response to the B1R agonist (Sar[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, 20 μM) by the method of lucigenin-enhanced chemiluminescence. Various inhibitors were added (10 μM) to block PKC_{total} (Ro-31-8220), PKCβ1/2 (LY333531), or NADPH oxidase (Diphenyleneiodonium). The cellular localization of B1R was studied in the aorta, popliteal artery, and renal glomerulus/arteries by immunofluorescence and confocal microscopy with markers of endothelial cells (anti-RECA-1), macrophages (anti-CD11), vascular smooth muscle cells (anti-SMA), and NADPH oxidase (anti-NOX1 and NOX2). Although B1R was largely distributed in resistant vessels, it was sparsely expressed in the aorta's endothelium. The greater basal production of $O_2^{\bullet-}$ in STZ-diabetic aorta was significantly enhanced by the B1R agonist (15–45 min). The peak response to the agonist (30 min) was inhibited by all inhibitors. Immunofluorescent staining for B1R, NOX1, and NOX2 was significantly increased in endothelial cells, vascular smooth muscle cells, and macrophages of STZ-diabetic aorta on which they were found co-localized. Data showed that B1R enhanced $O_2^{\bullet-}$ by activating vascular NADPH oxidase through PKCβ1/2. This was substantiated by the cellular co-localization of B1R with NOX1 and NOX2 and opens the possibility that B1R-enhanced oxidative stress is derived from vascular and infiltrating immune cells in diabetes.

Keywords: bradykinin B1 receptor, endothelium, macrophages, NOX1, NOX2, diabetes mellitus, VSMC

INTRODUCTION

Sustained hyperglycemia-induced oxidative stress exposes individuals to chronic, low-grade inflammation, and contributes to diabetes and its complications. Oxidative stress occurs when the production of reactive oxygen species (ROS) overwhelms the anti-oxidative defense (Johansen et al., 2005; Gao and Mann, 2009). Hyperglycemia and the accumulation of metabolites in the glycolysis pathway, notably advanced glycation end-products,

activate NADPH oxidase through protein kinase C (PKC) and thereby contribute to the major source of ROS (such as superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$) in vascular cells (He and King, 2004; Gao and Mann, 2009; Chen et al., 2014). ROS are known to activate a variety of signaling pathways and transcription factors, notably the nuclear factor NF- κ B, which mediates the transcription of several pro-inflammatory genes, especially pro-inflammatory cytokines such as TNF, IL-1, IL-6, IL-8 (Cai et al., 2003; Cave et al., 2006), chemokines [e.g., MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1), also known as CCL2] and cellular adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), integrins, selectins that increase macrophages and leukocytes infiltration in the vasculature leading to endothelial dysfunction and vascular disease (He and King, 2004; Feng et al., 2005; Goldberg, 2009; Gleissner, 2015).

Kinins are vasoactive peptides that play an important role in cardiovascular homeostasis, pain, and inflammation. These autacoids activate two G-protein-coupled receptors (GPCR) named B1R and B2R. While B2R is constitutive and mediates most effects of bradykinin (BK) including inflammation, vasodilation, and capillary leakage, B1R is weakly expressed in physiological situation, yet it is induced by pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF) and by ROS during diabetes through the NF- κ B pathway (Couture and Girolami, 2004; Couture et al., 2014). In a rat model of insulin resistance induced by high glucose feeding, B1R increased the production of $O_2^{\bullet-}$ via the activation of NADPH oxidase while B1R antagonism prevented the enhanced basal production of $O_2^{\bullet-}$ by NADPH oxidase and the upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the aorta (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012b). Given that B1R can activate iNOS through $G_{\alpha i}$, $G_{\beta \gamma}$ and Src-dependent activation of the ERK/MAP kinase pathway to generate high level of NO (Kuhr et al., 2010), one can suggest that peroxynitrite ($ONOO^-$) generated from the combination of NO and $O_2^{\bullet-}$ (Johansen et al., 2005) can contribute to the detrimental effect of B1R and to the reduction of endothelium-derived NO bioavailability in diabetes (Couture et al., 2014; Haddad and Couture, 2016). The production of ROS by B1R-induced activation of NADPH oxidase could represent a putative mechanism by which B1R antagonism reversed the auto-induction of B1R and its pro-inflammatory effects in models of diabetes (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a,b; Pouliot et al., 2012). A recent concept involving B1R in the propagation of inflammation has also been proposed in human vascular disease, which consists in the transfer to target organ recipient cells of a massive release of circulating leukocyte-derived microvesicles bearing functional B1R (Kahn et al., 2017).

Abbreviations: BK, bradykinin; B1R, bradykinin type 1 receptor; DPI, diphenyleneiodonium; H_2O_2 , hydrogen peroxide; iNOS, inducible nitric oxide synthase; IL-1, IL-6, IL-8, interleukin-1, -6, and -8; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1, ϕ , macrophages; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; NO, nitric oxide; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; PKC, protein kinase C; $ONOO^-$, peroxynitrite; ROS, reactive oxygen species; $O_2^{\bullet-}$, superoxide anion; STZ, streptozotocin; TNF, tumor necrosis factor- α ; VSM, vascular smooth muscle cells; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

The multiple forms of NADPH oxidases are emerging as important targets for prevention of vascular oxidative stress and cardiovascular diseases (Sun et al., 2016). The NOX isoforms of NADPH oxidases are transmembrane proteins that transfer electrons through biological membranes. NADPH oxidase catalyzes the transfer of electrons from NADPH to oxygen via its catalytic subunits to generate ROS ($O_2^{\bullet-}$ or H_2O_2). Four NOX isoforms are expressed in the vascular wall, including NOX1 (endothelial cells and VSMC), NOX2 (endothelial cells, adventitial fibroblasts, and leukocytes such as monocytes, macrophages, and platelets), NOX4 (endothelial cells, VSMC, and adventitial fibroblasts), and NOX5 (endothelial and VSMC—not expressed in rodents) (Wendt et al., 2005; Drummond et al., 2011). Because of their marked enhanced activities, NOX1 and NOX2 represent the most important superoxide-generating enzymes in diabetes and vascular disease. The subsequent formation of peroxynitrite ($ONOO^-$) resulting from the binding of $O_2^{\bullet-}$ and NO reduces NO bioavailability and activates pro-inflammatory signaling pathways in addition to causing irreversible damage to macromolecules including proteins, lipids, and DNA, thereby disrupting crucial cell signaling pathways and promoting cell death. On the other hand, NOX4 produces H_2O_2 and may provide protective function to the vascular wall by increasing NO bioavailability and suppressing cell death pathways; H_2O_2 does not react with NO and may even act as an endothelium-derived relaxing factor (Drummond and Sobey, 2014).

The objective of present study was two-fold; first, to determine whether PKC is involved in the activation of NADPH oxidase by B1R and if the two main isoforms of NADPH oxidase (NOX1 and NOX2) are upregulated and co-localized with B1R on vascular smooth muscle cells (VSMC), endothelium, and infiltrating macrophages in the diabetic thoracic aorta; second, to compare the distribution of B1R in the aorta (conductance vessel) with that of resistance arteries (popliteal and renal afferents/efferents and glomeruli) in diabetic rats.

MATERIALS AND METHODS

Animal Care and Ethics Approval

All animal care and experimental procedures complied with the Use of Laboratory Animals and were approved by the Université de Montréal's Committee on Ethics in the Care and Use of Laboratory Animals (protocol 15–013) <http://www.cdea.umontreal.ca> in accordance with the guiding principles as enunciated by the Canadian Council on Animal Care. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny et al., 2010; McGrath and Lilley, 2015).

Experimental Procedures

Male Sprague-Dawley rats (200–225 g; Charles River Laboratories, Saint-Constant, QC, Canada) were housed two per cage, under standard conditions of temperature (22.5°C) and humidity (42.5%), on a 12 h/12h light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water. Four days after their arrival, rats were made diabetic by a single injection of streptozotocin (STZ) freshly

prepared (65 mg.kg⁻¹; i.p.; Cayman Chemical, Michigan, USA). Age-matched controls were injected with sterile saline (0.9%). Blood glucose concentration was determined with a glucometer (Accu-Chek Aviva; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) in blood samples obtained from the tail vein, in non-fasting animals. Only STZ-treated rats whose blood glucose concentration was higher than 20 mM were considered as diabetic. At the end of 2 weeks, the thoracic aorta, popliteal artery, and renal cortex were removed under isoflurane anesthesia and kept frozen at -80°C.

Superoxide Anion Measurement

Superoxide anion production was measured from aortic slices using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method as described previously (Ohara et al., 1993; Munzel et al., 1995). Briefly, small rings of 3–5 mm from STZ and control aorta were pre-incubated at 37°C in Krebs-Hepes buffer (saturated with 95% O₂ and 5% CO₂) for 30 min and then transferred to a glass scintillation vial containing 5 μM of lucigenin in 2 ml for the determination of basal O₂^{•-} levels. The chemiluminescence was recorded every minute for 10 min in a dark room at room temperature in a liquid scintillation counter (Wallac 1409, Turku, Finland). The B1R agonist (A-B1R) Sar[D-Phe⁸] des-Arg⁹-BK (Drapeau et al., 1993) was added to tissue samples after the 30 min pre-incubation period and lucigenin counts were determined at time 0, 15, 30, and 45 min. The activation of NADPH oxidase in the samples was assessed by adding 0.1 mM NADPH to the vials 30 min before adding the B1R agonist. In a separate series of experiments, inhibitors (10 μM) of NADPH oxidase (DPI, Diphenyleneiodonium), PKC_{total} (Ro-31-8220) and PKCβ1/2 (LY333531) were added 30 min prior to the addition of the B1R agonist and lucigenin counts were determined at time 0 min (baseline) and at the peak time response (30 min) to the B1R agonist. The background was counted using a vial with no tissue but with the solution. The final value expressed as cpm.mg⁻¹ of fresh tissue was calculated as follows: (tissue value – background value) ÷ weight of fresh tissue.

Cellular Localization of B1R, NOX1, and NOX2 by Immunofluorescence

After sacrifice of rats, blood vessels and renal cortex were immediately frozen in 2-methylbutane cooled at -45 to -55°C with liquid nitrogen and kept at -80°C. They were mounted in an OCT (optimal cutting temperature) compound embedding medium for frozen tissue specimens (Fisher healthcare #4585) and serially cut into 20 μm-thick coronal sections (or 10 μm for renal cortex) on a cryostat and stored at -80°C. Sections were mounted on Fisherbrand Superfrost Plus Microscope Slides (Fisher Scientific #12-550-15) and put in vacuum jar overnight to ensure their adhesion to the slides. Next day, sections were fixed in paraformaldehyde (PFA 4%) for 2 min, washed for 5 min × three times with PBS (phosphate buffered saline 1X). Slides were incubated for 1 h with a blocking buffer PBS supplemented with 10% bovine serum albumin (BSA Roche diagnostic #10735086001) and 10% goat serum (Cedarlane CL1200-100) + Triton X-100 0.3% (Sigma Aldrich # T9284) to prevent non-specific labeling. Primary antibodies were diluted (1:100) in blocking buffer, put over the slides

overnight, washed for 5 min × three times with PBS on the next day, reincubated for 2 h with a secondary antibody diluted (1:200) in blocking buffer, washed with PBS 5 min × three times then the sections were covered by fluorescence mounting media (Glycerol/n-propyl gallate mounting medium prepared in lab) and the coverslip was fixed by applying a little nail varnish to its edges. Images were examined with Olympus IX-81 inverted fluorescence microscope; digitized RGB images were transferred to a computer and analyzed using NIH ImageJ 1.36b Software (NIH, Bethesda, MD, USA). Semi-quantification of immunofluorescence staining intensity (white vs. gray) was made on 10 randomly selected surface areas of a minimum of four blood vessel sections per rat from four controls and four STZ-diabetic rats. Background intensity (gray intensity) was subtracted from each individual value.

Images (single focal plane or Z-stack) were also captured with an oil immersion objective 40X x Plan-Apochromat objective (1.4 NA) on a Zeiss LSM 800 laser-scanning confocal microscope (Carl Zeiss, Jena, Germany). For confocal optical sectioning, sequences of images were taken along the optical axis with adequate increments (1.00 μm).

Drugs and Antibodies

Sar[D-Phe⁸] des-Arg⁹-BK was synthesized by Bio Basic Inc. Biotechnology Company (Markham, ON, Canada). Streptozotocin (STZ), NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Hydrogen), DPI (Diphenyleneiodonium), inhibitors of PKC_{total} (Ro-31-8220, No: 13334), and PKCβ1/2 (LY333531, No: 13964) were all purchased from Cayman Chemical (Michigan, USA). The following primary antibodies were used: home-made rabbit Anti-B1R (Lin et al., 2010; Lacoste et al., 2013); mouse Anti-RECA-1 (NB-10064647, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA); mouse Anti-rat CD11b/c recognition of macrophages (Cedarlane CL042AP, Burlington, ON, Canada); mouse Anti-alpha smooth muscle Actin (abcam ab7817, Toronto, ON, Canada) while goat Anti-NOX1 (SC-5821) and goat Anti-NOX2 (Anti gp91-phox, SC-5827) were from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. Secondary antibodies were obtained from Life Technology (Thermo Fisher Scientific, MA USA): Donkey Anti-mouse, Alexa Fluor 555 (A-31570), Donkey Anti-rabbit, Alexa Fluor 488 (A-21206), Donkey Anti-goat, Alexa Fluor 633 (A-21082).

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean ± SEM, and *n* represents the number of rats. The statistical analysis was performed using GraphPad prism software (GraphPad Software, Version 5, La Jolla, CA, USA). Data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis et al., 2015). Statistical significance was determined with Student's *t*-test for unpaired samples or with the one-way ANOVA followed by the Bonferroni test for multiple comparisons when *F* achieved *P* < 0.05 and there was no significant variance in homogeneity. A *P*-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

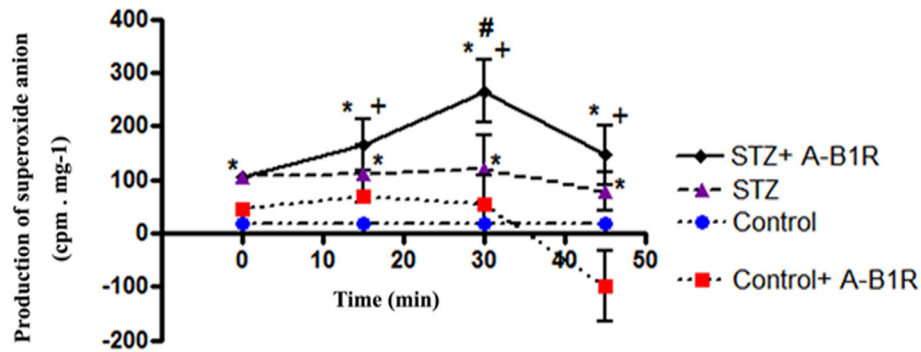


FIGURE 1 | Production of superoxide anion in control and STZ-aortic slices in the absence and presence of the B1R agonist (A-B1R) Sar[D-Phe⁸] des-Arg⁹-BK (20 μ M) at 0, 15, 30, and 45 min using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method. Data are mean \pm SEM obtained from five rats per group. * P < 0.01 STZ vs. Control; * P < 0.01 STZ + A-B1R vs. Control; + P < 0.05 STZ + A-B1R vs. Control + A-B1R at 15 min or + P < 0.01 at 30 and 45 min; # P < 0.01 STZ + A-B1R vs. STZ.

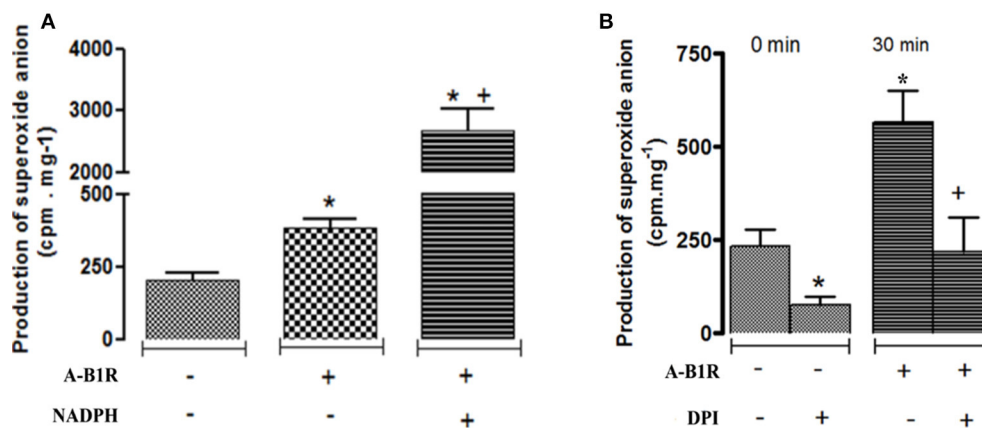


FIGURE 2 | Production of superoxide anion evoked by the B1R agonist (A-B1R) Sar[D-Phe⁸] des-Arg⁹-BK (20 μ M) at 0 min (-) and 30 min (+) in STZ-aortic slices in the absence (-) and presence (+) of (A) NADPH (0.1 mM), the substrate of NADPH oxidase, or (B) DPI (diphenyleneiodonium, 10 μ M), an inhibitor of NADPH oxidase. Data are mean \pm SEM obtained from five rats per group. In (A) * P < 0.05 A-B1R vs. Baseline; * P < 0.001 A-B1R + NADPH vs. Baseline; + P < 0.001 A-B1R + NADPH vs. A-B1R. In (B) * P < 0.05 DPI vs. Baseline; * P < 0.01 A-B1R vs. Baseline; + P < 0.01 A-B1R + DPI vs. A-B1R.

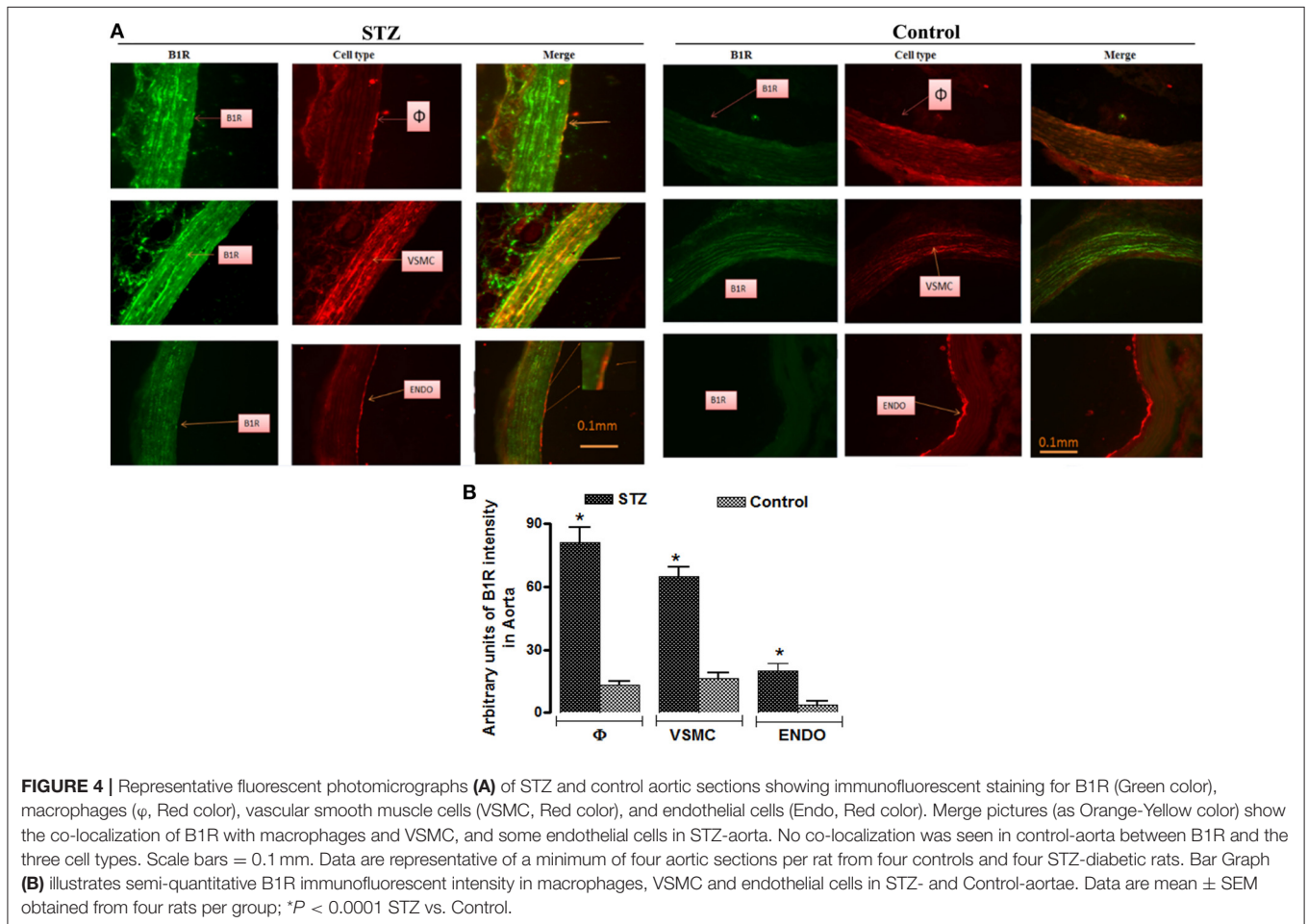
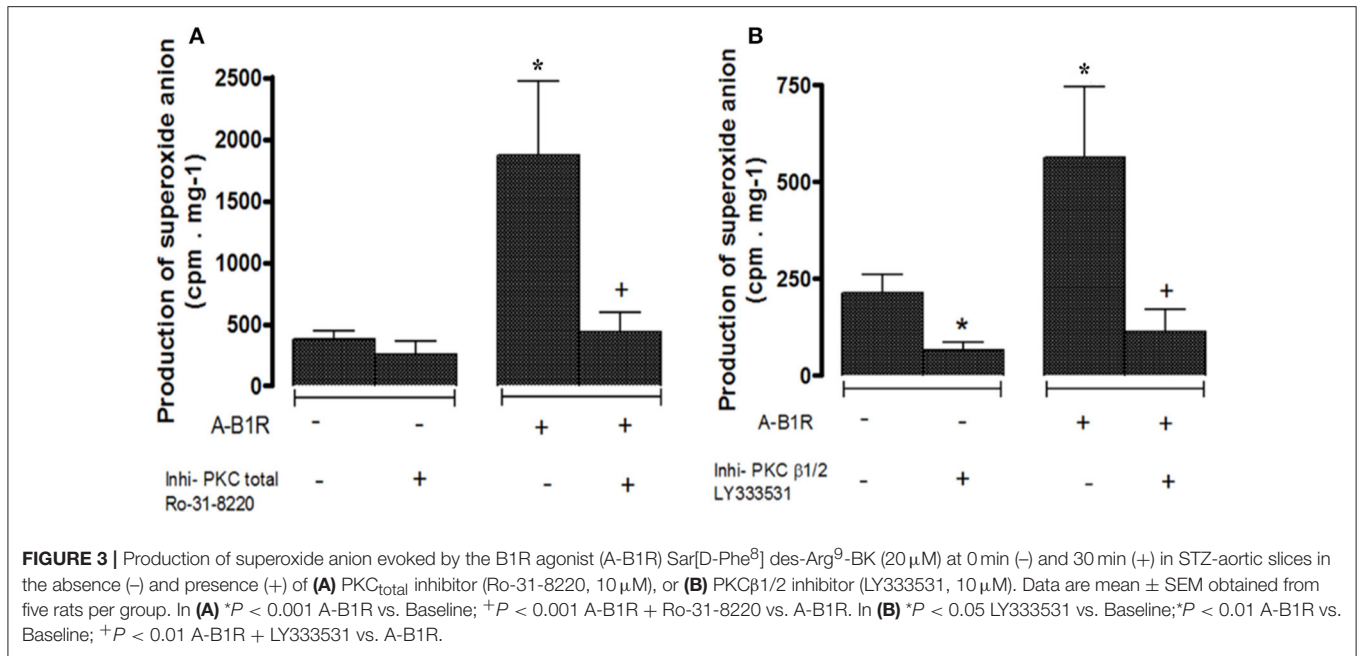
RESULTS

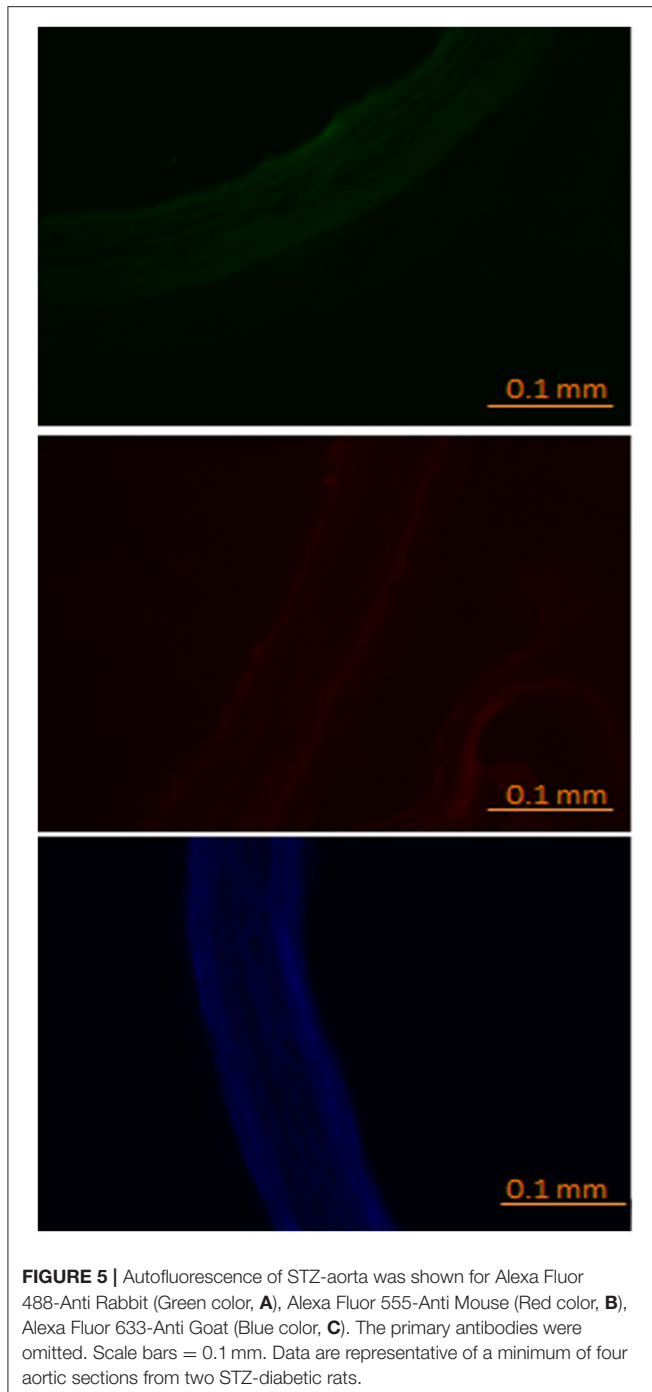
Effect of B1R Agonist on Superoxide Anion Production

Basal production of $O_2^{\bullet-}$ was significantly enhanced in STZ-aorta in comparison to control-aorta during the 45-min incubation period (Figure 1). The addition of the B1R agonist (Sar[D-Phe⁸] des-Arg⁹-BK, 20 μ M) at time 0 significantly amplified the production of $O_2^{\bullet-}$ in STZ-aorta at 15, 30 (peak effect) and 45 min post-agonist stimulation. In contrast, B1R agonist failed to significantly affect $O_2^{\bullet-}$ production during the same period in control-aorta. To assess the activity of NADPH oxidase in the production of $O_2^{\bullet-}$ evoked by the B1R agonist, its enzyme substrate NADPH was added to the vials. As depicted in Figure 2A, the maximal production of $O_2^{\bullet-}$ measured by the B1R agonist at 30 min was significantly boosted in the presence of NADPH (0.1 mM). To confirm the involvement of NADPH

oxidase, diphenyleneiodonium (DPI, 10 μ M), an inhibitor of NADPH oxidase (Massart et al., 2013; Song et al., 2015) was added to the vials 30 min prior to the addition of the B1R agonist. Data show that both the basal production of $O_2^{\bullet-}$ at time 0 min and that induced by 30 min stimulation with the B1R agonist were significantly blocked by DPI, confirming that $O_2^{\bullet-}$ derived from NADPH oxidase (Figure 2B).

To determine the involvement of PKC in B1R-induced NADPH oxidase activation, experiments were carried out in the presence of an inhibitor of PKC_{total} (Ro-31-8220) or a selective inhibitor of PKC β 1/2 (LY333531) (Gray et al., 2013) added at 10 μ M 30 prior to stimulation with the B1R agonist in STZ-aorta. As shown in Figure 3, the maximal production of $O_2^{\bullet-}$ induced by Sar[D-Phe⁸] des-Arg⁹-BK (20 μ M) at 30 min was significantly blocked by either inhibitor confirming the contribution of PKC β 1/2 in the activation of NADPH oxidase by the B1R agonist. Data also suggest the contribution of PKC β 1/2





in the basal production of $O_2^{\bullet-}$ induced by NADPH oxidase in STZ-aorta as evidenced by the significant reduction caused by the inhibitor in the absence of B1R agonist.

Cellular Localization of B1R in Thoracic Aorta

Representative pictures of STZ- and control- aortae labeled for B1R (tagged with anti-B1R in green color), macrophages (tagged

with anti-CD11 in red color), VSMC (tagged with anti-SMA in red color), and endothelial cells (tagged with anti-RECA-1 in red color) are presented in **Figure 4A**. B1R labeling was relatively weak in control-aorta and merge labeling (as orange-yellow color) was not seen in control-aorta revealing no localization of B1R on the three cell types. In contrast, B1R labeling was quite striking on macrophages and VSMC of STZ-aorta. The co-localization of B1R on the endothelium of STZ-aorta was less pronounced and seen only on a few cells. Semi-quantitative values of B1R immunofluorescent intensity in each cell type are also shown in **Figure 4B**. B1R labeling was relatively weak in control-aorta on the three cell types, yet it was significantly greater in STZ-aorta (macrophages > VSMC > endothelium). As control, the omission of primary antibodies produced a small autofluorescence background in STZ-aortic sections in the presence of secondary antibodies (**Figure 5**). Thus, this confirms that B1R is hardly detectable in control-aorta after subtracting the green autofluorescence.

Cellular Localization of NOX1 and NOX2 in Thoracic Aorta

Representative immunofluorescent pictures of STZ- and control- aortae are depicted for NOX1 (**Figure 6A**) and NOX2 (**Figure 7A**) (tagged with anti-NOX1 and anti-NOX2 in blue color), macrophages (tagged with anti-CD11 in red color), VSMC (tagged with anti-SMA in red color), and endothelial cells (tagged with anti-RECA-1 in red color). Data revealed that NOX1 and NOX2 were barely detectable in control-aorta (background is autofluorescence as seen in **Figure 5**) while their immun-expression was quite pronounced in STZ-aorta. Merge labeling (as blue-purple color) shows evidence of co-localization of NOX1 and NOX2 with macrophages, VSMC, and endothelial cells in STZ-aorta. In contrast, macrophages, VSMC, and endothelial cells show no evidence of labeling for NOX1 (**Figure 6A**) and NOX2 (**Figure 7A**) in control-aorta. Semi-quantitative values of NOX1 and NOX2 immunofluorescent intensity in each cell type are also shown in **Figures 6B, 7B**, respectively. Semi-quantitatively, NOX1 and NOX2 immunostaining intensities were significantly higher in all cell types of STZ-aorta, particularly in VSMC.

Co-localization of B1R with NOX1 and NOX2 in Thoracic Aorta

As B1R, NOX1, and NOX2 were found on VSMC, infiltrating macrophages and to some extent to endothelial cells in STZ-aorta, it remains to determine whether B1R co-localizes with NOXs on the same elements. **Figure 8A** illustrates representative immunofluorescent pictures of STZ- and control- aortae for NOX1 and NOX2. Whereas, merge immunostaining (as turquoise color dots) of B1R (green color) and NOX1/NOX2 (blue color) was not seen in control-aorta, it was highly detectable in STZ-aorta. The level of coexpression of B1R with NOX1 and B1R with NOX2 was highly significant in STZ-aorta when compared to control-aorta (**Figure 8B**). Furthermore, in triple labeling, co-localization of B1R with NOX1 (**Figures 9, 10A**) and B1R with NOX2 (**Figures 9, 10B**) was highly significant on

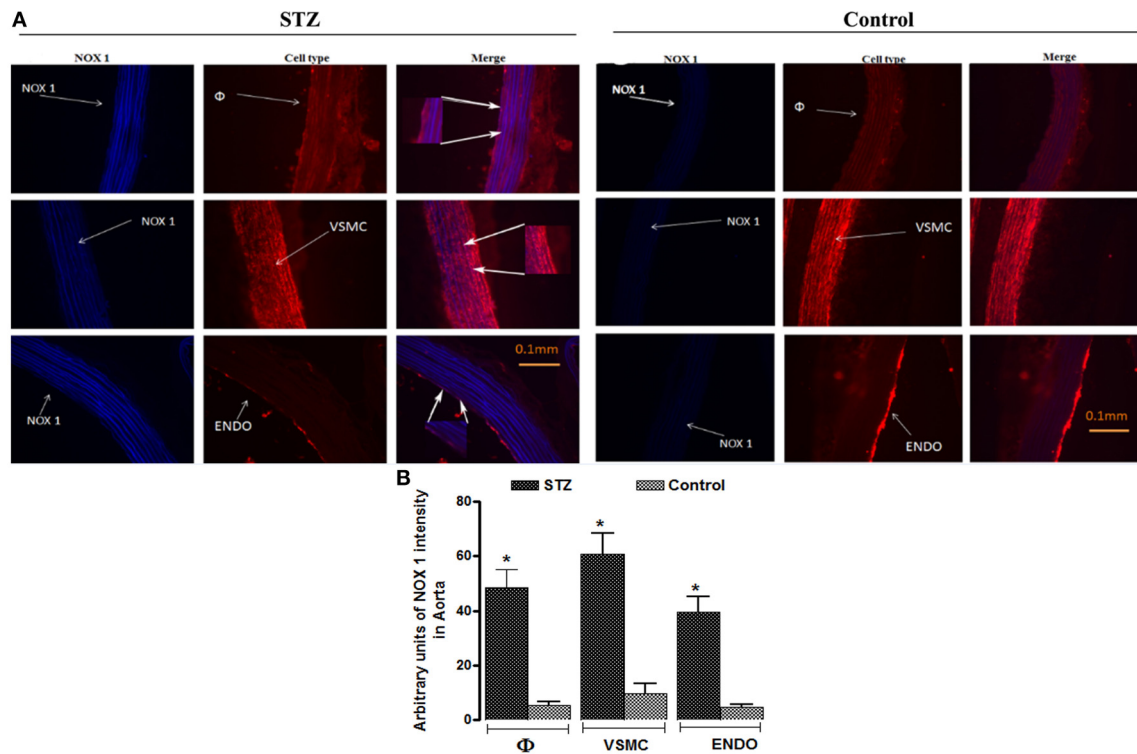


FIGURE 6 | Representative fluorescent photomicrographs (A) of STZ and control aortic sections showing immunofluorescent staining for NOX1 (Blue color), macrophages (ϕ , Red color), vascular smooth muscle cells (VSMC, Red color), and endothelial cells (Endo, Red color). While merge labeling (as Blue-Purple color) was absent in control-aorta, it was obvious in the STZ-aorta on each cell type. Scale bars = 0.1 mm. Data are representative of a minimum of four aortic sections per rat from four controls and four STZ-diabetic rats. Bar Graph (B) illustrates semi-quantitative NOX1 immunofluorescent intensity in macrophages, VSMC, and endothelial cells in STZ- and Control-aortae. Data are mean \pm SEM obtained from four rats per group; * $P < 0.0001$ STZ vs. Control.

the same cell type. While merge labeling (white color dots) was absent in control-aorta, it was markedly present on VSMC and infiltrating macrophages and more rarely on endothelial cells of STZ-aorta.

Cellular Localization of B1R in Popliteal Artery

The distribution of B1R was assessed in the popliteal artery as a prototype of resistance artery (Figure 11A). Red labeling was depicted to identify macrophages, VSMC, and endothelial cells, yet infiltrating macrophages were absent in the control artery. B1R intensity of labeling (green color) was significantly greater in STZ-artery than in control-artery on each cell type (Figures 11A,B). Importantly, B1R was found co-localized (yellow color) with infiltrating macrophages, VSMC and endothelial cells in the STZ-artery while weak co-localization was also found in VSMC and endothelial cells in control-artery. Contrarily to the STZ-aorta, localization of B1R on the endothelium was more pronounced in STZ-popliteal artery (Figures 11A,B).

Cellular Localization of B1R in Renal Arteries and Glomeruli

The localization of B1R was studied in small afferent/efferent arteries surrounding glomeruli in the renal cortex of STZ and

control rats for comparison with larger arteries such as the thoracic aorta and popliteal artery (Figure 12A). The labeling of B1R (green) and macrophages (red) was almost absent in control renal cortex while it was quite striking in STZ renal cortex showing co-localization of B1R with infiltrating macrophages in glomeruli and surrounding tissue. Likewise, B1R was co-localized with VSMC in larger renal arteries and endothelial cells in small afferent/efferent arteries and glomeruli of STZ. No apparent co-localization was found in those control renal structures, except in control glomeruli. This was ascertained semi-quantitatively in which B1R intensity of labeling was significantly higher in endothelium, VSMC and infiltrating macrophages of STZ renal cortex compared with control renal cortex (Figure 12B).

DISCUSSION

This study showed that activation of B1R, a $G\alpha_q$ -protein coupled receptor, stimulates $PKC\beta_{1/2}$ to enhance the production of $O_2^{\bullet-}$ through NADPH oxidase in the thoracic aorta of STZ-diabetic rats. Inhibitors of NADPH oxidase (DPI), PKC (Ro-31-8220), and $PKC \beta_{1/2}$ (LY333531) prevented the increased production of $O_2^{\bullet-}$ induced by the B1R agonist (Sar[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK) in isolated STZ-aorta. Also, the addition of NADPH boosted the activation of NADPH oxidase induced by the B1R agonist. In contrast, the B1R agonist was ineffective in control-aorta,

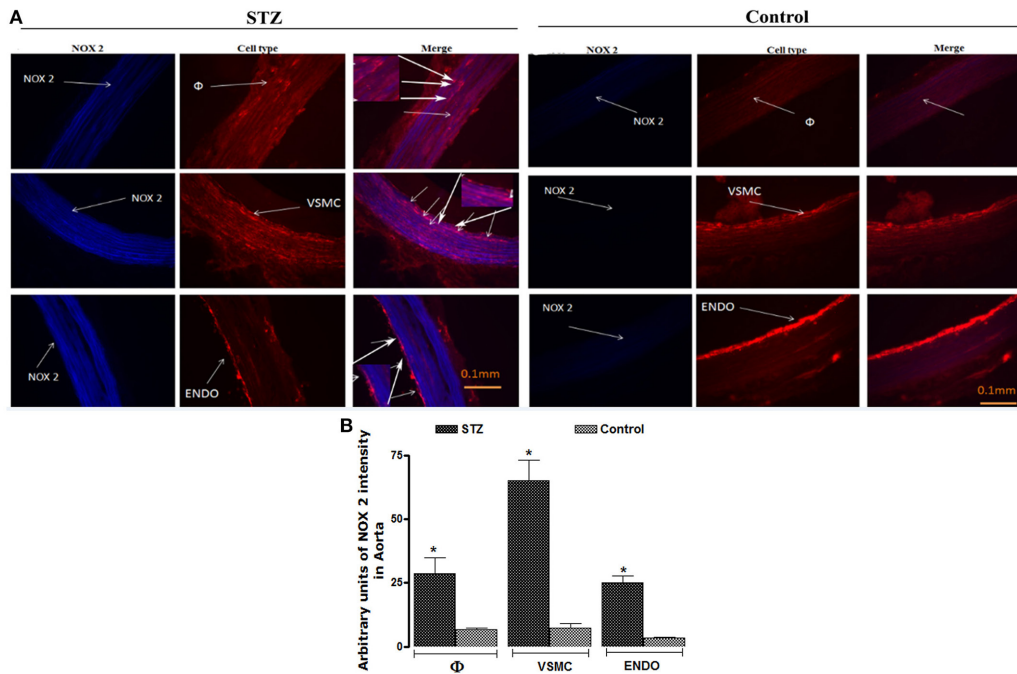


FIGURE 7 | Representative fluorescent photomicrographs **(A)** of STZ and control aortic sections showing immunofluorescent staining for NOX2 (Blue color), macrophages (Φ, Red color), vascular smooth muscle cells (VSMC, Red color), and endothelial cells (Endo, Red color). While merge labeling (as Blue-Purple color) was small in control-aorta, it was obvious in the STZ-aorta on each cell type. Scale bars = 0.1 mm. Data are representative of a minimum of four aortic sections per rat from four controls and four STZ-diabetic rats. Bar Graph **(B)** illustrates semi-quantitative NOX2 immunofluorescent intensity in macrophages, VSMC, and endothelial cells in STZ- and Control-aortae. Data are mean ± SEM obtained from four rats per group; **P* < 0.0001 STZ vs. Control.

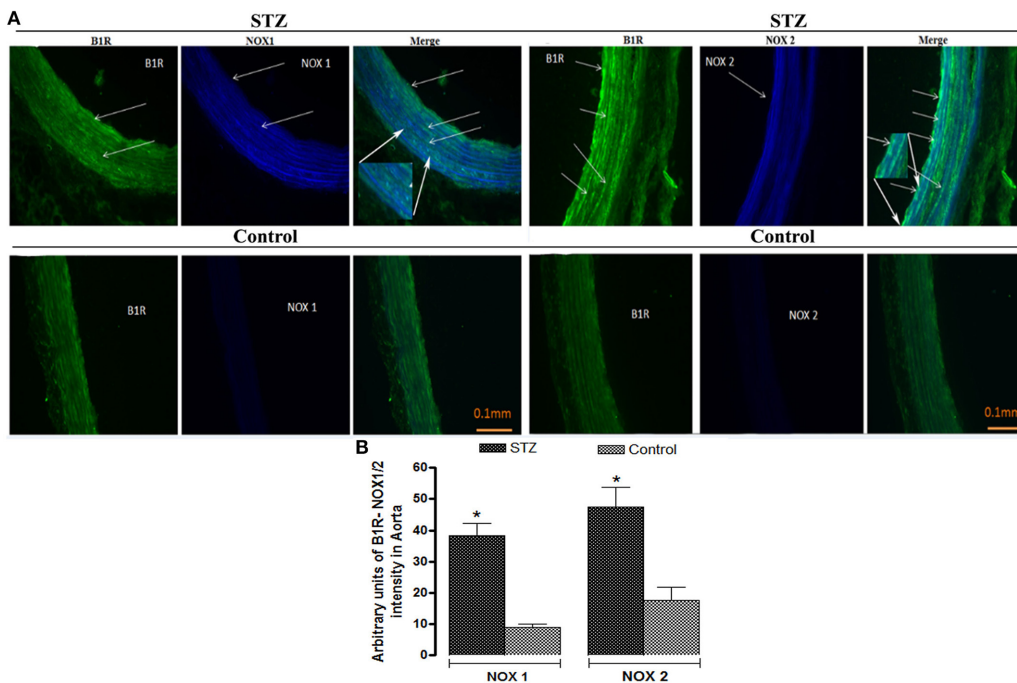


FIGURE 8 | Representative fluorescent photomicrographs **(A)** of STZ and control aortic sections showing immunofluorescent staining for B1R (Green color), NOX1 or NOX2 (Blue color). While merge labeling (as Turquoise color dots) was not seen in control-aorta, it occurred in STZ-aorta that highlighted co-localization of B1R with NOX1/2. Scale bars = 0.1 mm. Data are representative of a minimum of four aortic sections per rat from four controls and four STZ-diabetic rats. Bar Graph **(B)** illustrates semi-quantitative immunofluorescent intensity for B1R with NOX1 and NOX2 in STZ- and Control-aortae. Data are mean ± SEM obtained from four rats per group; **P* < 0.0001 STZ vs. Control.

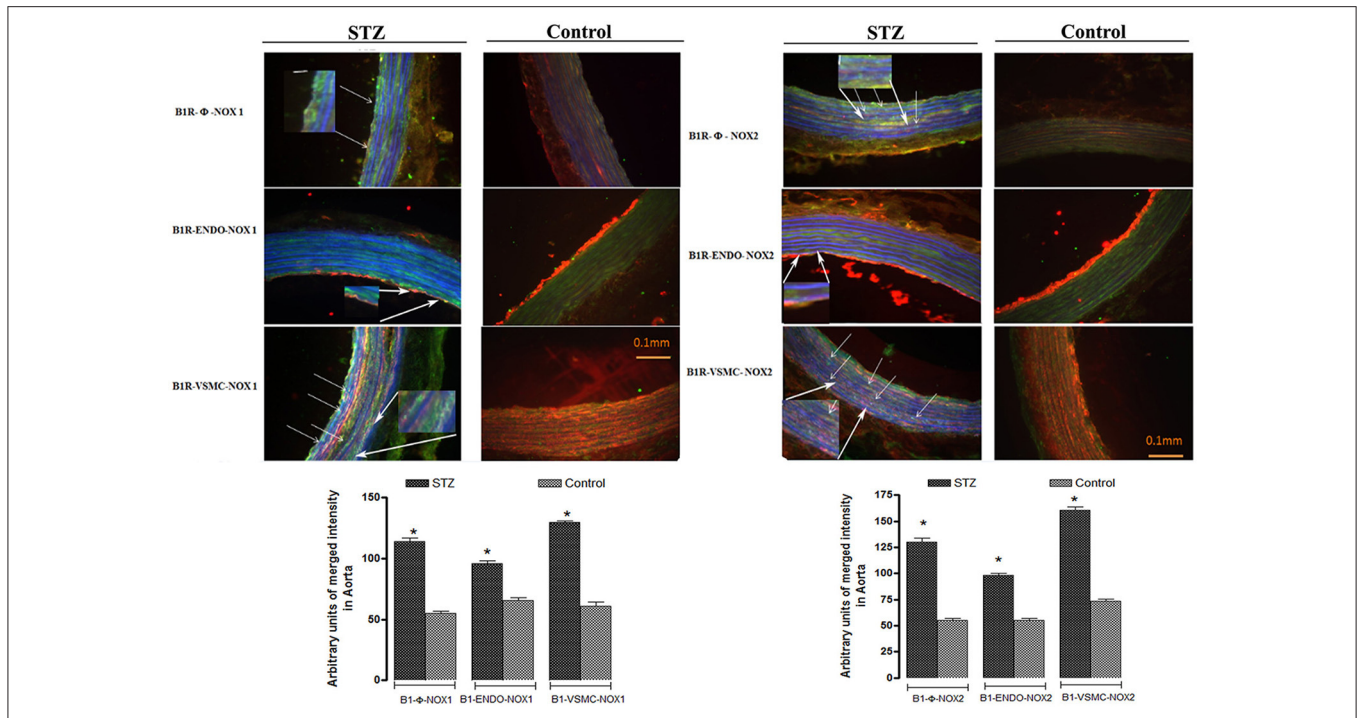


FIGURE 9 | Representative fluorescent photomicrographs of STZ and control aortic sections showing merge immunofluorescent staining (as White color dots) between B1R and NOX1 (**Upper-Left**) or B1R and NOX2 (**Upper-Right**) on the same cell type (macrophages and VSMC and to some extent on endothelial cells) in STZ-aorta. Such co-localization did not occur in control-aorta. Scale bars = 0.1 mm. Data are representative of a minimum of four aortic sections per rat from four controls and four STZ-diabetic rats. Bottom Bar Graphs illustrate semi-quantitative immunofluorescent intensity for B1R with NOX1 (**Left**) and NOX2 (**Right**) on the same cell type in STZ- and Control-aortae. Data are mean ± SEM obtained from four rats per group; *P < 0.0001 STZ vs. Control.

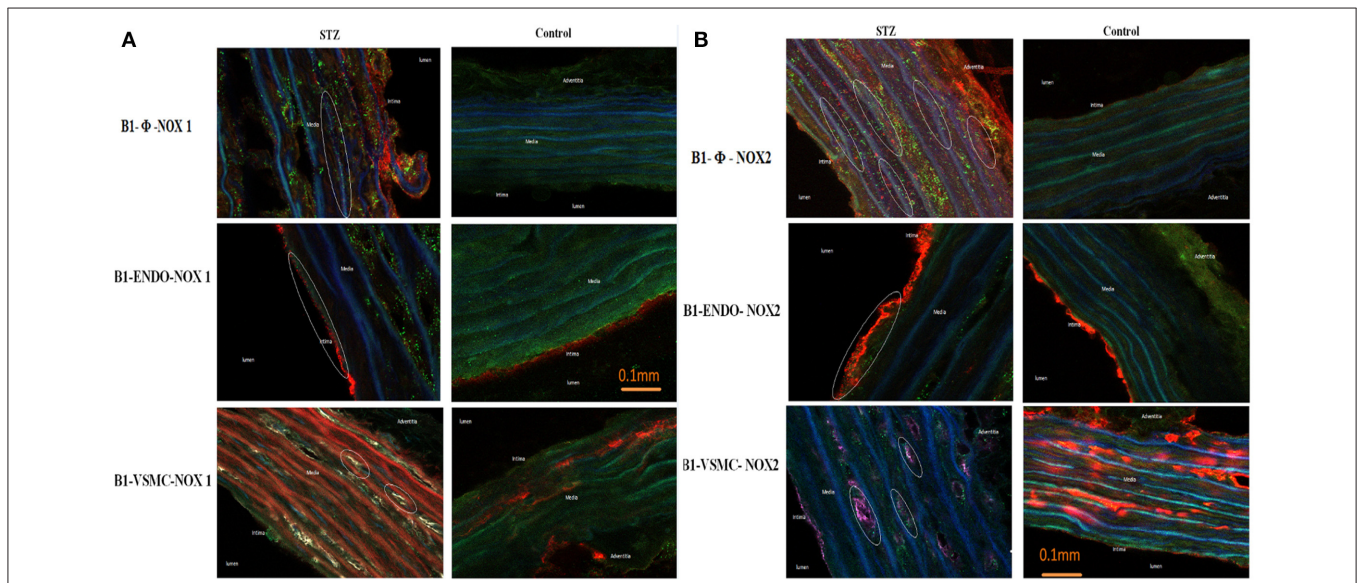


FIGURE 10 | Microphotographs of immunolocalization of B1R with NOX1 (**A**) and NOX2 (**B**) on macrophages, endothelial cells and VSMC by confocal microscopy (40 X). Shown are immunolabeling for B1R (green), macrophages (φ, Red color), endothelial cells (Endo, Red color), vascular smooth muscle cells (VSMC, Red color), and NOX1 or NOX2 (Blue color) in STZ- and Control-aorta. Note that B1R co-localized (as White color dots) with NOX1 and NOX2 on macrophages, VSMC, and rarely on endothelial cells in STZ-aorta. Triple immunocolocalization was not seen in Control-aorta. Data are representative of a minimum of four aortic sections per rat from four Controls and four STZ-diabetic rats.

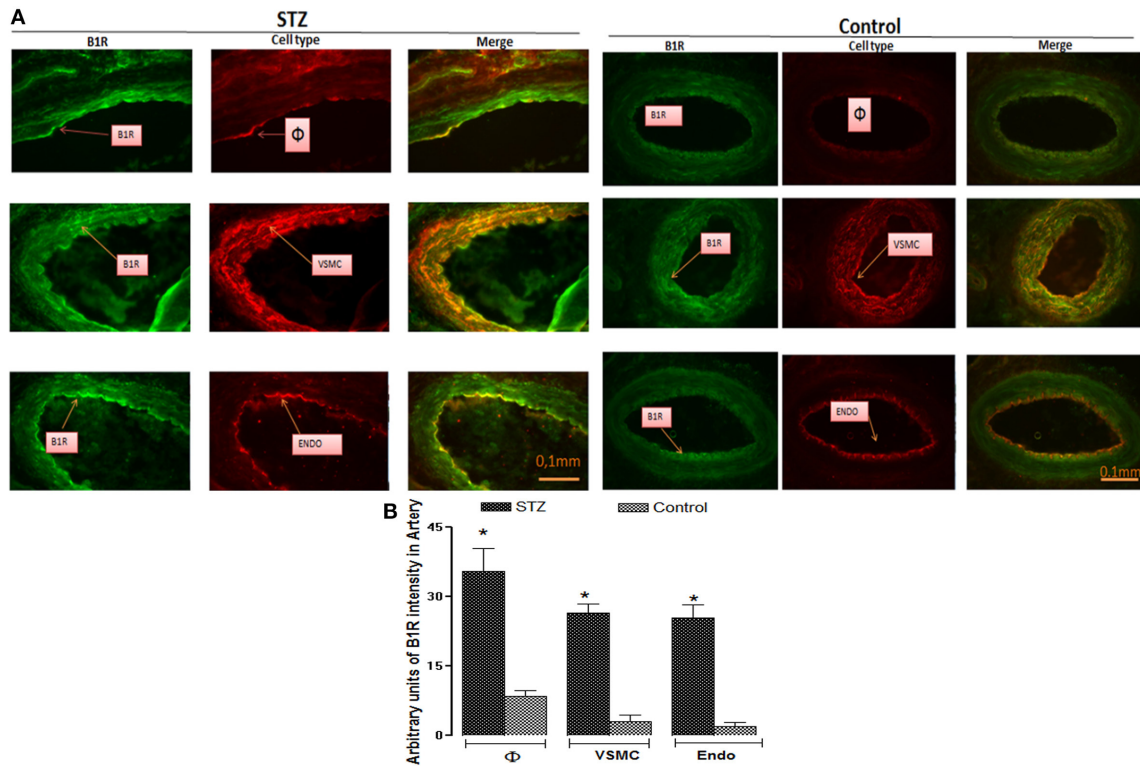
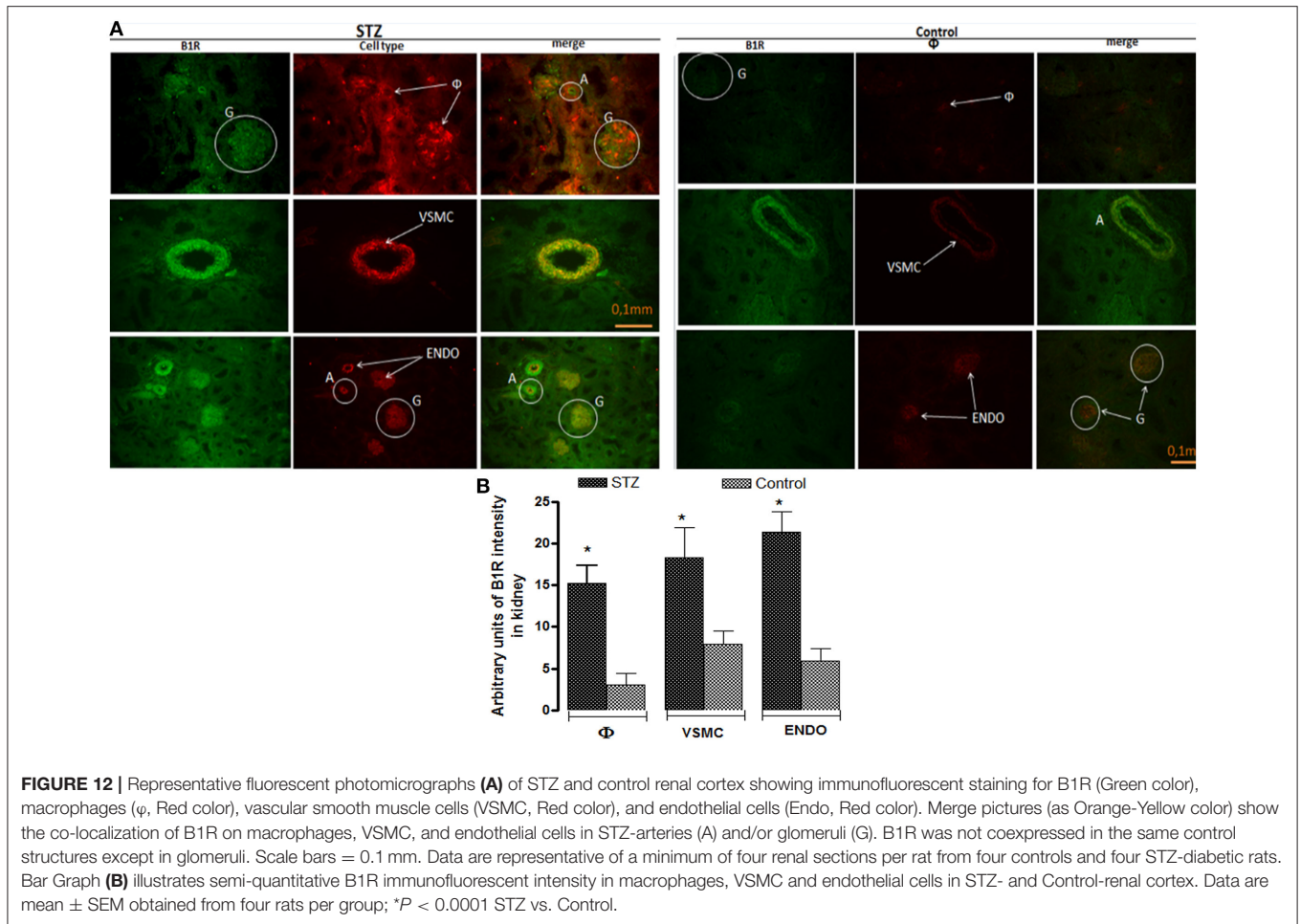


FIGURE 11 | Representative fluorescent photomicrographs (A) of STZ and control popliteal sections showing immunofluorescent staining for B1R (Green color), macrophages (ϕ , Red color), vascular smooth muscle cells (VSMC, Red color), and endothelial cells (Endo, Red color). Merge pictures (as Orange-Yellow color) show the co-localization of B1R on macrophages, VSMC, and endothelial cells in STZ-popliteal artery. B1R was also slightly expressed on VSMC and endothelial cells in the control resistance artery. Scale bars = 0.1 mm. Data are representative of a minimum of four popliteal sections per rat from four controls and four STZ-diabetic rats. Bar Graph (B) illustrates semi-quantitative B1R immunofluorescent intensity in macrophages, VSMC, and endothelial cells in STZ- and Control-popliteal artery. Data are mean \pm SEM obtained from four rats per group; * $P < 0.0001$ STZ vs. Control.

which is consistent with the low basal expression levels of B1R and NOX1/2 detected by immunofluorescence in non-diabetic control aorta. Importantly, this study provided the first evidence that B1R and NADPH oxidase are co-localized on VSMC, infiltrating macrophages and endothelial cells in STZ-diabetic blood vessels, thereby contributing to enhanced vascular oxidative stress. The upregulation of B1R in STZ blood vessels is likely a consequence of the higher basal level of oxidative stress ($O_2^{\bullet-}$) as documented earlier in STZ-retina (Abdouh et al., 2008). The cellular distribution of B1R on VSMC, endothelial cells (mainly on resistance vessels vs. aorta), and macrophages is consistent with its primary role in vasomotor tonus control (contractility/relaxation), vascular permeability, and cellular inflammation.

The present study demonstrated a substantial increase in the expression of NOX1 and NOX2 associated with increased NADPH oxidase activity in STZ-diabetic aorta. The two-fold upregulation of NOX1 with no changes in NOX4 was also reported in 8 weeks STZ-diabetic rat aorta (Wendt et al., 2005). Earlier studies have reported enhanced protein and gene expression of B1R in vessels and peripheral organs of STZ-diabetic rats (Pouliot et al., 2011, 2012; Tidjane et al., 2015, 2016) and in models of type 2 diabetes and insulin resistance (Ismael et al., 2008; Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012a;

Midaoui et al., 2015; Haddad and Couture, 2016). B1R activation increased the basal production of $O_2^{\bullet-}$ while B1R antagonism decreased it in the vasculature of diabetic rats along with a reduction of vascular inflammation and B1R expression (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012b). The present study suggests that B1R augments oxidative stress in diabetes by enhancing NADPH oxidase activity in a PKC β 1/2-dependent mechanism on VSMC, endothelial cells and infiltrating macrophages. The pro-oxidative effect of B1R is believed to activate the transcription nuclear factor NF- κ B known to further amplify and perpetuate the expression of B1R and other pro-inflammatory mediators (cytokines, iNOS, adhesion molecules, and so on) (Couture et al., 2014). The present data also highlight the likelihood contribution of infiltrating macrophages in addition to VSMC and endothelial cells in this pro-oxidative and pro-inflammatory vicious cycle in diabetic vascular tissues. This is congruent with the findings that prolonged treatment with B1R antagonists prevented the infiltration of macrophages and other immune cells in retina, pancreas, and adipose tissue, a mechanism which can contribute to the therapeutic effects of B1R antagonism in diabetic retinopathy, insulin resistance, and other diabetic complications (Dias et al., 2010; Dias and Couture, 2012b; Pouliot et al., 2012; Tidjane et al., 2015, 2016; Talbot et al., 2016). The expression of B1R on macrophages in STZ-aorta, popliteal



artery, and in the vicinity of renal glomeruli is reminiscent to B1R expression documented on macrophages and immune cells infiltrating the STZ-diabetic pancreas (Tidjane et al., 2016). This is keeping with previous findings showing the expression of B1R on macrophages and T lymphocytes (Bockmann and Paegelow, 2000; Couture et al., 2001) and with the up-regulation of B1R in endothelial cells, foamy macrophages, inflammatory cells, fibroblasts, and VSMC in atheromatous patients (Raidoo et al., 1997) and human brain endothelial cells exposed to interferon-gamma (Prat et al., 2000).

The protein Rac-GTP is required for NOX1 and NOX2 activity (George et al., 2013). PKC-mediated activation of Rac is an established mechanism of NADPH oxidase activation in a variety of cell types (Bedard and Krause, 2007). Upon activation, there is an exchange of GDP for GTP on Rac leading to phosphorylation of the cytosolic p47^{phox} subunit provoking conformational changes allowing interaction with p22^{phox}. The movement of p47^{phox} brings with it the other cytoplasmic subunits, p67^{phox} and p40^{phox}, to form the active NOX1/2 enzyme complex. The active enzyme complex transports electrons from cytoplasmic NADPH to extracellular oxygen to generate O₂^{•-} (Bedard and Krause, 2007). Increases in PKC β and PKC β 1 activities have been shown to account for much

of the elevated total PKC activity in hyperglycemic human brain microvascular endothelial cells and both act upstream to NADPH oxidase to increase the apoptotic effect of oxidative stress (O₂^{•-}) that impact negatively on blood-brain barrier (Shao and Bayraktutan, 2014). This is congruent with our findings that inhibition of total PKC β and PKC β 1/2 abolished O₂^{•-} production mediated by NADPH oxidase activity following B1R activation in STZ-diabetic thoracic aorta.

CONCLUSION

Pharmacological evidence is provided that activation of B1R increases the oxidative stress through a mechanism involving the stimulation of NADPH oxidase and PKC β 1/2 in the STZ-diabetic aorta. Moreover, the hypothesis is confirmed that B1R is upregulated and co-localized with NADPH oxidase (NOX1 and NOX2) in VSMC and infiltrating macrophages in STZ-diabetic aorta. Whereas, B1R was highly expressed on endothelial cells in small resistance arteries, its occurrence was weak in large conductance artery of STZ-diabetic rats. These findings further support a primary role for kinin B1R in vascular inflammation and oxidative stress that may be of importance in the treatment

of vascular diseases and hyperglycemia-induced cell apoptosis, particularly in the setting of diabetes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YH and RC conceived and designed the experiments. YH performed the experiments, analyzed the data, and drafted the paper. RC supervised the study, edited, and wrote the final version of the manuscript. All authors approved the final manuscript and contributed to editorial changes in the manuscript.

REFERENCES

- Abdouh, M., Talbot, S., Couture, R., and Hasséssian, H. M. (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 154, 136–143. doi: 10.1038/bjp.2008.48
- Bedard, K., and Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005
- Böckmann, S., and Paegelow, I. (2000). Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J. Leukoc. Biol.* 68, 587–592.
- Cai, H., Griendling, K. K., and Harrison, D. G. (2003). The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 24, 471–478. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00233-5
- Cave, A. C., Brewer, A. C., Narayanapanicker, A., Ray, R., Grieve, D. J., Walker, S., et al. (2006). NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 691–728. doi: 10.1089/ars.2006.8.691
- Chen, F., Yu, Y., Haigh, S., Johnson, J., Lucas, R., Stepp, D. W., et al. (2014). Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS ONE* 9:e88405. doi: 10.1371/journal.pone.0088405
- Couture, R., Blaes, N., and Girolami, J. P. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 12, 223–248. doi: 10.2174/1570161112666140226121627
- Couture, R., and Girolami, J. P. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 467–485. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.045
- Couture, R., Harrison, M., Vianna, R. M., and Cloutier, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429, 161–176. doi: 10.1016/S0014-2999(01)01318-8
- Curtis, M. J., Bond, R. A., Spina, D., Ahluwalia, A., Alexander, S. P., Giembycz, M. A., et al. (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br. J. Pharmacol.* 172, 3461–3471. doi: 10.1111/bph.12856
- Dias, J. P., and Couture, R. (2012a). Blockade of kinin B1 receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* 14, 244–253. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x
- Dias, J. P., and Couture, R. (2012b). Suppression of vascular inflammation by kinin B1 receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60, 61–69. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182576277
- Dias, J. P., Talbot, S., Sénécal, J., Carayon, P., and 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:e12622. doi: 10.1371/journal.pone.0012622
- Drapeau, G., Audet, R., Levesque, L., Godin, D., and Marceau, F. (1993). Development and *in vivo* evaluation of metabolically resistant antagonists of B1 receptors for kinins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266, 192–199.
- Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K., and Sobey, C. G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 453–471. doi: 10.1038/nrd3403
- Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 452–463. doi: 10.1016/j.tem.2014.06.012
- Feng, L., Matsumoto, C., Schwartz, A., Schmidt, A. M., Stern, D. M., and Pile-Spellman, J. (2005). Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care* 28, 379–384. doi: 10.2337/diacare.28.2.379
- Gao, L., and Mann, G. E. (2009). Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc. Res.* 82, 9–20. doi: 10.1093/cvr/cvp031
- George, A., Pushkaran, S., Konstantinidis, D. G., Koochaki, S., Malik, P., Mohandas, N., et al. (2013). Erythrocyte NADPH oxidase activity modulated by Rac GTPases, PKC, and plasma cytokines contributes to oxidative stress in sickle cell disease. *Blood* 121, 2099–2107. doi: 10.1182/blood-2012-07-441188
- Gleissner, C. A. (2015). The vulnerable vessel. vascular disease in diabetes mellitus. *Hamostaseologie* 35, 267–271. doi: 10.5482/HAMO-14-11-0059
- Goldberg, R. B. (2009). Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 3171–3182. doi: 10.1210/jc.2008-2534
- Gray, R. D., Lucas, C. D., Mackellar, A., Li, F., Hiersemenzel, K., Haslett, C., et al. (2013). Activation of conventional protein kinase C (PKC) is critical in the generation of human neutrophil extracellular traps. *J. Inflamm.* 10:12. doi: 10.1186/1476-9255-10-12
- Haddad, Y., and Couture, R. (2016). Interplay between the kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. *Br. J. Pharmacol.* 173, 1988–2000. doi: 10.1111/bph.13491
- He, Z., and King, G. L. (2004). Protein kinase C β isoform inhibitors: a new treatment for diabetic cardiovascular diseases. *Circulation* 110, 7–9. doi: 10.1161/01.CIR.0000133428.02295.6C
- Ismael, M. A., Talbot, S., Carbonneau, C. L., Beauséjour, C. M., and Couture, R. (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur. J. Pharmacol.* 589, 66–72. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.05.006
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J., and Ergul, A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc. Diabetol.* 4:5. doi: 10.1186/1475-2840-4-5
- Kahn, R., Mossberg, M., Ståhl, A. L., Johansson, K., Lopatko Lindman, I., Heijl, C., et al. (2017). Microvesicle transfer of kinin B1-receptors is a novel inflammatory mechanism in vasculitis. *Kidney Int.* 91, 96–105. doi: 10.1016/j.kint.2016.09.023
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., and Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 1, 94–99. doi: 10.4103/0976-500X.72351
- Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., Brovkovich, V., and Skidgel, R. A. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44, 145–154. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004
- Lacoste, B., Tong, X. K., Lahjouji, K., Couture, R., and Hamel, E. (2013). Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor

FUNDING

This work was supported by a Grant-in-Aid from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-119329) to RC. YH received a 1-year PhD Studentship award from the Graduate Program in Molecular, Cellular, and Integrative Physiology of the Université de Montréal.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are most grateful to Jacques Sénécal for his technical assistance.

- blockade in Alzheimer's disease mice. *J. Neuroinflammation* 10:57. doi: 10.1186/1742-2094-10-57
- Lin, J. C., Talbot, S., Lahjouji, K., Roy, J. P., Sénécal, J., Couture, R., et al. (2010). Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B(1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31, 1940–1945. doi: 10.1016/j.peptides.2010.07.008
- Massart, C., Giusti, N., Beauwens, R., Dumont, J. E., Miot, F., and Sande, J. V. (2013). Diphenyleneiodonium, an inhibitor of NOXes and DUOXes, is also an iodide-specific transporter. *FEBS Open Bio* 4, 55–59. doi: 10.1016/j.fob.2013.11.007
- McGrath, J. C., and Lilley, E. (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in *BJP. Br. J. Pharmacol.* 172, 3189–3193. doi: 10.1111/bph.12955
- Midaoui, A. E., Talbot, S., Lahjouji, K., Dias, J. P., Fantus, I. G., and Couture, R. (2015). Effects of alpha-lipoic acid on oxidative stress and kinin receptor expression in obese Zucker diabetic fatty rats. *J. Diabetes Metab.* 6, 1–7. doi: 10.4172/2155-6156.1000556
- Munzel, T., Sayegh, H., Freeman, B. A., Tarpey, M. M., and Harrison, D. G. (1995). Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J. Clin. Invest.* 95, 187–194. doi: 10.1172/JCI117637
- Ohara, Y., Peterson, T. E., and Harrison, D. G. (1993). Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J. Clin. Invest.* 91, 2546–2551. doi: 10.1172/JCI116491
- Pouliot, M., Hetu, S., Lahjouji, K., Couture, R., and Vaucher, E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in streptozotocin-diabetic rats. *Exp. Eye Res.* 92, 482–489. doi: 10.1016/j.exer.2011.03.007
- Pouliot, M., Talbot, S., Sénécal, J., Dotigny, F., Vaucher, E., and Couture, R. (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. doi: 10.1371/journal.pone.0033864
- Prat, A., Biernacki, K., Pouly, S., Nalbantoglu, J., Couture, R., and Antel, J. P. (2000). Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 896–906. doi: 10.1093/jnen/59.10.896
- Raidoo, D. M., Ramsaroop, R., Naidoo, S., Müller-Esterl, W., and Bhoola, K. D. (1997). Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology* 36, 153–160. doi: 10.1016/S0162-3109(97)00015-5
- Shao, B., and Bayraktutan, U. (2014). Hyperglycaemia promotes human brain microvascular endothelial cell apoptosis via induction of protein kinaseC- β_1 and prooxidant enzyme NADPH oxidase. *Redox Biol.* 2, 694–701. doi: 10.1016/j.redox.2014.05.005
- Song, H., Han, I. Y., Kim, Y., Kim, Y. H., Choi, I. W., Seo, S. K., et al. (2015). The NADPH oxidase inhibitor DPI can abolish hypoxia-induced apoptosis of human kidney proximal tubular epithelial cells through Bcl2 up-regulation via ERK activation without ROS reduction. *Life Sci.* 126, 69–75. doi: 10.1016/j.lfs.2015.02.004
- Sun, Q. A., Runge, M. S., and Madamanchi, N. R. (2016). Oxidative stress, NADPH oxidases, and arteries. *Hamostaseologie* 36, 77–88. doi: 10.5482/HAMO-14-11-0076
- Talbot, S., Dias, J. P., El Midaoui, A., and Couture, R. (2016). Beneficial effects of kinin B1 receptor antagonism on plasma fatty acid alterations and obesity in Zucker diabetic fatty rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 94, 752–757. doi: 10.1139/cjpp-2016-0063
- Tidjane, N., Gaboury, L., and Couture, R. (2016). Cellular localisation of the kinin B1R in the pancreas of streptozotocin-treated rat and the anti-diabetic effect of the antagonist SSR240612. *Biol. Chem.* 397, 323–336. doi: 10.1515/hsz-2015-0230
- Tidjane, N., Hachem, A., Zaid, Y., Merhi, Y., Gaboury, L., Girolami, J. P., et al. (2015). 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. Inflamm.* 13, 40–52. doi: 10.1177/1721727X15577736
- Wendt, M. C., Daiber, A., Kleschyov, A. L., Mülsch, A., Sydow, K., Schulz, E., et al. (2005). Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic. Biol. Med.* 39, 381–391. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.020

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2017 Haddad and Couture. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Chapitre 5

Discussion

Au terme de nos travaux, les résultats obtenus ont démontré, d'une part, que l'inhibition de la kininase 1 (carboxypeptidase M, CPM), l'enzyme clé impliquée dans la biosynthèse des agonistes RB₁, et d'autre part, que l'inhibition de la iNOS exerce les mêmes effets bénéfiques que ceux produits par l'antagoniste du RB₁ (SSR240612) chez les rats insulino-résistants. Une troisième étude a permis de montrer que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH oxydase sur le même type cellulaire et produit son activation via la PKC dans le système vasculaire chez les rats STZ-diabétiques.

Pour réaliser le premier objectif, le modèle utilisé par notre laboratoire était celui du rat rendu insulino-résistant avec une consommation élevée en hydrates de carbone (accès libre et à volonté à l'eau de boisson contenant 10% de D-glucose). L'équipe du Dr de Champlain a montré que ces rats traités au D-glucose pendant 4 semaines développent les symptômes du DT2 tels l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hypertension et la résistance à l'insuline, accompagnés d'une augmentation de l'anion superoxyde dans le cœur et les vaisseaux sanguins (El Midaoui *et al.*, 2002, 2005). Notre laboratoire a aussi confirmé ces données pour des périodes allant de 4 à 14 semaines et a aussi montré des symptômes de douleur neuropathique caractérisés par le développement des allodynies tactiles et au froid (Lungu *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2010). Cette exposition chronique au régime riche en glucose a permis de développer un modèle nutritionnel non génétique et peu coûteux. Ce modèle d'insulino-résistance permet de mieux comprendre les mécanismes qui déclenchent le DT2. Toutefois, ce modèle présente aussi des limites car il ne permet pas de bien étudier les complications vasculaires. La phase pré-diabétique ne montre que des changements anatomiques mineurs au niveau de la structure vasculaire sans aucune hypertrophie vasculaire ou cardiaque (Pilon *et al.*, 2009). De plus, les niveaux plasmatiques de triglycérides, LDL, HDL et cholestérol restent à être déterminés dans ce modèle.

Après 8 semaines de traitement au D-glucose, les rats développent une neuropathie douloureuse, une hyperglycémie, une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline et une hypertension artérielle, accompagnant une augmentation de la masse adipeuse, la surexpression du RB₁ et des marqueurs inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , iNOS, COX-2, protéines d'adhésion). Toutes ces anomalies ont pu être corrigées ou améliorées par un

traitement d'une semaine avec un antagoniste non peptidique du RB₁ (SSR240612) (Dias *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 a; Dias *et al.*, 2012 b).

Les cytokines pro-inflammatoires et le stress oxydatif via les ERO induisent l'expression du RB₁ (Lungu *et al.*, 2007; Ismael *et al.*, 2008). En retour le RB₁ active la iNOS par la voie de Gαi et la ERK/MAP kinase (Brovkovych *et al.*, 2011). La iNOS génère une grande quantité de NO qui, se trouvant dans un milieu oxydatif en présence de l'anion superoxyde, forme le peroxyde de nitrite hautement toxique et diminue la biodisponibilité du NO (Couture *et al.*, 2014). Ainsi, le RB₁ amplifie et perpétue le stress oxydatif en augmentant la production de l'anion superoxyde via l'activation de la NADPH oxydase (Dias *et al.*, 2010).

Impact du 1400W sur les paramètres cardiométaboliques et inflammatoires

Dans cette étude (article 1), nous avons rapporté qu'un traitement d'une semaine avec un inhibiteur sélectif de la iNOS (1400W) améliorait la résistance à l'insuline, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie en plus de renverser le gain de poids corporel chez les rats soumis au glucose. Les effets bénéfiques du 1400W sur ces anomalies métaboliques ont été associés à la correction de la formation de peroxyde de nitrite et à la suppression des biomarqueurs de l'inflammation (RB₁, iNOS, IL-1β) dans les tissus vasculaires et hépatiques. La formation de l'ONOO⁻, suite à l'activation de la iNOS par le RB₁, contribue à la résistance à l'insuline en bloquant, par la nitration de la tyrosine, la phosphorylation de l'IRS-1 (Pilon *et al.*, 2010). En effet, la délétion génétique de la iNOS prévient le développement de la résistance à l'insuline chez la souris exposée à une diète riche en gras (Perreault *et al.*, 2001). En outre, la surexpression de CPM est renversée par le 1400W chez les rats nourris au glucose. En renversant la surexpression de la CPM avec le 1400W, l'activation du RB₁ par ses agonistes endogènes est supprimée, menant à une normalisation de l'expression du RB₁ au niveau de l'ARNm et de la protéine. Par ce mécanisme, l'inhibition de la iNOS cible à la fois les ligands RB₁ et l'expression du RB₁.

Dans ce modèle de résistance à l'insuline, le 1400W n'a cependant pas eu d'impact sur l'augmentation significative des niveaux d'O₂^{•-} dans l'aorte des rats glucosés. En effet, la production de base d'O₂^{•-} provient principalement de l'activation de la NADPH oxydase par le RB₁ (Dias *et al.*, 2010) et l'inhibition de la iNOS, par le 1400W, empêche la formation de NO et donc subséquemment la formation du peroxyde de nitrite, ce qui peut expliquer l'accumulation de l'anion superoxyde dans l'aorte chez les rats témoins. Fait

intéressant, les données suggèrent également que le peroxy-nitrite, et non pas l' $O_2^{\bullet-}$ seul, serait impliqué dans la régulation à la hausse de CPM et RB₁ comme un mécanisme de rétroaction positive (figure 8 de l'article 1). Des études antérieures ont rapporté que le RB₁ peut être régulé à la hausse par ses propres agonistes dans les fibroblastes humains (Schanstra *et al.*, 1998), ainsi qu'*in vivo* dans les vaisseaux sanguins, et que cette régulation positive est renversée avec le SSR240612 chez les rats glucosés (Dias et Couture, 2012b, Dias et Couture, 2012a, Dias *et al.*, 2010). Ceci offre une explication plausible à l'inhibition de la surexpression de l'ARNm et de la protéine du RB₁ à la suite d'un traitement d'une semaine avec le SSR240612 dans ces différentes études. Autrement dit, l'antagoniste du RB₁ prévient les agonistes endogènes d'agir comme régulateur à la hausse de son expression dans un contexte inflammatoire.

L'inhibition de la surexpression de la iNOS associée à l'obésité, dans les tissus sensibles à l'insuline chez les rongeurs et les humains, améliore la résistance à l'insuline induite par l'obésité (Kaneki *et al.*, 2007). Notre laboratoire a montré qu'un traitement d'une semaine avec le SSR240612 renverse le gain de poids corporel, la masse adipeuse et la surexpression de la iNOS dans les tissu adipeux rétropéritonéaux chez les rats glucosés (Dias *et al.*, 2012 a). Notre étude (article 1) reproduit cet effet bénéfique après inhibition de la iNOS avec le traitement d'une semaine avec le 1400W dans le même modèle. Ces deux dernières études confirment un autre rapport de notre équipe, montrant qu'un traitement d'une semaine avec le SSR240612 renverse le gain de poids corporel et l'adiposité chez les rats Zucker obèses (ZDF), un modèle de diabète de type 2 (Talbot *et al.*, 2016).

Bien que le 1400W ait renversé l'insulinorésistance, il n'a pas pu affecter l'hypertension chez les rats glucosés. Cela indique que l'hypertension n'est pas liée à la iNOS périphérique, à la surproduction de l'anion superoxyde et du peroxy-nitrite ou encore à l'expression et à l'activation du RB₁ périphérique. En effet, seuls les antagonistes non peptidiques, capables de traverser la barrière hémato-encéphalique pour inhiber le RB₁ dans le système nerveux central, ont pu corriger l'hypertension chez les rats glucosés, les rats spontanément hypertendus ou les rats rendus hypertendus par infusion avec l'angiotensine II (Lungu *et al.*, 2007; De Brito Gariépy *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2010). Bien que des études aient montré que le 1400W infusé à forte dose (2.5 mg.kg⁻¹.h⁻¹), pendant 72h, prévient les dommages cérébraux induits par la iNOS dans un modèle

d'ischémie cérébrale chez le rat (Pérez-Asensio *et al.*, 2005), nous n'avons pas d'évidence que le 1400W inhibe la iNOS et l'induction du RB₁ dans le cerveau.

Une augmentation de l'expression et de l'activité de la iNOS a été signalée dans les artères mésentériques supérieures chez des rats diabétiques, induits par STZ (Bardell *et al.*, 2001). Dans ce modèle de diabète de type 1, les rats ne sont pas hypertendus mais présentent plutôt un phénotype de dépression cardiovasculaire associé à une expression accrue de la iNOS et de la nitrotyrosine dans les tissus cardiovasculaires accompagnants une dysfonction endothéliale (Nagareddy *et al.*, 2005). Notons que la dysfonction endothéliale est absente chez les souris diabétiques knock-out pour la iNOS (Gunnnett *et al.*, 2003). Nous pouvons alors spéculer que la dysfonction endothéliale n'est pas le premier mécanisme pouvant expliquer l'hypertension artérielle dans notre modèle de rats glucosés qui semble davantage tributaire d'un mécanisme central distinct de l'insulinorésistance périphérique.

L'inhibition de la iNOS par le traitement avec le 1400W a pu bloquer la surexpression des marqueurs de l'inflammation (RB₁, IL-1 β , CPM, iNOS et ONOO⁻) non seulement dans le tissu vasculaire mais aussi dans le foie et le rein, suggérant que l'inhibition de la iNOS et subséquemment du RB₁ peut atteindre plusieurs cibles thérapeutiques périphériques dans le diabète au-delà du système cardiovasculaire.

Impact du Mergetpa sur les paramètres cardiométaboliques et inflammatoires

Les résultats obtenus avec Mergetpa (article 2) sont étroitement similaires à ceux rapportés précédemment dans ce modèle de résistance à l'insuline après un traitement d'une semaine avec le SSR240612 (Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 a; Dias *et al.*, 2012 b) ou avec le 1400W (Haddad *et al.*, 2016). Il a été suggéré que l'activation du RB₁ conduit à la formation de peroxy-nitrite lors de l'activation post-traductionnelle de la iNOS et de la NADPH oxydase. À son tour, le peroxy-nitrite exerce une boucle de rétroaction positive sur l'expression de la CPM et du RB₁. Cela semble être un mécanisme crédible vu que l'expression du RB₁ peut être augmentée par ses propres agonistes (Schanstra *et al.*, 1998; Couture *et al.*, 2014). L'inhibition de la CPM avec le Mergetpa a produit les mêmes résultats que le blocage du RB₁ avec le SSR240612. En supprimant la production des agonistes endogènes du RB₁, on prévient la régulation à la hausse du RB₁ et la cascade de signalisation conduisant à l'activation de la iNOS et de la NADPH oxydase.

Le traitement d'une semaine avec le Mergetpa n'a pas réussi à réduire l'hypertension artérielle, ce qui n'est pas en accord avec l'effet antihypertenseur du SSR240612 (Dias *et al.*, 2010). Cela peut s'expliquer par le fait que le RB₁ central et non périphérique, tel que mentionné précédemment, est impliqué dans le maintien de l'hypertension artérielle chez les rats glucosés, à l'instar des rats spontanément hypertendus ou rendus hypertendus par l'angiotensine II (Lungu *et al.*, 2007; De Brito Gariépy *et al.*, 2010). À l'heure actuelle, il n'y a aucune information concernant la possibilité que Mergetpa puisse passer la barrière hémato-encéphalique pour inhiber la kininase 1 cérébrale. D'autres études seront nécessaires pour résoudre ce problème. Néanmoins, nos données mettent en évidence une dissociation des mécanismes sous-jacents à l'insulinorésistance et à l'hypertension (Haddad *et al.*, 2016) et soutiennent l'hypothèse selon laquelle le RB₁ périphérique ne contribue pas à l'hypertension tel que montré dans divers modèles expérimentaux chez le rat (Couture *et al.*, 2014).

L'inhibition et la normalisation de l'expression accrue de plusieurs marqueurs de l'inflammation (RB₁, CPM, iNOS et IL-1 β dans le cortex rénal, l'aorte thoracique et le foie) et du stress oxydatif (anion superoxyde dans l'aorte et expression de la nitrotyrosine dans l'aorte et le cortex rénal) avec le Mergetpa abonde dans le même sens que les résultats rapportés précédemment dans ce modèle de résistance à l'insuline après un traitement d'une semaine avec le SSR240612 (Dias *et al.*, 2012a; Dias *et al.*, 2012b; Dias *et al.*, 2010) et avec le 1400W (Haddad *et al.*, 2016).

L'activation chronique du RB₁ est susceptible d'être amplifiée par l'accumulation de Des-Arg⁹-BK et de la Lys-des-Arg⁹-BK au site d'inflammation, car la demi-vie de Des-Arg⁹-BK est 4 à 12 fois plus longue que celle de la BK (Decarie *et al.*, 1996; F. Marceau *et al.*, 1998). La surexpression de CPM peut également expliquer les niveaux endogènes croissants de métabolites Des-Arg⁹-kinines qui par auto-induction augmentent l'expression et l'activation du RB₁ dans le processus inflammatoire lié à la résistance à l'insuline.

Mergetpa n'a eu aucun effet significatif chez les rats témoins, suggérant la spécificité de l'action de cet inhibiteur enzymatique sur la biosynthèse des agonistes B₁ des kinines, mettant en évidence la faible implication de la kininase I et du RB₁ chez les rats témoins. Ceci est cohérent avec la faible expression du RB₁ dans les tissus sains des animaux contrôles (Couture *et al.*, 2014). La CPM (présente à la membrane cellulaire) est probablement plus importante que la CPN (présente dans le plasma) dans le processus

métabolique de clivage et de l'activité des kinines puisque ces peptides vasoactifs sont considérés principalement comme des autacoïdes jouant des fonctions autocrines et paracrines (Carretero *et al.*, 1991). Il a été démontré que la CPM liée à la membrane joue un rôle critique dans la génération d'agonistes spécifiques à proximité du RB₁ (Zhang *et al.*, 2013). Néanmoins, un concept récent développé à partir d'études moléculaires dans des cellules transfectées propose que la CPM facilite la signalisation du RB₁ par sa capacité à activer directement le récepteur via un changement conformationnel. Cette interaction CPM-RB₁ (protéine-protéine) qui ne cause pas la génération enzymatique des agonistes provoque directement l'activation du RB₁. Mergetpa bloque ce changement conformationnel en empêchant la liaison des kinines au CPM (Zhang *et al.*, 2013).

La CPM est une enzyme largement distribuée qui clive la lysine ou l'arginine en partie C-terminale de plusieurs peptides et protéines, y compris les anaphylatoxines, les chimiokines, les enképhalines et les facteurs de croissance (Deiteren *et al.*, 2009) qui peuvent remettre en question sa spécificité pour les kinines. Alors que le rôle régulateur de la CPM dans le catabolisme des kinines et l'activité du RB₁ a été assez bien documenté (Erdos *et al.*, 1962; Zhang *et al.*, 2013; Couture *et al.*, 2014; Regoli *et al.*, 2015), le rôle de la CPM dans la fonction des autres peptides est moins connu et particulièrement dans le diabète. L'impact du blocage de la CPM est en accord avec les effets bénéfiques du SSR240612 et du 1400W sur les paramètres métaboliques et inflammatoires (Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 b; Haddad *et al.*, 2016). De plus, le Mergetpa n'a pas ou peu d'effet significatif chez les rats témoins, ce qui est cohérent avec la quasi absence du RB₁ chez les rats normaux ou témoins (Couture *et al.*, 2014). Par conséquent, les résultats suggèrent la spécificité de l'action de cet inhibiteur sur la CPM et sur les kinines comme substrats principaux.

J'ai participé à une autre étude dans **un modèle de DT2 lié à l'obésité**, un modèle de souris C57BL/6J nourries avec une diète riche en gras (HFD) et connu pour développer des anomalies métaboliques incluant le surpoids, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et les troubles de la sécrétion des adipokines. Dans cette étude, les souris ont été soumises à une diète HFD pendant 20 semaines, incluant un traitement sous-cutané de 4 semaines avec l'antagoniste du RB₁ (SSR240612, 10 mg.kg⁻¹ par jour) et le pioglitazone (10 mg.kg⁻¹ par jour) administrés en monothérapie ou en thérapie combinée (El Akoum *et al.*, 2017). Le pioglitazone est une molécule antidiabétique qui

stimule le PPAR γ impliqué dans l'adipogenèse et la différenciation adipocytaire (Lowell, 1999). Elle est cependant connue pour augmenter le poids corporel (Hung *et al.*, 2008).

Dans cette étude, les souris diabétiques ont montré un niveau accru d'ARNm du marqueur moléculaire des macrophages, le F4 / 80. Cette infiltration accrue a été corrélée avec la surexpression par le tissu adipeux de CCL2, un facteur déclenchant la capture des monocytes et conduisant à la formation de macrophages dans le tissu adipeux (Gogebakan *et al.*, 2015). Les traitements avec le SSR et le pioglitazone seuls ou combinés ont amélioré l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, la résistance à l'insuline et l'inflammation du tissu adipeux (expression de F4/80, CCL2, TNF et RB₁). Contrairement au pioglitazone, le SSR a été capable de réduire significativement le gain de poids, la masse du tissu adipeux rétropéritonéal et l'hypertrophie des adipocytes. Les résultats de cette étude confortent notre hypothèse selon laquelle l'inflammation du tissu adipeux constitue un facteur important dans le développement du diabète, et suggèrent que l'augmentation de l'expression du RB₁ contribue à l'inflammation du tissu adipeux et à l'infiltration des cellules immunes. Le niveau élevé du RB₁, chez les souris diabétiques, soutient que l'obésité est une condition inflammatoire menant au DT2 et que son antagonisme pourrait représenter un outil thérapeutique prometteur en association avec les agonistes PPAR γ pour le traitement du DT2, de l'obésité et de la résistance à l'insuline.

L'interaction entre le RB1 et la NADPH oxydase a été abordée dans la dernière partie de cette thèse (article 3). Dans cette étude on a démontré que le RB₁, récepteur couplé à G α_q , stimule la PKC β 1/2 pour augmenter la production de l'O₂^{•-} à travers la NADPH oxydase dans l'aorte thoracique des rats STZ-diabétiques. L'inhibition de la PKC totale, de la PKC β 1/2 et de la NADPH oxydase en présence de son substrat le NADPH, a empêché la production de l'anion superoxyde induite par l'agoniste du RB₁ (Sar [D-Phe⁸] -des-Arg⁹ -BK) dans l'aorte isolée du rat STZ. En revanche, l'agoniste RB₁ était inefficace dans l'aorte isolée du rat témoin, ce qui est cohérent avec les faibles niveaux d'expression basale du RB₁ et NOX1/2 (isoformes de la NADPH oxydase) détectés par immunofluorescence dans l'aorte contrôle non diabétique. Fait important, cette étude a fourni la première preuve que le RB₁ et la NADPH oxydase sont colocalisés sur les CMLV, les macrophages infiltrants et les cellules endothéliales dans les vaisseaux sanguins diabétiques STZ, contribuant ainsi à l'augmentation du stress oxydatif

vasculaire. La surexpression du RB₁ dans les vaisseaux STZ est probablement une conséquence du niveau basal plus élevé de l'O₂^{•-} tel que documenté dans la rétine des rats STZ (Abdouh *et al.*, 2008).

La distribution cellulaire du RB₁ sur les CMLV, les cellules endothéliales (principalement sur les vaisseaux de résistance vs aorte) et les macrophages est en accord avec son rôle principal dans le contrôle vasomoteur (contractilité / relaxation), la perméabilité vasculaire et l'inflammation cellulaire. La présente étude a démontré une augmentation substantielle de l'expression de NOX1 et NOX2 associée à une augmentation de l'activité de la NADPH oxydase dans les aortes des rats STZ en accord avec une étude précédente (Wendt *et al.*, 2005). Des études antérieures ont montré une surexpression protéique et génomique du RB₁ dans les vaisseaux et les organes périphériques des rats STZ (Pouliot *et al.*, 2011; Tidjane *et al.*, 2015; Tidjane *et al.*, 2016) et des rats insulino-résistants et de diabète de type 2 (Ismael *et al.*, 2008; Dias *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2012 b; Midaoui *et al.*, 2015; Haddad *et al.*, 2016). L'expression du RB₁ sur les macrophages dans l'aorte STZ, l'artère poplitée et au voisinage des glomérules rénaux rappelle l'augmentation de l'expression du RB₁ documentée sur les macrophages et les cellules immunitaires infiltrant le pancréas du rat STZ-diabétique (Tidjane *et al.*, 2016). Ceci est également cohérent avec la littérature rapportant la présence du RB₁ sur les macrophages et les lymphocytes T (Bockmann *et al.*, 2000; Couture *et al.*, 2001) ainsi qu'avec l'augmentation de l'expression du RB₁ sur les cellules endothéliales, les macrophages spumeux, les cellules inflammatoires et les fibroblastes des patients athéromateux (Raidoo *et al.*, 1997) et sur les cellules endothéliales des vaisseaux cérébraux humain exposés à l'INF- γ (Prat *et al.*, 2000).

L'assemblage des sous-unités cytosoliques et membranaires de la NADPH oxydase est un mécanisme qui nécessite l'intervention de la protéine Rac-GTP suite à sa phosphorylation par la PKC, formant ainsi le complexe enzymatique actif NOX1/2 qui transporte les électrons de la NADPH cytoplasmique vers l'oxygène extracellulaire pour générer O₂^{•-} (Bedard *et al.*, 2007). Il a été démontré que l'augmentation de l'effet apoptotique de l'O₂^{•-} dans les cellules endothéliales microvasculaires de la barrière hémato-encéphalique chez les patients diabétiques est due à l'augmentation de l'activité des PKC β et PKC β 1 lesquelles agissent en amont pour activer la NADPH oxydase (Bedard *et al.*, 2007). Ceci est en accord avec nos résultats montrant que l'inhibition de la PKC totale et de la

PKC β 1/2 abolit la production de l'O $_2^{\bullet-}$ tributaire de l'activation de la NADPH oxydase par l'agoniste du RB $_1$ dans l'aorte du rat STZ-diabétique.

Chapitre 6

Conclusions et perspectives

Le blocage pharmacologique de la iNOS et de la kininase 1 pendant une semaine a produit des effets bénéfiques similaires à ceux de l'antagoniste du RB₁ (SSR240612) dans la résistance à l'insuline et l'inflammation périphérique secondaire à un apport riche en glucose. Ces résultats ont une pertinence clinique dans le traitement du diabète de type 2 et de ses complications. L'inhibition de la formation de peroxy-nitrite par le 1400W, inhibiteur sélectif de la iNOS, semble être un mécanisme cible possible pour empêcher la surexpression et l'activation du RB₁ par ses ligands endogènes sous le contrôle de la CPM. Par conséquent, l'inhibition de la CPM, tel que montré avec le Mergetpa, peut fournir une nouvelle approche thérapeutique comme alternative aux antagonistes RB₁. Ceci peut avoir l'avantage d'augmenter les effets cardioprotecteurs et antidiabétiques du RB₂ en empêchant la dégradation de la BK et de la kallidine par la kininase I.

Nous avons démontré par une approche pharmacologique que l'activation du RB₁ augmente le stress oxydatif grâce à un mécanisme impliquant la stimulation de la NADPH oxydase via la PKC β 1/2 dans l'aorte du rat STZ. Ces résultats sont confirmés par les études immunohistochimiques montrant que le RB₁ est colocalisé avec la NADPH oxydase (NOX1 et NOX2) dans les CMLV et les macrophages infiltrant dans l'aorte STZ-diabétique. Alors que le RB₁ est fortement exprimé sur les cellules endothéliales dans les petites artères de résistance, sa présence est plutôt faible sur l'endothélium dans l'aorte qui représente une artère de conductance. Ces observations confirment le rôle clé du RB₁ dans le stress oxydatif et l'inflammation vasculaire et suggèrent que ce récepteur atypique puisse être une cible thérapeutique importante dans le traitement des maladies micro- et macro-vasculaires liées au diabète, incluant la rétinopathie, la néphropathie et l'angiopathie périphérique et cardiaque.

D'autres études seront nécessaires pour mieux comprendre le rôle du RB₁ dans les mécanismes associés à l'obésité et au diabète de type 2 chez la souris soumise à une diète riche en gras. L'inhibition du RB₁ corrige les processus inflammatoires qui peuvent potentialiser l'action des médicaments utilisés dans le traitement du diabète. Ainsi des études montrant l'effet synergétique des antidiabétiques et des antagonistes du RB₁ pourraient ouvrir de nouvelles avenues thérapeutiques tel que suggéré dans l'une de nos études récentes (El Akoum *et al.*, 2017). Des études pharmacologiques réalisées sur des

modèles de souris et de rats transgéniques possédant un RB₁ humanisé pourraient aider au développement de meilleurs antagonistes à usage clinique. Ceci pourrait également aider à mieux comprendre les paradoxes rencontrés entre les études cliniques et précliniques (voir article de Qadri *et al.*, 2018 et Figure 31). Certaines approches visant à interférer avec la régulation à la hausse du RB₁ au niveau transcriptionnel et/ou post-transcriptionnel sont aussi des avenues de recherche prometteuses.

Des recherches additionnelles seront nécessaires pour définir le rôle possible de la iNOS et de la CPM dans les mécanismes centraux de régulation de la pression artérielle par le RB₁. La capacité du 1400W et du Mergetpa à traverser la barrière hémato-encéphalique pour bloquer la iNOS et la CPM ainsi que leur impact sur l'expression du RB₁ dans le SNC restent à déterminer.

Des études supplémentaires seront nécessaires pour vérifier si la présence du RB₁ sur les CMLV et l'endothélium est la résultante de l'infiltration des macrophages.

Permissions de publier les articles dans la thèse

Article 1 dans British journal of pharmacology
Wiley Global Permissions <permissions@wiley.com>

Dear Youssef Haddad,

Thank you for your email.

Permission is granted for you to use the material requested for your thesis/dissertation subject to the usual acknowledgements (author, title of material, title of book/journal, ourselves as publisher) and on the understanding that you will reapply for permission if you wish to distribute or publish your thesis/dissertation commercially.

You should also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Material. Permission is granted solely for use in conjunction with the thesis, and the material may not be posted online separately.

Any third party material is expressly excluded from this permission. If any material appears within the article with credit to another source, authorization from that source must be obtained.

Best wishes,

Kelly Hoff
Permissions Coordinator
Copyright & Permissions

Article 2 et 3 dans Frontiers

Frontiers in Pharmacology

Frontiers in Pharmacology, pharmacology@frontiersin.org

Dear Dr Youssef Haddad,

I would like to confirm that under the Frontiers Terms and Conditions, authors retain the copyright to their work. All Frontiers articles are Open Access and distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY 4.0), which permits the re-use, distribution and reproduction of material from published articles, provided the original authors and source are credited. This is noted in the Copyright statement at the end of your **two** articles: **Copyright**© 2017 Haddad and Couture.

This is an open-access article distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution License (CC BY)**. The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Please keep in mind that if anything in the paper, such as a figure, was already under copyright restriction from any other third-party, and then you would have to seek permission to reuse the item.

Kind regards,

Riina Lampela

Journal Development Specialist

Frontiers | Editorial Office - Journal Development Team

Journal Development Manager: Brian Boyle

Journal Development Specialist: Riina Lampela

Research Topic Specialist: Claudia Turner

Frontiers

www.frontiersin.org

EPFL Innovation Square, Building I

Lausanne, Switzerland

Office T +41 21 510 17 34

For technical issues, please contact our IT Helpdesk support@frontiersin.org.

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Abdouh, M., Talbot, S., Couture, R., & Hassessian, H. M. (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol*, 154(1), 136-143. doi: 10.1038/bjp.2008.48
- Abelous, J., Bardier, E. (1909). *Les substances hypotensives de l'urine humaine normale*. *C R Soc Biol*. 66, (Vol. 66).
- Adam, A., Albert, A., Calay, G., Closset, J., Damas, J., & Franchimont, P. (1985). Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem*, 31(3), 423-426.
- Aghadavod, E., Khodadadi, S., Baradaran, A., Nasri, P., Bahmani, M., & Rafieian-Kopaei, M. (2016). Role of Oxidative Stress and Inflammatory Factors in Diabetic Kidney Disease. *Iran J Kidney Dis*, 10(6), 337-343.
- Agwuh, K. N., & MacGowan, A. (2006). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the tetracyclines including glycylicyclines. *J Antimicrob Chemother*, 58(2), 256-265. doi: 10.1093/jac/dkl224
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., & Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. [Review]. *Biochem J*, 357(Pt 3), 593-615.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., & Starkov, A. A. (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)*, 70(2), 200-214.
- Ansari, N. A., & Dash, D. (2013). Amadori glycated proteins: role in production of autoantibodies in diabetes mellitus and effect of inhibitors on non-enzymatic glycation. *Aging Dis*, 4(1), 50-56.
- Antosik, K., Gnys, P., Jarosz-Chobot, P., Mysliwiec, M., Szadkowska, A., Malecki, M., Mlynarski, W., & Borowiec, M. (2017). An analysis of the sequence of the BAD gene among patients with maturity-onset diabetes of the young (MODY). *J Pediatr Endocrinol Metab*, 30(1), 97-100. doi: 10.1515/jpem-2016-0239
- Antosova, M., Mokra, D., Pepucha, L., Plevkova, J., Buday, T., Sterusky, M., & Bencova, A. (2017). Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiol Res*, 66(Supplementum 2), S159-s172.
- Ashcroft, F. M., Rohm, M., Clark, A., & Brereton, M. F. (2017). Is Type 2 Diabetes a Glycogen Storage Disease of Pancreatic beta Cells? *Cell Metab*, 26(1), 17-23. doi: 10.1016/j.cmet.2017.05.014
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *Lancet*, 383(9911), 69-82. doi: 10.1016/s0140-6736(13)60591-7
- Babior, B. M., Kipnes, R. S., & Curnutte, J. T. (2014). Pillars article: Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 1973. 52: 741-744. *J Immunol*, 193(11), 5359-5362.

- Bai, L., Wang, Y., Fan, J., Chen, Y., Ji, W., Qu, A., Xu, P., James, D. E., & Xu, T. (2007). Dissecting Multiple Steps of GLUT4 Trafficking and Identifying the Sites of Insulin Action. *Cell Metabolism*, 5, 47-57. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2006.11.013>
- Bandeira, M., da Fonseca, L. J., da, S. G. G., Rabelo, L. A., Goulart, M. O., & Vasconcelos, S. M. (2013). Oxidative stress as an underlying contributor in the development of chronic complications in diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*, 14(2), 3265-3284. doi: 10.3390/ijms14023265
- Banfi, B., Malgrange, B., Knisz, J., Steger, K., Dubois-Dauphin, M., & Krause, K. H. (2004). NOX3, a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear. *J Biol Chem*, 279(44), 46065-46072. doi: 10.1074/jbc.M403046200
- Barathi, S., Angayarkanni, N., & Sumantran, V. N. (2010). GLUT-1 Expression in Bovine Retinal Capillary Endothelial Cells and Pericytes Exposed to Advanced Glycation End Products. [journal]. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 51, 6810-6814. doi: 10.1167/iovs.10-5312
- Bardell, A. L., & MacLeod, K. M. (2001). Evidence for inducible nitric-oxide synthase expression and activity in vascular smooth muscle of streptozotocin-diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(2), 252-259.
- Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr*, 31(4), 347-366.
- Battelli, M. G., Polito, L., Bortolotti, M., & Bolognesi, A. (2016). Xanthine Oxidoreductase-Derived Reactive Species: Physiological and Pathological Effects. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3527579. doi: 10.1155/2016/3527579
- Bayir, H., & Kagan, V. E. (2008). Bench-to-bedside review: Mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis--there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care*, 12(1), 206. doi: 10.1186/cc6779
- Bedard, K., & Krause, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 87(1), 245-313. doi: 10.1152/physrev.00044.2005
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, 44(1), 1-80.
- Bishay, R. H., & Greenfield, J. R. (2016). A review of maturity onset diabetes of the young (MODY) and challenges in the management of glucokinase-MODY. *Med J Aust*, 205(10), 480-485.
- Blaukat, A. (2003). Structure and signalling pathways of kinin receptors. *Andrologia*, 35(1), 17-23.
- Bockmann, S., & Paegelow, I. (2000). Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol*, 68(5), 587-592.

- Brigelius-Flohe, R., & Flohe, L. (2003). Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation? *Biofactors*, *17*(1-4), 93-102.
- Brigelius-Flohe, R., & Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, *1830*(5), 3289-3303. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.11.020
- Brovkovych, V., Zhang, Y., Brovkovych, S., Minshall, R. D., & Skidgel, R. A. (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *15*(2), 258-269. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00992.x
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, *414*(6865), 813-820. doi: 10.1038/414813a
- Camenzind, R. S., Chip, S., Gutmann, H., Kapfhammer, J. P., Nitsch, C., & Bendfeldt, K. (2010). Preservation of transendothelial glucose transporter 1 and P-glycoprotein transporters in a cortical slice culture model of the blood-brain barrier. *Neuroscience*, *170*(1), 361-371. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.06.073
- Cantu-Medellin, N., & Kelley, E. E. (2013). Xanthine oxidoreductase-catalyzed reactive species generation: A process in critical need of reevaluation. *Redox Biology*, *1*(1), 353-358. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.05.002>
- Cardozo, A. K., Proost, P., Gysemans, C., Chen, M. C., Mathieu, C., & Eizirik, D. L. (2003). IL-1beta and IFN-gamma induce the expression of diverse chemokines and IL-15 in human and rat pancreatic islet cells, and in islets from pre-diabetic NOD mice. *Diabetologia*, *46*(2), 255-266. doi: 10.1007/s00125-002-1017-0
- Carretero, O. A., & Scicli, A. G. (1991). Local hormonal factors (intracrine, autocrine, and paracrine) in hypertension. *Hypertension*, *18*(3 Suppl), 158-69.
- Carvalho, D. P., & Dupuy, C. (2013). Role of the NADPH Oxidases DUOX and NOX4 in Thyroid Oxidative Stress. *Eur Thyroid J*, *2*(3), 160-167. doi: 10.1159/000354745
- Cayatte, A. J., Rupin, A., Oliver-Krasinski, J., Maitland, K., Sansilvestri-Morel, P., Boussard, M. F., Wierzbicki, M., Verbeuren, T. J., & Cohen, R. A. (2001). S17834, a new inhibitor of cell adhesion and atherosclerosis that targets nadph oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *21*(10), 1577-1584.
- Cellier, E., Mage, M., Duchene, J., Pecher, C., Couture, R., Bascands, J. L., & Girolami, J. P. (2003). Bradykinin reduces growth factor-induced glomerular ERK1/2 phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol*, *284*(2), F282-292. doi: 10.1152/ajprenal.00115.2002
- Charbonneau, A., & Marette, A. (2010). Inducible nitric oxide synthase induction underlies lipid-induced hepatic insulin resistance in mice: potential role of tyrosine nitration of insulin signaling proteins. *Diabetes*, *59*(4), 861-871. doi: 10.2337/db09-1238
- Charest-Morin, X., Roy, C., Fortin, E. J., Bouthillier, J., & Marceau, F. (2014). Pharmacological evidence of bradykinin regeneration from extended sequences that behave as peptidase-activated B2 receptor agonists. *Front Pharmacol*, *5*, 32. doi: 10.3389/fphar.2014.00032

- Chen, F., Yu, Y., Haigh, S., Johnson, J., Lucas, R., Stepp, D. W., & Fulton, D. J. (2014). Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One*, *9*(2), e88405. doi: 10.1371/journal.pone.0088405
- Chen, H., Charlat, O., Tartaglia, L. A., Woolf, E. A., Weng, X., Ellis, S. J., Lakey, N. D., Culpepper, J., Moore, K. J., Breitbart, R. E., Duyk, G. M., Tepper, R. I., & Morgenstern, J. P. (1996). Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell*, *84*(3), 491-495.
- Chen, K., Kirber, M. T., Xiao, H., Yang, Y., & Keaney, J. F., Jr. (2008). Regulation of ROS signal transduction by NADPH oxidase 4 localization. *J Cell Biol*, *181*(7), 1129-1139. doi: 10.1083/jcb.200709049
- Chen, X., Orfanos, S. E., Ryan, J. W., Chung, A. Y., Hess, D. C., & Catravas, J. D. (1991). Species variation in pulmonary endothelial aminopeptidase P activity. *J Pharmacol Exp Ther*, *259*(3), 1301-1307.
- Cifuentes, M. E., & Pagano, P. J. (2006). Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, *15*(2), 179-186. doi: 10.1097/01.mnh.0000214776.19233.68
- Clemus, R. E., Sorescu, D., Dikalova, A. E., Pounkova, L., Jo, P., Sorescu, G. P., Schmidt, H. H., Lassegue, B., & Griendling, K. K. (2007). Nox4 is required for maintenance of the differentiated vascular smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *27*(1), 42-48. doi: 10.1161/01.atv.0000251500.94478.18
- Comera, C., Andre, K., Laffitte, J., Collet, X., Galtier, P., & Maridonneau-Parini, I. (2007). Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. *Microbes Infect*, *9*(1), 47-54. doi: 10.1016/j.micinf.2006.10.009
- Conrad, M., & Friedmann Angeli, J. P. (2015). Glutathione peroxidase 4 (Gpx4) and ferroptosis: what's so special about it? *Mol Cell Oncol*, *2*(3), e995047. doi: 10.4161/23723556.2014.995047
- Coustan, D. R., Lowe, L. P., Metzger, B. E., & Dyer, A. R. (2010). The Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study: paving the way for new diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol*, *202*(6), 654.e651-656. doi: 10.1016/j.ajog.2010.04.006
- Couture, R., Blaes, N., & Girolami, J. P. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol*, *12*(2), 223-248.
- Couture, R., & Girolami, J. P. (2004). Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*, *500*(1-3), 467-485. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.045
- Couture, R., Harrisson, M., Vianna, R. M., & Cloutier, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, *429*(1-3), 161-176.

- da Costa, P. L., Sirois, P., Tannock, I. F., & Chammas, R. (2014). The role of kinin receptors in cancer and therapeutic opportunities. *Cancer Lett*, 345(1), 27-38. doi: 10.1016/j.canlet.2013.12.009
- Dahan, I., Issaeva, I., Gorzalczany, Y., Sigal, N., Hirshberg, M., & Pick, E. (2002). Mapping of functional domains in the p22(phox) subunit of flavocytochrome b(559) participating in the assembly of the NADPH oxidase complex by "peptide walking". *J Biol Chem*, 277(10), 8421-8432. doi: 10.1074/jbc.M109778200
- Dan Dunn, J., Alvarez, L. A., Zhang, X., & Soldati, T. (2015). Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*, 6, 472-485. doi: 10.1016/j.redox.2015.09.005
- Dang, P. M., Morel, F., Gougerot-Pocidallo, M. A., & El Benna, J. (2003). Phosphorylation of the NADPH oxidase component p67(PHOX) by ERK2 and P38MAPK: selectivity of phosphorylated sites and existence of an intramolecular regulatory domain in the tetratricopeptide-rich region. *Biochemistry*, 42(15), 4520-4526. doi: 10.1021/bi0205754
- De Brito Gariépy, H., Carayon, P., Ferrari, B., & Couture, R. (2010). Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides*, 44(2), 191-198. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.011
- De Meyts, P. (2000). The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. In L. J. De Groot, G. Chrousos, K. Dungan, K. R. Feingold, A. Grossman, J. M. Hershman, C. Koch, M. Korbonits, R. McLachlan, M. New, J. Purnell, R. Rebar, F. Singer & A. Vinik (Eds.), *Endotext*. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.
- Decarie, A., Raymond, P., Gervais, N., Couture, R., & Adam, A. (1996). Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol*, 271(4 Pt 2), H1340-1347.
- Deiteren, K., Hendriks, D., Scharpe, S., & Lambeir, A. M. (2009). Carboxypeptidase M: Multiple alliances and unknown partners. *Clin Chim Acta*, 399(1-2), 24-39. doi: 10.1016/j.cca.2008.10.003
- Delmastro, M. M., & Piganelli, J. D. (2011). Oxidative stress and redox modulation potential in type 1 diabetes. *Clin Dev Immunol*, 2011, 593863. doi: 10.1155/2011/593863
- Derbyshire, E. R., & Marletta, M. A. (2009). Biochemistry of soluble guanylate cyclase. *Handb Exp Pharmacol*(191), 17-31. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_2
- Dhodi, J. B., Mestry, S. N., & Juvekar, A. R. (2014). DIABETIC NEPHROPATHY – GENESIS, PREVENTION AND TREATMENT. [Diabetes Mellitus, Diabetic Nephropathy, End Stage Renal Disease, Advanced Glycation End Products, Protein Kinase C.]. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 6.

- Dias-Peixoto, M. F., Ferreira, A. J., Almeida, P. W., Braga, V. B., Coutinho, D. C., Melo, D. S., Gomes Filho, A., Melo, M. B., Greco, L., Campagnole-Santos, M. J., Lima, R. F., Santos, R. A., & Guatimosim, S. (2012). The cardiac expression of Mas receptor is responsive to different physiological and pathological stimuli. *Peptides*, *35*(2), 196-201. doi: 10.1016/j.peptides.2012.03.022
- Dias, J. P., & Couture, R. (2012 a). Blockade of kinin B1 receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *14*, 244-253. doi: 10.1111/j.1463-1326.2011.01521.x
- Dias, J. P., & Couture, R. (2012 b). Suppression of Vascular Inflammation by Kinin B1 Receptor Antagonism in a Rat Model of Insulin Resistance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *60*, 61-69. doi: 10.1097/FJC.0b013e3182576277.
- Dias, J. P., Ismael, M. A., Pilon, M., de Champlain, J., Ferrari, B., Carayon, P., & Couture, R. (2007). The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol*, *152*(2), 280-287. doi: 10.1038/sj.bjp.0707388
- Dias, J. P., Talbot, S., Senecal, J., Carayon, P., & Couture, R. (2010). Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*, *5*(9), e12622. doi: 10.1371/journal.pone.0012622
- Diatchuk, V., Lotan, O., Koshkin, V., Wikstroem, P., & Pick, E. (1997). Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J Biol Chem*, *272*(20), 13292-13301.
- Ding, Y., Chen, Z. J., Liu, S., Che, D., Vetter, M., & Chang, C. H. (2005). Inhibition of Nox-4 activity by plumbagin, a plant-derived bioactive naphthoquinone. *J Pharm Pharmacol*, *57*(1), 111-116. doi: 10.1211/0022357055119
- Drummond, G. R., Selemidis, S., Griendling, K. K., & Sobey, C. G. (2011). Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, *10*(6), 453-471. doi: 10.1038/nrd3403
- Drummond, G. R., & Sobey, C. G. (2014). Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab*, *25*(9), 452-463. doi: 10.1016/j.tem.2014.06.012
- Duez, H., Pavlic, M., & Lewis, G. F. (2008). Mechanism of intestinal lipoprotein overproduction in insulin resistant humans. *Atherosclerosis Supplements*, *9*(2), 33-38. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosissup.2008.05.013>
- Eisenbarth, G. S. (2007). Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, *92*(7), 2403-2407. doi: 10.1210/jc.2007-0339
- El Akoum, S., Haddad, Y., & Couture, R. (2017). Impact of pioglitazone and bradykinin type 1 receptor antagonist on type 2 diabetes in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Obes Sci Pract*, *3*(3), 352-362. doi: 10.1002/osp4.117

- El Midaoui, A., & de Champlain, J. (2002). Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension*, *39*(2), 303-307.
- El Midaoui, A., & de Champlain, J. (2005). Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens*, *23*(3), 581-588.
- Erdoş, E. G., & Sloane, E. M. (1962). An enzyme in human blood plasma that inactivates bradykinin and kallidins. *Biochem Pharmacol*, *11*, 585-592.
- Farhad, A. R., Razavi, S. M., Rozati, A. R., Shekarchizade, N., & Manshaei, M. (2017). Selective nitric oxide synthase inhibitor promotes bone healing. *Dent Res J (Isfahan)*, *14*(5), 306-313.
- Fernandes, D. C., Manoel, A. H., Wosniak, J., Jr., & Laurindo, F. R. (2009). Protein disulfide isomerase overexpression in vascular smooth muscle cells induces spontaneous preemptive NADPH oxidase activation and Nox1 mRNA expression: effects of nitrosothiol exposure. *Arch Biochem Biophys*, *484*(2), 197-204.
- Förstermann, U., & Sessa, W. C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *European Heart Journal*, *33*, 829-837. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304
- Fox, A., Kaur, S., Li, B., Panesar, M., Saha, U., Davis, C., Dragoni, I., Colley, S., Ritchie, T., Bevan, S., Burgess, G., & McIntyre, P. (2005). Antihyperalgesic activity of a novel nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonist in transgenic mice expressing the human B1 receptor. *Br J Pharmacol*, *144*(7), 889-899. doi: 10.1038/sj.bjp.0706139
- Fukai, T., & Ushio-Fukai, M. (2011). Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxid Redox Signal*, *15*(6), 1583-1606. doi: 10.1089/ars.2011.3999
- Gabra, B. H., Couture, R., & Sirois, P. (2003). [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)*, *19*(11), 1101-1110. doi: 10.1051/medsci/200319111101
- Gao, L., & Mann, G. E. (2009). Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res*, *82*(1), 9-20. doi: 10.1093/cvr/cvp031
- Garvey, E. P., Oplinger, J. A., Furfine, E. S., Kiff, R. J., Laszlo, F., Whittle, B. J., & Knowles, R. G. (1997). 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, *272*(8), 4959-4963.
- Gavazzi, G., Banfi, B., Deffert, C., Fiette, L., Schappi, M., Herrmann, F., & Krause, K. H. (2006). Decreased blood pressure in NOX1-deficient mice. *FEBS Lett*, *580*(2), 497-504. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.049
- Gerber, S. H., & Sudhof, T. C. (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*, *51 Suppl 1*, S3-11.

- Gianani, R., Campbell-Thompson, M., Sarkar, S. A., Wasserfall, C., Pugliese, A., Solis, J. M., Kent, S. C., Hering, B. J., West, E., Steck, A., Bonner-Weir, S., Atkinson, M. A., Coppieters, K., von Herrath, M., & Eisenbarth, G. S. (2010). Dimorphic histopathology of long-standing childhood-onset diabetes. *Diabetologia*, *53*(4), 690-698. doi: 10.1007/s00125-009-1642-y
- Gibly, R. F., Graham, J. G., Luo, X., Lowe, W. L., Jr., Hering, B. J., & Shea, L. D. (2011). Advancing islet transplantation: from engraftment to the immune response. *Diabetologia*, *54*(10), 2494-2505. doi: 10.1007/s00125-011-2243-0
- Glantzounis, G. K., Tsimoyiannis, E. C., Kappas, A. M., & Galaris, D. A. (2005). Uric Acid and Oxidative Stress. *Current Pharmaceutical Design*, *11*(32), 4145-4151. doi: <http://dx.doi.org/10.2174/138161205774913255>
- Glorieux, C., Zamocky, M., Sandoval, J. M., Verrax, J., & Calderon, P. B. (2015). Regulation of catalase expression in healthy and cancerous cells. *Free Radic Biol Med*, *87*, 84-97. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.017
- Gobeil, F., Jr., Sirois, P., & Regoli, D. (2014). Preclinical pharmacology, metabolic stability, pharmacokinetics and toxicology of the peptidic kinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides*, *52*, 82-89. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.009
- Gochman, E., Mahajna, J., Shenzer, P., Dahan, A., Blatt, A., Elyakim, R., & Reznick, A. Z. (2012). The expression of iNOS and nitrotyrosine in colitis and colon cancer in humans. *Acta Histochem*, *114*(8), 827-835. doi: 10.1016/j.acthis.2012.02.004
- Gogebakan, O., Osterhoff, M. A., Schuler, R., Pivovarova, O., Kruse, M., Seltsmann, A. C., Mosig, A. S., Rudovich, N., Nauck, M., & Pfeiffer, A. F. (2015). GIP increases adipose tissue expression and blood levels of MCP-1 in humans and links high energy diets to inflammation: a randomised trial. *Diabetologia*, *58*(8), 1759-1768. doi: 10.1007/s00125-015-3618-4
- Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T. M., & Schultz, G. (1999). Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem*, *274*(25), 17901-17907.
- Gougat, J., Ferrari, B., Sarran, L., Planchenault, C., Poncelet, M., Maruani, J., Alonso, R., Cudennec, A., Croci, T., & Guagnini, F. (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-dimethylpiperidiny]methyl]pheny l)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, *309*, 661 - 669.
- Goyal, M. M., & Basak, A. (2010). Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell*, *1*(10), 888-897. doi: 10.1007/s13238-010-0113-z
- Gunnnett, C. A., Heistad, D. D., & Faraci, F. M. (2003). Gene-targeted mice reveal a critical role for inducible nitric oxide synthase in vascular dysfunction during diabetes. *Stroke*, *34*(12), 2970-2974. doi: 10.1161/01.str.0000099123.55171.3f

- Haddad, Y., & Couture, R. (2016). Interplay between the kinin B1 receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. *Br J Pharmacol*, *173*(12), 1988-2000. doi: 10.1111/bph.13491
- Haddad, Y., & Couture, R. (2017a). Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B1 Receptor in Insulin Resistance. [Original Research]. *Frontiers in Pharmacology*, *8*(509). doi: 10.3389/fphar.2017.00509
- Haddad, Y., & Couture, R. (2017b). Localization and Interaction between Kinin B1 Receptor and NADPH Oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats. *Frontiers in Physiology*, *8*(861). doi: 10.3389/fphys.2017.00861
- Harris, M. B., Ju, H., Venema, V. J., Liang, H., Zou, R., Michell, B. J., Chen, Z. P., Kemp, B. E., & Venema, R. C. (2001). Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem*, *276*(19), 16587-16591. doi: 10.1074/jbc.M100229200
- Harrison, D. G., Chen, W., Dikalov, S., & Li, L. (2010). Regulation of endothelial cell tetrahydrobiopterin pathophysiological and therapeutic implications. *Adv Pharmacol*, *60*, 107-132. doi: 10.1016/b978-0-12-385061-4.00005-2
- He, Z., & King, G. L. (2004). Protein Kinase C β Isoform Inhibitors: A New Treatment for Diabetic Cardiovascular Diseases. *Circulation*, *110*(1), 7-9. doi: 10.1161/01.cir.0000133428.02295.6c
- Heck, D. E., Shakarjian, M., Kim, H. D., Laskin, J. D., & Vetrano, A. M. (2010). Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci*, *1203*, 120-125. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05603.x
- Henquin, J. C. (2004). Pathways in beta-cell stimulus-secretion coupling as targets for therapeutic insulin secretagogues. *Diabetes*, *53 Suppl 3*, S48-58.
- Heuvel-Borsboom, H., de Valk, H. W., Losekoot, M., & Westerink, J. (2016). Maturity onset diabetes of the young: Seek and you will find. *Neth J Med*, *74*(5), 193-200.
- Hoffmann, L. S., Schmidt, P. M., Keim, Y., Schaefer, S., Schmidt, H. H., & Stasch, J. P. (2009). Distinct molecular requirements for activation or stabilization of soluble guanylyl cyclase upon haem oxidation-induced degradation. *Br J Pharmacol*, *157*(5), 781-795. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00263.x
- Holzerova, E., & Prokisch, H. (2015). Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol*, *63*, 16-20. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.021
- Hung, S. H., Yeh, C. H., Huang, H. T., Wu, P., Ho, M. L., Chen, C. H., Wang, C., Chao, D., & Wang, G. J. (2008). Pioglitazone and dexamethasone induce adipogenesis in D1 bone marrow stromal cell line, but not through the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway. *Life Sci*, *82*(11-12), 561-569. doi: 10.1016/j.lfs.2007.11.033

- Irgens, H. U., Molnes, J., Johansson, B. B., Ringdal, M., Skrivarhaug, T., Undlien, D. E., Sovik, O., Joner, G., Molven, A., & Njolstad, P. R. (2013). Prevalence of monogenic diabetes in the population-based Norwegian Childhood Diabetes Registry. *Diabetologia*, *56*(7), 1512-1519. doi: 10.1007/s00125-013-2916-y
- Irimia, J. M., Meyer, C. M., Segvich, D. M., Surendran, S., DePaoli-Roach, A. A., Morral, N., & Roach, P. J. (2017). Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and steatosis in mice. *J Biol Chem*, *292*(25), 10455-10464. doi: 10.1074/jbc.M117.786525
- Ishida, H., Scicli, A. G., & Carretero, O. A. (1989). Role of angiotensin converting enzyme and other peptidases in in vivo metabolism of kinins. *Hypertension*, *14*(3), 322-327.
- Ismael, M. A., Talbot, S., Carbonneau, C. L., Beausejour, C. M., & Couture, R. (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol*, *589*(1-3), 66-72. doi: 10.1016/j.ejphar.2008.05.006
- Johansen, J., Harris, A., Rychly, D., & A, E. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, *4*:5. doi: 10.1186/1475-2840-4-5
- Kaneki, M., Shimizu, N., Yamada, D., & Chang, K. (2007). Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. *Antioxid Redox Signal*, *9*(3), 319-329. doi: 10.1089/ars.2006.1464
- Kanno, T., Utsumi, T., Takehara, Y., Ide, A., Akiyama, J., Yoshioka, T., Horton, A. A., & Utsumi, K. (1996). Inhibition of neutrophil-superoxide generation by alpha-tocopherol and coenzyme Q. *Free Radic Res*, *24*(4), 281-289.
- Kashuba, E., Bailey, J., Allsup, D., & Cawkwell, L. (2013). The kinin-kallikrein system: physiological roles, pathophysiology and its relationship to cancer biomarkers. *Biomarkers*, *18*(4), 279-296. doi: 10.3109/1354750X.2013.787544
- Katsarou, A., Gudbjornsdottir, S., Rawshani, A., Dabelea, D., Bonifacio, E., Anderson, B. J., Jacobsen, L. M., Schatz, D. A., & Lernmark, A. (2017). Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*, *3*, 17016. doi: 10.1038/nrdp.2017.16
- Kawanabe, Y., & Nauli, S. M. (2011). Endothelin. *Cell Mol Life Sci*, *68*(2), 195-203. doi: 10.1007/s00018-010-0518-0
- Kelly, J., Vanhatalo, A., Bailey, S. J., Wylie, L. J., Tucker, C., List, S., Winyard, P. G., & Jones, A. M. (2014). Dietary nitrate supplementation: effects on plasma nitrite and pulmonary O₂ uptake dynamics during exercise in hypoxia and normoxia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *307*(7), R920-930. doi: 10.1152/ajpregu.00068.2014
- Kirk, J. A., Holewinski, R. J., Crowgey, E. L., & Van Eyk, J. E. (2016). Protein kinase G signaling in cardiac pathophysiology: Impact of proteomics on clinical trials. *Proteomics*, *16*(5), 894-905. doi: 10.1002/pmic.201500401
- Kleniewska, P., Piechota, A., Skibska, B., & Goraca, A. (2012). The NADPH oxidase family and its inhibitors. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, *60*(4), 277-294. doi: 10.1007/s00005-012-0176-z

- Konior, A., Schramm, A., Czesnikiewicz-Guzik, M., & Guzik, T. J. (2014). NADPH oxidases in vascular pathology. *Antioxid Redox Signal*, 20(17), 2794-2814. doi: 10.1089/ars.2013.5607
- Koopman, W. J., Nijtmans, L. G., Dieteren, C. E., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J. A., & Willems, P. H. (2010). Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid Redox Signal*, 12(12), 1431-1470. doi: 10.1089/ars.2009.2743
- Kots, A. Y., Martin, E., Sharina, I. G., & Murad, F. (2009). A short history of cGMP, guanylyl cyclases, and cGMP-dependent protein kinases. *Handb Exp Pharmacol*(191), 1-14. doi: 10.1007/978-3-540-68964-5_1
- Kraut, H., Frey, E.K., Werle, E. (1930). Der nachweis eines krislauf hormones in der pankreasdruse. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 189, 97-106 (1930), 189, 97-106.
- Kuduk, S. D., & Bock, M. G. (2008). Bradykinin B1 receptor antagonists as novel analgesics: a retrospective of selected medicinal chemistry developments. *Curr Top Med Chem*, 8(16), 1420-1430.
- Kuhr, F., Lowry, J., Zhang, Y., Brovkovich, V., & Skidgel, R. A. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, 44(2), 145-154. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004
- Lassegue, B., & Griendling, K. K. (2004). Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens*, 17(9), 852-860. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.02.004
- Lassegue, B., Sorescu, D., Szocs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S. L., Lambeth, J. D., & Griendling, K. K. (2001). Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, 88(9), 888-894.
- Laszlo, F., & Whittle, B. J. (1997). Actions of isoform-selective and non-selective nitric oxide synthase inhibitors on endotoxin-induced vascular leakage in rat colon. *Eur J Pharmacol*, 334(1), 99-102.
- Lavin, D. P., White, M. F., & Brazil, D. P. (2016). IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*, 59(11), 2280-2291. doi: 10.1007/s00125-016-4072-7
- Leeb-Lundberg, Marceau, F., Muller-Esterl, W., Pettibone, D., & Zuraw, B. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 57, 27 - 77.
- Leineweber, K., Moosmang, S., & Paulson, D. (2017). Genetics of NO Deficiency. *Am J Cardiol*, 120(8s), S80-s88. doi: 10.1016/j.amjcard.2017.06.013
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216-226. doi: 10.1007/s00125-007-0886-7
- Liebmann, C. (2001). Bradykinin signalling to MAP kinase: cell-specific connections versus principle mitogenic pathways. *Biol Chem*, 382(1), 49-55. doi: 10.1515/bc.2001.008

- Lin, Y. J., Kwok, C. F., Juan, C. C., Hsu, Y. P., Shih, K. C., Chen, C. C., & Ho, L. T. (2014). Angiotensin II enhances endothelin-1-induced vasoconstriction through upregulating endothelin type A receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, *451*(2), 263-269. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.119
- Lind, M., Hayes, A., Caprnda, M., Petrovic, D., Rodrigo, L., Kruzliak, P., & Zulli, A. (2017). Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? *Biomed Pharmacother*, *93*, 370-375. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.036
- Liou, K. T., Shen, Y. C., Chen, C. F., Tsao, C. M., & Tsai, S. K. (2003). Honokiol protects rat brain from focal cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting neutrophil infiltration and reactive oxygen species production. *Brain Res*, *992*(2), 159-166.
- Lorenz, R., Bertinetti, D., & Herberg, F. W. (2017). cAMP-Dependent Protein Kinase and cGMP-Dependent Protein Kinase as Cyclic Nucleotide Effectors. *Handb Exp Pharmacol*, *238*, 105-122. doi: 10.1007/164_2015_36
- Lowe, L. P., Metzger, B. E., Dyer, A. R., Lowe, J., McCance, D. R., Lappin, T. R., Trimble, E. R., Coustan, D. R., Hadden, D. R., Hod, M., Oats, J. J., & Persson, B. (2012). Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study: associations of maternal A1C and glucose with pregnancy outcomes. *Diabetes Care*, *35*(3), 574-580. doi: 10.2337/dc11-1687
- Lowell, B. B. (1999). PPARgamma: an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell*, *99*(3), 239-242.
- Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., & Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, *52*(3), 375-414.
- Lungu, C., Dias, J. P., Franca, C. E., Ongali, B., Regoli, D., Moldovan, F., & Couture, R. (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides*, *41*(6), 375-387. doi: 10.1016/j.npep.2007.09.005
- Marceau, F., & Bachvarov, D. (1998). Kinin receptors. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, *16*(4), 385-401. doi: 10.1007/bf02737658
- Marceau, F., Hess, J., & Bachvarov, D. (1998). The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*, *50*, 357 - 386.
- Marceau, F., & Regoli, D. (2004). Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*, *3*, 845 - 852.
- Marceau, F., Sabourin, T., Houle, S., Fortin, J. P., Petitclerc, E., Molinaro, G., & Adam, A. (2002). Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol*, *2*(13-14), 1729-1739.
- Mason, R. P., Kalinowski, L., Jacob, R. F., Jacoby, A. M., & Malinski, T. (2005). Nebivolol reduces nitroxidative stress and restores nitric oxide bioavailability in endothelium of black Americans. *Circulation*, *112*(24), 3795-3801. doi: 10.1161/circulationaha.105.556233

- Mathews, C. E., Langley, S. H., & Leiter, E. H. (2002). New mouse model to study islet transplantation in insulin-dependent diabetes mellitus. *Transplantation*, 73(8), 1333-1336.
- Medeiros, R., Cabrini, D. A., Ferreira, J., Fernandes, E. S., Mori, M. A. S., Pesquero, J. B., Bader, M., Avellar, M. C. W., Campos, M. M., & Calixto, J. B. (2004). Bradykinin B1 Receptor Expression Induced by Tissue Damage in the Rat Portal Vein: A Critical Role for Mitogen-Activated Protein Kinase and **Nuclear Factor- κ B** Signaling Pathways. *Circulation Research*, 94(10), 1375-1382. doi: 10.1161/01.res.0000128404.65887.08
- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292(1), C82-97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006
- Mehta, P. K., & Griendling, K. K. (2007). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 292(1), C82-C97. doi: 10.1152/ajpcell.00287.2006
- Melloul, D., Marshak, S., & Cerasi, E. (2002). Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia*, 45(3), 309-326. doi: 10.1007/s00125-001-0728-y
- Menshikov, M., Plekhanova, O., Cai, H., Chalupsky, K., Parfyonova, Y., Bashtrikov, P., Tkachuk, V., & Berk, B. C. (2006). Urokinase plasminogen activator stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via redox-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(4), 801-807. doi: 10.1161/01.atv.0000207277.27432.15
- Messaoui, A., Tenoutasse, S., & Dorchy, H. (2016). [Maturity onset diabetes of the young: just think about it]. *Rev Med Brux*, 37(2), 95-100.
- Metzger, B. E., Gabbe, S. G., Persson, B., Buchanan, T. A., Catalano, P. A., Damm, P., Dyer, A. R., Leiva, A., Hod, M., Kitzmiller, J. L., Lowe, L. P., McIntyre, H. D., Oats, J. J., Omori, Y., & Schmidt, M. I. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*, 33(3), 676-682. doi: 10.2337/dc09-1848
- Midaoui, A. E., Talbot, S., Lahjouji, K., Dias, J. P., Fantus, I. G., & Couture, R. (2015). Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oxidative Stress and Kinin Receptor Expression in Obese Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Diabetes Metab*, 6(6), 1-7. doi: 10.4172/2155-6156.1000556
- Mingueneau, M., Chaix, A., Scotti, N., Chaix, J., Reynders, A., Hammond, C., & Thimonier, J. (2015). Hands-on experiments on glycemia regulation and type 1 diabetes. *Adv Physiol Educ*, 39(3), 232-239. doi: 10.1152/advan.00047.2015
- Mollnau, H., Wendt, M., Szocs, K., Lassegue, B., Schulz, E., Oelze, M., Li, H., Bodenschatz, M., August, M., Kleschyov, A. L., Tsilimingas, N., Walter, U., Forstermann, U., Meinertz, T., Griendling, K., & Munzel, T. (2002). Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res*, 90(4), E58-65.

- Montezano, A. C., Burger, D., Ceravolo, G. S., Yusuf, H., Montero, M., & Touyz, R. M. (2011). Novel Nox homologues in the vasculature: focusing on Nox4 and Nox5. *Clin Sci (Lond)*, *120*(4), 131-141. doi: 10.1042/cs20100384
- Montezuma, K., Biojone, C., Lisboa, S. F., Cunha, F. Q., Guimaraes, F. S., & Joca, S. R. (2012). Inhibition of iNOS induces antidepressant-like effects in mice: pharmacological and genetic evidence. *Neuropharmacology*, *62*(1), 485-491. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.09.004
- Morand-Contant, M., Anand-Srivastava, M. B., & Couture, R. (2010). Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *299*(5), H1625-H1632. doi: 10.1152/ajpheart.00735.2009
- Moreau, M., N., G., & Molinaro, G. (2005). The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci*, *99*, 6–38.
- Morinelli, T. A., Lee, M. H., Kendall, R. T., Luttrell, L. M., Walker, L. P., & Ullian, M. E. (2013). Angiotensin II activates NF-kappaB through AT1A receptor recruitment of beta-arrestin in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, *304*(12), C1176-1186. doi: 10.1152/ajpcell.00235.2012
- Nagareddy, P. R., Xia, Z., McNeill, J. H., & MacLeod, K. M. (2005). Increased expression of iNOS is associated with endothelial dysfunction and impaired pressor responsiveness in streptozotocin-induced diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *289*(5), H2144-2152. doi: 10.1152/ajpheart.00591.2005
- Nathan, C., & Ding, A. (2010). Nonresolving inflammation. *Cell*, *140*(6), 871-882. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.029
- Nauseef, W. M. (2001). Contributions of myeloperoxidase to proinflammatory events: more than an antimicrobial system. *Int J Hematol*, *74*(2), 125-133.
- Nauseef, W. M. (2008). Nox enzymes in immune cells. *Semin Immunopathol*, *30*(3), 195-208. doi: 10.1007/s00281-008-0117-4
- Nieto-Vazquez, I., Fernández-Veledo, S., Krämer, D. K., Vila-Bedmar, R., Garcia-Guerra, L., & Lorenzo, M. (2008). Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Archives Of Physiology And Biochemistry*, *114*(3), 183-194. doi:10.1080/13813450802181047
- O'Donnell, V. B., Smith, G. C., & Jones, O. T. (1994). Involvement of phenyl radicals in iodonium inhibition of flavoenzymes. *Mol Pharmacol*, *46*(4), 778-785.
- Okamoto, H. G., LH. (1983). Pharmacological properties of T-kinin (isoleucyl-seryl-bradykinin) from rat plasma. *Biochemical pharmacology 1983*, *32*, 2637-2638. doi: 10.1016/0006-2952(83)90039-4
- Panchal, S. K., & Brown, L. (2011). Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*, *351982*(10), 30.

- Parnham, M., & Sies, H. (2000). Ebselen: prospective therapy for cerebral ischaemia. *Expert Opin Investig Drugs*, 9(3), 607-619. doi: 10.1517/13543784.9.3.607
- Pathak, M., Wong, S. S., Dreveny, I., & Emsley, J. (2013). Structure of plasma and tissue kallikreins. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(9), 423-433. doi: 10.1160/th12-11-0840
- Pérez-Asensio, F. J., Hurtado, O., Burguete, M. C., Moro, M. A., Salom, J. B., Lizasoain, I., Torregrosa, G., Leza, J. C., Alborch, E., Castillo, J., Knowles, R. G., & Lorenzo, P. (2005). Inhibition of iNOS activity by 1400W decreases glutamate release and ameliorates stroke outcome after experimental ischemia. *Neurobiology of Disease*, 18(2), 375-384. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbd.2004.10.018>
- Perez, V., Velarde, V., Acuna-Castillo, C., Gomez, C., Nishimura, S., Sabaj, V., Walter, R., & Sierra, F. (2005). Increased kinin levels and decreased responsiveness to kinins during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 60(8), 984-990.
- Perreault, M., & Marette, A. (2001). Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med*, 7(10), 1138-1143. doi: 10.1038/nm1001-1138
- Pilon, G., Charbonneau, A., White, P. J., Dallaire, P., Perreault, M., Kapur, S., & Marette, A. (2010). Endotoxin mediated-iNOS induction causes insulin resistance via ONOO(-) induced tyrosine nitration of IRS-1 in skeletal muscle. *PLoS One*, 5(12), e15912. doi: 10.1371/journal.pone.0015912
- Pilon, M., Wu, R., Huot-Marchand, J. E., deBlois, D., Champlain, J., & Couture, R. (2009). Effect of chronic inhibition of nitric oxide on hypertension, insulin resistance, and cardiovascular remodeling in glucose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 53(5), 405-413. doi: 10.1097/FJC.0b013e3181a1d88a
- Pinet, F. (2004). [What is the role of endothelin system?]. *Med Sci (Paris)*, 20(3), 339-345. doi: 10.1051/medsci/2004203339
- Pizard, A., Blaukat, A., Muller-Esterl, W., Alhenc-Gelas, F., & Rajerison, R. M. (1999). Bradykinin-induced internalization of the human B2 receptor requires phosphorylation of three serine and two threonine residues at its carboxyl tail. *J Biol Chem*, 274(18), 12738-12747.
- Polidori, M. C., Praticó, D., Savino, K., Rokach, J., Stahl, W., & Mecocci, P. (2004). Increased F2 isoprostane plasma levels in patients with congestive heart failure are correlated with antioxidant status and disease severity. *Journal of Cardiac Failure*, 10(4), 334-338. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cardfail.2003.11.004>
- Porreca, F., Vanderah, T. W., Guo, W., Barth, M., Dodey, P., Peyrou, V., Luccarini, J. M., Junien, J. L., & Pruneau, D. (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. doi: 10.1124/jpet.105.098368

- Potter, L. R., Abbey-Hosch, S., & Dickey, D. M. (2006). Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, *27*(1), 47-72. doi: 10.1210/er.2005-0014
- Pouliot, M., Hetu, S., Lahjouji, K., Couture, R., & Vaucher, E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res*, *92*(6), 482-489.
- Pouliot, M., Talbot, S., Senecal, J., Dotigny, F., Vaucher, E., & Couture, R. (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. doi: 10.1371/journal.pone.0033864
- Prat, A., Biernacki, K., Pouly, S., Nalbantoglu, J., Couture, R., & Antel, J. P. (2000). Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, *59*(10), 896-906.
- Puntarulo, S., & Cederbaum, A. I. (1998). Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med*, *24*(7-8), 1324-1330.
- Qadri, F., & Bader, M. (2018). Kinin B1 receptors as a therapeutic target for inflammation. *Expert Opin Ther Targets*, *22*(1), 31-44. doi: 10.1080/14728222.2018.1409724
- Quinlan, C. L., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V., Treberg, J. R., Ackrell, B. A., & Brand, M. D. (2012). Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem*, *287*(32), 27255-27264. doi: 10.1074/jbc.M112.374629
- Raad, H., Paclet, M. H., Boussetta, T., Kroviarski, Y., Morel, F., Quinn, M. T., Gougerot-Pocidalò, M. A., Dang, P. M., & El-Benna, J. (2009). Regulation of the phagocyte NADPH oxidase activity: phosphorylation of gp91phox/NOX2 by protein kinase C enhances its diaphorase activity and binding to Rac2, p67phox, and p47phox. *FASEB J*, *23*(4), 1011-1022. doi: 10.1096/fj.08-114553
- Raidoo, D. M., Ramsaroop, R., Naidoo, S., Muller-Esterl, W., & Bhoola, K. D. (1997). Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology*, *36*(2-3), 153-160.
- Rajagopalan, S., Kurz, S., Munzel, T., Tarpey, M., Freeman, B. A., Griending, K. K., & Harrison, D. G. (1996). Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest*, *97*(8), 1916-1923. doi: 10.1172/jci118623
- Regoli, D., & Barabe, J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*, *32*(1), 1-46.
- Regoli, D., & Gobeil, F., Jr. (2015). Critical insights into the beneficial and protective actions of the kallikrein-kinin system. *Vascul Pharmacol*, *64*, 1-10. doi: 10.1016/j.vph.2014.12.003

- Rey, F. E., Cifuentes, M. E., Kiarash, A., Quinn, M. T., & Pagano, P. J. (2001). Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(-) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*, *89*(5), 408-414.
- Rigutto, S., Hoste, C., Grasberger, H., Milenkovic, M., Communi, D., Dumont, J. E., Corvilain, B., Miot, F., & De Deken, X. (2009). Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, *284*(11), 6725-6734. doi: 10.1074/jbc.M806893200
- Rocha, E. S. M., Beraldo, W. T., & Rosenfeld, G. (1949). Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am J Physiol*, *156*(2), 261-273.
- Roman-Pintos, L. M., Villegas-Rivera, G., Rodriguez-Carrizalez, A. D., Miranda-Diaz, A. G., & Cardona-Munoz, E. G. (2016). Diabetic Polyneuropathy in Type 2 Diabetes Mellitus: Inflammation, Oxidative Stress, and Mitochondrial Function. *J Diabetes Res*, *2016*, 3425617. doi: 10.1155/2016/3425617
- Rother, K. I. (2007). Diabetes treatment--bridging the divide. *N Engl J Med*, *356*(15), 1499-1501. doi: 10.1056/NEJMp078030
- Sadagurski, M., Dong, X. C., Myers, M. G., Jr., & White, M. F. (2014). Irs2 and Irs4 synergize in non-LepRb neurons to control energy balance and glucose homeostasis. *Mol Metab*, *3*(1), 55-63. doi: 10.1016/j.molmet.2013.10.004
- Sainz, I. M., Pixley, R. A., & Colman, R. W. (2007). Fifty years of research on the plasma kallikrein-kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb Haemost*, *98*(1), 77-83.
- Sakamoto, K., & Holman, G. D. (2008). Emerging role for AS160/TBC1D4 and TBC1D1 in the regulation of GLUT4 traffic. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *295*, E29-37. doi: 10.1152/ajpendo.90331.2008
- Salgado, H. C., Carretero, O. A., Scicli, A. G., & Murray, R. D. (1986). Effect of DL-2-mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropionic acid on the blood pressure response to vasoactive substances. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *237*(1), 204-208.
- San Martin, A., Foncea, R., Laurindo, F. R., Ebensperger, R., Griendling, K. K., & Leighton, F. (2007). Nox1-based NADPH oxidase-derived superoxide is required for VSMC activation by advanced glycation end-products. *Free Radic Biol Med*, *42*(11), 1671-1679. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.02.002
- Schanstra, J. P., Bataille, E., Marin Castano, M. E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J. B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J. P., & Bascands, J. L. (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. doi: 10.1172/jci1359

- Schlossmann, J., & Schinner, E. (2012). cGMP becomes a drug target. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 385(3), 243-252. doi: 10.1007/s00210-012-0730-6
- Schuelert, N., Just, S., Corradini, L., Kuelzer, R., Bernloehr, C., & Doods, H. (2015). The bradykinin B1 receptor antagonist B113823 reverses inflammatory hyperalgesia by desensitization of peripheral and spinal neurons. *Eur J Pain*, 19(1), 132-142. doi: 10.1002/ejp.573
- Schulz, E., & Munzel, T. (2008). NOX5, a new "radical" player in human atherosclerosis? *J Am Coll Cardiol*, 52(22), 1810-1812. doi: 10.1016/j.jacc.2008.08.040
- Selemidis, S., Sobey, C. G., Wingler, K., Schmidt, H. H., & Drummond, G. R. (2008). NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther*, 120(3), 254-291. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.08.005
- Shapiro, A. M., Lakey, J. R., Ryan, E. A., Korbitt, G. S., Toth, E., Warnock, G. L., Kneteman, N. M., & Rajotte, R. V. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 343(4), 230-238. doi: 10.1056/nejm200007273430401
- Shima, K., Zhu, M., & Mizuno, A. (1999). Pathoetiology and prevention of NIDDM lessons from the OLETF rat. *J Med Invest*, 46(3-4), 121-129.
- Siebenlist, U., Franzoso, G., & Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, 10, 405-455. doi: 10.1146/annurev.cb.10.110194.002201
- Sivieri, D. O., Jr., Bispo-da-Silva, L. B., Oliveira, E. B., Resende, A. C., & Salgado, M. C. (2007). Potentiation of bradykinin effect by angiotensin-converting enzyme inhibition does not correlate with angiotensin-converting enzyme activity in the rat mesenteric arteries. *Hypertension*, 50(1), 110-115. doi: 10.1161/hypertensionaha.106.085761
- Sparks, J. D., Phung, T. L., Bolognino, M., Cianci, J., Khurana, R., Peterson, R. G., Sowden, M. P., Corsetti, J. P., & Sparks, C. E. (1998). Lipoprotein alterations in 10- and 20-week-old Zucker diabetic fatty rats: hyperinsulinemic versus insulinopenic hyperglycemia. *Metabolism*, 47(11), 1315-1324.
- Sparks, M. A., Crowley, S. D., Gurley, S. B., Mirotsoy, M., & Coffman, T. M. (2014). Classical Renin-Angiotensin system in kidney physiology. *Compr Physiol*, 4(3), 1201-1228. doi: 10.1002/cphy.c130040
- Stephan, B. C. M., Harrison, S. L., Keage, H. A. D., Babateen, A., Robinson, L., & Siervo, M. (2017). Cardiovascular Disease, the Nitric Oxide Pathway and Risk of Cognitive Impairment and Dementia. *Curr Cardiol Rep*, 19(9), 87. doi: 10.1007/s11886-017-0898-y
- Stielow, C., Catar, R. A., Muller, G., Wingler, K., Scheurer, P., Schmidt, H. H., & Morawietz, H. (2006). Novel Nox inhibitor of oxLDL-induced reactive oxygen species formation in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 344(1), 200-205. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.114

- Stolk, J., Hiltermann, T. J., Dijkman, J. H., & Verhoeven, A. J. (1994). Characteristics of the inhibition of NADPH oxidase activation in neutrophils by apocynin, a methoxy-substituted catechol. *Am J Respir Cell Mol Biol*, *11*(1), 95-102. doi: 10.1165/ajrcmb.11.1.8018341
- Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *Febs j*, *275*(13), 3249-3277. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06488.x
- Swarup, S., & Zeltser, R. (2017). *Metabolic Syndrome StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. StatPearls Publishing LLC.
- Szabo, C., Ischiropoulos, H., & Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, *6*(8), 662-680. doi: 10.1038/nrd2222
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, *50*(6), 537-546.
- Takeya, R., & Sumimoto, H. (2006). Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases. *Antioxid Redox Signal*, *8*(9-10), 1523-1532. doi: 10.1089/ars.2006.8.1523
- Talbot, S., Chahmi, E., Dias, J., & Couture, R. (2010). Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation*, *7*(1), 36.
- Talbot, S., De Brito Gariépy, H., Saint-Denis, J., & R., C. (2012). Activation of kinin B1 receptor evokes hyperthermia through a vagal sensory mechanism in the rat. *J Neuroinflammation*, *9*:214 doi: doi:10.1186/1742-2094-9-214
- Talbot, S., Dias, J. P., El Midaoui, A., & Couture, R. (2016). Beneficial effects of kinin B1 receptor antagonism on plasma fatty acid alterations and obesity in Zucker diabetic fatty rats. *Can J Physiol Pharmacol*, *94*(7), 752-757. doi: 10.1139/cjpp-2016-0063
- Tang, C., Carr, B. A., Poignant, F., Ma, B., Polsky-Fisher, S. L., Kuo, Y., Strong-Basalyga, K., Norcross, A., Richards, K., Eisenhandler, R., Carlini, E. J., Di Marco, C. N., Kuduk, S. D., Yu, N. X., Raab, C. E., Rushmore, T., Frederick, C. B., Bock, M. G., & Prueksaritanont, T. (2008). CYP2C75-involved autoinduction of metabolism in rhesus monkeys of methyl 3-chloro-3'-fluoro-4'-{(1R)-1-[(1-(trifluoroacetyl)amino)cyclopropyl]carbonyl)amino]ethyl}-1,1'-biphenyl-2-carboxylate (MK-0686), a bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, *325*(3), 935-946. doi: 10.1124/jpet.107.136044
- Tang, S. C. W., J.C.K., L., & K.N., L. (2011). The Kallikrein-Kinin System. In L. K. N. H. K. T. S. C. W. H. Kong (Ed.), *Diabetes and the Kidney* (Vol. vol 170, pp. pp 145–155).
- Tekin, Z., Garfinkel, M. R., Chon, W. J., Schenck, L., Golab, K., Savari, O., Thistlethwaite, J. R., Philipson, L. H., Majewski, C., Pannain, S., Ramachandran, S., Rezanian, K., Hariprasad, S. M., Millis, J. M., & Witkowski, P. (2016). Outcomes of Pancreatic Islet Allotransplantation Using the Edmonton Protocol at the University of Chicago. *Transplant Direct*, *2*(10), e105. doi: 10.1097/txd.0000000000000609

- Thong, F. S. L., Dugani, C. B., & Klip, A. (2005). Turning Signals On and Off: GLUT4 Traffic in the Insulin-Signaling Highway. *Physiology*, 20, 271-284. doi: 10.1152/physiol.00017.2005
- Tidjane, N., Gaboury, L., & Couture, R. (2016). Cellular localisation of the kinin B1R in the pancreas of streptozotocin-treated rat and the anti-diabetic effect of the antagonist SSR240612. *Biol Chem*, 397(4), 323-336. doi: 10.1515/hsz-2015-0230
- Tidjane, N., Hachem, A., Zaid, Y., Merhi, Y., Gaboury, L., Girolami, J. P., & Couture, R. (2015). 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 Inflamm*, 13(1), 40-52. doi: 10.1177/1721727x15577736
- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2000). Signal transduction mechanisms mediating the physiological and pathophysiological actions of angiotensin II in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol Rev*, 52(4), 639-672.
- Turkmen, K. (2017). Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. *Int Urol Nephrol*, 49(5), 837-844. doi: 10.1007/s11255-016-1488-4
- Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552(Pt 2), 335-344. doi: 10.1113/jphysiol.2003.049478
- Vartak, R., Porras, C. A., & Bai, Y. (2013). Respiratory supercomplexes: structure, function and assembly. *Protein Cell*, 4(8), 582-590. doi: 10.1007/s13238-013-3032-y
- Voltan, R., Secchiero, P., Casciano, F., Milani, D., Zauli, G., & Tisato, V. (2016). Redox signaling and oxidative stress: Cross talk with TNF-related apoptosis inducing ligand activity. *Int J Biochem Cell Biol*, 81(Pt B), 364-374. doi: 10.1016/j.biocel.2016.09.019
- Wallach, T. M., & Segal, A. W. (1997). Analysis of glycosylation sites on gp91phox, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. *Biochem J*, 321 (Pt 3), 583-585.
- Wassmann, S., Laufs, U., Muller, K., Konkol, C., Ahlbory, K., Baumer, A. T., Linz, W., Bohm, M., & Nickenig, G. (2002). Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(2), 300-305.
- Wen, Y., Suter, M., Ji, R., Yeh, G., Wu, Y., Wang, K., Kohno, T., Sun, W., & Wang, C. (2009). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal microglia contributes to incision-induced mechanical allodynia. *Anesthesiology*, 110, 155 - 165.
- Wendt, M. C., Daiber, A., Kleschyov, A. L., Mulsch, A., Sydow, K., Schulz, E., Chen, K., Keaney, J. F., Jr., Lassegue, B., Walter, U., Griendling, K. K., & Munzel, T. (2005). Differential effects of diabetes on the expression of the gp91phox homologues nox1 and nox4. *Free Radic Biol Med*, 39(3), 381-391. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.020

- Wu, D., Lin, X., Bernloehr, C., Hildebrandt, T., & Doods, H. (2012). Effects of a novel bradykinin B1 receptor antagonist and angiotensin II receptor blockade on experimental myocardial infarction in rats. *PLoS One*, 7(12), e51151. doi: 10.1371/journal.pone.0051151
- Wu, J., & Yan, L. J. (2015). Streptozotocin-induced type 1 diabetes in rodents as a model for studying mitochondrial mechanisms of diabetic beta cell glucotoxicity. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 8, 181-188. doi: 10.2147/dms0.s82272
- Yandza, T., Tauc, M., Saint-Paul, M.-C., Ouaisi, M., Gugenheim, J., & Hébuterne, X. (2012). The pig as a preclinical model for intestinal ischemia-reperfusion and transplantation studies. *Journal of Surgical Research*, 178(2), 807-819. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jss.2012.07.025>
- Yang, C. M., Lin, M. I., Hsieh, H. L., Sun, C. C., Ma, Y. H., & Hsiao, L. D. (2005). Bradykinin-induced p42/p44 MAPK phosphorylation and cell proliferation via Src, EGF receptors, and PI3-K/Akt in vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol*, 203(3), 538-546. doi: 10.1002/jcp.20250
- Yasuda, K., Nishikawa, W., Iwanaka, N., Nakamura, E., Seino, Y., Tsuda, K., & Ishihara, A. (2002). Abnormality in fibre type distribution of soleus and plantaris muscles in non-obese diabetic Goto-Kakizaki rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29(11), 1001-1008.
- Zhang, P., Xu, X., Hu, X., van Deel, E. D., Zhu, G., & Chen, Y. (2007). Inducible nitric oxide synthase deficiency protects the heart from systolic overload-induced ventricular hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res*, 100(7), 1089-1098. doi: 10.1161/01.res.0000264081.78659.45
- Zhang, X., Tan F, Brovkovich V, Zhang Y, & RA., S. (2011). Cross-talk between carboxypeptidase M and the kinin B1 receptor mediates a new mode of G protein-coupled receptor signaling. *J Biol Chem*. doi: 10.1074/jbc.M110.214940
- Zhang, X., Tan, F., Brovkovich, V., Zhang, Y., Lowry, J. L., & Skidgel, R. A. (2013). Carboxypeptidase M augments kinin B1 receptor signaling by conformational crosstalk and enhances endothelial nitric oxide output. *Biol Chem*, 394(3), 335-345. doi: 10.1515/hsz-2012-0290
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., & Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505), 425-432. doi: 10.1038/372425a0

Annexe

Liste des publications

Potential for tolerance of delta opioid receptor (DOR) agonists in an animal model of diabetic neuropathic pain. **Haddad Y**, Bagheri H, Couture R, Pineyro FG. (*Manuscript in progress*).

Argan Oil as an Effective Nutri-Therapeutic Agent in Metabolic Syndrome: A Preclinical Study. El Midaoui A, **Haddad Y**, Filali-Zegzouti Y, Couture R. *Int J Mol Sci.* **2017 Nov 22**;18(11). pii: E2492. doi: 10.3390/ijms18112492. PMID: 29165388

Localization and Interaction between Kinin B₁ Receptor and NADPH Oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats. **Haddad Y**, Couture R. *Front Physiol.* **2017 Oct 31**; 8:861. doi: 10.3389/fphys.2017.00861. eCollection 2017. PMID: 29163205

Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B₁ Receptor in Insulin Resistance. **Haddad Y**, Couture R. *Front Pharmacol.* **2017 Aug 2**; 8:509. doi: 10.3389/fphar.2017.00509. eCollection 2017. PMID: 28824433

Impact of pioglitazone and bradykinin type 1 receptor antagonist on type 2 diabetes in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. El Akoum S, **Haddad Y**, Couture R. *Obes Sci Pract.* **2017 Jul 6**; 3(3):352-362. doi: 10.1002/osp4.117. eCollection 2017 Sep. PMID: 29071111

Beneficial effects of argan oil on blood pressure, insulin resistance, and oxidative stress in rat. El Midaoui A, **Haddad Y**, Couture R. *Nutrition.* **2016 Oct**; 32(10):1132-7. doi: 10.1016/j.nut.2016.02.021. Epub 2016 Mar 17. PMID: 27161594

Interplay between the kinin B₁ receptor and inducible nitric oxide synthase in insulin resistance. **Haddad Y**, Couture R. *Br J Pharmacol.* **2016 Jun**; 173(12):1988-2000. doi: 10.1111/bph.13491. Epub 2016 May 6. PMID: 27059924

Liste des abrégés

Haddad, Y., Couture, R., Le rôle du récepteur B₁ des kinines dans le système vasculaire des rats diabétiques. 59e réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Hôtel Estrimont, Suites & Spa Magog-Orford du 12 au 14 octobre 2017, Abstract 39-affiche.

Haddad, Y., Couture, R., Le récepteur B₁ des kinines dans le système vasculaire des rats diabétiques. Journée scientifique de la recherche GABRIEL L. PLAA en pharmacologie et physiologie, centre de recherche Sainte-Justine, Montréal, 19 Mai 2017, Abstract 43-affiche.

Haddad, Y., Couture, R., Le rôle du récepteur B₁ des kinines dans le système vasculaire des rats diabétiques. 58e Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Hôtel le manoir du lac Delage, Québec, 29 septembre au 1^{er} octobre **2016**, Abstract 34-affiche.

Haddad, Y., Couture, R., Le récepteur B1 des kinines dans le système vasculaire des rats diabétiques. Journée scientifique du Département de physiologie, Faculté de médecine, Université de Montréal, 18 mai **2016**.

Vaucher, E., Bhat, M., Hachana, S., **Haddad, Y.**, El Akoum S., Pouliot, M, Couture, R. Contribution of bradykinin 1 receptor to retina damage in rodent models of diabetes. International Meeting on Kinin System and Peptide Receptors, Kinin 2015 Brazil, 28 June-1 July, **2015**, Sao Paulo, Brazil, Abstract 0.3.4.

Couture, R., **Haddad, Y.**, Tidjane, N. Partnership between Kinin B1 receptor and iNOS in diabetes and its complications. International Meeting on Kinin System and Peptide Receptors, Kinin, Brazil, 28 June-1 July, 2015, Sao Paulo, Brazil, Abstract 0.3.3.

Haddad, Y., Couture, R. Contribution de la iNOS dans les effets délétères du récepteur B1 des kinines dans l'insulino-résistance. 56e Réunion annuelle du Club de Recherches Cliniques du Québec, Ste-Adèle, Qc, 18-20 Septembre 2014. Abstract-106 Oral.