

Université de Montréal

**Le récepteur B1 des kinines: cible thérapeutique pour le choc  
septique dans le diabète**

Par

**Nejla Tidjane**

Département de physiologie  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de

**Maîtrise ès sciences (M.Sc.) en Physiologie**

Octobre, 2008  
© Nejla Tidjane

Université de Montréal  
Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé :  
**Le récepteur B1 des kinines: cible thérapeutique pour le choc  
septique dans le diabète**

Présenté par :  
**Nejla Tidjane**

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Lucie Parent.....président-rapporteur

Réjean Couture.....directeur de recherche

Denis Deblois .....membre du jury

## RÉSUMÉ

Les décès attribués à un choc septique à la suite d'une infection sévère augmentent chez les diabétiques et surviennent assez fréquemment dans les unités de soins intensifs. Le diabète sucré et le choc septique augmentent la production d'espèces réactives oxygénées et de cytokines pro-inflammatoires, lesquelles activent le facteur de transcription nucléaire Kappa B conduisant à l'induction du récepteur B1 (RB1) des kinines. Le diabète induit par la streptozotocine (STZ) augmente l'expression du RB1 dans divers tissus périphériques, le cerveau et la moelle épinière. Les lipopolysaccharides bactériens (LPS), souvent utilisés pour induire le choc septique, induisent aussi le RB1. L'objectif de ce travail vise à démontrer la contribution du RB1 des kinines dans l'exacerbation du choc septique pendant le diabète. Des rats Sprague-Dawley (225-250 gr) traités à la STZ (65 mg/kg, i.p.) ou le véhicule ont reçu quatre jours plus tard les LPS (2 mg/kg, i.v.) ou le véhicule en présence ou pas d'un antagoniste du RB1 (SSR240612, 10 mg/kg) administré par gavage. La température corporelle a été mesurée pendant 24h après le traitement. Le SSR240612 a aussi été administré à 9h AM et 9h PM et les rats sacrifiés à 9h AM le jour suivant après un jeûne de 16 h. Les effets de ces traitements ont été mesurés sur les taux plasmatiques d'insuline et de glucose, l'œdème et la perméabilité vasculaire (dans divers tissus avec la technique du Bleu d'Evans) ainsi que sur l'expression du RB1 (PCR en temps réel) dans le cœur et le rein. L'augmentation de la température corporelle après traitement au LPS chez les rats traités ou pas à la STZ a été bloquée par le SSR240612. L'antagoniste a normalisé l'hyperglycémie et amélioré la déficience en insuline chez les rats STZ. Le SSR240612 a inhibé l'œdème et réduit la perméabilité vasculaire dans les tissus des rats diabétiques

traités ou pas avec les LPS. La surexpression du RB1 chez les rats traités au STZ et/ou LPS était renversée par le SSR240612. Cet antagoniste a prévenu la mortalité causée par les LPS et LPS plus STZ. Les effets anti-pyrétique, anti-inflammatoire et anti-diabétique du SSR240612 suggèrent que le RB1 puisse représenter une cible thérapeutique valable pour le traitement de la co-morbidité associée au choc septique dans le diabète.

**MOTS CLÉS :**

Diabète, choc septique, récepteur B1 des kinines, lipopolysaccharides, streptozotocine, hyperthermie, hyperglycémie, œdème, perméabilité vasculaire.

## SUMMARY

Death attributed to septic shock following severe infection increases in diabetic patients and occurs quite frequently in intensive care units. Diabetes mellitus and septic shock increase the production of reactive oxygen species and pro-inflammatory cytokines leading to higher kinin B1 receptor (RB1) expression that is mediated by the activation of the transcriptional nuclear factor Kappa B. Streptozotocin (STZ)-induced diabetes increased the expression of RB1 in rat peripheral tissues, brain and spinal cord. Bacterial lipopolysaccharides (LPS) commonly used to induce septic shock in animal models, also induce RB1. Our objective is to study the contribution of kinin RB1 in the increased morbidity and mortality associated with the combination of these two diseases. Sprague-Dawley rats (225-250g) treated with STZ (65 mg/kg, ip) or vehicle received four days later LPS (2 mg/kg, iv) or vehicle in the presence or absence of the RB1 antagonist, SSR240612 (10 mg/kg), administered by gavage. Body temperature was monitored for 24h after treatment. In addition, SSR240612 was administered twice (9h AM and 9h PM) and rats were sacrificed the following morning at 9h AM after 16 h of fasting to measure the impact on plasma insulin and glucose, oedema and vascular permeability in various tissues (with the technique of Evans Blue) and on the expression of RB1 (real-time PCR) in heart and kidney. The increase in body temperature caused by treatment with LPS both in STZ-diabetic and non-diabetic rats was blocked by SSR240612. The antagonist normalized hyperglycaemia and improved insulin deficiency in STZ rats. SSR240612 inhibited oedema and reduced vascular permeability in all tissues from diabetic rats treated or not with LPS. The overexpression of RB1 induced by LPS and STZ was blocked by SSR240612. Pharmacological blockade of B1R with SSR240612 prevented the mortality induced by LPS and STZ plus LPS. Thus the anti-pyretic, anti-inflammatory and anti-diabetic effects

of SSR240612 suggest that kinin RB1 is a promising therapeutic target for the treatment of co-morbidity associated with septic shock in diabetes.

**KEY WORDS:**

Diabetes, septic shock, kinin B1 receptor, lipopolysaccharides, streptozotocin, hyperthermia, hyperglycaemia, oedema, vascular permeability.

## RÉSUMÉ VULGARISÉ

Les maladies endocriniennes sont la troisième cause de décès au Canada. Le diabète juvénile ou de type 1 occupe la septième place à cause des complications qu'il engendre. Il s'agit d'une pathologie chronique où le système immunitaire s'attaque aux cellules bêta insulino-gènes du pancréas et les détruit. Le pancréas produit alors peu ou pas d'insuline. Le diabète de type 1 n'est pas causé par l'obésité ni par une consommation excessive de sucre; on croit plutôt qu'il est causé par une combinaison de facteurs génétiques et de facteurs agressifs du milieu. La septicémie et le choc septique sont des réponses extrêmes de l'organisme à l'infection. Environ 800,000 personnes atteintes de septicémie sont admises chaque année dans les hôpitaux en Amérique du nord. La septicémie et la défaillance d'organes multiples qui peut en résulter, constituent la cause première de décès dans les unités de soins intensifs du monde industrialisé, et on leur attribue plus de 500,000 décès par année à l'échelle mondiale. Les décès par septicémie sont typiquement causés par une insuffisance cardiaque précoce (hypotension ou choc) ou par une défaillance multi-viscérale. Le choc et la défaillance viscérale peuvent se produire même si l'antibiothérapie a éliminé l'organisme pathogène. La septicémie et le choc septique déclenchent souvent chez le patient une réaction génétique et métabolique en chaîne qui entraîne des lésions organiques et l'incapacité du système atteint à fonctionner malgré l'élimination de la cause initiale. D'importantes découvertes ont été réalisées au sujet des voies de signalisation moléculaire qui déterminent la réaction d'un patient à la septicémie et au choc septique, grâce à l'aide de technologies permettant d'examiner les modes d'expression génique aberrantes qui se produisent au cours de la maladie. Notre travail consiste à étudier le rôle des kinines et, en particulier, de son récepteur inductible B1 dans les effets délétères résultant de la combinaison du choc septique et du diabète dans un modèle animal de

diabète de type 1. Ainsi, l'animal devra manifester les principaux symptômes résultant de la combinaison de ces deux pathologies, nous permettant de tester le potentiel thérapeutique des antagonistes du récepteur B1 des kinines. Pour cela, nous avons utilisé un modèle animal de diabète de type 1; c'est à dire des rats traités à la streptozotocine (ZANOSAR\*) auxquels nous avons administré des lipopolysaccharides bactériens de type E. coli. Ils ont ensuite été traités par un antagoniste non peptidique du RB1 (SSR240612). Les effets de ces traitements ont été mesurés sur la température corporelle, la glycémie, l'insulinémie, l'œdème, la perméabilité vasculaire ainsi que sur l'expression du RB1 dans divers tissus périphériques. Les résultats nous ont permis de démontrer que l'antagoniste du RB1 des kinines possède un effet bénéfique dans la phase aiguë et prolongée du choc septique chez les diabétiques en exerçant un effet anti-inflammatoire, antidiabétique et un effet préventif sur la mortalité.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY .....	v
RÉSUMÉ VULGARISÉ.....	vii
LISTE DES FIGURES .....	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	xiii
DÉDICACE.....	xv
REMERCIEMENTS .....	xvi
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION .....	1
<b>1.1 LE DIABÈTE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.1 Les types de diabète.....</b>	<b>4</b>
1.1.1.1 Diabète de type 1 .....	4
1.1.1.2 Diabète de type 2.....	5
1.1.1.3 Diabète de type 3.....	6
1.1.1.4 Diabète gestationnel.....	8
1.1.1.5 Autres types de diabète .....	9
1.1.2 Diagnostic du diabète.....	10
1.1.3 Complications du diabète.....	11
1.1.4 Traitements du diabète.....	12
<b>1.2 LE CHOC SEPTIQUE.....</b>	<b>13</b>
1.2.1 Physiopathologie du choc septique .....	15
1.2.2 Signalisation cellulaire au cours du choc septique .....	18
<b>1.3 LE DIABÈTE ET LE CHOC SEPTIQUE.....</b>	<b>19</b>
<b>1.4 LA VOIE DE L'INSULINE .....</b>	<b>21</b>
1.4.1 L'insuline .....	21
1.4.2 Structure et production.....	21
1.4.3 Les récepteurs de l'insuline.....	23
1.4.4 Voies de signalisation intracellulaire de l'insuline .....	25
1.4.5 Les types de transporteurs de glucose .....	28
1.4.6 Pathologie de la voie de signalisation de l'insuline dans le diabète.....	29
<b>1.5 SYSTÈME KALLICRÉINE-KININE (SKK) .....</b>	<b>30</b>
1.5.1 Biosynthèse des kinines.....	30
1.5.2 Les kinines et leurs récepteurs .....	32
1.5.2.1 Le récepteur B1 des kinines .....	33
1.5.2.1.1 Rôles du récepteur B1 des kinines .....	34
1.5.2.1.1.1 Dans le diabète sucré .....	34
1.5.2.1.1.2 Dans la douleur Inflammatoire.....	34

### 1.5.2.1.1.3 Dans l'œdème et perméabilité

Vasculaire.....	36
1.5.2.2 Le récepteur B2 des kinines.....	36
1.5.2.2.1 Distribution.....	36
1.5.2.2.2 Fonctions.....	36
1.5.3 Signalisation cellulaire des récepteurs des kinines.....	37
1.5.4 Pharmacologie et biochimie des kinines.....	38
1.5.4.1 Les agonistes du récepteur B1.....	38
1.5.4.2 Les antagonistes du récepteur B1.....	40
1.5.4.3 Les agonistes du récepteur B2.....	41
1.5.4.4 Les antagonistes du récepteur B2.....	41
<b>1.6 LA PROBLÉMATIQUE DE L'ÉTUDE.....</b>	<b>43</b>
1.6.1 Problématique et objectifs.....	43
1.6.2 Hypothèse.....	44
<b>CHAPITRE 2 - MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>45</b>
2.1 Protocoles.....	46
2.2 Mesure de la température corporelle.....	47
2.3 Mesure de la glycémie sanguine.....	47
2.4 Le dosage de l'insuline.....	47
2.5 Mesure de l'œdème.....	48
2.6 Mesure de la perméabilité vasculaire.....	48
2.7 PCR quantitatif en temps réel.....	48
2.8 La mortalité.....	50
2.9 Mise en place des canulations.....	50
2.10 Les analyses statistiques.....	51
<b>CHAPITRE 3 – RÉSULTATS.....</b>	<b>52</b>
3.1 Effet du SSR 240612 sur la glycémie.....	53
3.2 Effet du SSR 240612 et du HOE 140 sur la glycémie.....	54
3.3 Effet du SSR 240612 sur l'insulinémie.....	55
3.4 Effet du SSR 240612 sur la température.....	56
3.5 Effet du SSR 240612 sur l'œdème du cœur.....	57
3.6 Effet du SSR 240612 sur l'œdème au niveau	
Du poumon.....	58
3.7 Effet du SSR 240612 sur l'œdème au niveau	
Du rein.....	59
3.8 Effet du SSR 240612 sur l'œdème au niveau	
Du foie.....	60

3.9 Effet du SSR 240612 sur l'œdème de l'aorte.....	61
3.10 Effet du SSR 240612 sur la perméabilité Vasculaire .....	62
3.11 Effet du SSR240612 sur l'induction du récepteur B1 dans le cœur.....	63
3.12 Effet du SSR240612 sur l'induction du récepteur B1 dans le cortex rénal .....	64
3.13 Effet du SSR 240612 sur la mortalité .....	65
<b>CHAPITRE 4 - DISCUSSION ET CONCLUSION .....</b>	<b>66</b>
4.1 Rôle du récepteur B1 dans le choc septique .....	68
4.2 Rôle du récepteur B1 dans le diabète de type 1.....	69
4.3 Rôle du récepteur B1 dans le diabète de type 1 et le choc septique.....	72
4.4 Perspectives.....	75
4.5 Conclusion.....	76
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>77</b>

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	STRUCTURE DE L'INSULINE .....	22
FIGURE 2.	STRUCTURE DU RÉCEPTEUR DE L'INSULINE.....	24
FIGURE 3.	SCHÉMA REPRÉSENTANT LES ÉLÉMENTS DE SIGNALISATION INTRACELLULAIRE ACTIVES VIA LE RECEPTEUR DE L'INSULINE MENANT À LA TRANSLOCATION DE GLUT4 À LA MEMBRANE PLASMIQUE ET AU T-TUBULES DES CELLULES MUSCULAIRES.....	27
FIGURE 4.	SCHÉMA REPRÉSENTANT LA LOCALISATION DES DIFFÉRENTS TYPES DE TRANSPORTEURS DE GLUCOSE.....	28
FIGURE 5.	SCHÉMA ILLUSTRANT LE SYSTÈME KALLICRÉINE-KININES.....	31
FIGURE 6.	REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES RÉCEPTEURS DES KININES ET LEURS AGONISTE.....	33
FIGURE 7.	SIGNALISATION CELLULAIRE DES KININES.....	37
FIGURE 8	EFFETS DU SSR240612 SUR LA GLYCÉMIE.....	52
FIGURE 9.	EFFETS DU SSR240612 ET DU HOE 140 SUR LA GLYCÉMIE .....	53
FIGURE 10.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'INSULINE.....	54
FIGURE 11.	EFFETS DU SSR240612 SUR LA TEMPÉRATURE.....	55
FIGURE 12.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'OEDÈME DU CŒUR.....	56
FIGURE 13.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'OEDÈME DU POUMON.....	57
FIGURE 14.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'OEDÈME DU REIN.....	58
FIGURE 15.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'OEDÈME DU FOIE.....	59
FIGURE 16.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'OEDEME DE L'AORTE.....	60
FIGURE 17.	EFFETS DU SSR240612 SUR LA PERMÉABILITÉ VASCULAIRE.....	61
FIGURE 18.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'INDUCTION DU RÉCEPTEUR B1 DANS LE CŒUR.....	62
FIGURE 19.	EFFETS DU SSR240612 SUR L'INDUCTION DU RÉCEPTEUR B1 DANS LE CORTEX RÉNAL.....	63
FIGURE 20.	EFFETS DU SSR240612 SUR LA MORTALITÉ.....	64

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

<u>Sigle ou abréviation</u>	<u>Signification</u>
AGE	<i>Advanced Glycation End products</i>
BMI	<i>Body mass index</i>
Cbl	<i>Casitas b-lymphoma</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CIVD	Coagulation intra-vasculaire disséminée
DAG	Diacylglycérol
DT1	Diabète de type 1
GCSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GMPc	GMP cyclique
GTP	Guanosine triphosphate
HbA1c	Hémoglobine glycosylée
HGPO	Hyperglycémie provoquée orale
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
HNF-4 $\alpha$	<i>Hepatocyte Nuclear Factor-4<math>\alpha</math></i>
ICV	Intracerebro ventriculaire
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IP3	Inositol-triphosphate
IRS	<i>Insulin receptor substrate</i>
IL1-2-6	Interleukin -1-2-6
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
IPF-1	<i>Insulin promotor factor -1</i>
KOB1	<i>Knock-out B1</i>
LAR	<i>Leucocyte Common antigene-related molecule</i>
LPS	Lipopolysaccharides
Mody	<i>Maturity onset type diabetes of the Young</i>
NEUROD1/BETA2	<i>Neurogenic differentiation</i>
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	Monoxyde d'azote

N-WASP	<i>Neural Wiskott -Aldrich syndrome protein</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PIP2	Phosphatidyl-inositol-diphosphate
PKC $\zeta$	<i>Protein Kinase C <math>\zeta</math> interacting protein</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i>
RB1	Récepteur B1 des kinines
RB2	Récepteur B2 des kinines
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End products</i>
SHIP	<i>Src homology2-domain- containing inositol 5-phosphatase</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
STZ	Streptozotocine
TCA	Temps de céphaline avec activateur
TNF $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha</i>
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
tPA	Activateur tissulaire du plasminogène
WKY	Wistar-Kyoto
WT	<i>Wild Type</i>

## DÉDICACE

### A YAMINA CHEVROL BENGUEDDACHE

Mina a été la première femme algérienne à avoir assumé toutes les contraintes et à avoir réussi à les vaincre pour arriver finalement à être la première spécialiste en chirurgie de la main. Ce métier qui, encore aujourd'hui, a de la peine à trouver son intitulé au féminin ! Aucune femme ne l'avait osé avant elle en Algérie.

Née en 1942, elle obtient à 27 ans son doctorat et à 37 ans, son titre de professeur. Elle nous a quitté en mai 2007.

Mina, je te dédie ce mémoire, mon parcours ne s'annonce pas facile, mais j'ai devant moi un exemple d'une femme pionnière, courageuse et déterminée et surtout des personnes autour qui, tout comme toi, croient en moi malgré tout...

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements au Dr Réjean Couture pour m'avoir accueillie au sein de son équipe, pour la confiance inconditionnelle qu'il a placée en moi, pour ses encouragements, son assistance et par-dessus tout sa profonde gentillesse.

Je souhaiterais remercier aussi Jacques Sénécal pour son soutien technique et sa disponibilité.

J'aimerais témoigner ma reconnaissance à Magalie Pilon, Magda Descorbeth, Helaine De Brito Pereira, Jenny Pena Dias, Sébastien Talbot, Mahmoud Ali Ismaël, Marielle Morand - Contant pour leur contribution et leur présence. J'aimerais aussi remercier Touria Addou, Rym Aouameur et Emna Chahmi pour leur soutien moral et encouragements.

J'aimerais dire un grand merci à Joanne Payette, notre technicienne en gestion des dossiers étudiants, pour le service de qualité qu'elle offre aux étudiants étrangers.

Aussi un grand merci et une entière reconnaissance pour le soutien financier du Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM-Sanofi Aventis).

Et pour finir, je remercie mes parents pour leur confiance et assistance malgré l'éloignement, Amine Benyelles, Djamal et Louiza Abide, je remercie aussi mon amie Lise LaFrance et Salim Mrabet et enfin, mon frère adoré Adel pour m'avoir supporté dans la réalisation de mes études ici au Canada.

Et je ne dirai jamais assez merci à tous ceux qui ont essayé de barrer ma route vers le succès, vous avez fait de moi une personne plus forte et sage.

# **CHAPITRE 1 – INTRODUCTION**

## 1.1 Le diabète

Le diabète sucré est une maladie métabolique caractérisée par la présence d'une hyperglycémie en rapport avec un défaut de la sécrétion d'insuline et/ou de l'action de l'insuline. L'hyperglycémie chronique liée au diabète est associée à d'importantes séquelles à long terme d'ordre cardiovasculaire, rénale, oculaire et neurologique en rapport avec l'équilibre glycémique et la durée du diabète. L'insuline est l'un des agents anaboliques les plus importants de l'organisme humain puisqu'elle favorise l'entrée du glucose sanguin dans les tissus cibles (muscle squelettique, foie et adipocytes) (Saltiel & Kahn, 2001) en augmentant la concentration des transporteurs GLUT4 à la surface des membranes cellulaires (Furtado *et al.*, 2002). Le terme diabète recouvre en fait deux maladies différentes: le diabète insulino-dépendant (type 1), qui survient le plus souvent avant l'âge de 20 ans, représente 5 à 10% des cas de diabète dans le monde. Il est caractérisé par la destruction spécifique des cellules  $\beta$  du pancréas menant à une suppression de la sécrétion d'insuline (World Health Organisation Diabetes Unit). Le diabète non insulino-dépendant (type 2) qui représente plus de 90% des cas de diabète dans le monde (World Health Organisation Diabetes Unit), avait la réputation de toucher des sujets âgés de 50 ans et plus. À l'heure actuelle, il touche un nombre croissant d'enfants et d'adolescents (Rapaport *et al.*, 2004). C'est le diabète non insulino-dépendant qui pose un problème de santé publique. Sa prévalence augmente parallèlement au vieillissement, à l'urbanisation, à la sédentarisation et au développement de l'obésité dans les populations des pays industrialisés. Cette maladie n'épargne pourtant pas les pays sous-développés où le diabète non insulino-dépendant atteint parfois une prévalence de 20 à 30 %, en raison d'une prédisposition génétique couplée à une modification rapide du mode de vie, urbanisation

brutale, sédentarisation et alcoolisation des populations (Caroli *et al.*, 2008) . Une révision de l'ancienne classification a été réalisée en 2003 et tient compte de l'étiologie de la maladie diabétique plutôt que de son mode thérapeutique (The Expert Committees in diagnosis and classification of diabetes mellitus, 2003).

### 1.1.1 Les types de diabète

La nouvelle classification distingue :

#### 1.1.1.1 Diabète de type 1

Le diabète insulino-dépendant représente 10 à 15% des cas de diabète. Il survient le plus souvent chez un sujet non obèse, avant l'âge de 30 ans, mais peut survenir à tous les âges. Il est caractérisé par une destruction spécifique des cellules ( $\beta$ ) des îlots de Langerhans aboutissant à une absence complète de la sécrétion d'insuline (World Health Organisation Diabetes Unit). Le rôle de l'auto-immunité dans la survenue du diabète de type 1A est certain. On retrouve souvent des anticorps anti-îlots de Langerhans, anticorps qui attaquent les cellules du pancréas fabriquant l'insuline. La réaction auto-immune est déclenchée par des facteurs environnementaux encore mal connus comme les produits toxiques et les virus. D'ailleurs, le diabète de type 1 (DT1) est souvent associé à d'autres maladies auto-immunes tels que la thyroïdite de Hashimoto, maladie de Basedow, myxœdème idiopathique, maladie d'Addison, maladie de Biermer, vitiligo, maladie cœliaque, et bien d'autres. Il existe une prédisposition génétique au diabète de type 1 liée à certains gènes du système HLA situé sur le bras court du chromosome 6. L'histoire naturelle du diabète de type 1 peut se schématiser de la façon suivante : chez des sujets prédisposés génétiquement, les cellules bêta du pancréas sont attaquées par des facteurs extérieurs lors de la phase pré-diabétique. Cette phase peut durer plusieurs années. Les fonctions de sécrétion de l'insuline s'altèrent alors progressivement et discrètement et la tolérance au glucose s'affaiblit. Ces anomalies sont probablement réversibles, du moins dans certains cas. Le diabète de type 1 finit par se révéler soit subitement pour un patient traité d'urgence pour une acidocétose diabétique (Dehan *et al.*, 2008), soit progressivement par réduction, au dessous du seuil

critique (20%), du nombre de cellules  $\beta$  Langerhansiennes fonctionnelles. L'hyperglycémie consécutive à un défaut d'insuline joue un rôle aggravant : elle épuise les cellules  $\beta$  restantes en entraînant une diminution de la sensibilité périphérique à l'action de l'insuline. On peut donc obtenir des rémissions sous l'effet de traitements immunosuppresseurs (cyclosporine) au début du diabète de type 1 ou à la suite d'une stricte normalisation glycémique. Une prévention sera sans doute possible. À l'avenir, la mise en route d'un traitement immunosuppresseur dès la phase pré-diabétique, lorsque le nombre de cellules  $\beta$  détruites est encore limité, rendra la prévention possible. La destruction des cellules  $\beta$  peut ne pas être d'origine auto-immune, il s'agit alors du diabète idiopathique de type 1B fortement en rapport avec une origine génétique.

#### **1.1.1.2 Diabète de type 2**

Le diabète non insulino-dépendant ou diabète de type 2 résulte de la conjonction de plusieurs gènes de susceptibilité, dont l'expression dépend de facteurs environnementaux au premier rang desquelles on note la consommation excessive de graisses saturées, de sucres simples et la sédentarité (Leahy, 2005). L'insulino-déficience responsable de l'hyperglycémie du diabète de type 2 est précédée par 10 ou 20 ans, d'hypersecretion insulinaire (hyperinsulinisme) secondaire à une insulino-résistance des tissus périphériques (Kahn, 2003; Leahy, 2005). L'anomalie métabolique fondamentale qui précède le diabète non insulino-dépendant est l'insulino-résistance. L'insulino-résistance est secondaire à l'excès de graisses au niveau des muscles et du tissu adipeux viscéral. Le tissu adipeux viscéral libère une grande quantité d'acides gras libres. Le flux portal des acides gras libres favorise la synthèse hépatique des triglycérides et stimule la néoglucogenèse hépatique. Au niveau musculaire, il existe une véritable compétition entre les acides gras libres et le glucose pour être oxydé : les acides gras libres sont oxydés en priorité, entraînant une

production accrue d'acetyl CoA qui inhibe en retour les enzymes de la glycolyse. L'énergie musculaire est donc fournie en priorité par l'oxydation des acides gras libres et le stock de glycogène musculaire reste intact, ce qui réprime en retour la glycogène synthase. En résumé, le stockage et l'utilisation du glucose sont diminués au niveau musculaire alors qu'au niveau hépatique, il y a une stimulation de la néoglucogenèse. Tout ceci concourt à augmenter la glycémie (Lewis *et al.*, 2002) .

### **1.1.1.3 Diabète de type 3**

Il s'agit en fait de résultats de travaux associant le diabète à la maladie d'Alzheimer qui révèlent la présence d'une forme d'insuline, de facteurs de croissance tels que "insulin growth factor" I et II (IGFI et IGFI) et de plusieurs isoformes de protéines tau produits dans le cerveau (Steen *et al.*, 2005). À partir de modèles animaux et de l'analyse post-mortem de tissu cérébral de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer, les chercheurs ont découvert que des taux réduits d'insuline et des protéines associées produites dans le cerveau seraient liés à la maladie d'Alzheimer. Lorsque les niveaux de ces protéines sont inférieurs à la normale, les neurones du système nerveux central qui sont localisés dans l'hippocampe meurent. La diminution marquée de l'expression des gènes codant pour l'insuline, les facteurs de croissance et les récepteurs associés suggère que la maladie d'Alzheimer pourrait être de nature neuroendocrine (un désordre semblable, quoique distinct, à celui du diabète mellitus). C'est pourquoi les chercheurs proposent l'appellation de « diabète de type 3 » pour exprimer ce mécanisme pathogénique nouvellement identifié de neurodégénération. On savait déjà que les personnes qui souffrent de diabète ont un risque accru (jusqu'à 65 % de plus) de développer la maladie d'Alzheimer. Toutefois, cette nouvelle source d'insuline produite par le cerveau n'affecterait pas les niveaux de glucose sanguin. Les chercheurs pensent qu'il faudrait concevoir des agents thérapeutiques capables

d'influer spécifiquement sur l'action de cette insuline dans le cerveau. Les recherches se poursuivent afin de renforcer le lien entre diabète et la maladie d'Alzheimer (de la Monte & Wands, 2005; Steen *et al.*, 2005).

#### 1.1.1.4 Diabète gestationnel

C'est un diabète révélé ou diagnostiqué pendant la grossesse, il disparaît dans la plupart des cas après l'accouchement. C'est un facteur de risque d'apparition du diabète de type 2. En effet, environ 40% des femmes avec un diabète gestationnel peuvent être atteintes de diabète de type 2 à la vieillesse (Moore, 1997). Les besoins en insuline augmentent pendant la grossesse et si la sécrétion durant cette phase est insuffisante, le diabète apparaît. Les facteurs de risque de diabète gestationnel sont : l'âge maternel ( $> 30$  ans), le surpoids maternel avant la grossesse ( $BMI > 25 \text{ kg/m}^2$ ), la prise de poids excessive pendant la grossesse, l'origine ethnique (origine indienne, asiatique, chinoise, les races noires et hispaniques), les antécédents familiaux de diabète, les antécédents de diabète gestationnel, la macrosomie et les antécédents d'hypertension artérielle (Baraban *et al.*, 2008). Il n'existe pas de test diagnostique parfaitement validé pour le diabète gestationnel et le seul test qui garde sa place à travers le monde dans cette situation pathologique est l'hyperglycémie provoquée orale (l'HGPO). Il n'existe pas de malformation fœtale en rapport avec le diabète gestationnel vu que l'hyperglycémie se développe au 2<sup>ème</sup> trimestre de la grossesse et que l'organogenèse est déjà effectuée. Le principal risque est lié à l'hyperinsulinisme fœtal avec pour conséquence une macrosomie fœtale; cette dernière est définie par un poids à la naissance supérieur à 4 kg avec risque d'hypoglycémie dans les premiers jours de vie, car le pancréas du bébé a pris l'habitude de fabriquer beaucoup d'insuline pendant la grossesse (Perichart *et al.*, 2006). Il lui faudra quelques jours pour perdre cette habitude. Le traitement repose sur le régime diététique chez la mère : 1 500 à 2 000 kcal/j avec un apport de 150 à 200 g de glucides. Cet apport doit être fractionné en 3 repas et 3 collations. Les aliments à très fort index glycémique doivent être supprimés tandis que les aliments à index glycémique fort comme le pain ou la semoule doivent être limités. L'auto-surveillance

glycémique à l'aide d'un lecteur, avant et 2h après le début de chaque repas, est conseillée (Gunderson, 2004). L'objectif est d'obtenir une glycémie préprandiale  $< 0.90$  g/l et une glycémie postprandiale  $< 1.20$  g/l. En cas d'échec ou d'insuffisance du traitement diététique pour obtenir cet objectif, une insulinothérapie sera instituée, consistant en une injection d'insuline ou parfois de mélanges contenant une insuline lente et une insuline rapide afin d'éviter les injections multiples d'insuline.

#### **1.1.1.5 Autres types de diabète**

Le diabète de type Mody "Maturity onset type diabetes of the Young" est un diabète insulino-dépendant à transmission autosomique dominante en rapport avec une anomalie primaire de la sécrétion d'insuline (Schwartz & Chadha, 2008). On compte à ce jour cinq gènes responsables, les MODY 1, 3, 4 et 5 qui correspondent à des mutations des gènes suivants HNF-4 $\alpha$  "Hépatocyte Nuclear Factor -4 $\alpha$ ", HNF-1 $\alpha$ , IPF-1 "insulin promotor factor -1" et HNF-1 $\beta$ . Le MODY2 constitue une exception puisqu'il est dû à des mutations des gènes de la glucokinase, enzyme clé dans le métabolisme qui conduit à l'insulinosécrétion en réponse au glucose (Byrne *et al.*, 1996). Plus récemment, le facteur de transcription NEUROD1/BETA2 "Neurogenic differentiation" 1 a été impliqué dans la survenue d'un diabète à transmission autosomique dominante. Les maladies infectieuses tels que la grippe, les oreillons, les pneumonies, la tuberculose, quelques maladies endocriniennes tels que l'acromégalie, la maladie de Cushing, l'hyperthyroïdie et les pancréatites chroniques peuvent déclencher le diabète. Aussi, certaines médications telles que la chimiothérapie anti cancéreuse, les pilules contraceptives, certains diurétiques, les glucocorticoïdes et les médicaments anti épileptiques peuvent entraîner l'apparition de ce type de diabète.

### 1.1.2 Diagnostic du diabète

Le diagnostic de tous les types de diabète est simple; il repose essentiellement sur la mesure de la glycémie sanguine à jeun et sur l'hyperglycémie provoquée. Les nouveaux critères diagnostiques du diabète selon l'OMS sont basés sur l'abaissement des valeurs de la glycémie de 7,8 mmol/L à 7 mmol/L, et par la création d'une nouvelle catégorie intermédiaire nommée l'hyperglycémie non diabétique à jeun. Cette dernière est définie par une glycémie à jeun entre 6,1mmol/L et 6,9 mmol/L. La méthode de l'hyperglycémie provoquée (HGPO) consiste en la mesure de la glycémie veineuse 2 h après l'ingestion de 75g de glucose dissout dans 250 ml d'eau, à absorber en moins de 5 minutes. Les sujets dont la glycémie 2h après une charge orale en glucose est  $> 11.1$  mmol/L sont considérés comme diabétiques. L'hyperglycémie provoquée par voie orale (HPO ou HGPO) est aujourd'hui la méthode de référence pour les études épidémiologiques ou des campagnes de dépistage pilote chez les sujets totalement asymptomatiques. La méthode de l'Hémoglobine glycosylée ou glyquée (HbA1c) est le résultat de la réaction non enzymatique entre l'hémoglobine et le glucose dans le sang; elle reflète l'équilibre glycémique moyen de chaque individu durant les 8 à 12 semaines précédentes. La simplicité technique par rapport à l'HPO, l'absence de modification du mode alimentaire des jours précédents contrairement à la glycémie à jeun sont des atouts sérieux en faveur de cette méthode. Les seuils de glycémie à jeun sont définis par l'OMS et l'American Diabetes Association comme suit: le seuil proposé de diabète est  $\geq 6,9$  mmol/L, le seuil d'intolérance au glucose  $\geq 5,8$  mmol/L et le seuil de normalité est  $< 5,8$  mmol/L (Glah, 2008).

### 1.1.3 Complications du diabète

La principale complication du diabète sucré est la rétinopathie diabétique; elle est la cause majeure de troubles visuels et de cécité et elle est en étroite liaison avec les niveaux circulants de caroténoïdes (Brazionis *et al.*, 2008). Le diabète sucré provoque des lésions au niveau des capillaires de la rétine qui entraînent un effondrement de l'acuité visuelle au bout de quelques années d'évolution. Des études cliniques conduisent à penser qu'après un diabète de 15 ans, environ 2 % des malades perdent la vue et environ 10 % sont affectés d'un grave handicap visuel. Un dépistage précoce et une régulation métabolique adéquate permettent de retarder l'apparition et l'évolution de la rétinopathie diabétique. L'insuffisance rénale est également liée à la gravité et à la longévité du diabète. L'incidence de l'insuffisance rénale chronique s'établit à 11 % chez les patients atteints du diabète de type 2 et à 50 % chez ceux atteints du diabète de type 1 (Santé Canada 2002). Une étude récente a montré un rôle possible des niveaux d'expression de l'"alpha-actinin-4" dans la progression de la glomérulopathie et de la protéinurie dans la néphropathie diabétique chez l'homme (Kimura *et al.*, 2008). L'atteinte rénale peut être ralentie par une lutte continue contre l'hyperglycémie et l'hypertension et un traitement médical précoce avec une surveillance rapprochée du mode nutritionnel. Les cardiopathies sont responsables d'environ 50 % des décès chez les diabétiques dans les pays industrialisés surtout en présence de facteurs de risque tels que le tabagisme, l'hypertension, l'hypercholestérolémie et l'obésité. Ces pathologies peuvent être retardées par un dépistage et une prise en charge précoce afin de prévenir leur survenue chez les diabétiques. Les neuropathies diabétiques atteignent environ 50 % des diabétiques à des degrés divers, liées à la durée et à la gravité de l'hyperglycémie responsable de symptômes allant de la perte de la sensibilité à des

lésions des membres amenant à des amputations chirurgicales Elles sont également une cause importante d'impuissance chez les hommes (Trief, 2005).

#### **1.1.4 Traitements du diabète**

Le but de la thérapie antidiabétique est la stabilisation du taux de glucose sanguin à un taux le plus proche de la normale et de prévenir l'apparition des complications secondaires à cette pathologie. La thérapie traditionnelle consiste pour les diabétiques de type 1 à injecter l'insuline et pour le type 2 à diminuer la résistance périphérique à l'insuline ainsi qu'à augmenter sa production pancréatique. Le diabète de type 2 est traité au départ par des mesures hygiéno-diététiques, incluant un régime alimentaire faible en gras saturé et en sucres, associées à la mise en place d'un programme d'activités physiques adapté (Crandall *et al.*, 2008). L'étape suivante si nécessaire est un traitement par des antidiabétiques oraux et une insulinothérapie pour maintenir une glycémie normale. Pour ce qui est du diabète de type 1, le traitement repose essentiellement sur l'insulinothérapie vu la déficience de production par le pancréas. Les schémas d'insulinothérapie actuellement proposés visent à reproduire l'insulino-sécrétion physiologique. Un nouveau traitement du diabète est en cours d'expérimentation et suscite beaucoup de controverses malgré des résultats encourageants. Il s'agit de la greffe de cellules souches hématopoïétiques, d'ilôts de Langerhans et de pancréas seul ou avec une greffe rénale dans les cas de diabètes compliqués (Ryan *et al.*, 2002).

## 1.2 Le choc septique

La septicémie est une réponse systémique à l'infection accompagnée d'un syndrome de défaillance multi viscéral. Elle est le résultat d'interactions complexes entre cellules, cytokines et cascades humorales, initiées aussi bien par des bactéries à gram positif, des éléments fongiques que par les endotoxines contenues dans les bactéries à gram négatif. Le choc septique est accompagné d'une mortalité élevée à cause des dysfonctionnements organiques qui en résultent et les conséquences sur les différents systèmes, à savoir le système cardiovasculaire avec hypovolémie et troubles de la vasomotricité, manifestes dès le début du choc septique et pouvant conduire à la défaillance cardiaque avec des altérations myocardiques et des atteintes de la contractilité dont le TNF $\alpha$ , les IL1-2-6 sont les responsables (Dougnac *et al.*, 2007). Il y a aussi des modifications de la perméabilité vasculaire aboutissant à une augmentation du flux liquidien et protéique du secteur vasculaire au secteur interstitiel responsable du syndrome œdémateux. Une atteinte rénale avec hypotension et des troubles de la microcirculation peuvent survenir. Une atteinte métabolique avec perturbation de la consommation d'oxygène par les tissus et responsable d'une acidose lactique, témoignant d'un métabolisme anaérobie, est souvent observée (Pinsky *et al.*, 1993). Concernant la fièvre, cette dernière n'est rien d'autre qu'un déterminant de l'élévation de la demande métabolique et elle est souvent accompagnée de troubles de l'hémostase avec coagulation intra vasculaire disséminée. Enfin, une atteinte du système nerveux central est souvent associée avec troubles de la conscience et confusion voire encéphalopathie. Le traitement du choc septique est avant tout étiologique; il vise à traiter l'infection responsable par une antibiothérapie adaptée et efficace choisie en fonction des résultats de l'antibiogramme, du foyer infectieux suspecté, du terrain et en fonction des facteurs de risques éventuels de résistance aux antibiotiques. Dans de rares

cas, un traitement chirurgical est nécessaire à l'éradication du foyer infectieux. Pour ce qui est du traitement symptomatique, il faut favoriser le transport d'oxygène en assurant une bonne ventilation, maintenir un taux d'hémoglobine supérieur à 10g/dl et corriger les troubles métaboliques, surtout l'acidose métabolique en essayant de maintenir un pH supérieur à 7.2. On aura également recours au remplissage vasculaire pour corriger l'hypotension secondaire au collapsus avec utilisation de catécholamines et de corticoïdes (Popovic *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Physiopathologie du choc septique

Le choc septique est la traduction clinique d'une réponse immunologique exacerbée face à une agression de l'organisme par un agent pathogène à travers une porte d'entrée dont les principales sont pulmonaire, hépato digestive, urinaire, cathéter, cutanée et méningée; dans certains cas aucune porte d'entrée n'est retrouvée (Muckart & Bhagwanjee, 1997). Les germes en cause peuvent être d'origine hospitalière ou non avec le plus souvent une résistance plus importante pour les germes nosocomiaux. Parmi les terrains qui fragilisent la résistance de l'organisme, on retrouve le diabète sucré, l'immunodépression, la corticothérapie, la cirrhose hépatique, le néoplasme, la dénutrition, en plus des facteurs de risques génétiques dont l'influence du polymorphisme génétique du promoteur de CD14 sur le développement et la mortalité du choc septique (Gibot *et al.*, 2002). La présence d'agents pathogènes déclenche une réaction immédiate de l'hôte par la mise en jeu du système immunitaire inné qui constitue le premier rempart à l'invasion des agents pathogènes, exerçant son action dès les premières minutes de l'infection en stimulant, entre autres, le système des monocytes macrophages dont la première mission est de phagocyter et d'éliminer l'agent infectieux et de coordonner la réaction inflammatoire par la synthèse de cytokines et d'autres médiateurs de l'inflammation. Si la réaction inflammatoire reste circonscrite au foyer infectieux, la réaction de l'hôte sera bénéfique car il y aura activation puis inhibition de la coagulation. C'est le cas lorsque l'activation de la coagulation est assez pour contenir dans les mailles du réseau de fibrine les bactéries, les polynucléaires et les macrophages. À l'inverse si cette action est dépassée, il y a généralisation des phénomènes inflammatoires avec atteinte tissulaire. L'atteinte cardiovasculaire signe alors le choc septique. Le système immunitaire inné a également la fonction d'initier la présentation des antigènes microbiens au système lymphoïde, d'induire

la prolifération des lymphocytes T et B puis de diriger des anticorps spécifiquement contre l'agent pathogène en cause tout au long de la vie de l'hôte. C'est ce qu'on appelle l'immunité adaptative et elle met quatre à cinq jours pour se développer et être active (Pulendran *et al.*, 2001).

Les cytokines représentent les facteurs les plus virulents responsables des complications du choc septique. Le "tumor necrosis factor alpha" (TNF $\alpha$ ) semble être responsable de la fièvre (Olivadoti & Opp, 2008), de l'hypotension, du syndrome de détresse respiratoire aigu, des troubles de la coagulation et de la pancréatite aiguë. Les interleukines dont l'IL-1 possèdent une action moins virulente que le TNF $\alpha$ . Le "Granulocyte colony-stimulating factor" (GCSF) et le système du complément sont responsables respectivement de la production accrue de leucocytes et de leur activation (Morimoto *et al.*, 1990). Le système kallikreine-kinine est quant à lui responsable en partie de la vasodilatation et enfin les radicaux libres dont le monoxyde d'azote (NO) constituent des vasodilatateurs puissants responsables de la peroxydation des lipides, ces derniers représentent l'étape ultime des perversions biochimiques du choc septique (Lordal *et al.*, 1997). L'activation de la voie apoptotique se fait par ces mêmes facteurs de l'inflammation et la mort par apoptose des cellules lymphocytes et monocytes jouerait un rôle immunosuppresseur plutôt défavorable (Guillermo *et al.*, 2008). Les cytokines, le TNF $\alpha$  et le NO semblent être responsables d'atteintes mitochondriales (Samavati *et al.*, 2008), le NO semblant agir par compétition avec l'oxygène. L'hypoperfusion tissulaire est aussi responsable des anomalies d'extraction d'oxygène. L'œdème et la séquestration liquidienne dans certains secteurs font suite à l'hypotension causée par une diminution du retour veineux. En effet, il a été démontré qu'une élévation des résistances vasculaires du système porte avait lieu au cours du choc septique et entraîne en amont une séquestration sanguine splanchnique avec une diminution du retour veineux intéressant aussi d'autres secteurs (Nishikawa *et al.*, 2008).

À un stade avancé du choc septique, les cytokines semblent être responsables de l'initiation de la myocardopathie; ainsi le  $TNF\alpha$ , l' $IL-1\beta$  et le NO agissent soit directement sur le myofilament soit par la diminution de l'effet du calcium intracellulaire résultant de l'activation de la guanylate-cyclase soluble, responsable de la production de GMP cyclique. Ces médiateurs ayant une durée de vie brève ne suffisent pas à eux seuls pour expliquer ce dysfonctionnement (Nozaki *et al.*, 1997). Il y a en effet une participation du phénomène apoptotique avec mise en jeu des caspases (Aharinejad *et al.*, 2008). Une dysfonction de la chaîne respiratoire mitochondriale participe aux formes graves de dysfonction myocardique. La libération de la troponine dans le choc septique signe l'ischémie et son importance est en rapport avec la sévérité de l'insuffisance ventriculaire (Scott *et al.*, 2008). Le contexte de l'hypovolémie entraîne une insuffisance rénale fonctionnelle aggravée par une atteinte microcirculatoire liée à la précipitation de complexes, thrombine anti-thrombine au niveau glomérulaire. L'atteinte du système nerveux peut être directe par action des toxines microbiennes (Kim, 2008) ou indirecte par hypo perfusion cérébrale secondaire à l'hypovolémie. Les conséquences sur la coagulation au cours du choc septique que ce soit par le biais des lipopolysaccharides microbiens ou par les médiateurs de l'inflammation entraînent l'activation du facteur tissulaire exprimé à la surface de l'endothélium. Ce facteur peut se lier au facteur VII activé formant ainsi un complexe facteur tissulaire-facteur VIIa qui active à son tour la thrombinoformation. La thrombine transforme le fibrinogène en fibrine qui avec les plaquettes et autres facteurs de la coagulation constitue le thrombus. Ceci entraîne une surconsommation de plaquettes, de fibrinogène et de facteurs anti coagulants comme la protéine C, la protéine S et l'antithrombine III. Il s'en suit ainsi une extension du processus thrombotique aboutissant à une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD). Cette dernière est d'autant plus renforcée par une diminution de la fibrinolyse physiologique par baisse de l'activité de

l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) qui constitue un mécanisme endogène de lutte contre la formation de microthrombose (Iqbal *et al.*, 2002).

### **1.2.2 Signalisation cellulaire au cours du choc septique**

Lors du passage de l'agent pathogène dans l'organisme de l'hôte, il y a activation de nombreux signaux pour déclencher une réponse inflammatoire qui démarre au niveau de la membrane des cellules immunitaires, tels les macrophages et les polynucléaires, et qui se poursuit dans le cytoplasme pour atteindre le noyau et entraîner des modifications de l'expression des gènes codant pour les protéines de l'inflammation. Une signature moléculaire se trouvant à la surface de chaque agent pathogène est appelée "Pathogen Associated Molecular Patterns" (PAMP), identifiée par les récepteurs situés à la surface des cellules du système immunitaire. Ces récepteurs nommés "Toll Like Receptors" (TLR) créent ainsi le complexe de la signalisation qui active le facteur NF- $\kappa$ B lequel déclenche la production d'ARNm responsable de la synthèse des protéines de l'inflammation (Christman *et al.*, 1998). Les bacilles à gram négatif ont comme PAMP, le lipopolysaccharide, et pour récepteur spécifique, le TLR4. Les bacilles à gram positif ont pour PAMP, le peptidoglycan, et pour récepteur spécifique, le TLR2. Récemment, une équipe de Vancouver a découvert un antagoniste du TLR4 et tente de le développer pour le proposer comme éventuel traitement du choc septique (Leon *et al.*, 2008).

### 1.3 Le diabète et le choc septique

Par des mécanismes multiples dont le rôle respectif reste à élucider, le diabète sucré constitue indiscutablement un facteur de risque favorisant les infections sévères, les bactériémies et les décès par maladies infectieuses (Van Cromphaut *et al.*, 2008). On explique la susceptibilité du patient diabétique à développer des infections sévères par un déficit des fonctions antimicrobiennes des polynucléaires neutrophiles et des macrophages (Moutschen *et al.*, 1992). La phagocytose et la microbicidie oxydative requièrent une quantité importante d'énergie dérivant essentiellement de la glycolyse anaérobie. Une étude marquante a démontré dans les polynucléaires neutrophiles du patient diabétique qu'il existe une diminution de 50 % de la consommation de glucose et de la glycolyse (Munroe & Shipp, 1965). Des travaux réalisés au Danemark démontrent l'interférence de glycémies très élevées avec la fonction microbicide des polynucléaires; en effet, des chercheurs ont incubé des polynucléaires neutrophiles de sujets non diabétiques pendant une heure en présence de glucose en concentrations croissantes et démontrent que la génération de superoxyde en réponse à la "N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine" est réduite de moitié pour une glycémie de 25 mmol/L. La "N-formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine" joue un rôle important dans le chimiotactisme et l'activation des leucocytes. Cet effet du glucose s'explique vraisemblablement par l'inhibition de la "glucose-6-phosphate deshydrogenase" dont l'activité est nécessaire à la production de NADPH et donc d'espèces réactives oxygénées dans le leucocyte (Perner *et al.*, 2003). Aussi, il faut rappeler le rôle des récepteurs aux AGE exprimés sur les leucocytes dans l'inflammation et dans le choc septique. Des souris génétiquement déficientes en récepteurs aux AGE consolident l'hypothèse selon laquelle l'axe AGE/RAGE/NF-KB "Advanced Glycation End products/receptor for Advanced Glycation End products/NF-KB" est

important dans la genèse de complications vasculaires et neuropathiques au cours du diabète en diminuant la production de NO, étape qui amplifie aussi les phénomènes inflammatoires systémiques (Liliensiek *et al.*, 2004).

## **1.4 La voie de l'insuline**

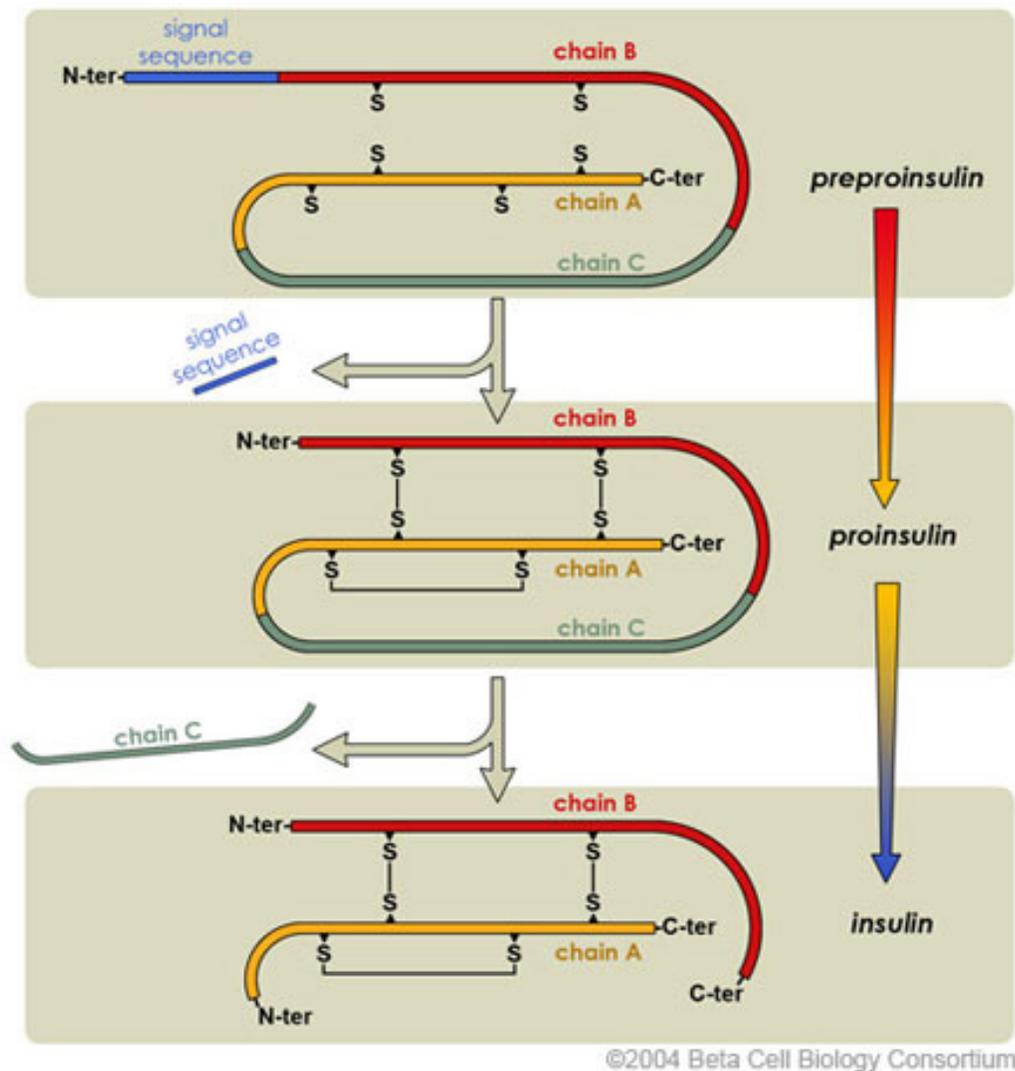
### **1.4.1 L'insuline**

L'insuline est une hormone synthétisée par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas; elle agit sur la majorité des cellules de l'organisme à l'exception des cellules nerveuses. Elle exerce son effet en activant le récepteur de l'insuline entraînant ainsi une cascade de signaux intracellulaires aboutissant à une augmentation de la captation du glucose par le muscle squelettique et le tissu adipeux et à une inhibition de la production de glucose par le foie. Elle stimule le stockage du glucose nouvellement entré dans les tissus périphériques sous forme de glycogène et de triglycérides et favorise son oxydation via la glycolyse. Elle favorise également la capture des acides gras et la synthèse des triglycérides (tissus adipeux), la capture des acides aminés et la synthèse protéique (foie et muscle). L'insuline possède également des propriétés d'un facteur de croissance en stimulant la différenciation et la croissance cellulaire (Vanhorebeek *et al.*, 2005; Van Cromphaut *et al.*, 2008).

### **1.4.2 Structure et production**

L'insuline est une hormone constituée de 2 chaînes polypeptidiques reliées entre elles par 2 ponts disulfures. Une chaîne  $\alpha$  de 21 acides aminés et une chaîne  $\beta$  de 30 acides aminés. Elle est produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas sous la forme d'une pro-insuline constituée d'une seule chaîne peptidique, clivée par une enzyme protéolytique spécifique au cours d'une maturation dans des vésicules intra cytoplasmiques et sécrétée dans l'espace extracellulaire en réponse à une élévation du taux de glucose dans le sang. Dans les vésicules de sécrétion intra cytoplasmiques, les monomères d'insuline

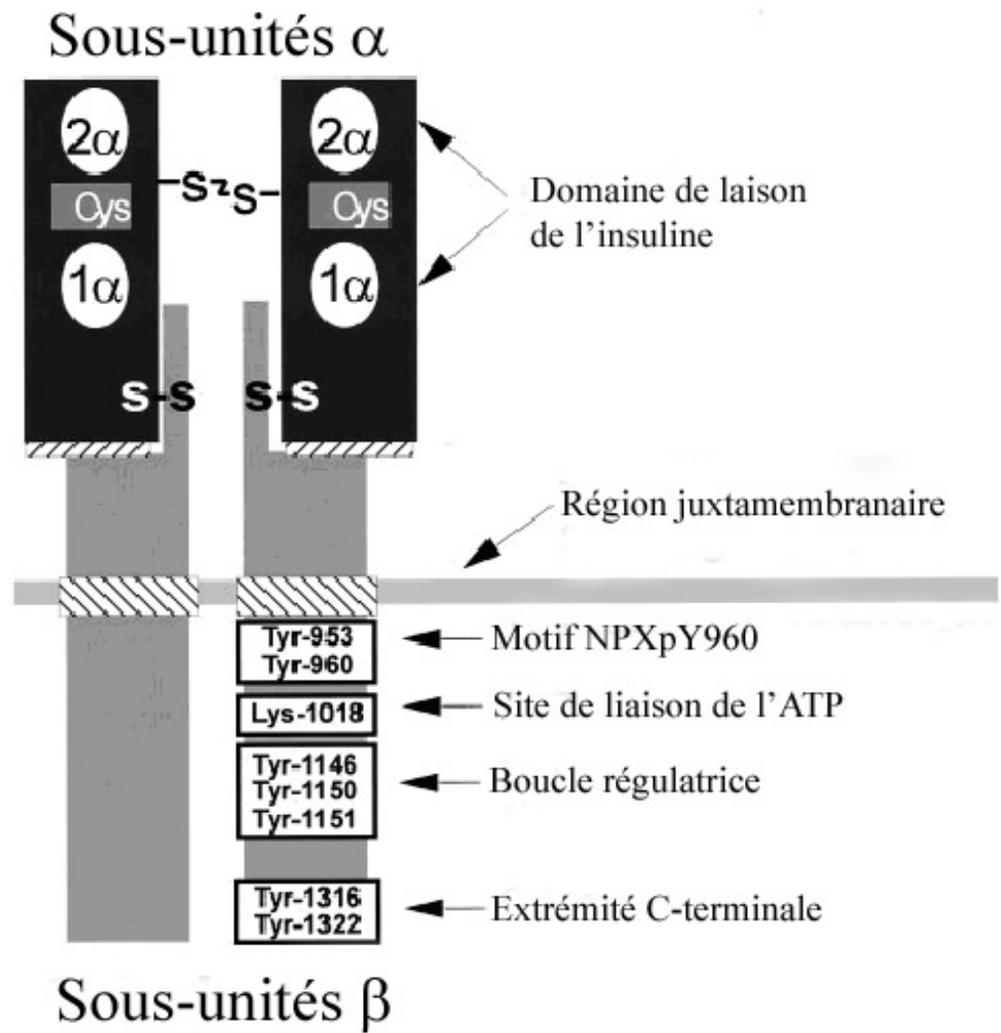
s'assemblent en dimères, puis en hexamères. Les hexamères complexent chacun 2 atomes de zinc et s'empilent pour former une structure quasi-cristalline. Cette structure hexamérique n'est qu'une structure inactive de transport de l'insuline. Par contre, lorsqu'elle est sous forme de monomère, l'insuline possède un effet hypoglycémiant: elle favorise le retour de la glycémie à la valeur basale physiologique. La masse moléculaire de l'insuline est de 5807 daltons.



**Figure 1.** Structure de l'insuline  
[www.beta cell.org](http://www.beta cell.org)

### 1.4.3 Les récepteurs de l'insuline

Le récepteur à l'insuline est un hétérodimère composé de deux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires et de deux sous-unités  $\beta$  transmembranaires reliées par des ponts disulfures. Le récepteur est activé après sa liaison à l'insuline permettant une activation de la tyrosine kinase d'une des deux sous-unités  $\beta$  suivi d'une rapide autophosphorylation des résidus tyrosines des sous-unités transmembranaires : Tyr 960 et 953 [région juxta membranaire], Tyr 1146, 1150 et 1151 [boucle régulatrice] et Tyr 1316 et 1322 [extrémité C-terminale] (White & Yenush, 1998). Une mutation des résidus tyrosines inhibe la phosphorylation des substrats du récepteur de l'insuline et entraîne une absence de réponse biologique induite par l'internalisation du récepteur. Le motif NPXpY960 est responsable de l'internalisation du récepteur (Smith *et al.*, 1996), un processus requis pour l'inactivation du récepteur. Il a été montré que le récepteur de l'insuline, une fois internalisé, maintient une activité tyrosine kinase contenue dans le muscle squelettique des rats alors qu'il est inactivé dans les compartiments intracellulaires des cellules adipeuses et hépatiques (Dombrowski *et al.*, 2000). La phosphorylation des résidus contenus dans la boucle régulatrice (Tyr 1146, 1150 et 1151) module l'ampleur de l'activité tyrosine kinase du récepteur (Wilden *et al.*, 1992). La mutation isolée ou associée de ces résidus entraîne une diminution progressive de l'activité du récepteur envers ces substrats. À l'inverse, le rôle de la phosphorylation des résidus tyrosine de l'extrémité C-terminale (Tyr1316 et 1322) demeure peu connu (Yamamoto-Honda *et al.*, 1993).



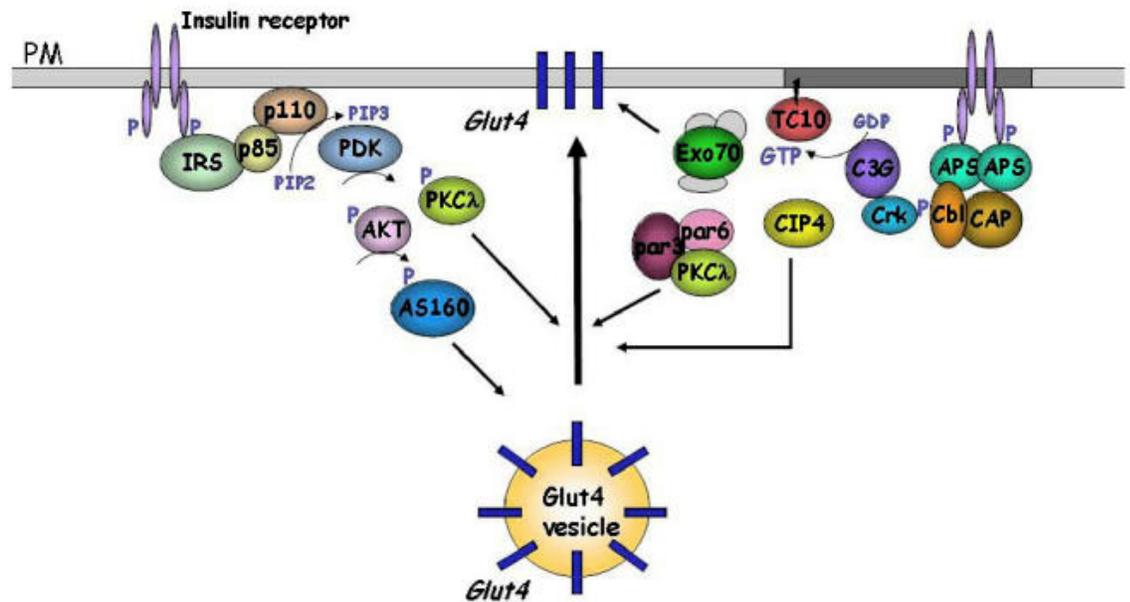
**Figure 2.** Structure du récepteur de l'insuline.

Tiré de White *et al.*, 1997.

#### 1.4.4 Voies de signalisation intracellulaire de l'insuline

Le degré de sensibilité à l'insuline d'une personne se définit par la capacité de l'insuline à favoriser l'utilisation du glucose par les tissus périphériques; cette action est réduite chez les sujets obèses et diabétiques, elle peut être due à un défaut au niveau des transporteurs de glucose. Il est donc important de comprendre les mécanismes par lesquels l'insuline stimule ce processus dans le muscle et le tissu adipeux. L'insuline se lie aux sous-unités  $\alpha$  extracellulaires entraînant une autophosphorylation des sous-unités  $\beta$  transmembranaires qui mène à une activation de l'activité kinase intrinsèque des sous-unités  $\beta$  envers IRS 1-2 "insulin receptor substrate 1-2". Les protéines IRS, une fois phosphorylées sur tyrosine servent de point d'ancrage pour la sous-unité régulatrice p85 de la phosphatidylinositol (PI) 3 kinase qui lorsque liée à l'IRS-1 ou l'IRS-2, active la sous-unité catalytique P110 (Figure 3). La production de PI (3, 4, 5) triphosphate par la PI3-kinase permet l'activation de la "3'-phosphoinositide-dependent protein kinase" (PDK-1/2) qui phosphoryle l'Akt (Thr308 et Ser473) et PKC  $\alpha$  (Thr410). Ces deux kinases ont été proposées comme médiateurs en aval de la PI3-kinase responsable de la translocation de GLUT4 après stimulation insulinique. Aussi, la protéine AS160, ainsi nommée à cause de son poids moléculaire de 160 kDa et substrat de l'Akt, qui est phosphorylée dans les adipocytes 3T3-L1 stimulés par l'insuline est importante pour le transport du glucose (Yuasa *et al.*, 2009). La signalisation induite par le récepteur de l'insuline est aussi responsable de l'augmentation de la phosphorylation de Cbl "Casitas b-lymphoma" sur tyrosine, un processus nécessitant la présence de la protéine APS "adapter protein with a PH and SH2 domain". Cbl est alors recruté par le récepteur de l'insuline avec une seconde protéine adaptatrice CAP. Le complexe CAP-Cbl se dissocie du récepteur de l'insuline et se déplace vers un domaine membranaire enrichi en flotiline et cavéoline où la flotiline forme un complexe ternaire

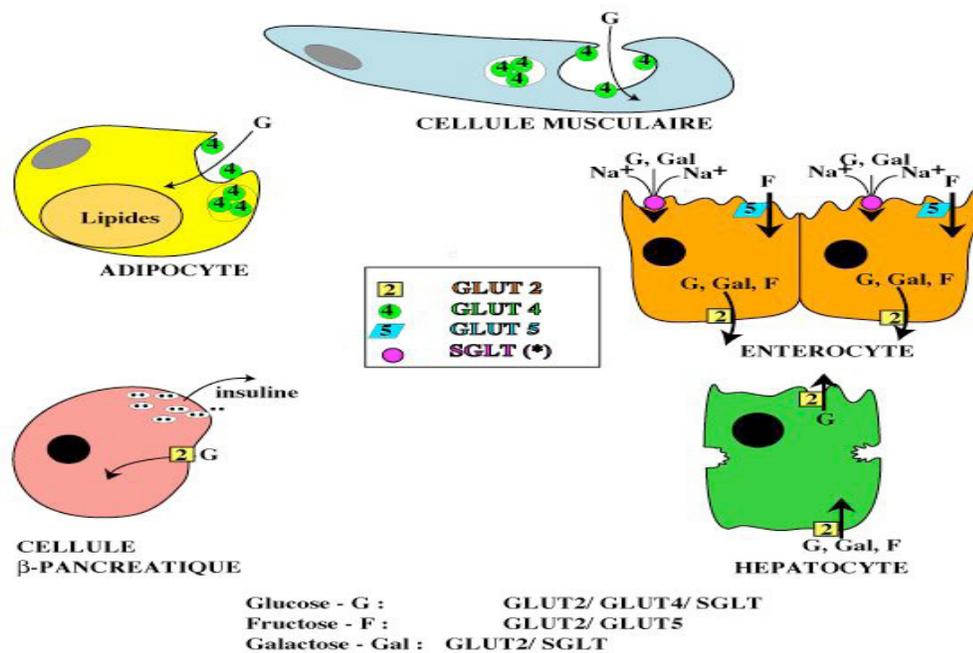
avec CAP et Cbl. Il y a alors mobilisation de CrkII et de C3G vers ce domaine membranaire et l'activation de TC10, une petite protéine liant le GTP de la famille Rho. Il a été suggéré que la protéine TC10 participe à la translocation du GLUT4 via des voies de signalisation impliquant CIP4/2 "cdc42-interacting protein 4/2" et ou N-WASP "neural wiskott-Aldrich syndrome protein". La convergence de ces voies de signalisation serait nécessaire à la translocation de GLUT4 à la surface cellulaire (Ishikura & Klip, 2008) (Figure 3). Le signal se termine par la dégradation de l'hormone après internalisation des complexes insuline- récepteur dans les endosomes. Certains récepteurs sont recyclés à la membrane tandis que d'autres sont dégradés (Capeau, 2005). La déphosphorylation des résidus tyrosines du récepteur et des protéines IRS requiert des tyrosines phosphatases PTP1B, cytosoliques et LAR "leucocyte Common antigene-related molecule" membranaires qui ont été impliqués dans ce processus notamment PTP1B, présente sur les récepteurs intracellulaires en cours d'endocytose (Nieto-Vazquez *et al.*, 2008). Une augmentation de l'activité PTPase dans les muscles des patients diabétiques a été observée et participerait à la résistance de ces tissus à l'insuline. Des inhibiteurs de ces enzymes sont de plus en plus disponibles et constituent des outils thérapeutiques prometteurs. Par ailleurs, la stimulation du récepteur B2 des kinines induit la translocation du GLUT4 par une voie indépendante de l'insuline et de la protéine Kinase C dans différents types cellulaires, en particulier l'adipocyte (Kishi *et al.*, 1998).



**Figure 3.** Schéma représentant les éléments de signalisation intracellulaire activés via le récepteur de l'insuline menant à la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique et au T-tubules des cellules musculaires [Saltiel *et al.*, 2001].

### 1.4.5 Les types de transporteurs de glucose

Le transport du glucose de l'extérieur de la cellule vers l'intérieur nécessite la présence de transporteurs de glucose, les GLUT, situés à la surface de la cellule. On distingue deux types; les transporteurs de glucose dépendant du sodium (SGLT) et les transporteurs de glucose facilités (GLUT). Les GLUT sont regroupés en trois classes; la classe I regroupe les isoformes de GLUT1 à GLUT4. La classe II inclut le transporteur de fructose GLUT5, 7, 9 et 11. Et enfin, la classe III regroupe quant à elle les GLUT 6, 8, 10, 12 et HMIT (cotransporteur de proton /myoinositol) (Joost & Thorens, 2001).



**Figure 4.** Schéma représentant la localisation des différents types de transporteurs de glucose.

Tiré de [http://www.chusa.jussieu.fr/disc/bio\\_cell/PCEM1/Cours/04\\_JC-PF\\_Metabolisme\\_2006-07.pdf](http://www.chusa.jussieu.fr/disc/bio_cell/PCEM1/Cours/04_JC-PF_Metabolisme_2006-07.pdf).

### 1.4.6 Pathologie de la voie de signalisation de l'insuline dans le diabète

La phosphorylation des résidus sérine ou thréonine permet de mettre fin à l'activation physiologique du récepteur à l'insuline. Son exacerbation en pathologie induit une résistance à l'hormone; en effet plusieurs études se sont intéressées récemment à la phosphorylation des résidus Ser/Thr des protéines IRS-1 et IRS-2 qui découplerait ces protéines du récepteur pour arrêter la transduction du signal de l'insuline (Le & Zick, 2001). La phosphorylation peut être induite par plusieurs signaux tels que les acides gras libres, le diacylglycérol, l'acyl-CoA et le glucose, les cytokines inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou l'interleukine-1 $\beta$  (Draznin, 2006). On peut ajouter l'insuline, les enzymes telles que la PKC  $\zeta$ , la kinase IKK $\beta$  "inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B", la MAP kinase et surtout la Jun Kinase (JNK); cette dernière semble particulièrement intéressante. En effet, en phosphorylant la sérine 307 de l'IRS-1 murin (sérine 312 chez l'homme), la JNK empêche l'interaction du domaine PTB de l'IRS1-2 avec la tyrosine 960 phosphorylée du RI et induit un état de résistance à l'insuline. Cette kinase est activée par l'insuline elle-même, ce qui pourrait expliquer l'insulino-résistance associée aux états d'hyperinsulinémie (Lee *et al.*, 2003). D'autres mécanismes sont également impliqués dans la régulation négative du signal de l'insuline: la déphosphorylation des phosphoinositides par des phosphatases lipidiques comme PTEN "phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten" et SHIP "Src homology2-domain- containing inositol 5-phosphatase" qui renversent le signal de la PI3 kinase. Certaines protéines sont capables de se lier au récepteur et de bloquer la transmission du signal, comme les membres de la famille GRB7, 10 et 14. Cette dernière utilisant la protéine ZIP "protein Kinase C  $\zeta$  interacting protein" et la PKC $\zeta$  (pour le rétrocontrôle du RI) et les protéines de la famille SOCS "suppressor of cytokine signaling" impliquées dans la régulation négative de la signalisation par les cytokines. La régulation

de la quantité des protéines substrats IRS qui sont dégradées après ubiquitination va contrôler la réponse à l'insuline.

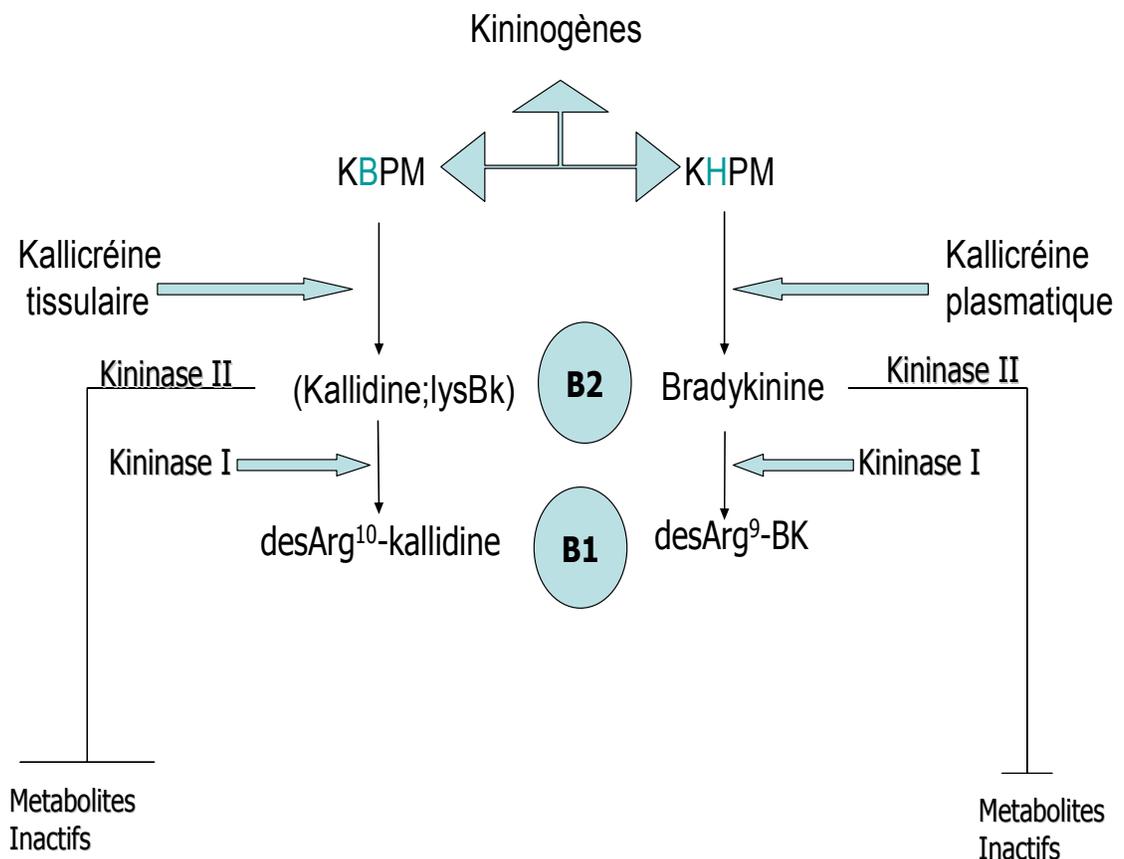
## **1.5 Système kallicréine-kinine (SKK)**

Le SKK est un système peptidergique complexe comprenant des enzymes de synthèse, les kallicréines, leurs substrats, les kininogènes et les peptides vasoactifs, les kinines. Ces dernières sont libérées à la suite de lésions tissulaires à partir des kininogènes sous l'action de la kallicréine plasmatique ou de la kallicréine tissulaire activée par des protéases produites au sein de la lésion (Bhoola *et al.*, 1992b). Des études récentes ont démontré que l'activité des kallicréines tissulaires chez l'homme et l'animal avait un rôle protecteur vis-à-vis les effets du diabète et de l'ischémie cardiaque (Pizzard *et al.*, 2008). Ce système pourrait jouer un rôle de neuromédiateurs dans certaines fonctions cérébrales notamment dans le contrôle des informations nociceptives et de la pression artérielle (Cloutier & Couture, 2000; Couture & Lindsey, 2000).

### **1.5.1 Biosynthèse des kinines**

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

associée au kininogène de haut poids moléculaire (KHPM), est convertie par le facteur de Hageman activé en kallibréine. Le traitement du KHPM par la kallibréine active libère la BK. La kallibréine tissulaire est activée par des enzymes protéolytiques; elle assure le clivage du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM) pour former la KD (Figure5). La T-kinine est présente uniquement chez le rat. Les KHPM et KBPM proviennent d'un seul gène, le gène *K*, et résultent de la transcription de deux ARNm différents (Gabra *et al.*, 2003).

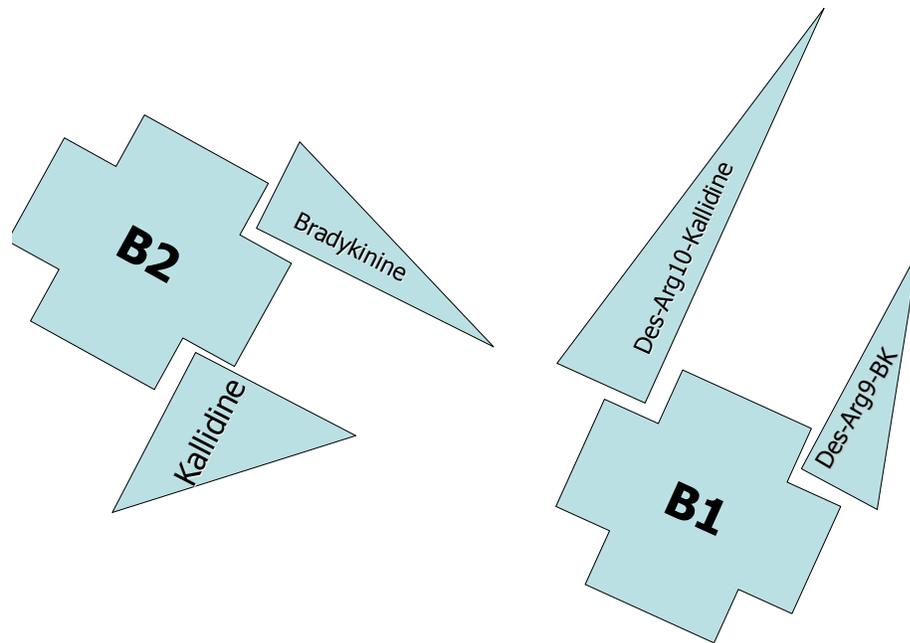


**Figure 5.** Schéma illustrant le système kallibréine-kinine.

### 1.5.2 Les kinines et leurs récepteurs

Les kinines sont des peptides vasoactifs et des neuromédiateurs centraux impliqués dans le contrôle cardiovasculaire, l'inflammation et la douleur. Elles exercent leurs effets via deux types de récepteurs membranaires couplés aux protéines G; un récepteur B2 (RB2) constitutif et un récepteur B1 (RB1) inductible en présence de cytokines pro-inflammatoires, d'endotoxines ou après lésion tissulaire. Le RB2 participe à la phase aiguë de l'inflammation alors que le RB1 trouve surtout son rôle dans la phase chronique de la réponse inflammatoire où il est l'acteur principal des pathologies à forte composante immune comme le diabète ou le choc septique. Ceci justifie l'utilisation d'antagonistes de ces récepteurs comme agents thérapeutiques (Couture *et al.*, 2001; Gabra *et al.*, 2003).

Les récepteurs B1 et B2 des kinines ont été clonés et définis sur la base de critères pharmacologiques par l'usage d'agonistes peptidiques et non peptidiques (Regoli *et al.*, 2001). Ces récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G ( $G_{\alpha q}$  /  $G_{\alpha i}$ ) à sept domaines transmembranaires. Le RB1 a pour agoniste la desArg9-BK et la desArg10-KD alors que le RB2 se trouve la cible préférentielle de la BK, la KD et la T-kinine (Marceau & Bachvarov, 1998) (Figure 6).



**Figure 6.** Représentation schématique des récepteurs des kinines et leurs agonistes

### 1.5.2.1 Le récepteur B1 des kinines

Le RB1 des kinines est absent ou sous exprimé en situation physiologique normale; il est induit et surexprimé à la suite de lésions tissulaires ou après l'exposition à des endotoxines bactériennes ou à des cytokines tels que IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$ . Cette induction est contrôlée par la MAP-Kinase, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la protéine kinase p38 activée par le stress (Larrivee *et al.*, 1998; Ganju *et al.*, 2001). Des études *in vivo* suggèrent que l'activation du RB2 peut également induire l'expression du RB1 probablement par la production autocrine de cytokines et/ou sa désensibilisation par séquestration (Couture *et al.*, 2001). L'activation du RB2 peut également activer directement le NF- $\kappa$ B qui à son tour induit l'expression du RB1 (Phagoo *et al.*, 1999). Le RB1 joue un rôle dans la phase chronique de l'inflammation et de la douleur. Son activation chronique peut probablement

être amplifiée par l'accumulation de la des-Arg<sup>9</sup>-BK au site de l'inflammation (Couture *et al.*, 2001).

### **1.5.2.1.1 Rôles du récepteur B1 des kinines**

#### **1.5.2.1.1.1 Dans le diabète sucré**

Le diabète de type 1 implique la présence d'une hyperglycémie persistante avec surproduction des cytokines pro-inflammatoires et d'espèces réactives oxygénées. Le stress oxydatif qui en résulte active le facteur NF-κB, (Yerneni *et al.*, 1999), lequel est impliqué dans l'induction du RB1 (Moreau *et al.*, 2007). Le RB1 des kinines est induit et surexprimé dans plusieurs organes chez le rat diabétique ayant reçu la STZ (Mage *et al.*, 2002; Ongali *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005). La STZ est un antibiotique toxique pour les cellules β pancréatiques à l'origine d'un état inflammatoire chronique marqué par la libération de cytokines pro-inflammatoires. Celles-ci activent également le facteur NF-κB qui est une voie d'induction du RB1. Le modèle induit par la STZ est le plus utilisé pour étudier le rôle du RB1 dans le diabète de type 1 (Zuccollo *et al.*, 1996).

#### **1.5.2.1.1.2 Dans la douleur inflammatoire**

Des données expérimentales suggèrent que le RB1 des kinines est impliqué dans le contrôle de la douleur inflammatoire. Des études en immunohistochimie ou par autoradiographie ont montré une expression basale du RB1 dans les ganglions sensoriels et dans les terminaisons nerveuses centrales et périphériques des neurones sensoriels (fibres Aδ et C) chez le rat de même que dans la corne dorsale chez l'homme (Couture *et al.*, 2001; Yamaguchi-Sase *et al.*, 2003; Ongali *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2007). Pesquero *et al.* (2000) ont montré une réduction du phénomène de sensibilisation aux stimuli

nociceptifs chez la souris knock-out B1, avec une perte de la sensibilité aux stimuli chimiques et thermiques. Le rôle du RB1 dans le contrôle normal des informations douloureuses chez l'animal sain, reste incertain. En effet, les agonistes de ce récepteur n'ont pas d'effet sur la nociception chez des rats normaux ou dans des modèles d'inflammation aiguë (Calixto *et al.*, 2000). Les antagonistes pharmacologiques du RB1 causent une analgésie uniquement dans des modèles animaux d'hyperalgésie mécanique et thermique persistante, d'origine inflammatoire, ou dans la douleur viscérale soutenue. Ces résultats peuvent être expliqués par l'induction du RB1 sur des cellules autres que les neurones sensoriels (macrophages, fibroblastes ou les cellules endothéliales) où ils peuvent être responsables de la libération de médiateurs (PG, cytokines et NO) qui sensibilisent et activent les nocicepteurs (Couture *et al.*, 2001).

#### **1.5.2.1.1.3 Dans l'œdème et la perméabilité vasculaire**

L'induction du RB1 par les cytokines et les LPS a été étudiée dans l'œdème (deBlois & Horlick, 2001; Seguin *et al.*, 2008). Cette réponse inflammatoire relayée par le RB1 est liée à la libération de la substance P (SP) et de "calcitonin gene-related peptide" (CGRP) à partir de fibres sensorielles de type C, à la production de sérotonine et de prostaglandines (Le Bars & Adam, 2002). Le RB1 semble aussi impliqué dans le développement des réponses inflammatoires locales dans des modèles d'arthrite aiguë et chronique chez le rat (œdème de la patte, œdème articulaire) (Bhoola *et al.*, 1992 a), dans les phénomènes inflammatoires de la rétinopathie diabétique (Abdough *et al.*, 2008) et dans certains aspects des manifestations inflammatoires intestinales (Stadnicki *et al.*, 2005a; Stadnicki *et al.*, 2005b). Son inhibition par des antagonistes sélectifs paraît prometteur dans le traitement de l'œdème lors de l'inflammation (Colman *et al.*, 1998).

La libération de substances pro-inflammatoires tels que la SP et le CGRP par la BK amplifie les phénomènes inflammatoires et entraîne une extravasation plasmatique. La SP produit également une vasodilatation *via* la libération de NO par les cellules endothéliales ce qui augmente le flux sanguin. Les travaux de (Seguin *et al.*, 2008) montrent plutôt un rôle protecteur du récepteur B1, en effet il a été observé une mortalité post LPS plus élevée chez les souris “knock-out B1” vs “wild type”. Ce rôle protecteur du B1 dans cette dernière étude n’a pas été élucidé et n’est pas nécessairement lié à l’œdème ou à une augmentation de la perméabilité vasculaire.

### **1.5.2.2 Le récepteur B2 des kinines**

#### **1.5.2.2.1 Distribution**

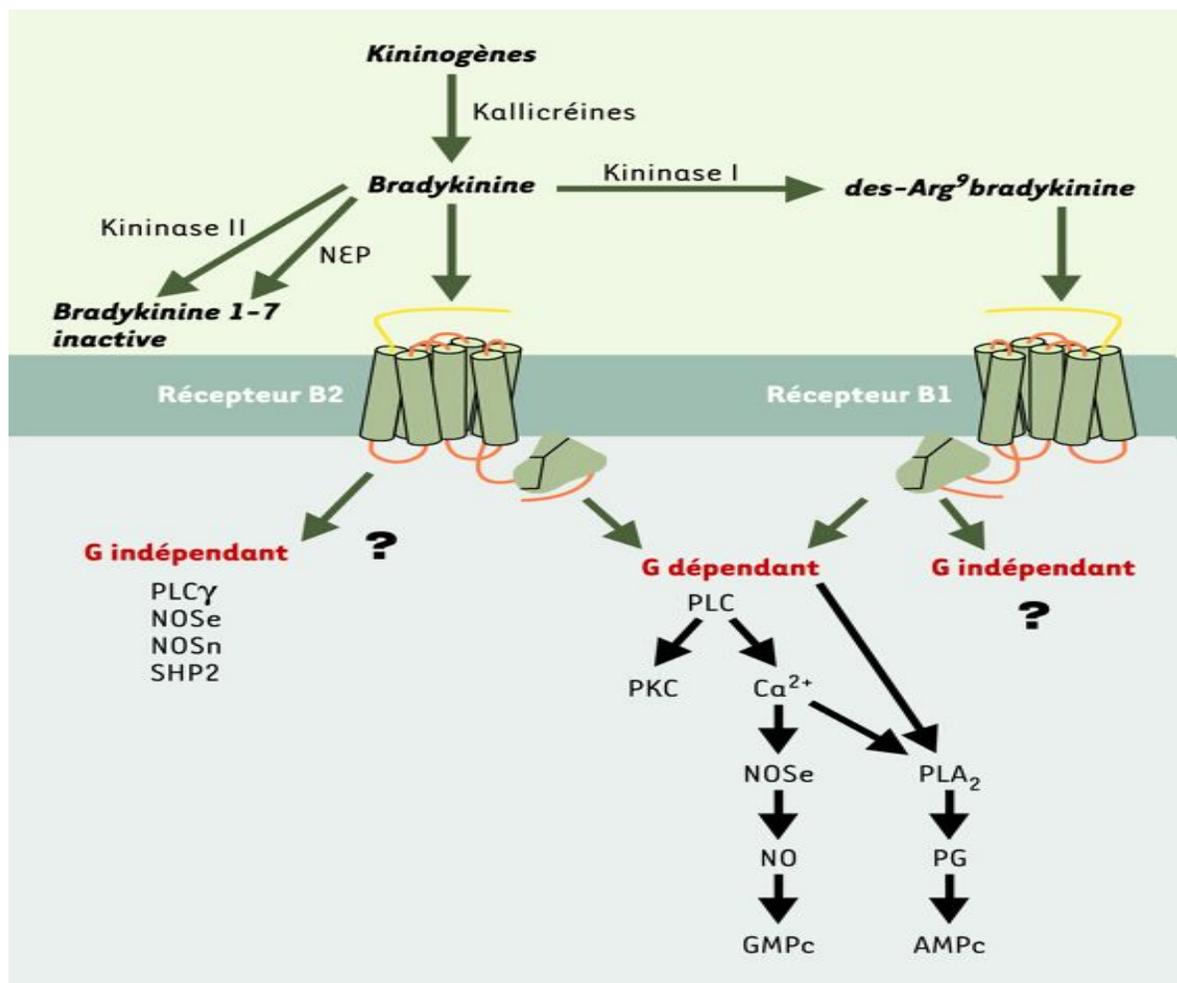
Le RB2 est distribué de façon ubiquitaire, présent sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules épithéliales et mésangiales, certains neurones, les astrocytes et les polynucléaires neutrophiles (Bhoola *et al.*, 1992).

#### **1.5.2.2.2 Fonctions**

Le RB2 est impliqué dans la vasomotricité, surtout la vasodilatation via le NO; il est aussi impliqué dans l’augmentation de la perméabilité vasculaire, l’œdème et la douleur (Couture *et al.*, 2001). Le RB2 aurait des propriétés antifibrosantes via la bradykinine à l’inverse du RB1 (Wollert & Drexler, 1997) et un rôle anti-hypertrophique (Tsuchida *et al.*, 1999). La stimulation du RB2 induit l’activation des récepteurs nociceptifs polymodaux et l’hyperalgésie par la production de DAG et l’activation de la PKC (Dray, 1997). Pour une revue plus exhaustive, le lecteur est référé à la revue de Couture & Girolami (2004).

### 1.5.3 Signalisation cellulaire des récepteurs des kinines

Les récepteurs des kinines sont couplés au GPCR et sont connus pour activer la protéine  $G_{\alpha q}$ . Celle-ci est couplée à l'activation de la phospholipase C qui induit la scission du phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP<sub>2</sub>) et produit la diacylglycérol (DAG) et l'inositol-triphosphate (IP<sub>3</sub>). Ces seconds messagers induisent une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire via l'activation des canaux IP<sub>3</sub>R situés sur le réticulum sarcoplasmique. En outre, de récents travaux suggèrent que le B2R pourrait emprunter des voies de signalisation indépendantes des protéines G (Figure 7).



**Figure 7.** Voies de transduction du signal associée à l'activation des récepteurs B1 et B2 (Bascands *et al.*, 2003).

#### 1.5.4 Pharmacologie et biochimie des kinines

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



C'est grâce aux travaux de Regoli *et al.*, 1977 qu'on doit la nomenclature et l'analyse des récepteurs de la BK. Les auteurs ont proposé la nomenclature des récepteurs B1 et B2 qui demeure celle en vigueur (Regoli *et al.*, 1978). Depuis, un grand nombre d'agonistes et d'antagonistes B1 et B2 ont été synthétisés et leur profil pharmacologique a été évalué.

##### 1.5.4.1 Les agonistes du récepteur B1

Les deux agonistes naturels pour le récepteur B1, le des-Arg<sup>10</sup>-KD et le des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été évalué sur plusieurs systèmes contractiles (veines jugulaire de lapin, veine portale du rat) ou relaxant (artère rénale du chien dépourvue d'endothélium). L'ensemble des données obtenues avec ces études révèle que l'activité du des-Arg<sup>10</sup>-KD est plus forte que celle du des-Arg<sup>9</sup>-BK chez l'homme, le lapin et le cochon (Regoli *et al.*, 2001). La différence d'affinité entre le des-Arg<sup>10</sup>-KD et le des-Arg<sup>9</sup>-BK peut s'expliquer par une co-évolution du gène codant pour le récepteur B1 et du gène codant pour le kininogène afin de garder une fonction physiologique optimale suivant l'activation du récepteur B1 (Marceau *et al.*, 1998; Regoli *et al.*, 2001). Cette théorie est soutenue par le fait que dans le kininogène du rat et de la souris, la séquence de la BK est précédée par une Arginine (Furuto-Kato *et al.*, 1985; Hess *et al.*, 1996) alors que le kininogène humain contient la séquence pour la Lys-BK (Müller-Esterl., 1992). À partir de la structure de la Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK, des modifications ont été apportées pour améliorer sa résistance au métabolisme. L'agoniste B1 synthétique, le Sar-[D-Phe<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK a une forte affinité et sélectivité pour le

récepteur B1 (Drapeau *et al.*, 1991; 1993); il est 7 fois plus puissant que le des-Arg<sup>9</sup>-BK mais 11 fois moins puissant que le Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (Lévesque *et al.*, 1995). Il a été bénéfique pour démontrer la présence du récepteur B1 sur les cellules endothéliales du cerveau humain (Prat *et al.*, 2000) et pour montrer son implication dans l'effet cardiovasculaire produit par l'injection i.c.v. de kinines chez le SHR "spontaneously hypertensive rat" et le WKY "Wistar-Kyoto" (Emanueli *et al.*, 1999). Cet agoniste s'avère donc un bon outil pour démontrer la présence fonctionnelle du récepteur B1.

#### 1.5.4.2 Les antagonistes du récepteur B1

Le premier antagoniste B1, le [Leu<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK a été mis au point par l'équipe de Regoli (1997). L'ajout de l'acide aminé Lysine en N-terminal de cet antagoniste augmente par un facteur de 10 son affinité pour le récepteur B1 (Drouin *et al.*, 1979). Le Lys-[Leu<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK et le [Leu<sup>8</sup>]-des-Arg<sup>9</sup>-BK ont été les deux antagonistes B1 les plus utilisés et ont permis de suggérer la contribution du récepteur B1 dans plusieurs maladies expérimentales telles que l'hypertension artérielle, le diabète de type1, la septicémie et l'inflammation (Marceau *et al.*,1998). Ces antagonistes possèdent quelques limitations à cause de l'activité agoniste résiduelle chez certaines espèces en plus d'être métabolisés rapidement.

L'antagoniste B1, AcLys [D-βNal<sup>7</sup>,Ile<sup>8</sup>]des-Arg<sup>9</sup>-BK(R715) a été développé par l'équipe de Regoli (Gobeil *et al.*,1996). Cet antagoniste n'a montré aucun effet agoniste partiel et il est un antagoniste de type compétitif chez l'homme, le lapin et la souris (Regoli *et al.*, 1998). L'antagoniste non peptidique, le SSR240612, a été développé par la compagnie pharmaceutique Sanofi-Aventis; il est actif par voie orale (Gougat *et al.*, 2004). Il est efficace dans plusieurs modèles de douleur et d'inflammation *in vivo*. Son administration par voie intrapéritonéale (0,3-1 mg/kg) réduit de façon dose-dépendante l'œdème causée par la des-Arg<sup>9</sup>-BK chez des souris traitées par l'interleukine 1β. Son administration par voie orale diminue l'œdème de la patte chez les souris traitées avec l'IL1β, la des-Arg<sup>9</sup>-BK ou la capsaïcine. L'efficacité de l'administration par voie orale du SSR240612 a aussi été démontrée dans des modèles de pleurésie induite par la caragénine et de douleur neuropathique chez la souris (Campos *et al.*, 2004).

Un autre antagoniste non peptidique, LF220542, au profil compétitif pour le B1 s'est avéré efficace dans le traitement de la douleur neuropathique et inflammatoire (Porreca *et al.*, 2006). D'autres études ont montré l'efficacité d'antagonistes du RB1 développés à partir de

plantes naturelles, la *Mendevilla Vellutina*, laquelle possède un rôle anti oedématogénique chez les rats prétraités par le des-Arg<sup>9</sup>-BK (Calixto *et al.*, 1998). Des antagonistes B1 non peptidiques ont été développés à partir du composé Alkylamino-5-sulfamoylbenzamide, lesquels seraient actifs sur la douleur inflammatoire (Ritchie *et al.*, 2004).

#### **1.5.4.3 Les agonistes du récepteur B2**

La BK demeure l'agoniste le plus utilisé. Il existe d'autres agonistes synthétiques pour le récepteur B2, le [Tyr(Me)<sup>8</sup>]-BK et le [Hyp<sup>3</sup>,Tyr(Me)<sup>8</sup>]-BK, lesquels sont des agonistes B2 plus actifs que la BK (Barabé *et al.*, 1997) mais qui sont peu utilisés du fait qu'ils ne sont pas commercialement disponibles. La BK a soulevé un intérêt clinique du fait qu'elle augmente la perméabilité de la barrière hématoencéphalique et permet à des agents anticancéreux de mieux pénétrer dans le cerveau. Le Cereport<sup>®</sup> formellement appelé (RMP-7) a été développé comme agoniste du RB2 avec une plus grande résistance au métabolisme que la BK (Straub *et al.*, 1994). Cet agoniste est efficace pour augmenter la concentration d'agents chimiothérapeutiques à l'intérieur de tumeurs cérébrales (Emerich *et al.*, 2001). L'agoniste non peptidique FR 190997 (Aramori *et al.*, 1997) semble se comporter plutôt comme un antagoniste B2 chez l'humain et le cochon (Regoli *et al.*, 2001).

#### **1.5.4.4 Les antagonistes du récepteur B2**

On distingue 3 générations d'antagonistes B2.

La première génération décrite par le groupe de Vavrek et Stewart (1985), toujours à partir de la structure de la BK avec des remplacements de la Proline en position 7 par un acide aminé D-aromatique, la D-phénylalanine (D-Phe), a produit un premier antagoniste B2, le [D-Phe<sup>7</sup>]-BK. Les composés de cette génération se sont révélés limités en raison de leur

activité agoniste partielle sur certaines préparations tissulaires, de leur activité antagoniste relativement faible et de leur pauvre sélectivité pour le récepteur B2 (Regoli *et al.*, 1993).

La deuxième génération est marquée par le HOE140 (D-Arg-[Hyp<sup>3</sup>,Thi<sup>5</sup>,D-Tic<sup>7</sup>,Oic<sup>8</sup>]-BK) mis au point par la compagnie Hoechst (Hock *et al.*, 1991); cet antagoniste se caractérise par une forte affinité et sélectivité pour le récepteur B2. Cependant, le HOE 140 est un peptide relativement large et ne possède pas les propriétés pharmacocinétiques favorables pour une application thérapeutique chez l'homme. C'est dans cette optique que la troisième génération d'antagonistes du récepteur B2 a été lancée en synthétisant des molécules non peptidiques destinées à l'administration orale. Le premier prototype, le WIN 64338, a été synthétisé par la compagnie pharmaceutique Sterling Winthrop (Salvino *et al.*, 1993). Ce dernier s'est avéré presque inactif chez l'homme (Regoli *et al.*, 1998). Peu de temps après, le FR 173657 a été proposé par la compagnie pharmaceutique Fujisawa (Asano *et al.*, 1997) et représente le premier antagoniste B2 actif oralement. C'est à partir de sa structure que la compagnie pharmaceutique Fournier a élaboré d'autres antagonistes non peptidiques dont le LF 16.0687 qui semble prometteur d'après les résultats obtenus *in vivo* dans divers modèles animaux de traumatismes crâniens (Shultz *et al.*, 2000; Plesnila *et al.*, 2001).

## **1.6 La problématique de l'étude**

### **1.6.1 Problématique et objectifs**

L'Organisation Mondiale de la Santé rapporte plus de 180 millions de diabétiques dans le monde et prévoit que ce nombre doublera avant 2030 (Rathmann & Giani, 2004). On estime qu'à chaque 10 secondes, deux personnes développent le diabète dans le monde et qu'une personne meurt des suites des complications diabétiques. De plus, le diabète sucré constitue indiscutablement un facteur favorisant les infections sévères, les bactériémies et les décès par maladies infectieuses. Le décès par choc septique à la suite d'une infection sévère au cours du diabète est une situation malheureusement assez fréquente dans les unités de soins intensifs, situation difficile à gérer en plus des coûts générés par les établissements de santé. En effet, le coût moyen annuel des soins administrés aux patients atteints de choc septique est estimé à environ \$16.7 milliards (Hodgin & Moss, 2008). Une meilleure compréhension des étiologies et des mécanismes impliqués dans le développement du diabète et de ses complications pourrait nous permettre de développer une approche thérapeutique plus adaptée et efficace. C'est pour cette raison que la recherche dans ce domaine doit continuer et constituer une priorité. À l'heure actuelle, beaucoup de paramètres, entre autres éthiques, nous limitent dans l'expérimentation sur les sujets humains ce qui justifie l'utilisation de modèles animaux. Fort heureusement, un modèle de diabète de type 1 à notre portée représente les aspects recherchés de l'association pathologique à étudier. Ce modèle a été élaboré sur la base de la physiopathologie du diabète de type 1; c'est à dire basé sur l'insulinopénie ou l'absence de production d'insuline par le pancréas après injection de streptozotocine. Ce dernier est un agent de chimiothérapie de type alcalin extrait de *Streptomyces Acromogenes* et qui est sélectivement toxique pour

les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans du pancréas (Like & Rossini, 1976). Le deuxième aspect de la maladie développé dans notre modèle est le choc septique par l'injection de lipopolysaccharides bactériens à une dose suffisante pour induire tous les signes relatifs d'un syndrome inflammatoire systémique. Ainsi, ce modèle reflète bien les conditions observées dans la population humaine où le choc septique se développe au cours de l'évolution naturelle d'un diabète compliqué d'une infection microbienne et qui présente les lésions secondaires à cette association pathologique.

### **1.6.2 Hypothèse**

Ce projet étudie d'abord le RB1 des kinines puisqu'il est induit et surexprimé pendant le diabète et le choc septique. En effet, il a été montré que le LPS augmente l'expression du RB1 dans plusieurs tissus ainsi que la température corporelle. De plus, l'hyperglycémie mène à un stress oxydatif résultant de la production d'espèces réactives oxygénées qui activent le NF $\kappa$ B, lequel induit l'expression du RB1. Une relation a donc pu être établie entre l'induction de ce récepteur et les différentes atteintes organiques. Notre hypothèse de travail est que le RB1 puisse contribuer à l'exacerbation du choc septique pendant le diabète, et en particulier dans la phase chronique. Ce récepteur peut donc s'avérer une cible thérapeutique potentielle dans le traitement de la co-morbidité associée à ces deux maladies. Notre travail vise à étudier l'expression et la fonction du RB1 dans un modèle de rat diabétique traité au LPS. Un antagoniste non peptidique de ce récepteur sera administré pour étudier la participation du RB1 dans les complications associées au choc septique dans le diabète.

## **CHAPITRE 2 - MATÉRIELS ET MÉTHODES**

## 2.1 Protocoles

Notre étude a été approuvée par le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux de l'Université de Montréal. Nous avons utilisé des rats mâles Sprague-Dawley (Charles River Laboratories, St Constant, Qc, Canada) pesant 225-250 g, hébergés deux par cage dans les conditions requises de température (23°C) et d'humidité (50%), et soumis à un cycle de 12h lumière/noirceur pendant une semaine, avec régime alimentaire normal (Charles River Rodent n° 5075). Les rats ont été divisés en sept groupes de 8 rats : groupe 1 (témoins), groupe 2 (STZ), groupe 3 (LPS), groupe 4 (STZ+LPS), groupe 5 (STZ+SSR240612), groupe 6 (LPS+SSR240612), groupe 7 (STZ+LPS+SSR240612). Le LPS (2mg/kg, i.v.) a été administré aux groupes 3, 4, 6 et 7, quatre jours après l'induction du diabète avec la STZ (65mg/kg, i.p.) ou l'injection du véhicule. SSR240612 (10 mg/kg) a été administré par gavage immédiatement après le LPS et 12 h plus tard. L'effet de l'antagoniste RB1 sur la température rectale a été mesuré à toutes les heures pendant 24h avec un thermomètre digital. Les deux traitements avec l'antagoniste RB1 (10 mg/kg) ont eu lieu 24h et 12h avant le sacrifice qui a été pratiqué chez le rat après 8h de jeun. Ainsi, 24h après traitement au LPS et/ou 4 jours après STZ ou le véhicule, les rats ont été sacrifiés par section des carotides sous anesthésie à l'isoflurane. Le sang et plusieurs organes (cœur, rein, foie, poumon, aorte) ont été prélevés afin de mesurer les taux plasmatiques d'insuline, l'œdème, l'exsudation plasmatique (extraction du bleu d'Evans) et l'expression des récepteurs B1 et B2 des kinines par RT-PCR en temps réel (cœur et cortex rénal). La glycémie a été mesurée juste avant le sacrifice à partir d'une goutte de sang obtenue par piqûre de la queue.

## 2.2 Mesure de la température corporelle

La température de référence est celle qui règne au centre de l'organisme, un endroit où il est difficile d'accéder. La mesure de la température corporelle doit concilier la facilité de la prise de température avec la nécessité de s'approcher au mieux des conditions internes. La mesure de la température interne des rats traités a été réalisée à l'aide d'un thermomètre à affichage digital classique thermosouple (l'embout est souple donc moins de risque pour les rats gigoteurs) bien désinfecté, enduit de vaseline à l'embout et introduit dans l'anus à une distance de 2 cm en raison de la morphologie des rats mâles adultes. Dans les conditions normales, la température des rats est de 37 °C (Byeong *et al.*, 2005).

## 2.3 Mesure de la glycémie

La mesure de la glycémie a été réalisée chez les rats à jeun selon les recommandations de l'organisation mondiale de la santé pour le dépistage et le diagnostic du diabète (Genuth *et al.*, 2003) en utilisant un glucomètre avec piqueur et languettes d'analyse (ACCU-CHEK, Roche). Le prélèvement sanguin se fait avec une légère piqûre au moyen d'une aiguille stérile au niveau de l'extrémité distale de la queue du rat afin d'obtenir une goutte de sang qui sera apposée sur la bandelette qui effectue le dosage après son introduction dans le lecteur automatique.

## 2.4 Le dosage de l'insuline

La mesure de l'insuline libre plasmatique a été faite grâce à une trousse commerciale d'essai radioimmunologique utilisant des anticorps polyclonaux reconnaissant les

proinsulines sur les échantillons de sang de rats mis à jeun la veille du sacrifice (Linco Research, St Charles, Missouri, USA).

## **2.5 Mesure de l'œdème**

L'œdème est une accumulation anormale de liquide dans les tissus du corps. Nous l'avons mesuré par la technique suivante : soustraction du poids sec des organes à étudier du poids humide mesuré au moment du prélèvement après sacrifice. Les valeurs obtenues reflètent la quantité d'eau (en gramme) retenue dans les tissus.

## **2.6 Mesure de la perméabilité vasculaire**

L'augmentation de la perméabilité vasculaire a été mesurée par la quantification du colorant bleu d'Evans (Sigma-Aldrich, CANADA) lié à l'albumine dans les différents tissus cibles (cœur, rein, aorte, foie, poumon). L'injection du bleu d'Evans à raison de 35 mg/kg par voie intra veineuse a été effectuée 20 minutes avant le sacrifice. Les organes à étudier ont été prélevés et mis dans la formamide (tubes de 8ml) pendant 48h à 60 °C. La lecture de la densité optique des échantillons a été réalisée avec un spectrophotomètre à 620 nm.

## **2.7 PCR quantitatif en temps réel**

L'expression du RB1 dans le cœur et dans le rein a été mesurée par la méthode quantitative de la réaction en chaîne par polymérase en temps réel (Q-PCR). C'est une technique basée sur une réaction enzymatique; la polymérase II, qui consiste à amplifier l'ADN de manière quantitative au moyen d'un chromophore (Friedberg, 2006). En effet, à chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN total ou d'amplicon (un fragment d'ADN amplifié par

PCR) est mesurée grâce à une sonde fluorescente, le SYBER Green (QIAGEN, Valencia, CA, USA). L'obtention de la cinétique complète de la réaction de polymérisation permet d'obtenir une quantification absolue de la quantité initiale d'ADN cible, chose qui était difficile à réaliser en PCR où la quantité d'ADN n'est mesurée qu'à la fin de la réaction. Le SYBER Green est un agent intercalant qui ne se lie qu'à l'ADN double brin et émet une fluorescence. La Q-PCR utilise donc ce fluorophore pour mesurer la quantité d'ADN double brin produite au cours de la réaction. Grâce à sa très grande stabilité, il permet d'exécuter un grand nombre de cycles sans dégradation de la fluorescence émise. De plus, puisque plusieurs molécules de SYBER Green peuvent se lier à l'ADN, la fluorescence émise sera d'autant plus intense que l'amplicon est grand.

Brièvement, les rats sont décapités, les tissus d'intérêts prélevés et déposés dans une solution de stabilisation de l'ARN (*RNAlater stabilization reagent*). L'ARN total est ensuite extrait tel que décrit par le manufacturier. L'ADN complémentaire est synthétisé à partir de 400 ng d'ARN total au moyen d'amorces dégénérées, fourni dans le *QuantiTect Rev Transcription Kit* (QIAGEN). Le PCR quantitatif est réalisé au moyen de la sonde SYBER Green tel que décrit par Aoki *et al.* (2002). Le signal fluorescent (515 nm) est détecté à l'aide des capteurs du Mx3000p et le PCR se fait à l'aide de 300 nM des différentes amorces. Celles-ci ont été élaborées avec Vector NTI :

	Sequences	Position	Gen Bank
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	

B1 receptor Forward	5' GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3'	367 - 391	NM_030851
B1 receptor Reverse	5' CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3'	478 - 454	

Les conditions du PCR sont les suivantes : 95°C pour 15 min, suivi de 46 cycles à 94 °C pour 15 sec, 60 °C pour 30 sec et 72 °C pour 30 sec. Le Ct (cycle threshold ou seuil) représente le cycle auquel le signal fluorescent devient significativement supérieure au bruit

de fond. La quantification relative de l'expression des gènes est analysée au moyen de la méthode du  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . À titre de contrôle interne, le 18s est amplifié simultanément.

## **2.8 La mortalité**

Nous avons évalué les effets de l'antagoniste du RB1 dans l'association pathologique étudiée, par l'observation du taux de mortalité dans les différents groupes de rats après une semaine de traitement quotidien au SSR240612 (10 mg/kg), par gavage en prise unique matinale à la même heure. Ces groupes de rats n'ont subi aucune chirurgie et n'ont été utilisés que pour déterminer leur taux de survie après une semaine de traitement avec ou sans antagoniste du RB1.

## **2.9 Mise en place des canulations**

La canulation de la veine fémorale est effectuée sur tous les animaux sous anesthésie à l'isoflurane. Ils sont rasés et incisés au niveau de la région de l'aîne. La peau est dégagée et à l'aide de pinces, le pédicule fémoral est dégagé par dilacération. Deux fils à ligaturer sont alors placés sous cette veine. Une première ligature est réalisée du côté céphalique. Après l'hémisection de la veine fémorale, un cathéter connecté à l'aiguille d'une seringue est mis en place. Ce cathéter est alors fixé en serrant la seconde ligature. La canulation se fait sur les rats en prenant soin d'isoler le nerf crural. Une première ligature est placée sur la veine dégagée le plus haut possible, tandis qu'une pince « clamp » fixée plus bas sur la veine bloque la circulation. Un cathéter (PE-10) est alors introduit puis fixé par une seconde ligature, le « clamp » est alors retiré. Pour éviter les risques de coagulation, une injection immédiate de sérum physiologique hépariné (1,000 U.S.P units/ml) est effectuée.

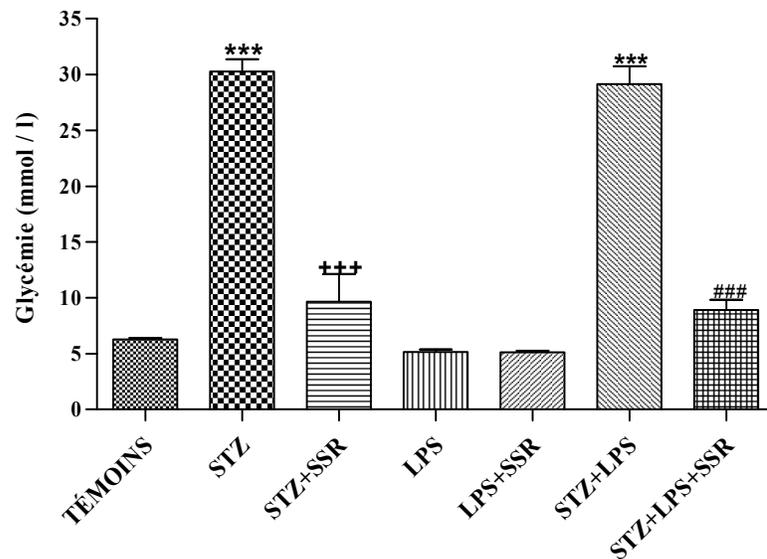
## 2.10 Les analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel informatique GraphPad Prism (version 4.00, GraphPad Software Inc.). Les valeurs sur les graphiques représentent les moyennes  $\pm$  les écart-types dans chaque groupe analysé où « n » représente le nombre de rats. Les tests de comparaison entre les moyennes ont été effectués avec l'épreuve *t* de Student sur des échantillons non pairés. Pour les comparaisons multiples, les analyses statistiques ont été faites au moyen d'une ANOVA suivi du test de Bonferroni ou de Dunnett (si comparaison au même groupe témoin). Seule la valeur de  $P < 0.05$  était jugée statistiquement significative.

**CHAPITRE 3 - RÉSULTATS**

### 3.1 Effets du SSR240612 sur la glycémie

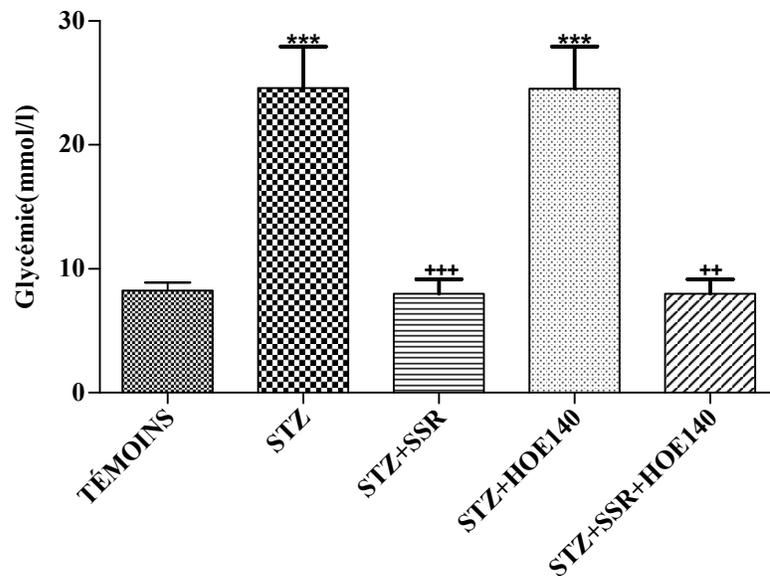
La figure 7 représente les effets du SSR240612 sur la glycémie à jeun de tous les groupes immédiatement avant le sacrifice. Les rats traités à la STZ ayant ou pas reçu les lipopolysaccharides (LPS) ont une glycémie élevée par rapport aux témoins, environ cinq fois plus importante. Il est à noter que le LPS n'a pas affecté la glycémie produite par le traitement à la STZ. L'hyperglycémie a été normalisée par le SSR240612 aussi bien chez les rats STZ que STZ traités aux LPS. Le traitement avec le LPS seul ou avec le SSR240612 n'a eu aucun effet significatif sur la glycémie par rapport aux rats témoins.



**Figure 8.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur la glycémie à jeun. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, +++ P<0.001 vs STZ, ### P<0.001 vs LPS+STZ.

### 3.2 Effets du SSR240612 et du Hoe140 sur la glycémie

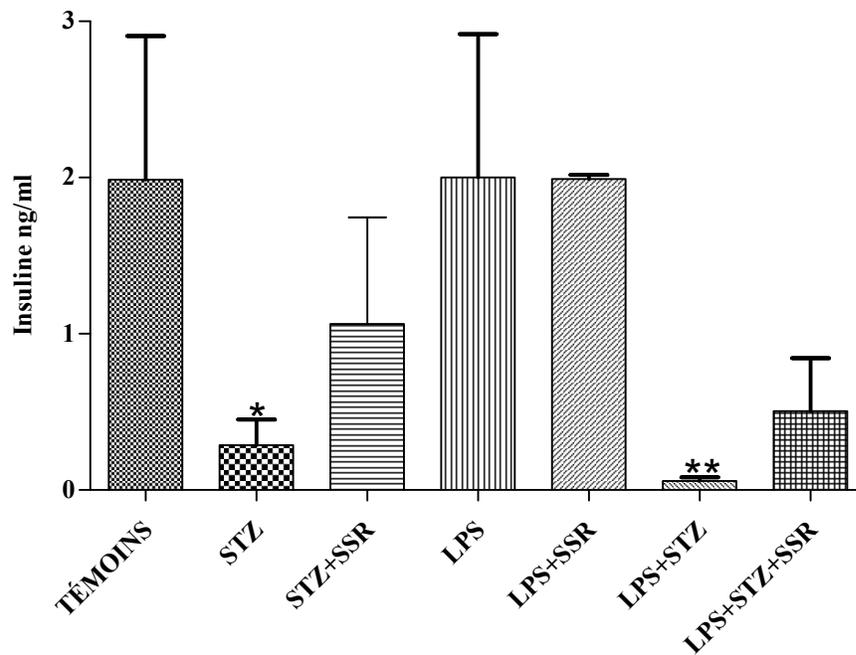
Un antagoniste du récepteur B2 (Hoe140) a été utilisé afin de déterminer si l'inhibition de la glycémie causée par le SSR240612 chez le rat diabétique STZ était due à un effet hypoglycémiant relayé par l'activation du récepteur B2. Les résultats montrent que le Hoe 140 n'a pas modifié la glycémie chez les rats traités à la STZ, contrairement aux rats traités avec le SSR240612. De plus, le Hoe 140 n'a pas empêché l'inhibition de l'hyperglycémie produite par le SSR240612 chez le rat STZ.



**Figure 9.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) et d'une dose de 500 µg/kg Hoe140 (s.c. 24 avant sacrifice) sur la glycémie à jeun. Les valeurs représentent les moyennes ± écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, +++ P<0.001 vs STZ, ++ P<0.01 vs STZ+Hoe140.

### 3.3 Effets du SSR240612 sur l'insulinémie

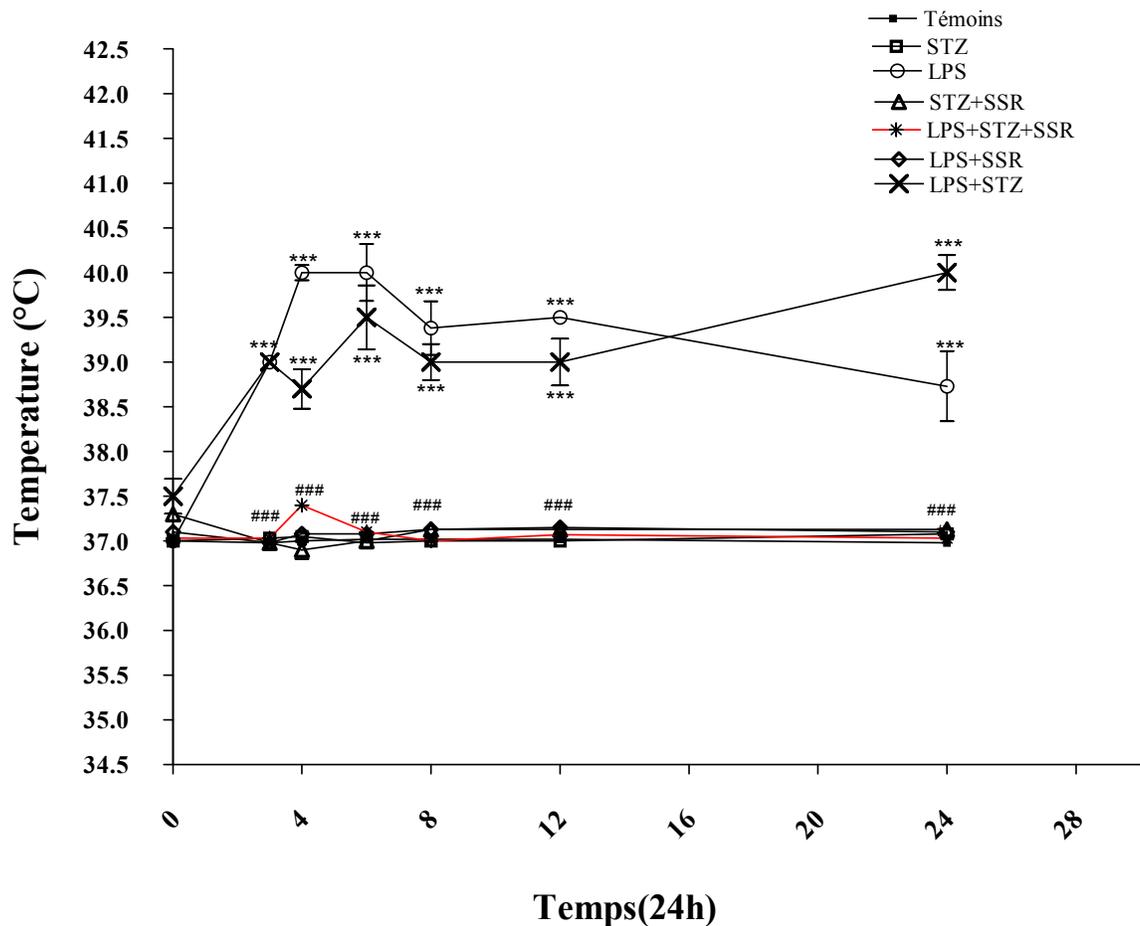
Les rats STZ ont une insulinémie effondrée comparativement aux témoins. Les rats LPS ont une insulinémie normale qui n'a pas été influencée par l'administration du SSR240612. Par contre, l'antagoniste B1, SSR240612, semble améliorer la déficience en insuline chez les rats STZ avec ou sans LPS; le degré de signification n'est cependant pas atteint (Figure 9). L'administration du LPS n'a pas d'influence sur l'insulinémie des rats diabétiques.



**Figure 10.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'insulinémie à jeun. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*P<0.05, \*\* P<0.01 vs Témoins.

### 3.4 Effets du SSR240612 sur la température corporelle

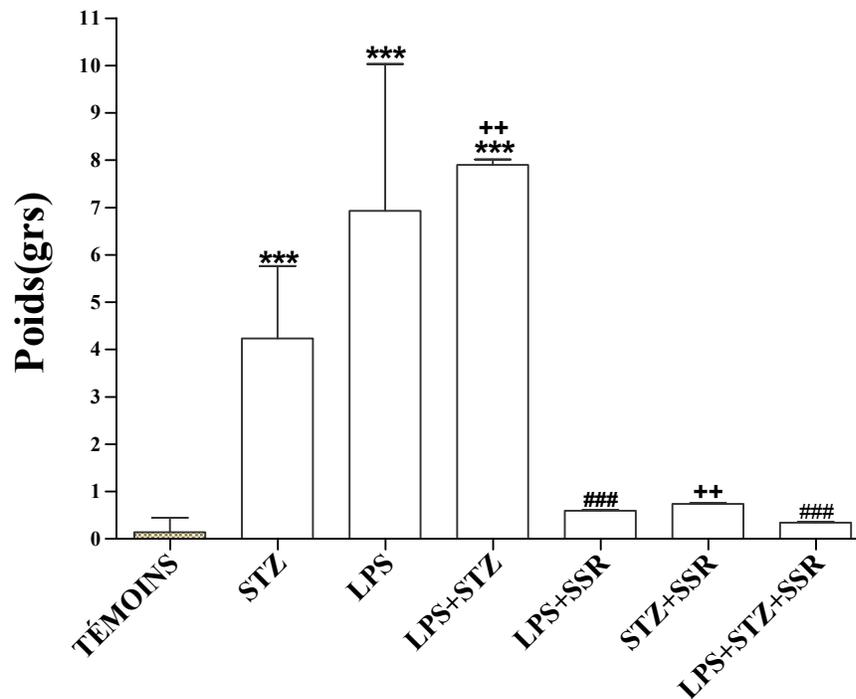
Les rats STZ ont une température comparable (37 °C) à celle des rats témoins. Les rats non diabétiques traités aux LPS et les rats STZ traités aux LPS ont une température élevée, 3h après traitement; elle demeure significativement élevée jusqu'à 24h post-LPS. Le SSR240612 a prévenu la survenue de l'hyperthermie chez tous les groupes de rats traités aux LPS, diabétiques ou non.



**Figure 11.** Effet du LPS et/ou STZ sur la température corporelle. Le SSR240612 a été administré par gavage en raison de 10 mg/kg au même moment que le LPS (temps 0) et 12h plus tard. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, ### P<0.001 vs LPS avec ou sans STZ.

### 3.5 Effets du SSR240612 sur l'œdème du cœur

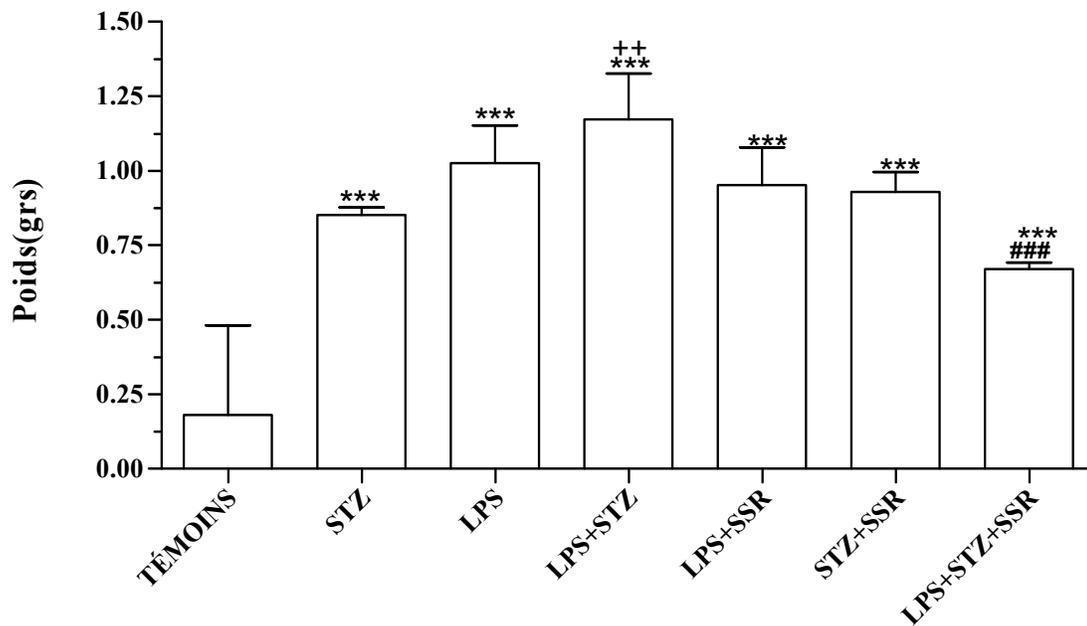
Les rats STZ et LPS présentent de l'œdème au niveau du cœur qui est important par rapport aux rats témoins. L'ajout des LPS chez les rats STZ favorise son expansion. Le SSR240612 a complètement prévenu l'œdème chez les rats diabétiques et traités au LPS.



**Figure 12.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'œdème du cœur. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, ++ P<0.01 vs STZ, ### P<0.001 vs LPS ou LPS+STZ.

### 3.6 Effets du SSR 240612 sur l'œdème au niveau du poumon

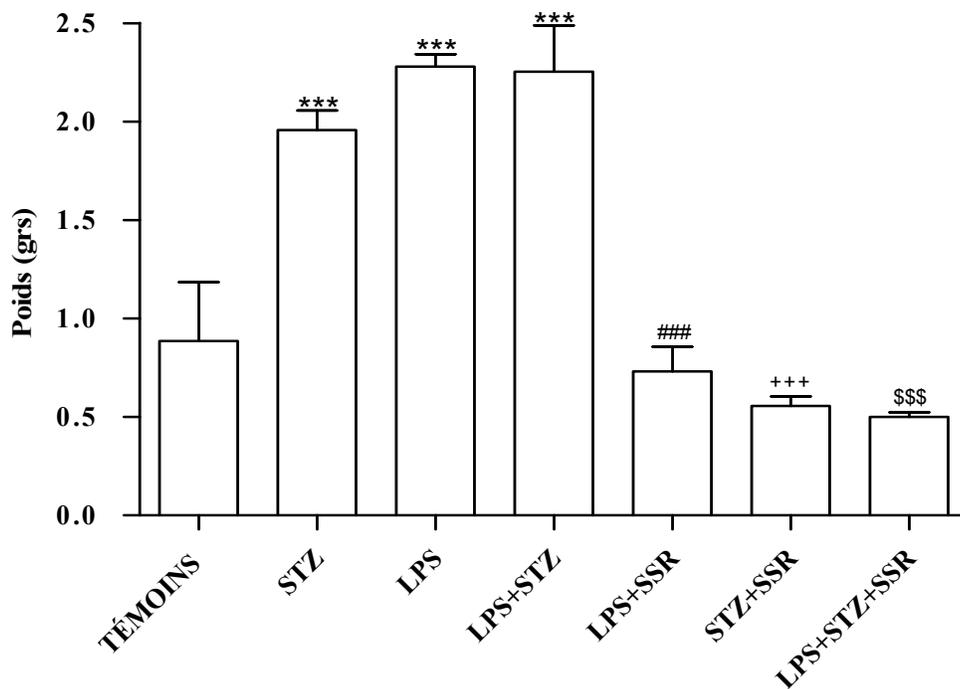
À la figure 13, on note la présence d'œdème dans les poumons des rats STZ, LPS, et un effet additif chez les rats STZ+LPS. Le SSR240612 ne prévient pas l'œdème des poumons des rats STZ et traités aux LPS seul, mais le réduit de manière significative chez les rats STZ+LPS.



**Figure 13.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'œdème du poumon. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, ++ P<0.01 vs STZ, ### P<0.001 vs LPS+STZ.

### 3.7 Effets du SSR240612 sur l'œdème au niveau du rein

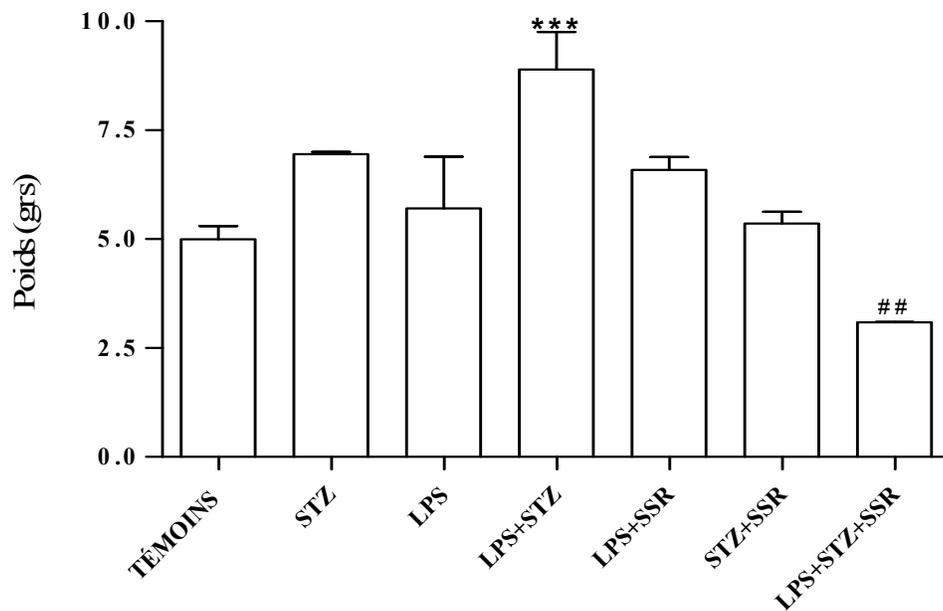
L'œdème est significativement augmenté dans les reins des groupes de rats STZ, LPS, et LPS+ STZ par rapport aux rats témoins. Le SSR240612 prévient significativement la formation de l'œdème dans les reins de ces groupes.



**Figure 14.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'œdème du rein. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, ### P<0.001 vs LPS, +++ P<0.001 vs STZ, \$\$\$ P<0.001 vs LPS+STZ.

### 3.8 Effets du SSR240612 sur l'œdème au niveau du foie

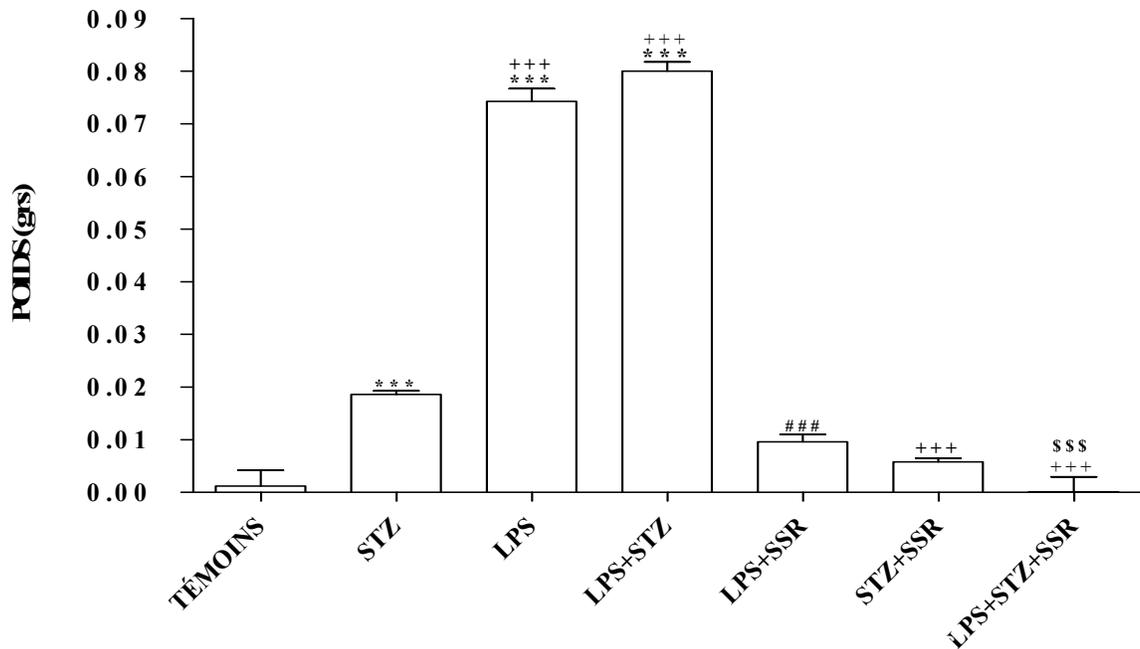
L'œdème dans le foie est significativement augmenté chez les rats LPS+STZ, mais pas dans les autres groupes de rats traités avec LPS. Le SSR240612 a prévenu cet œdème chez les rats STZ traités au LPS.



**Figure 15.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'œdème du foie. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\*  $P < 0.001$  vs Témoins, ##  $P < 0.01$  vs LPS+STZ.

### 3.9 Effets du SSR240612 sur l'œdème de l'aorte

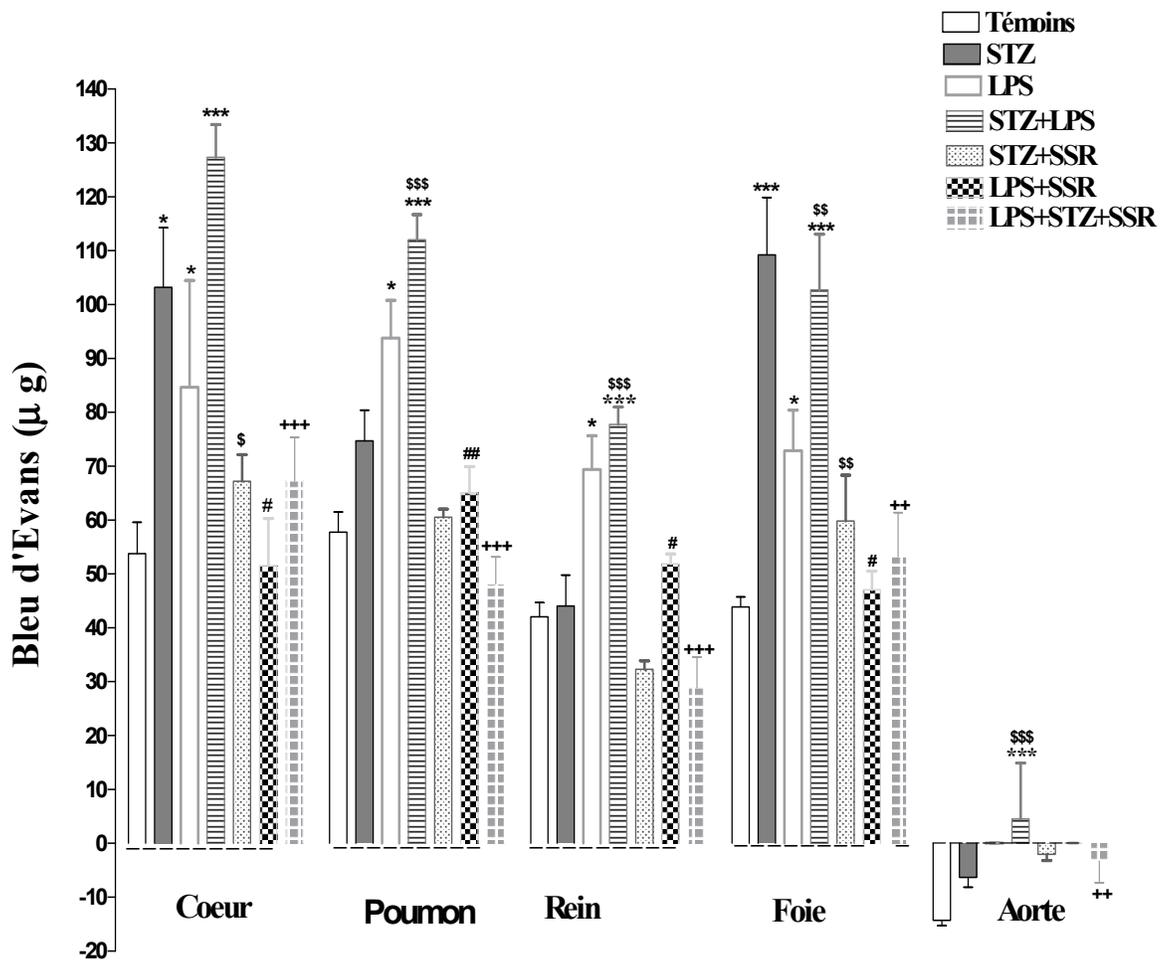
L'œdème est augmenté significativement dans les aortes thoraciques des rats STZ, mais davantage dans celles des rats LPS, et STZ +LPS par rapport aux rats témoins. L'administration du SSR240612 a prévenu la formation de l'œdème chez ces groupes de rats.



**Figure 16.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'œdème de l'aorte thoracique. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \*\*\* P<0.001 vs Témoins, ### P<0.001vs LPS, \$\$\$ P<0.001 vs LPS+STZ, +++ P<0.001 vs STZ.

### 3.10 Effets du SSR240612 sur la perméabilité vasculaire

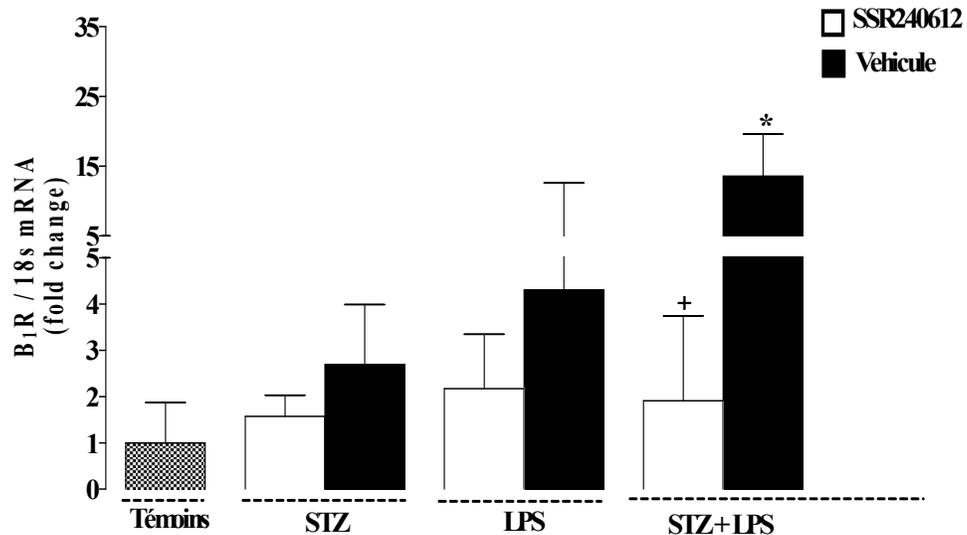
Dans la figure 17, les résultats montrent que la perméabilité vasculaire est augmentée significativement dans le cœur et le foie des rats STZ mais pas dans le poumon, le rein et l'aorte. Elle est aussi augmentée dans tous les organes des rats LPS et STZ+LPS. Cependant, peu d'effets sont notés sur l'aorte des groupes traités à l'exception de STZ + LPS. L'augmentation de la perméabilité vasculaire est prévenue de façon significative dans tous les organes après traitement au SSR240612, chez tous les groupes de rats.



**Figure 17.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur la perméabilité vasculaire. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8), \* P<0.05, \*\*\* P<0.001 vs Témoins, # P<0.05, ## P<0.01 vs LPS, \$ P<0.05, \$\$ P<0.01, \$\$\$ P<0.001 vs STZ, ++P<0.01, +++ P<0.001 vs LPS+STZ.

### 3.11 Effets du SSR240612 sur l'induction du récepteur B1 dans le cœur

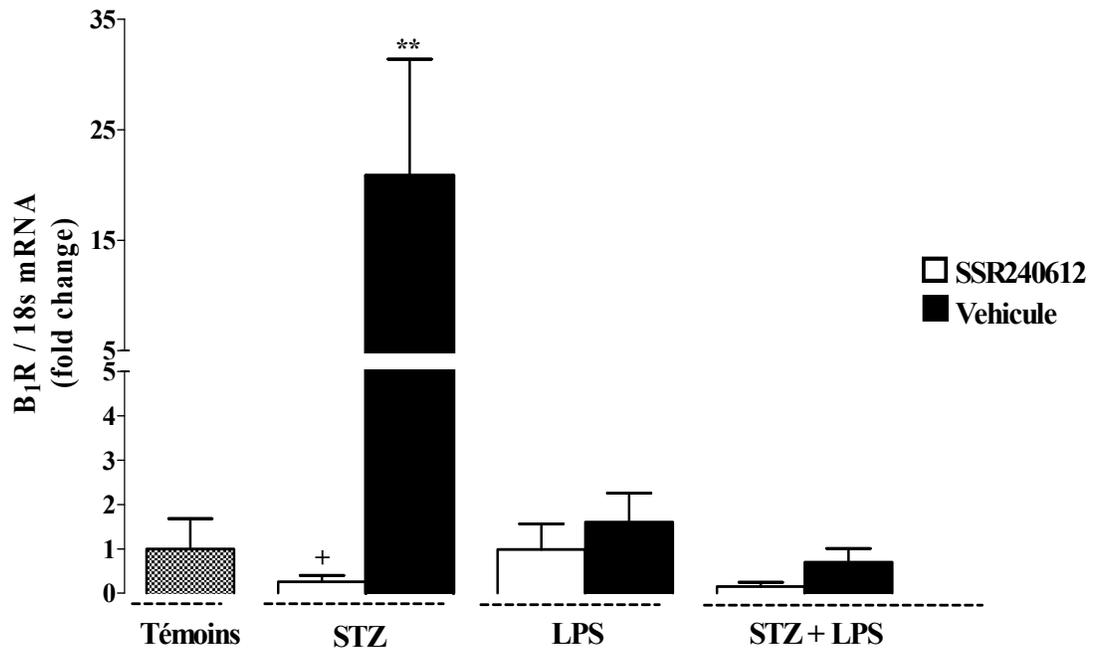
L'expression du récepteur B1 n'augmente pas significativement dans le cœur des rats STZ et LPS. Toutefois, le récepteur B1 est significativement surexprimé chez les rats LPS + STZ. Le traitement avec l'antagoniste B1, SSR240612, a prévenu l'induction du récepteur B1 dans le cœur des rats traités au LPS + STZ.



**Figure 18.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'expression du récepteur B1 dans le cœur. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=4), \*  $P < 0.05$  vs Témoins, +  $P < 0.05$  vs véhicule.

### 3.12 Effets du SSR240612 sur l'induction du récepteur B1 dans le cortex rénal

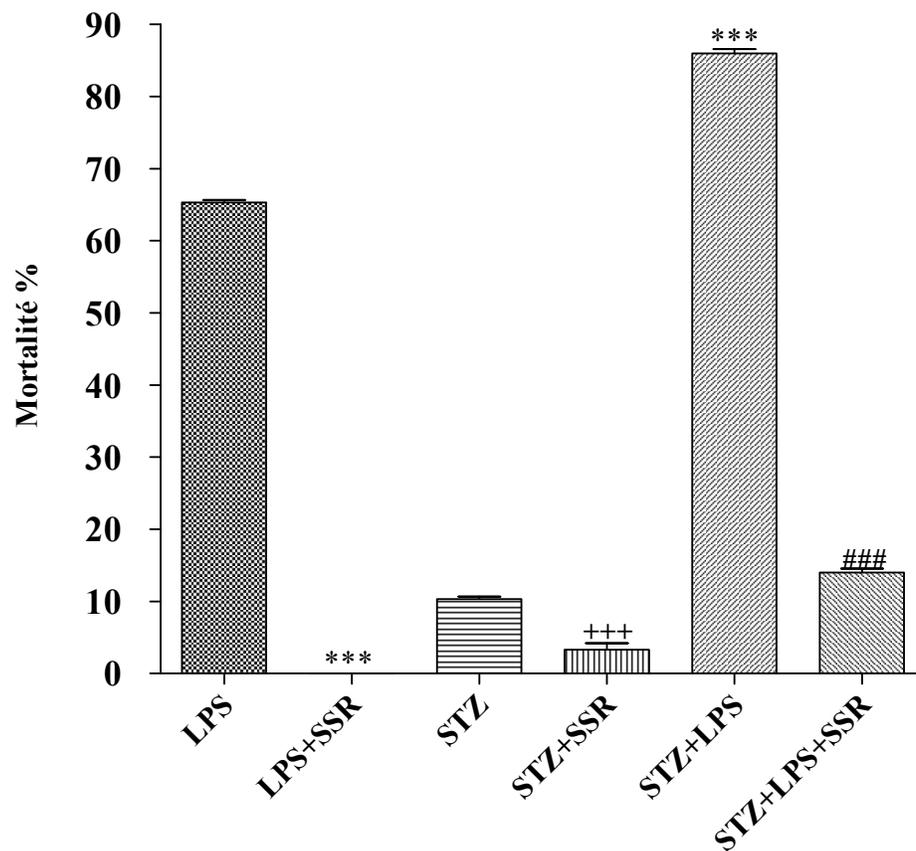
Le récepteur B1 est surexprimé dans le cortex rénal des rats STZ, mais pas dans celui des rats LPS et LPS+STZ, ceci pourrait s'expliquer par l'atteinte parenchymateuse due au choc septique. Le SSR240612, a prévenu l'induction du récepteur B1 dans le cortex rénal des rats STZ.



**Figure 19.** Effets de deux doses de 10 mg/kg de SSR240612 par gavage (24h et 12h avant le sacrifice) sur l'expression du récepteur B1 dans le cortex rénal. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=4), \*\* P<0.01 vs Témoins, +P<0.05 vs véhicule.

### 3.13 Effets du SSR240612 sur la mortalité

Dans la figure 19, on observe que la mortalité est élevée une semaine après traitement au LPS et elle l'est davantage chez les rats diabétiques STZ traités au LPS. Le traitement quotidien avec le SSR240612 pendant une semaine, améliore la survie dans tous les groupes de façon significative.



**Figure 20.** Effets d'une dose quotidienne de 10 mg/kg de SSR240612 sur la mortalité des rats LPS et/ou STZ. Les valeurs représentent les moyennes  $\pm$  écart-type (n=8),

\*\*\*  $P < 0.001$  vs LPS, +++  $P < 0.001$  vs STZ, ###  $P < 0.001$  vs STZ+LPS.

**CHAPITRE 4 – DISCUSSION ET CONCLUSION**

L'incidence du diabète mellitus augmente plus rapidement que prévu et les projections comme déjà évoquées initialement indiquent que le nombre de nouveaux cas de diabète diagnostiqués doublerait en moins de 20 ans. Cette augmentation ne s'explique pas simplement par une manifestation plus précoce de la maladie. Elle reflète probablement l'apparition de conditions environnementales défavorables qui augmentent les risques. Les avenues thérapeutiques actuelles sont limitées. Elles comprennent outre la thérapie traditionnelle qui consiste à remplacer l'insuline pour les diabétiques de type 1, une thérapie moderne en cours d'expérimentation et qui suscite beaucoup de controverses malgré des résultats encourageants. Il s'agit de la greffe avec des cellules souches hématopoïétiques, de la greffe d'îlots de Langerhans et de la greffe du pancréas qui peut se faire simultanément avec une greffe rénale dans les cas d'une complication rénale du diabète (Ryan *et al.*, 2002). L'expérimentation sur des sujets humains étant largement limitée par des considérations d'ordres éthiques, nous laisse l'unique possibilité d'effectuer nos travaux de recherche sur des modèles d'animaux pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques. En recherche fondamentale, une multitude de modèles animaux pour diverses pathologies sont utilisés; chaque modèle animal est utilisé pour représenter un aspect particulier d'une pathologie. Le modèle de rat STZ représente les aspects recherchés de l'association pathologique visée dans notre étude car non seulement il mime le diabète de type 1 par l'absence de production d'insuline par le pancréas, mais en plus le récepteur B1 des kinines y est fortement exprimé. L'innombrable littérature sur le sujet est résumée dans quelques articles (Couture *et al.*, 2001; Mage *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 2002; Ongali *et al.*, 2004; Abdouh *et al.*, 2008). De plus, l'administration de LPS comme déjà décrit dans la littérature induit le récepteur B1 (deBlois & Horlick, 2001; Wille *et al.*, 2001; Cayla *et al.*, 2007; Seguin *et al.*, 2008).

À partir de ces données, nous avons pu réunir tous les éléments nécessaires à notre hypothèse qui consiste à étudier la possibilité que le récepteur B1 des kinines puisse constituer une cible thérapeutique dans le choc septique au cours du diabète. En effet, les résultats présentés indiquent clairement l'implication de ce récepteur, non seulement dans l'apparition de l'hyperthermie, de l'œdème et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans divers tissus (cœur, rein, foie, poumon, aorte), mais aussi dans l'hyperglycémie et l'insuffisance insulinémique du diabète mellitus. L'inhibition de ce récepteur par un antagoniste non peptidique, le SSR240612, s'est avéré un outil efficace sur tous ces paramètres.

#### **4.1 Le rôle du récepteur B1 dans le choc septique**

Il est bien connu que l'injection de lipopolysaccharides bactériens induit la libération de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-1 $\beta$  qui joue un rôle essentiel dans l'induction de la fièvre. Il est aussi connu que l'IL-1 $\beta$  induit la surexpression du récepteur B1 (Larrivée *et al.*, 1998; Ganju *et al.*, 2001). La première évidence démontrant le rôle des kinines dans l'induction de la fièvre après injection de lipopolysaccharides a été obtenue à la suite d'études réalisées sur le lapin (Pela *et al.*, 1975) et sur le rat (Bhattacharya *et al.*, 1988). Mais le rôle des récepteurs des kinines dans ce phénomène n'a été démontré que bien plus tard utilisant la voie intra cérébrale (ICV) pour l'injection des endotoxines (Walker *et al.*, 1996). Les résultats de ces travaux ne peuvent être comparés car les voies d'administration des endotoxines et des antagonistes sont totalement différentes. En effet, dans l'étude de (Walker *et al.*, 1996) l'effet sur l'hyperthermie a été amélioré par un antagoniste B2 injecté en I.C.V mais pas par son association à un antagoniste B1 suggérant ainsi le rôle central de la bradykinine lors de l'induction de la fièvre par injection d'endotoxine par ICV. Dans la

section résultats (Figure 10), on observe que l'hyperthermie chez les rats traités aux LPS, diabétiques ou pas, est complètement prévenue par un traitement préventif au SSR240612 administré par gavage. Ainsi nous suggérerons un antagoniste du récepteur B1 comme traitement antipyrétique au cours du choc septique.

## 4.2 Le rôle du récepteur B1 dans le diabète de type 1

Le récepteur B1 des kinines est induit et surexprimé dans plusieurs organes des rats diabétiques ayant reçu la streptozotocine (Couture et al., 2001 ; Couture & Girolami, 2004). Il a été montré que les rats traités par la STZ surexpriment très tôt le récepteur B1 dans la moelle épinière (Ongali *et al.*, 2004). Il a aussi été rapporté que l'hyperglycémie chronique et l'hyperinsulinémie associée peuvent augmenter les sites de liaison de ce récepteur dans un modèle de rat insulino-résistant (El Midaoui *et al.*, 2005; Ismael et al., 2008). Une étude réalisée par l'équipe d'Araújo *et al.* (2006) a montré l'importance du récepteur B1 dans le contrôle de l'homéostasie pancréatique et la sécrétion d'insuline. En effet, ils montrent que les souris knock-out B1 présentent, lorsqu'elles sont à jeun des concentrations plasmatiques faibles en glucose et une glycémie élevée après l'alimentation par rapport aux souris sauvages ainsi que des anomalies pancréatiques avec raréfaction des îlots de Langerhans et des taux faibles en insuline. Ils ont aussi rapporté une diminution de la perméabilité vasculaire chez ce même phénotype faisant ressortir un nouveau rôle pour ce récepteur dans la pathologie du diabète et les manifestations pathologiques connexes. Il est aussi bien connu que le récepteur B1 est exprimé dans le pancréas (Chai *et al.*, 1996). Les résultats représentés sur les figures 7 et 9 montrent les effets du SSR240612 sur la glycémie et l'insulinémie. En effet, les rats traités par STZ ayant ou pas reçu les lipopolysaccharides ont une glycémie élevée et des taux faibles

d'insuline. L'administration de l'antagoniste B1 a normalisé cette hyperglycémie aussi bien chez les rats STZ que STZ traités aux LPS et il a aussi amélioré la déficience en insuline. Il est connu que la bradykinine joue un rôle important dans la translocation du transporteur GLUT4 et la captation du glucose (Duka *et al.*, 2001). Nous avons donc pensé que les effets observés sur l'hyperglycémie en présence du SSR240612 étaient dus à l'activation du récepteur B2 qui est connu pour être hypoglycémiant en activant le transporteur GLUT4. Nous avons donc administré un antagoniste du récepteur B2 en même temps que celui du récepteur B1 mais les résultats obtenus ne supportent pas cette hypothèse (Voir figure 8). L'étude utilisant les souris knock-out B1 (B1<sup>-/-</sup>) va à l'encontre de ce qui a été observé dans nos travaux. Leurs résultats montrent que la stimulation du récepteur B1 par un agoniste B1 injecté en IV entraîne une sécrétion d'insuline par le pancréas de la souris sauvage mais pas chez les knock-out B1 (Araujo *et al.*, 2006), suggérant ainsi un rôle facilitateur du récepteur B1 sur la libération d'insuline. Nos résultats suggèrent plutôt un rôle délétère car comme déjà cité, son inhibition par le SSR240612 améliore les effets de la déficience insulinémique. La divergence entre notre étude et celle d'Araújo *et al.* (2006) peut être due au fait que les souris knock-out B1 surexpriment le récepteur B2 (Seguin *et al.*, 2008). Il faut aussi admettre que le rôle du récepteur B1 sur la libération d'insuline peut être fort différent chez la souris normale et le rat diabétique. En effet, l'insulinitis dans le diabète entraîne une surexpression du récepteur B1 par un processus inflammatoire. On sait que le récepteur TRPV1 est surexprimé au niveau des fibres sensorielles innervant le pancréas (Suri & Szallasi, 2008). Des études réalisées dans notre laboratoire et non encore publiées ont montré que l'induction du récepteur B1 pourrait être relayée par l'activation du récepteur TRPV1. Cette voie pourrait être activée par les médiateurs pro-inflammatoires qui activent le TRPV1, créant ainsi un cercle vicieux d'activation et réactivation entre TRPV1 et le récepteur B1. Des travaux réalisés récemment dans notre

laboratoire et non publiés ont montré aussi que l'inhibition du TRPV1 par la capsazépine entraîne une baisse de l'hyperglycémie et une amélioration de l'insuffisance en insuline chez les rats STZ. Ces résultats consolident en effet notre hypothèse mais d'autres travaux publiés montrent la complexité de ce système. En effet, l'étude de Van Buren *et al.* (2005) montre un rôle de l'insuline et de l'IGF-1 dans la sensibilisation et la translocation du TRPV1 au niveau des cellules pancréatiques. D'autre part, les travaux d'une équipe chinoise relatent une diminution de l'expression du récepteur TRPV1 dans le cœur des souris C57BL/6J diabétiques, faisant ressortir un rôle protecteur du TRPV1 (Song *et al.*, 2008). Il nous paraît impossible présentement de comparer les résultats et de conclure à une hypothèse unificatrice car les modèles sont différents. Il y a deux ans, des chercheurs de l'Université de Toronto ont montré que l'inactivation de neurones sensoriels producteurs de substance P cause une disparition des cas de diabète de type I chez des souris prédisposées. Ces chercheurs ont découvert que, paradoxalement, l'injection de substance P aux cellules pancréatiques productrices d'insuline attaquées par les cellules immunitaires provoquait l'arrêt de la réaction auto-immune (Razavi *et al.*, 2006). La réduction de la quantité de substance P transportée par les axones sensoriels chez le rat diabétique serait liée en partie à l'activité aldose réductase et en partie à quelques autres conséquences du diabète pouvant être corrigées par l'insuline selon les travaux de Robinson *et al.* (1987). Certes, les résultats de ces travaux sont contradictoires mais ils constituent tout de même une percée importante dans la compréhension des éléments déclencheurs de la maladie. Ils montrent ainsi qu'il ne suffit pas d'avoir un système immunitaire dysfonctionnel pour souffrir du diabète de type 1 mais qu'il y a aussi le système sensoriel pancréatique qui jouerait vraisemblablement un rôle clé dans l'apparition de la maladie.

### **4.3 Le rôle du récepteur B1 dans le diabète de type 1 et le choc septique**

Comme déjà décrit, l'induction du récepteur B1 par les cytokines pro-inflammatoires a été étudiée dans l'œdème (Campos *et al.*, 1998), dans les phénomènes inflammatoires de la rétinopathie (Abdouh *et al.*, 2008), dans certaines manifestations inflammatoires intestinales (Stadnicki *et al.*, 2005), dans les pancréatites (Kuebler *et al.*, 2003) et dans l'arthrite aiguë et chronique (Bhoola *et al.*, 1992). La libération de substances pro-inflammatoires entraîne aussi une extravasation plasmatique avec augmentation de la perméabilité vasculaire dans plusieurs organes, comme la rétine (Abdouh *et al.*, 2008), le cœur, le poumon, l'aorte thoracique et abdominale, la rate et le rein des rats STZ (Rothschild *et al.*, 1999; Wille *et al.*, 2001). Nos résultats montrent une augmentation de l'œdème au niveau du cœur, du poumon, de l'aorte et du rein des rats STZ. Ce n'est pas le cas au niveau du foie des rats STZ bien que la perméabilité vasculaire y soit augmentée. Il s'agit du même constat pour le traitement au LPS. Ceci s'expliquerait possiblement par une augmentation du catabolisme protidique au niveau hépatique lors du choc septique avec hypoalbuminémie par redistribution vers les espaces extravasculaires, et diminution de sa synthèse sous l'action de l'IL-1 au profit de la synthèse des protéines inflammatoires. Mais aussi par une réduction de l'expression de l'albumine en rapport avec le signal ERK et p38 kinase (Wang *et al.*, 2005). On note chez les rats STZ+LPS une augmentation de la perméabilité vasculaire dans le cœur, ceci consolide notre hypothèse concernant le rôle du RB1 dans l'exacerbation de ce phénomène inflammatoire dans le choc septique au cours du diabète. En effet, les résultats du PCR quantitatif en temps réel montrent une augmentation significative de l'expression du RB1 dans le cœur de ce groupe de rats. L'effet additif du LPS au diabète est manifeste dans tous les organes étudiés. En effet, on note une augmentation de l'œdème dans tous les organes des rats LPS+STZ. Par contre, on note des

différences concernant la perméabilité vasculaire, ceci tient compte probablement de la vascularisation de chaque organe et du degrés de l'atteinte endothéliale qui semble tout particulièrement importante et qui est responsable de la dysrégulation de la vasomotricité dépendante de l'endothélium et de la coagulopathie intravasculaire disséminée (Metais *et al.*, 2004).

L'augmentation de l'œdème et de la perméabilité vasculaire au niveau du rein va de paire avec l'augmentation de l'expression du RB1 dans la zone corticale du rein chez les rats STZ selon nos résultats. Ceci nous amène encore une fois à attribuer un rôle probable du RB1 dans l'exacerbation du choc septique dans le diabète d'autant plus que ces phénomènes sont prévenus par l'administration de l'antagoniste du RB1. En effet, les œdèmes et la perméabilité vasculaire sont complètement prévenus par le SSR240612 dans tous les organes étudiés chez les rats LPS+STZ. De plus, le SSR240612 a inhibé l'expression du RB1 dans le cœur des rats LPS+STZ et dans le cortex rénal des rats STZ. Parmi les mécanismes possibles susceptibles d'expliquer l'inhibition de l'expression (ARNm) du récepteur B1 en présence de l'antagoniste B1, nous suggérons que le SSR 240612 : 1- puisse empêcher l'induction du RB1 en prévenant la stimulation par l'agoniste du récepteur B1, lequel est connu pour induire son propre récepteur (Schanstra *et al.*, 1998); 2- puisse agir au niveau du site d'expression nucléaire du récepteur B1 étant donné que cet antagoniste est non peptidique et pourrait entrer dans la cellule. Cette dernière hypothèse est totalement vérifiable par l'administration d'un antagoniste peptidique qui ne traverse pas la membrane cellulaire; 3- puisse inhiber le stress oxydatif selon des données obtenues récemment dans notre laboratoire où le SSR240612 inhibe le stress oxydatif dans un modèle de résistance à l'insuline. Tel que décrit antérieurement, le stress oxydatif induit le récepteur B1. Dans la figure 19, sont représentés les effets du SSR240612 sur la mortalité. Nous avons observé un fort taux de décès chez les rats LPS, et plus encore chez

les LPS+STZ. L'antagoniste du RB1 a amélioré la survie chez ces groupes de rats démontrant ainsi un rôle délétère du RB1. Comme déjà dit, la mortalité due au choc septique est liée aux défaillances viscérales qui l'accompagnent ou lui succèdent, constituant ainsi un syndrome de défaillance multiviscéral qui associe des désordres cardiocirculatoires et des manifestations de dysfonction d'autres organes (respiratoire, neurologique, splanchnique, rénal ou hématologique). Le risque d'un pronostic défavorable augmente avec le nombre d'organes atteints. Notre hypothèse concernant la cause de mortalité chez les rats traités au LPS, outre les causes d'atteintes cardiovasculaires, nous paraît être liée au développement d'une coagulation intra vasculaire disséminée (CIVD). En effet, la CIVD est une cause fréquente de décès au cours du choc septique (Gando *et al.*, 1998). Il s'agit d'un syndrome de défibrination ou d'une coagulopathie de consommation. C'est en fait un syndrome hémorragique caractérisé par la disparition du fibrinogène du sang circulant et l'apparition soudaine de facteurs d'activation de la thrombine qui provoque la formation de dépôts de fibrine et l'oblitération thrombotique des petits vaisseaux, surtout au niveau rénal. C'est probablement en partie la structure de la microcirculation qui prédispose également les reins à une souffrance précoce au cours du choc septique. Au niveau des reins, il est également observé une modification des caractéristiques anticoagulantes de la surface endothéliale. Car à la phase initiale du choc endotoxémique, il est noté une précipitation des complexes thrombine-antithrombine au niveau glomérulaire (Jourdain *et al.*, 1997). Le fait que le récepteur des kinines soit exprimé à la surface des plaquettes sanguines (Harrison *et al.*, 2008) et que l'antagoniste du RB1 ait amélioré la survie chez les rats traités par les LPS, nous laisse penser que le récepteur B1 des kinines puisse très probablement être impliqué dans la CIVD au cours du choc septique et que son inhibition par le SSR 240612 serait une avenue thérapeutique intéressante dans ce cadre pathologique.

#### 4.4 Perspectives

L'étape que nous venons d'accomplir, à savoir de développer un modèle expérimental réunissant à la fois les manifestations et les complications du choc septique et du diabète de type 1, s'intègre dans une perspective globale dont l'objectif ultime est d'en comprendre les mécanismes, afin de proposer un ou des traitements appropriés. La connaissance des voies d'induction du récepteur B1 des kinines ainsi que son implication dans de nombreuses manifestations pathologiques (hyperthermie secondaire au choc endotoxémique, œdème, douleur, perméabilité vasculaire, hyperglycémie secondaire au diabète, insuffisance insulinémique, mortalité) ainsi que les effets bénéfiques résultant de son inhibition par le SSR240612, nous font prendre conscience de son potentiel thérapeutique. Nous devons ainsi poursuivre nos travaux en précisant davantage l'implication du système nerveux sensoriel pancréatique dans l'apparition de la maladie. Nous aurons à examiner avec objectivité le comportement du récepteur B1 dans l'insulite, lors de la stimulation ou l'inactivation du TRPV1 ainsi qu'en présence d'antagonistes des neuropeptides sensoriels (substance P, CGRP), en prenant soin d'évaluer tous les paramètres déjà cités dans ces conditions. La découverte de l'amélioration de la survie par le SSR240612 chez les rats traités au LPS nous conduit à vérifier l'hypothèse selon laquelle le RB1 serait impliqué dans l'apparition de la CIVD. Parmi les nouvelles études suggérées notons : le dosage des produits de dégradation de la fibrine (PDF) et des D-dimères, la mesure du temps de cephaline avec activateur (TCA), des études histologiques sur le pancréas et le parenchyme rénal, le dosage des marqueurs du stress oxydatif dans le pancréas, le dosage du TNF alpha et de son expression au niveau du pancréas, le dosage des interleukines. De plus il faudra étudier finalement la possibilité de combiner avec nos travaux une approche immunologique, qui pourrait éventuellement potentialiser notre approche pharmacologique.

#### 4.5 Conclusion

Le diabète possède deux versants distincts: des complications à long terme, dépendantes de l'hyperglycémie importante et prolongée, et la possibilité de complications aiguës et parfois graves comme la survenue d'un état de choc septique. Nos travaux bien que nécessitant des approches multidisciplinaires, nous permettent de confirmer notre hypothèse de recherche selon laquelle le récepteur B1 des kinines pourrait constituer une cible thérapeutique pour le choc septique, le diabète ou pour le choc septique au cours du diabète.

## BIBLIOGRAPHIE

- ABDOUH, M., TALBOT, S., COUTURE, R., & HASSESIAN, 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.
- AHARINEJAD, S., ANDRUKHOVA, O., LUCAS, T., ZUCKERMANN, A., WIESELTHALER, G., WOLNER, E., & GRIMM, M. (2008). Programmed cell death in idiopathic dilated cardiomyopathy is mediated by suppression of the apoptosis inhibitor Apollon. *Ann Thorac Surg* **86**, 109-114.
- AOKI, S., SU, Q., LI, H., NISHIKAWA, K., AYUKAWA, K., HARA, Y., NAMIKAWA, K., KIRYU-SEO, S., KIYAMA, H., & WADA, K. (2002). Identification of an axotomy-induced glycosylated protein, AIGP1, possibly involved in cell death triggered by endoplasmic reticulum-Golgi stress. *J Neurosci* **22**, 10751-10760.
- ARAMORI, I., ZENKOH, J., MORIKAWA, N., ASANO, M., HATORI, C., SAWAI, H., KAYAKIRI, H., SATOH, S., INOUE, T., ABE, Y., SAWADA, Y., MIZUTANI, T., INAMURA, N., NAKAHARA, K., KOJO, H., OKU, T., & NOTSU, Y. (1997). Nonpeptide mimic of bradykinin with long-acting properties at the bradykinin B2 receptor. *Mol Pharmacol* **52**, 16-20.
- ARAUJO, R.C., MORI, M.A., MERINO, V.F., BASCANDS, J.L., SCHANSTRA, J.P., ZOLLNER, R.L., VILLELA, C.A., NAKAIE, C.R., PAIVA, A.C., PESQUERO, J.L., BADER, M., & PESQUERO, J.B. (2006). Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biol Chem* **387**, 431-436.
- ASANO, M., INAMURA, N., HATORI, C., SAWAI, H., FUJIWARA, T., KATAYAMA, A., KAYAKIRI, H., SATOH, S., ABE, Y., INOUE, T., SAWADA, Y., NAKAHARA, K., OKU, T., & OKUHARA, M. (1997). The identification of an orally active, nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR173657. *Br J Pharmacol* **120**, 617-624.
- BARABAN, E., MCCOY, L., & SIMON, P. (2008). Increasing prevalence of gestational diabetes and pregnancy-related hypertension in Los Angeles County, California, 1991-2003. *Prev Chronic Dis* **5**, A77.
- BASCANDS, J.L., SCHANSTRA, J.P., COUTURE, R., & GIROLAMI, J.P. (2003). Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles. *Med Sci (Paris)* **19**, 1093-1100.

BHATTACHARYA, S.K., MOHAN RAO, P.J., DAS, N., & DAS, G.G. (1988). Intracerebroventricularly administered bradykinin augments carrageenan-induced paw oedema in rats. *J Pharm Pharmacol* **40**, 367-369.

BHOOLA, K.D., ELSON, C.J., & DIEPPE, P.A. (1992a). Kinins--key mediators in inflammatory arthritis? *Br J Rheumatol* **31**, 509-518.

BHOOLA, K.D., FIGUEROA, C.D., & WORTHY, K. (1992b). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* **44**, 1-80.

BRAZIONIS, L., ROWLEY, K., ITSIOPOULOS, C., & O'DEA, K. (2008). Plasma carotenoids and diabetic retinopathy. *Br J Nutr* 1-8.

BYRNE, M.M., STURIS, J., MENZEL, S., YAMAGATA, K., FAJANS, S.S., DRONSFIELD, M.J., BAIN, S.C., HATTERSLEY, A.T., VELHO, G., FROGUEL, P., BELL, G.I., & POLONSKY, K.S. (1996). Altered insulin secretory responses to glucose in diabetic and nondiabetic subjects with mutations in the diabetes susceptibility gene MODY3 on chromosome 12. *Diabetes* **45**, 1503-1510.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A., FERREIRA, J., & CAMPOS, M.M. (2000). Kinins in pain and inflammation. *Pain* **87**, 1-5.

CAMPOS, M.M., ONGALI, B., THIBAUT, G., NEUGEBAUER, W., & COUTURE, R. (2005). Autoradiographic distribution and alterations of kinin B1 receptors in the brain and spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Synapse* **58**, 184-192.

CAMPOS, M.M., SOUZA, G.E., & CALIXTO, J.B. (1998). Modulation of kinin B1 but not B2 receptors-mediated rat paw edema by IL-1beta and TNFalpha. *Peptides* **19**, 1269-1276.

CALIXTO, J.B., MEDEIROS, R., FERNANDES, E.S., FERREIRA, J., CABRINI, D.A., & CAMPOS, M.M. (2004). Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* **143**, 803-818.

CAPEAU, J. (2005). Insulin signaling: mechanisms altered in insulin resistance. *Med.Sci (Paris)* **21 Spec No**, 34-39.

- CAROLI, G., PAGANELLI, A., FATTORI, G., DAGHIO, M.M., GUIDETTI, P.BORSARI, S., GUERZONI, A., PETROPULACOS, K., DAYA, G., & CIARDULLO, A.V (2008). Prevention of diabetes mellitus complications and improvement of early diagnosis at a population level, through the implementation of early diagnosis integrated disease management in the Modena region. *Recenti Prog Med* **99**, 2003
- CAYLA, C., TODIRAS, M., ILIESCU, R., SAUL, V.V., GROSS, V., PILZ, B., CHAI, G., MERINO, V.F., PESQUERO, J.B., BALATU, O.C., & BADER, M. (2007). Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *FASEB J* **21**, 1689-1698.
- CHAI, K.X., NI, A., WANG, D., WARD, D.C., CHAO, J., & CHAO, L. (1996). Genomic DNA sequence, expression, and chromosomal localization of the human B1 bradykinin receptor gene *BDKRB1*. *Genomics* **31**, 51-57.
- CHRISTMAN, J.W., LANCASTER, L.H., & BLACKWELL, T.S. (1998). Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med* **24**, 1131-1138.
- CLOUTIER, F. & COUTURE, R. (2000). Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* **130**, 375-385.
- COLMAN, R.W., SARTOR, R.B., ADAM, A.A., LA CADENA, R.A., & STADNICKI, A. (1998). The plasma kallikrein-kinin system in sepsis, inflammatory arthritis, and enter colitis. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 365-384.
- COUTURE & LINDSEY C.J. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. Handbook of Chemical Neuroanatomy, Editors: R. Quirion, A. Björklund and T. Hökfelt, Vol 16: Peptide Receptors , Part I, Chap VII, 241-300.
- COUTURE, R., HARRISSON, M., VIANNA, R.M., & CLOUTIER, F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* **429**, 161-176.
- CRANDALL, J.P., KNOWLER, W.C., KAHN, S.E., MARRERO, D., FLOREZ, J.C., BRAY, G.A., HAFFNER, S.M., HOSKIN, M., & NATHAN, D.M. (2008). The prevention of type 2 diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **4**, 382-393.

DE LA MONTE, S.M. & WANDS, J.R. (2005). Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **7**, 45-61.

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

DEHAN, C., TRAN, V.D., DELACOUR, H., DEROUDILHE, G., FRITSCH, N., CHIAPPINI, J., DARDARE, E., & GARDET, V. (2008). Diabetic ketoacidosis with a fatal issue: is it a MODY3 (maturity-onset diabetes of the young type 3)? *Ann Biol Clin (Paris)* **66**, 189-193.

DOMBROWSKI, L., FAURE, R., & MARETTE, A. (2000). Sustained activation of insulin receptors internalized in GLUT4 vesicles of insulin-stimulated skeletal muscle. *Diabetes* **49**, 1772-1782.

DOUGNAC, A.L., MERCADO, M.F., CORNEJO, R.R., CARIAGA, HERNANDEZ, G.P., ANDRESEN, M.H., BUGEDO, G.T., & CASTILLO, L.F. (2007). Prevalence of severe sepsis in intensive care units. A national multicentric study. *Rev Med Chil* **135**, 620-630.

DRAPEAU, G., DEBLOIS, D., & MARCEAU, F. (1991). Hypotensive effects of Lys-des-Arg9-bradykinin and metabolically protected agonists of B1 receptors for kinins. *J Pharmacol Exp Ther* **259**, 997-1003.

DRAPEAU, G., AUDET, R., LEVESQUE, L., GODIN, D., & MARCEAU, F. (1993). Development and in vivo evaluation of metabolically resistant antagonists of B1 receptors for kinins. *J Pharmacol Exp Ther* **266**, 192-199.

DRAY, A. (1997). Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* **75**, 704-712.

DRAZNIN, B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* **55**, 2392-2397.

DROUIN, J.N., GAUDREAU, P., ST-PIERRE, S.A., & REGOLI, D. (1979). Structure-activity studies of [des-Arg9]-bradykinin on the B1 receptor of the rabbit aorta. *Can J Physiol Pharmacol* **57**, 562-566.

DUKA, I., SHENOUDA, S., JOHNS, C., KINTSURASHVILI, E., GAVRAS, I., & GAVRAS, H. (2001). Role of the B(2) receptor of bradykinin in insulin sensitivity. *Hypertension* **38**, 1355-1360.

EL MIDAOU, M.A., ONGALI, B., PETCU, M., RODI, D., DE CHAMPLAIN J., NEUGEBAUER, W., & COUTURE, R. (2005). Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* **26**, 1323-1330.

EMANUELI, C., CHAO, J., REGOLI, D., CHAO, L., NI, A., & MADEDDU, P. (1999). The bradykinin B1 receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* **126**, 1769-1776.

EMERICH, D.F., DEAN, R.L., OSBORN, C. & BARTUS, R.T.(2001). The development of the bradykinin agonist labradimil as a means to increase the permeability of the blood-brain barrier: from concept to clinical evaluation. *Clin pharmacokinet*, **40**, 105-23

FRIEDBERG, E.C. (2006). The eureka enzyme: the discovery of DNA polymerase. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 143-147.

FURTADO, L.M., SOMWAR, R., SWEENEY, G., NIU, W., & KLIP, A. (2002). Activation of the glucose transporter GLUT4 by insulin. *Biochem Cell Biol* **80**, 569-578.

FURUTO-KATO, S., MATSUMOTO, A., KITAMURA, N., & NAKANISHI, S. (1985). Primary structures of the mRNAs encoding the rat precursors for bradykinin and T-kinin. Structural relationship of kininogens with major acute phase protein and alpha 1-cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **260**, 12054-12059.

GABRA, B.H., COUTURE, R., & SIROIS, P. (2003). Functional duality of kinin receptors in pathophysiology. *Med Sci (Paris)* **19**, 1101-1110.

GANDO, S., NANZAKI, S., SASAKI, S., AOI, K., & KEMMOTSU, O. (1998). Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* **26**, 2005-2009.

GANJU, P., DAVIS, A., PATEL, S., NUNEZ, X., & FOX, A. (2001). p38 stress-activated protein kinase inhibitor reverses bradykinin B (1) receptor-mediated component of inflammatory hyperalgesia. *Eur J Pharmacol* **421**, 191-199.

GENUTH, S., ALBERTI, K.G., BENNETT, P., BUSE, J., DEFRONZO, R., KAHN, R., KITZMILLER, J., KNOWLER, W.C., LEOVITZ, H., LERNMARK, A., NATHAN, D., PALMER, J., RIZZA, R., SAUDEK, C., SHAW, J., STEFFES, M., STERN, M., TUOMILEHTO, J., & ZIMMET, P. (2003). Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **26**, 3160-3167.

GIBOT, S., CARIOU, A., DROUET, L., ROSSIGNOL, M., & RIPOLL, L. (2002). Association between a genomic polymorphism within the CD14 locus and septic shock susceptibility and mortality rate. *Crit Care Med* **30**, 969-973.

GLAH, D. (2008). American Diabetes Association--68th Scientific Sessions. Preclinical and early clinical data with promising agents. *Drugs* **11**, 553-555.

GOBEIL, F., NEUGEBAUER, W., FILTEAU, C., JUKIC, D., ALLOGHO, S.N., PHENG, L.H., NGUYEN-LE, X.K., BLOUIN, D., & REGOLI, D. (1996). Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists. *Hypertension* **28**, 833-839.

GUILLERMO, L.V., PEREIRA, W.F., DE, M.J., RIBEIRO-GOMES, F.L., SILVA, E.M., KROLL-PALHARES, K., TAKIYA, C.M., & LOPES, M.F. (2008). Targeting Caspases in Intracellular Protozoan Infections. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1-30 [Epub ahead of print]

GUNDERSON, E.P. (2004). Gestational diabetes and nutritional recommendations. *Curr Diab Rep* **4**, 377-386.

HESS, J.F., DERRICK, A.W., MACNEIL, T., & BORKOWSKI, J.A. (1996). The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology* **33**, 1-8.

HODGIN, K.E. & MOSS, M. (2008). The epidemiology of sepsis. *Curr Pharm Des* **14**, 1833-1839.

HOCK, F.J., WIRTH, K., ALBUS, U., LINZ, W., GERHARDS, H.J., WIEMER, G., HENKE, S., BREIPOHL, G., KONIG, W., KNOLLE, J., & . (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol* **102**, 769-773.

IQBAL, O., MESSMORE, H., FAREED, J., AHMAD, S., HOPPENSTEADT, D., HAZAR, S., TOBU, M., AZIZ, S., & WEHRMACHER, W. (2002). Antithrombotic agents in the treatment of severe sepsis. *Expert Opin Emerg Drugs* **7**, 111-139.

ISHIKURA, S. & KLIP, A. (2008). Muscle cells engage Rab8A and myosin Vb in insulin-dependent GLUT4 translocation. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**, C1016-C1025.

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**, 66-72.

JOOST, H.G. & THORENS, B. (2001). The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol* **18**, 247-256.

JOURDAIN, M., CARRETTE, O., TOURNOYS, A., FOURRIER, F., MIZON, C., MANGALABOYI, J., GOUEMAND, J., MIZON, J., & CHOPIN, C. (1997). Effects of inter-alpha-inhibitor in experimental endotoxic shock and disseminated intravascular coagulation. *Am J Respir Crit Care Med* **156**, 1825-1833.

KAHN, S.E. (2003). The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* **46**, 3-19.

KIM, K.S. (2008). Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier. *Nat Rev Microbiol* **6**, 625-634.

KIMURA, M., TOYODA, M., KATO, M., KOBAYASHI, K., ABE, M., KOBAYASHI, T., MIYAUCHI, M., YAMAMOTO, N., UMEZONO, T., & SUZUKI, D. (2008). Expression of alpha-actinin-4 in human diabetic nephropathy. *Intern Med* **47**, 1099-1106.

KISHI, K., MUROMOTO, N., NAKAYA, Y., MIYATA, I., HAGI, A., HAYASHI, H., & EBINA, Y. (1998). Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes* **47**, 550-558.

KUEBLER, J.F., SCHREMMER-DANNINGER, E., BHOOLA, K.D., ROSCHER, A.A., MESSMER, K., & HOFFMANN, T.F. (2003). Kinin-B1 receptors in ischaemia-induced pancreatitis: functional importance and cellular localisation. *Biol Chem* **384**, 1311-1319.

LARRIVEE, J.F., BACHVAROV, D.R., HOULE, F., LANDRY, J., HUOT, J., & MARCEAU, F. (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol* **160**, 1419-1426.

LE Bars.D. & ADAM, F. (2002). Nociceptors and mediators in acute inflammatory pain *Ann Fr Anesth Reanim* **21**, 315-335.

LE ROITH, D., ZICK, Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* **24**, 588-597.

LEAHY, J.L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* **36**, 197-209.

LEE, Y.H., GIRAUD, J., DAVIS, R.J., & WHITE, M.F. (2003). c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem* **278**, 2896-2902.

LEON, C.G., TORY, R., JIA, J., SIVAK, O., & WASAN, K.M. (2008). Discovery and development of toll-like receptor 4 (TLR4) antagonists: a new paradigm for treating sepsis and other diseases. *Pharm Res* **25**, 1751-1761.

LEVESQUE, L., HARVEY, N., RIOUX, F., DRAPEAU, G., & MARCEAU, F. (1995). Development of a binding assay for the B1 receptors for kinins. *Immunopharmacology* **29**, 141-147.

LEWIS, G.F., CARPENTIER, A., ADELI, K., & GIACCA, A. (2002). Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23**, 201-229.

LIKE, A.A. & ROSSINI, A.A. (1976). Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* **193**, 415-417.

LILIENSIEK, B., WEIGAND, M.A., BIERHAUS, A., NICKLAS, W., KASPER, M., HOFER, S., PLACHKY, J., GRONE, H.J., KURSCHUS, F.C., SCHMIDT, A.M., YAN, S.D., MARTIN, E., SCHLEICHER, E., STERN, D.M., HAMMERLING, G.G., NAWROTH, P.P., & ARNOLD, B. (2004). Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest* **113**, 1641-1650.

LORDAL, M., SODER, O., & HELLSTROM, P.M. (1997). Tachykinins stimulate lipid peroxidation mediated by free radicals in gastrointestinal tract of rat. *Dig Dis Sci* **42**, 1524-1529.

MAGE, M., PECHER, C., NEAU, E., CELLIER, E., DOS REISS, M.L., SCHANSTRA, J.P., COUTURE, R., BASCANDS, J.L., & GIROLAMI, J.P. (2002). Induction of B1

receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can J Physiol Pharmacol* **80**, 328-333.

MARCEAU, F. & BACHVAROV, D.R. (1998). Kinin receptors. *Clin Rev Allergy Immunol* **16**, 385-401.

MARIN-CASTANO, M.E., SCHANSTRA, J.P., NEAU, E., PRADDAUDE, F., PECHER, C., ADER, J.L., GIROLAMI, J.P., & BASCANDS, J.L. (2002). Induction of functional bradykinin b(1)-receptors in normotensive rats and mice under chronic Angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment. *Circulation* **105**, 627-632.

MARUANI, J., ALONSO, R., CUDENNEC, A., CROCI, T., GUAGNINI, F., URBAN-SZABO, K., MARTINOLLE, J.P., SOUBRIE, P., FINANCE, O., & LE FUR, G. (2004). SSR240612 a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* **309**, 661-669.

METAIS, C., WIEL, E., & VALLET, B. (2004). Role of endothelial dysfunction in sepsis mortality. *Therapie* **59**, 31-40.

MOORE, T.R. (1997). Fetal growth in diabetic pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* **40**, 771-786.

MOREAU, M.E., BAWOLAK, M.T., MORISSETTE, G., ADAM, A., & MARCEAU, F. (2007). Role of nuclear factor-kappaB and protein kinase C signaling in the expression of the kinin B1 receptor in human vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* **71**, 949-956.

MORIMOTO, A., SAKATA, Y., WATANABE, T., & MURAKAMI, N. (1990). Leucocytosis induced in rabbits by intravenous or central injection of granulocyte colony stimulating factor. *J Physiol* **426**, 117-126.

MOUSCHEN, M.P., SCHEEN, A.J., & LEFEBVRE, P.J. (1992). Impaired immune responses in diabetes mellitus: analysis of the factors and mechanisms involved. Relevance to the increased susceptibility of diabetic patients to specific infections. *Diabete Metab* **18**, 187-201.

MUCKART, D.J. & BHAGWANJEE, S. (1997). American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the

systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Crit Care Med* **25**, 1789-1795.

MULLER-ESTERL, W. (1992). Kininogens, kinins and kinships. In: The Kallikrein-kinin system in health and disease, H. Fritz, I. Schmidt and G. Dietze, eds. (Munich, Germany: Limbach-Verlag), pp. 289-300.

MUNROE, J.F. & SHIPP, J.C. (1965). Glucose metabolism in leucocytes from patients with diabetes mellitus, with and without hypercholesteremia. *Diabetes* **14**, 584-590.

NIETO-VAZQUEZ, I., FERNANDEZ-VELEDO, S., DE, A.C., & LORENZO, M. (2008). Dual role of interleukin-6 in regulating insulin sensitivity in murine skeletal muscle. *Diabetes* **57**, 3211-3221.

NISHIKAWA, K., HIGUCHI, M., KIMURA, S., SHIMODATE, Y., & NAMIKI, A. (2008). Severe hyperglycemic shock associated with hepatic portal venous gas. *J Anesth* **22**, 74-76.

NOZAKI, N., YAMAGUCHI, S., SHIRAKABE, M., NAKAMURA, H., & TOMOIKE, H. (1997). Soluble tumor necrosis factor receptors are elevated in relation to severity of congestive heart failure. *Jpn Circ J* **61**, 657-664.

OLIVADOTI, M.D. & OPP, M.R. (2008). Effects of i.c.v. administration of interleukin-1 on sleep and body temperature of interleukin-6-deficient mice. *Neuroscience* **153**, 338-348.

ONGALI, B., CAMPOS, M.M., PETCU, M., RODI, D., CLOUTIER, F., CHABOT, J.G., THIBAUT, G., & COUTURE, R. (2004). Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* **15**, 2463-2466.

OZTURK, Y., ALTAN, V.M., YIDIZOGLU-ARI, N., & ALTINKURT, O. (1993). Bradykinin receptors in intestinal smooth muscles and their post-receptor events related to calcium. *Mediators Inflamm* **2**, 309-315.

PELA, I.R., GARDEY-LEVASSORT, C., LECHAT, P., & ROCHA E SILVA (1975). Brain kinins and fever induced by bacterial pyrogens in rabbits. *J Pharm Pharmacol* **27**, 793-794.

PERICHART, P.O., ALONSO, D.L., V, & ORTEGA, G.C. (2006). Physiopathology and nutritional care of patients with gestational diabetes. *Ginecol Obstet Mex* **74**, 218-223.

PERNER, A., NIELSEN, S.E., & RASK-MADSEN, J. (2003). High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Med* **29**, 642-645.

PESQUERO, J.B., ARAUJO, R.C., HEPPENSTALL, P.A., STUCKY, C.L., SILVA, J.A., JR., WALTHER, T., OLIVEIRA, S.M., PESQUERO, J.L., PAIVA, A.C., CALIXTO, J.B., LEWIN, G.R., & BADER, M. (2000). Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8140-8145.

PHAGOO, S.B., POOLE, S., & LEEB-LUNDBERG, L.M. (1999). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* **56**, 325-333.

PINSKY, M.R., VINCENT, J.L., DEVIERE, J., ALEGRE, M., KAHN, R.J., & DUPONT, E. (1993). Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* **103**, 565-575.

PIZARD, A., RICHER, C., BOUBY, N., PICARD, N., MENETON, P., AZIZI, M., & HENC-GELAS, F. (2008). Genetic deficiency in tissue kallikrein activity in mouse and man: effect on arteries, heart and kidney. *Biol Chem* **389**, 701-706.

POPOVIC, N., MIJUSKOVIC, D., NESKOVIC, V., ARSENIJEVIC, L., KARAMARKOVIC, A., & BRANISLAVA, S. (2008). Myocardial dysfunction in septic shock--a case report. *Med Pregl* **61**, 187-190.

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-dimethylphenyl]sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **318**, 195-205.

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**, 896-906.

PULENDRAN, B., KUMAR, P., CUTLER, C.W., MOHAMADZADEH, M., VAN, D.T., & BANCHEREAU, J. (2001). Lipopolysaccharides from distinct pathogens induce different classes of immune responses in vivo. *J Immunol* **167**, 5067-5076.

RAPAPORT, R., SILVERSTEIN, J.H., GARZARELLA, L., & ROSENBLOOM, A.L. (2004). Type 1 and type 2 diabetes mellitus in childhood in the United States: practice patterns by pediatric endocrinologists. *J Pediatr Endocrinol Metab* **17**, 871-877.

RATHMANN, W. & GIANI, G. (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 2568-2569.

RAZAVI, R., CHAN, Y., AFIFIYAN, F.N., LIU, X.J., WAN, X., YANTHA, J., TSUI, H., TANG, L., TSAI, S., SANTAMARIA, P., DRIVER, J.P., SERREZE, D., SALTER, M.W., & DOSCH, H.M. (2006). TRPV1+ sensory neurons control beta cell stress and islet inflammation in autoimmune diabetes. *Cell* **127**, 1123-1135.

REGOLI, D., BARABE, J., & PARK, W.K. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aortae. *Can J Physiol Pharmacol* **55**, 855-867.

REGOLI, D., MARCEAU, F., & BARABE, J. (1978). De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Can J Physiol Pharmacol* **56**, 674-677.

REGOLI, D., JUKIC, D., GOBEIL, F., & RHALEB, N.E. (1993). Receptors for bradykinin and related kinins: a critical analysis. *Can J Physiol Pharmacol* **71**, 556-567.

REGOLI, D., RIZZI, A., PERRON, S.I., & GOBEIL, F., JR. (2001). Classification of kinin receptors. *Biol Chem* **382**, 31-35.

RITCHIE, T.J., DZIADULEWICZ, E.K., CULSHAW, A.J., MULLER, W., BURGESS, G.M., BLOOMFIELD, G.C., DRAKE, G.S., DUNSTAN, A.R., BEATTIE, D., HUGHES, G.A., GANJU, P., MCINTYRE, P., BEVAN, S.J., DAVIS, C., & YAQOUB, M. (2004). Potent and orally bioavailable non-peptide antagonists at the human bradykinin B(1) receptor based on a 2-alkylamino-5-sulfamoylbenzamide core. *J Med Chem* **47**, 4642-4644.

ROBINSON, J.P., WILLARS, G.B., TOMLINSON, D.R., & KEEN, P. (1987). Axonal transport and tissue contents of substance P in rats with long-term streptozotocin-diabetes. Effects of the aldose reductase inhibitor 'statil'. *Brain Res* **426**, 339-348.

ROTHSCHILD, A.M., MELO, V.L., REIS, M.L., FOSS, M.C., & GALLO, L., JR. (1999). Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats

are normalized by insulin in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **360**, 217-220.

RYAN, E.A., LAKEY, J.R., PATY, B.W., IMES, S., KORBUTT, G.S., KNETEMAN, N.M., BIGAM, D., RAJOTTE, R.V., & SHAPIRO, A.M. (2002). Successful islet transplantation: continued insulin reserve provides long-term glycemic control. *Diabetes* **51**, 2148-2157.

SALTIEL, A.R. & KAHN, C.R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**, 799-806.

SALVINO, J.M., SEOANE, P.R., DOUTY, B.D., AWAD, M.M., DOLLE, R.E., HOUCK, W.T., FAUNCE, D.M., & SAWUTZ, D.G. (1993). Design of potent non-peptide competitive antagonists of the human bradykinin B2 receptor. *J Med Chem* **36**, 2583-2584.

SAMAVATI, L., LEE, I., MATHES, I., LOTTSPEICH, F., & HUTTEMANN, M. (2008). Tumor necrosis factor alpha inhibits oxidative phosphorylation through tyrosine phosphorylation at subunit I of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **283**, 21134-21144.

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**, 2080-2091.

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

SCOTT, E.C., HO, H.C., YU, M., CHAPITAL, A.D., KOSS, W., & TAKANISHI, D.M., JR. (2008). Pre-existing cardiac disease, troponin I elevation and mortality in patients with severe sepsis and septic shock. *Anaesth Intensive Care* **36**, 51-59.

SEGUIN, T., BULEON, M., DESTRUBE, M., RANERA, M.T., COUTURE, R., GIROLAMI, J.P., & TACK, I. (2008). Hemodynamic and renal involvement of B1 and B2 kinin receptors during the acute phase of endotoxin shock in mice. *Int Immunopharmacol* **8**, 217-221.

SMITH, R.M., ZHANG, S., WHITE, M.F., & JARETT, L. (1996). The role of receptor kinase activity and the NPEY960 motif in insulin-accelerated receptor-mediated insulin internalization. *J Recept Signal Transduct Res* **16**, 339-355.

SONG, J.X., WANG, L.H., YAO, L., XU, C., WEI, Z.H., & ZHENG, L.R. (2008). Impaired transient receptor potential vanilloid 1 in streptozotocin-induced diabetic hearts. *Int J Cardiol* [Epub ahead of print].

STADNICKI, A., GIL, D., MAZUREK, U., & LATOCHA, M. (2005a). [Intestinal tissue kallikrein-kinin system in patients with ulcerative colitis during treatment with cyclosporine A]. *Wiad Lek* **58**, 295-298.

STADNICKI, A., PASTUCHA, E., NOWACZYK, G., MAZUREK, U., PLEWKA, D., MACHNIK, G., WILCZOK, T., & COLMAN, R.W. (2005b). Immunolocalization and expression of kinin B1R and B2R receptors in human inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G361-G366.

STEEN, E., TERRY, B.M., RIVERA, E.J., CANNON, J.L., NEELY, T.R., TAVARES, R., XU, X.J., WANDS, J.R., & DE LA MONTE, S.M. (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J Alzheimers Dis* **7**, 63-80.

STRAUB, J.A., AKIYAMA, A., & PARMAR, P. (1994). In vitro plasma metabolism of RMP-7. *Pharm Res* **11**, 1673-1676.

SURI, A. & SZALLASI, A. (2008). The emerging role of TRPV1 in diabetes and obesity. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 29-36.

TRIEF, P.M. (2005). Diabetes and your marriage. Making things work. *Diabetes Self Manag* **22**, 52-4, 56.

TSUCHIDA, S., MIYAZAKI, Y., MATSUSAKA, T., HUNLEY, T.E., INAGAMI, T., FOGO, A., & ICHIKAWA, I. (1999). Potent antihypertrophic effect of the bradykinin B2 receptor system on the renal vasculature. *Kidney Int* **56**, 509-516.

VAN BUREN, J.J., BHAT, S., ROTELLO, R., PAUZA, M.E., & PREMKUMAR, L.S.(2005). Sensitization and translocation of TRPV1 by insulin and IGF-I. *Mol Pain* **1**, 17.

VAN CROMPHAUT, S.J., VANHOREBEEK, I., & VAN DEN, B.G. (2008). Glucose metabolism and insulin resistance in sepsis. *Curr Pharm Des* **14**, 1887-1899.

VANHOREBEEK, I., LANGOUCHE, L., & VAN DEN, B.G. (2005). Glycemic and nonglycemic effects of insulin: how do they contribute to a better outcome of critical illness? *Curr Opin Crit Care* **11**, 304-311.

VAVREK, R.J. & STEWART, J.M. (1985). Competitive antagonists of bradykinin. *Peptides* **6**, 161-164.

WALKER, K., DRAY, A., & PERKINS, M. (1996). Development of hyperthermia and hyperalgesia following intracerebroventricular administration of endotoxin in the rat: effect of kinin B1 and B2 receptor antagonists. *Immunopharmacology* **33**, 264-269.

WANG, X.Y., LI, W.Q., LU, J., LI, N., & LI, J.S. (2005). Mechanism of reduction of albumin expression induced by lipopolysaccharide in rat hepatocytes. *Chin Med J (Engl)* **118**, 1695-1702.

WERNER, M.F., KASSUYA, C.A., FERREIRA, J., ZAMPRONIO, A.R., CALIXTO, J.B., & RAE, G.A. (2007). Peripheral kinin B(1) and B(2) receptor-operated mechanisms are implicated in neuropathic nociception induced by spinal nerve ligation in rats. *Neuropharmacology* **53**, 48-57.

WHITE, M.F. & YENUSH, L. (1998). The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol* **228**, 179-208.

WILDEN, P.A., KAHN, C.R., SIDDLE, K., & WHITE, M.F. (1992). Insulin receptor kinase domain autophosphorylation regulates receptor enzymatic function. *J Biol Chem* **267**, 16660-16668.

WILLE, P.R., VITOR, R., GABILAN, N.H., & NICOLAU, M. (2001). Plasma extravasation mediated by lipopolysaccharide-induction of kinin B1 receptors in rat tissues. *Mediators Inflamm* **10**, 163-167.

WOLLERT, K.C. & DREXLER, H. (1997). The kallikrein-kinin system in post-myocardial infarction cardiac remodeling. *Am J Cardiol* **80**, 158A-161A.

YAMAGUCHI-SASE, S., HAYASHI, I., OKAMOTO, H., NARA, Y., MATSUZAKI, S., HOKA, S., & MAJIMA, M. (2003). Amelioration of hyperalgesia by kinin receptor antagonists or kininogen deficiency in chronic constriction nerve injury in rats. *Inflamm Res* **52**, 164-169.

YAMAMOTO-HONDA, R., KADOWAKI, T., MOMOMURA, K., TOBE, K., TAMORI, Y., SHIBASAKI, Y., MORI, Y., KABURAGI, Y., KOSHIO, O., AKANUMA, Y., (1993). Normal insulin receptor substrate-1 phosphorylation in autophosphorylation-defective truncated insulin receptor. Evidence that phosphorylation of substrates might be sufficient for certain biological effects evoked by insulin. *J Biol Chem* **268**, 16859-16865.

YERNENI, K.K., BAI, W., KHAN, B.V., MEDFORD, R.M., & NATARAJAN, R. (1999). Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* **48**, 855-864.

YUASA, T., UCHIYAMA, K., OGURA, Y., KIMURA, M., TESHIGAWARA, K., HOSAKA, T., TANAKA, Y., OBATA, T., SANO, H., KISHI, K., & EBINA, Y. (2009). The Rab GTPase-Activating Protein AS160 as A Common Regulator of Insulin- and Galphaq-Mediated Intracellular GLUT4 Vesicle DistributionA. *Endocr J*.

ZICK, Y. (2001). Recent advances in our understanding of insulin action and insulin resistance. *Diabetes Care* **24**, 588-597.

ZUCCOLLO, A., NAVARRO, M., & CATANZARO, O. (1996). Effects of B1 and B2 kinin receptor antagonists in diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* **74**, 586-589.