

Université de Montréal

**La contribution du récepteur B₁ des kinines dans les complications diabétiques
chez le rat traité au glucose, un modèle de résistance à l'insuline**

Par

Jenny Pena Dias

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de **Philosophiae Doctor (Ph.D)**

en Physiologie

Janvier 2012

©Jenny Pena Dias, 2012

Université de Montréal

Faculté de médecine

Cette thèse intitulée :

**La contribution du récepteur B₁ des kinines dans les complications diabétiques
chez le rat traité au glucose, un modèle de résistance à l'insuline**

Présentée par :

Jenny Pena Dias

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Lise Coderre, président-rapporteur

Dr. Réjean Couture, directeur de recherche

Dr. Daniel Lamontagne, membre du jury

Dr. Hélène Bachelard, examinateur externe

Dr. Ashok Srivastava, représentant de la doyenne

All trues are easy to understand once they are discovered; the point is to discover them.

Galilée

*Hâtez-vous lentement, et sans perdre courage,
Vingt fois sur le métier remettez votre ouvrage,
Polissez-le sans cesse, et le repolissez,
Ajoutez quelquefois, et souvent effacez.*

Nicolas Boileau (1670)

À mes parents : Agapito et Caridad

J'ai toujours étudié en pensant à mon frère Ernesto, cette thèse est particulièrement dédiée à lui.

Remerciements

Je tiens à remercier particulièrement Dr. Réjean Couture, mon directeur de recherche, pour sa patience, son encadrement et ses enseignements. Son parcours scientifique, sa persévérance et son dynamisme sont une référence pour moi.

J'aimerais aussi remercier mes parrains Dr.s Lise Coderre et Madhu Anand-Srivastava ainsi que Dr. Pierre Beaulieu pour leur attention et précieux conseils ainsi que mes collègues de laboratoire: Sébastien Talbot, Nejla Tidjane, Helaine de Brito Perreira et Emna Chamí. Je ne peux oublier Christopher, Laurene et Corinne qui m'ont toujours encouragée durant les différentes étapes de mes études de Ph.D.

Un remerciement spécial à ma famille, à mes parents ainsi qu'à ma cousine Amélia Bastista Esperanca et à la famille Pena: Tia Bertila, Tio Ernesto, Tia Margarita, Dulce, Sulaima, Surama et Deyarina qui de loin ont toujours su m'appuyer.

J'aimerais aussi remercier les organismes subventionnaires qui m'ont accordée des bourses d'étude au doctorat: le Fonds de la recherche en santé du Québec, l'Association Canadienne du Diabète ainsi que les Instituts de recherche en Santé du Canada pour la bourse Frederick Banting and Charles Best Canada.

Résumé

Les kinines agissent sur deux types de récepteurs couplés aux protéines G, nommés B₁ et B₂, lesquels jouent un rôle important dans le contrôle cardiovasculaire, la nociception et l'inflammation. Nous considérons l'hypothèse que le récepteur B₁ des kinines est induit et contribue aux complications diabétiques, incluant l'hypertension artérielle, les polyneuropathies sensorielles, l'augmentation du stress oxydatif vasculaire, l'inflammation vasculaire et l'obésité chez le rat traité au D-glucose (10% dans l'eau de boisson) pendant 8 ou 12 semaines. Dans ce modèle de résistance à l'insuline, nous avons évalué les effets d'un traitement pharmacologique d'une semaine avec un antagoniste du récepteur B₁ des kinines, le SSR240612 (10 mg/kg/jr). Les résultats montrent que le SSR240612 renverse l'hypertension, l'allodynie tactile et au froid, la production de l'anion superoxyde et la surexpression de plusieurs marqueurs inflammatoires dans l'aorte (iNOS, IL-1 β , macrophage (CD68, CD11), ICAM-1, E-selectine, MIF ainsi que le B₁R) et dans les adipocytes (iNOS, IL-1 β , TNF- α et macrophage CD68). De plus, le SSR240612 corrige la résistance à l'insuline, les anomalies du profil lipidique plasmatique et le gain de poids et de masse adipeuse.

Ces données supportent l'implication des kinines dans les complications diabétiques dans un modèle animal de résistance à l'insuline et suggèrent que le récepteur B₁ est une cible thérapeutique potentielle dans le diabète et l'obésité.

Mots-clés : allodynie, diabète de type 2, hypertension artérielle, inflammation, obésité, récepteurs des kinines, résistance à l'insuline.

Abstract

Kinins act on two G-protein-coupled receptors, denoted as B₁ and B₂, and play an important role in cardiovascular regulation, nociception and inflammation. We have considered the hypothesis that kinin B₁ receptor is upregulated and involved in diabetic complications, notably hypertension, pain sensory neuropathy, the oxidative stress in the vasculature, vascular inflammation, insulin resistance and obesity in rats treated for 8 or 12 weeks with D-glucose (10% of glucose in their drinking water). In this model of insulin resistance, we assessed the effects of one-week treatment with SSR240612 (10 mg/kg/day), a selective kinin B₁ receptor antagonist. Data show that SSR240612 reverses high blood pressure, tactile and cold allodynia, the production of oxidative stress (superoxyde anion) in the aorta, the overexpression of iNOS, IL-1 β , macrophage (CD68, CD11), ICAM-1, E-selectine, MIF and B₁R in the aorta and iNOS, IL-1 β , TNF- α and macrophage (CD68) in adipocytes. Moreover, SSR240612 reverses insulin resistance, plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain.

These data support a key role for kinins in diabetic complications in a rat model of insulin resistance and suggest that kinin B₁ receptor is a promising therapeutic target in diabetes and obesity.

Keywords: allodynia, arterial hypertension, inflammation, insulin resistance, kinin receptors, obesity, type 2 diabetes

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	VII
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XV
PRÉAMBULE	XVII
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GÉNÉRALE : KININES, RÉSISTANCE À L'INSULINE, DOULEUR ET HYPERTENSION	- 1 -
1.0 LE SYSTÈME KALLICRÉINE-KININES.....	- 1 -
1.1.1 <i>Les kallikréines</i>	- 2 -
1.1.2 <i>Dégradation des kinines : par les kininases</i>	- 3 -
1.1.3 <i>Les récepteurs des kinines</i>	- 6 -
Le récepteur B ₂	- 6 -
Le récepteur B ₁	- 8 -
1.1.4 <i>Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines</i>	- 10 -
1.2. HOMÉOSTASIE DU GLUCOSE	- 12 -
1.3. DIABÈTE	- 13 -
1.3.1 <i>Épidémiologie du Diabète</i>	- 15 -
1.3.2 <i>Mortalité</i>	- 16 -
1.3.3 <i>Diabète de type 1</i>	- 17 -
1.3.3.1. <i>Auto-immun ou Type 1A</i>	- 17 -
1.3.3.2. <i>Idiopathique ou Type 1B</i>	- 17 -
1.3.4. <i>Pathogenèse de la résistance à l'insuline et le diabète de type 2</i>	- 19 -
1.3.4.1. <i>La génétique</i>	- 20 -
1.3.4.2. <i>L'environnement</i>	- 21 -
1.3.5. <i>La résistance à l'insuline et la dysfonction des cellules β du pancréas</i>	- 22 -
1.3.5.1. <i>La signalisation du récepteur à l'insuline</i>	- 23 -
1.3.5.2. <i>La régulation du récepteur à l'insuline via la phosphorylation sérine/thréonine de IRS-1</i>	- 25 -
1.3.5.3. <i>Le NF-κB et JNK dans la résistance à l'insuline</i>	- 28 -
1.3.5.4. <i>Kinines et hyperglycémie dans le diabète</i>	- 31 -
1.3.6. <i>Stress oxydatif et la production de l'anion superoxyde</i>	- 33 -
1.3.6.1. <i>Mécanisme d'amplification du stress oxydatif</i>	- 36 -
1.4. LA DOULEUR	- 45 -
1.4.1. <i>Les nocicepteurs</i>	- 45 -
1.4.2. <i>Propagation de la douleur</i>	- 46 -
1.4.3. <i>Traitement de la douleur chronique</i>	- 47 -
1.4.4. <i>La douleur neuropathique et la neuropathie diabétique</i>	- 47 -
1.4.4.1. <i>La douleur neuropathique</i>	- 47 -
1.4.4.2. <i>La sensibilisation périphérique ou centrale</i>	- 48 -
1.4.4.3. <i>Mécanisme de l'allodynie (douleur causée par les fibres Aβ)</i>	- 50 -
1.4.5. <i>Neuropathie diabétique</i>	- 50 -
1.4.5.1. <i>Les types de neuropathie diabétique</i>	- 51 -
1.4.5.2. <i>Le récepteur B₁ en lien avec la douleur</i>	- 53 -

1.5. HYPERTENSION ET DIABÈTE DE TYPE 2	- 54 -
1.5.1. Traitements.....	- 55 -
1.5.2. Le système rénine - angiotensine.....	- 55 -
1.5.3. Dysfonctions dans les cellules endothéliales (le stress oxydatif et le NO)	- 57 -
1.5.4. Dysfonctions dans les muscles lisses vasculaires.....	- 57 -
1.5.5. Kinines et l'hypertension.....	- 58 -
CHAPITRE 2 : PREMIER ARTICLE.....	- 61 -
2.1. HYPOTHÈSE	- 61 -
2.2. OBJECTIFS	- 61 -
2.3. APPROCHES EXPÉRIMENTALES	- 61 -
2.4. PUBLICATION.....	- 61 -
CHAPITRE 3 : INTRODUCTION GÉNÉRALE SUR L'INFLAMMATION VASCULAIRE.....	- 76 -
3.1. DYSFONCTION ENDOTHÉLIALE ET L'INFLAMMATION VASCULAIRE.....	- 76 -
3.1.1. Le récepteur B ₁ en lien avec l'inflammation vasculaire	- 80 -
CHAPITRE 4 : DEUXIÈME ARTICLE.....	- 81 -
4.1. HYPOTHÈSE	- 81 -
4.2. OBJECTIF	- 81 -
4.3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	- 81 -
4.4. PUBLICATION.....	- 81 -
CHAPITRE 5 : INTRODUCTION GÉNÉRALE SUR L'OBÉSITÉ.....	- 113 -
5.1. OBÉSITÉ.....	- 113 -
5.2. RÔLE DES ADIPOCYTES	- 115 -
5.3. LA RÉGULATION DE L'APPÉTIT	- 117 -
5.4. LA NUTRITION, L'AUGMENTATION DE LA CONSOMMATION DE BREUVAGE SUCRÉ ET L'AUGMENTATION DE POIDS -	
119 -	
5.4.1. Différence entre les diètes riches en glucose et fructose dans l'induction de l'obésité.....	- 119 -
5.5. TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES DE L'OBÉSITÉ.....	- 121 -
5.5.1. Classification.....	- 123 -
5.5.2. Les acides gras et la résistance à l'insuline.....	- 124 -
5.6. MODÈLE ANIMAL DE DIABÈTE DE TYPE 2, SYNDROME MÉTABOLIQUE	- 127 -
5.6.1. Modèles génétiques	- 128 -
5.6.2. Modèles nutritionnels.....	- 129 -
5.6.3. Kinines et obésité	- 132 -
CHAPITRE 6 : TROISIÈME ARTICLE.....	- 133 -
6.1. HYPOTHÈSE :	- 133 -
6.2. OBJECTIFS	- 133 -
6.3. APPROCHE EXPÉRIMENTALE	- 133 -
6.4. PUBLICATION.....	- 133 -
CHAPITRE 7 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	- 144 -
7.1. DISCUSSION GÉNÉRALE	- 144 -
7.2. CHOIX DU MODÈLE AU GLUCOSE : AVANTAGES ET LIMITATIONS	- 145 -

7.3. ÉTUDES SUPPLÉMENTAIRES	- 146 -
7.3.1. a) <i>La mesure de l'expression du facteur de transcription NF-κB/IKB</i>	- 146 -
7.3.1. b) <i>La mesure de l'expression de l'IRS-1</i>	- 147 -
7.3.2. <i>La contribution du B₁R chez le rat Zucker</i>	- 148 -
7.3.3. <i>Le poids en fonction du temps chez les rats traités au glucose</i>	- 149 -
7.4. EXPÉRIENCES COMPARANT LE BLOCAGE DU B ₁ R AVEC UN ANTAGONISTE NON PEPTIDIQUE SSR240612 ET UN ANTAGONISTE PEPTIDIQUE R-954.....	- 151 -
7.4.1. <i>L'expression du B₁R dans l'hypothalamus</i>	- 152 -
7.4.2. <i>L'expression IL-1β et B₁R dans l'aorte et iNOS dans le foie chez les rats traités au glucose</i>	- 154 -
7.4.3. <i>L'expression du B₁R et le stress oxydatif dans l'aorte</i>	- 156 -
7.5. PERSPECTIVES FUTURES	- 161 -
7.6. CONCLUSIONS	- 163 -
RÉFÉRENCES	- 164 -
ANNEXE	- 209 -

LISTE DES FIGURES

Chapitre 1 : Introduction générale : Kinines, résistance à l'insuline, douleur et hypertension

Figure 1. Le système kallibréine-kinines	- 1 -
Figure 2. Sites d'action des enzymes protéolytiques des kinines	- 5 -
Figure 3. Mécanismes de signalisation intracellulaires des récepteurs B1 et B2 des kinines....	- 11 -
Figure 4. La régulation du glucose dans l'organisme et son interaction avec l'insuline.	- 12 -
Figure 5. La physiopathologie du diabète de type 2.	- 19 -
Figure 6. Séquences menant au diabète de type 2.....	- 21 -
Figure 7. Principales voies de signalisation du récepteur à l'insuline.	- 24 -
Figure 8. Modulation du récepteur à l'insuline via l'IRS.	- 25 -
Figure 9. Mécanismes inhibiteurs de la signalisation de l'insuline.	- 28 -
Figure 10. NF- κ B et JNK, médiateurs de la résistance à l'insuline dans l'obésité en lien avec l'inflammation.....	- 29 -
Figure 11. Voies de formation des radicaux libres de l'oxygène ou des espèces réactives d'oxygène (ERO).	- 33 -
Figure 12. Les complications diabétiques causées par l'hyperglycémie et l'anion superoxyde.-	37 -
Figure 13. Les NOX dans la paroi d'un vaisseau.	- 40 -
Figure 14. L'assemblage et l'activation de la NOX2.....	- 41 -
Figure 15. Domaines de la NOS dans différents types cellulaires des mammifères.....	- 44 -
Figure 16. Hyperalgésie et Allodynie selon IASP en 2008	- 49 -

Chapitre 3 : Introduction générale sur l'inflammation vasculaire

Figure 17. Médiateurs de l'inflammation vasculaire.	- 77 -
Figure 18. Mécanismes d'activation des médiateurs de l'inflammation vasculaire.	- 79 -
Figure 19. Facteurs conduisant à l'obésité	- 115 -

Chapitre 4 : Deuxième Article

Figure 1. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on B ₁ R protein expression in the aorta of 8-week glucose-fed rats.	-108-
Figure 2. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on protein expression of eNOS (A) and iNOS (B) in the aorta of 8-week glucose-fed rats.....	-109-
Figure 3. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on protein expression of CD68 (A) and CD11b (B) in the aorta of 8-week glucose-fed rats.....	-110-
Figure 4. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on protein expression of IL-1 β (A), IL-6 (B) and TNF- α (C) in the aorta of glucose-fed rats.....	-111-
Figure 5. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on mRNA levels of ICAM-1 (A), E-selectin (B) and MIF-1 (C) in the aorta of glucose-fed rats.....	-112-

Chapitre 5 : Introduction générale sur l'obésité

Figure 20. Circuits neuronaux hypothalamiques dans la régulation du métabolisme du glucose.	118 -
Figure 21. Métabolisme dans le foie du fructose et du glucose.	- 120 -
Figure 22. Structure de l'acide palmiloléique, C16 :1 Δ 9 ω 7 ou C16 :1 Δ 9n-7	- 122 -
Figure 23. Biosynthèse des acides gras montrant le patron de la résistance à l'insuline dans le plasma.	- 125 -

Chapitre 7: Discussion générale et Conclusion

Figure 24. L'expression protéique de NF- κ B et IKB- α dans l'aorte suite à l'administration du SSR240612.....	- 147 -
Figure 25. Effet du SSR240612 sur les taux de IRS-1 de l'ARN messenger dans le foie et dans le muscle squelettique chez le rat traité au glucose pendant 8 semaines.	- 148 -
Figure 26. Courbes montrant le poids des animaux en fonction de la durée du traitement au glucose.	- 150 -
Figure 27. Photographie montrant la différence de taille de la région abdominale entre le rat témoin (control) et le rat traité au glucose pendant 24 semaines.	- 150 -
Figure 28. Densité des sites de liaison du B ₁ R dans l'hypothalamus de rats 1 sem après l'administration d'antagonistes (SSR240612 et R-954).	- 153 -

Figure 29. Effet d'un traitement d'une semaine avec le SSR240612 ou le R-954 sur (A) l'insuline plasmatique, (B) le glucose plasmatique (C) Index Homa. - 155 -

Figure 30. Effets du SSR240612 ou du R-954 sur l'expression (A) de la iNOS dans le foie et (B) de l'IL-1 β dans l'aorte..... - 156 -

Figure 31. Effet du SSR240612 ou du R-954 sur l'expression protéique du B1R dans l'aorte..- 157 -

Figure 32. Effet du SSR240612 ou du R-954 sur la production de l'anion superoxyde dans l'aorte. - 157 -

Figure 33. Effet de l'injection répétée de R-954 sur (A) l'allodynie tactile et (B) l'allodynie au froid..... - 159 -

Figure 34. Synthèse de la contribution en périphérie du B₁R dans les complications diabétiques....- 160 -

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre 1 : Introduction générale : Kinines, résistance à l'insuline, douleur et hypertension

Tableau 1. Quelques antagonistes du récepteur B2 des kinines.....	- 7 -
Tableau 2. Quelques antagonistes du récepteur B1 des kinines.....	- 9 -
Tableau 3. Étiologique du Diabète Mellitus.	- 13 -
Tableau 4. Critères de diagnostique du diabète.	- 14 -
Tableau 5. Incidence du diabète selon le pays, projection vers 2030.	- 16 -
Tableau 6. Homologues de NAD(P)H oxydase	- 39 -

Chapitre 4 : Deuxième Article

Table 1. Primers used to measure mRNA expression in aorta.....	-104-
Table 2. Antibodies used to measure protein expression in aorta.....	-105-
Table 3. Baseline parameters determined in glucose-fed rats treated with B ₁ R antagonist.....	-106-

Chapitre 5 : Introduction générale sur l'obésité

Tableau 7. Classification de l'obésité chez l'adulte en fonction de l'indice de masse corporelle	- 114 -
Tableau 8. Modèles de rongeurs ayant le syndrome métabolique.	- 128 -

Chapitre 7 : Discussion générale et Conclusion

Tableau 9. Paramètres de la composition corporelle des rats traités au glucose pendant 34 semaines.	- 151 -
--	---------

Liste des abréviations

AGE: produits terminaux de glycation
AgRP: *agouti-related protein*
AKt : protein Kinase B (PKB), une sérine/thréonine protéine kinase
AMPc: adénosine monophosphate cyclique
ARNm: messenger de l'acide ribonucléique
BH4 : tetrahydrobioptérine
BK: bradykinine
CCK: cholécystokinine
CCL2 ou 5: chemokine ligand 2 ou MCP-1
CGRP: peptide relié au gène de la calcitonine
CNTF: *ciliary neurotrophic factor*
COX : cyclooxygénase
CRH: *corticotrophin-releasing hormone*
CXCL4: *platelet-derived chemokine*
DAG: diacylglycérol
ECA: enzyme de conversion de l'angiotensine-1
EDHF: facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
EGF : *epidermal growth factor*
ERK1/2 : extracellular signal-regulated kinases
ERO : espèce réactive d'oxygène
FAD : flavine adénine dinucléotide
FGF: *fibroblast growth factor*
FMN : flavine mononucleotide
GAD₆₅ : acide glutamique décarboxylase
GLP-1: *glucagon-like peptide-1*
GLUT4: protéine transporteuse-4 du glucose
GMPc: guanosine monophosphate cyclique
GRB2 : *growth factor receptor-bound protein 2*
HDL: *high density lipoprotein*
IAAs : *insulin autoantibodies*
IB₄: isolectine B₄
ICAM-1: *intercellular Adhesion Molecule 1*
IECA :inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1
IFN- γ : *Interferon-gamma*
IGF: *insulin-like growth factor*
IKK β : *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*
IL-1: interleukine-1
Il-6: interleukine-6
IP₃: inositol triphosphate
IRS: substrat du récepteur à l'insuline
I κ B: inhibiteur du facteur de transcription nucléaire kappa B
JNK : *c-Jun N-terminal kinases*
KD: kallidine

KFPM: kininogène de faible poids moléculaire
KHPM: kininogène de haut poids moléculaire
LDL: *low density lipoprotein*
LPS : lipopolysaccharide
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*
MCP-1: *monocyte chemoattractant protein 1*
M-CSF : *macrophage colony-stimulating factor*
MEK : *mitogen/extracellular signal-regulated kinase*
MIF : *macrophage inhibitory factor*
MIP: *macrophage Inflammatory Proteins*
mTOR : *mammalian target of rapamycin*
NA: noradrénaline
NADPH oxydase : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxydase
NF- κ B: facteur de transcription nucléaire kappa B
NGF: facteur de croissance nerveux
NO: monoxyde d'azote
NOS: synthase du monoxyde d'azote
NPY: *neuropeptide Y*
p38 : p38 MAP kinase
PAI-1 : inhibiteur des activateurs du plasminogène
PDGF: *platelet-derived growth factor*
PDK1 : *pyruvate dehydrogenase [lipoamide] kinase isozyme 1*
PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*
PKC : *protein kinase C*
PLC : *phospholipase C*
POMC: *pro-opiomelanocortin*
PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptors*
Raf : *proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*
RAGE : récepteur des AGE
Ras : petite GTPase
SOS : *salt Overly Sensitive*
SP: substance P
TGF- β : *transforming growth factor beta*
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha
TRH: *thyrotropin releasing hormone*
VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule 1*
VEGF: *vascular endothelial growth factor*

Préambule

Cette thèse explique différents événements menant au diabète mellitus. Elle porte particulièrement sur la résistance à l'insuline/diabète de type 2 et la contribution du récepteur B₁ des kinines dans les complications de cette de maladie : l'hypertension, la neuropathie douloureuse, et dans les facteurs de risques : l'inflammation vasculaire et l'obésité.

Les kinines forment une petite famille de peptides incluant la bradykinine (BK), la kallidine (KD; Lys-BK) et la T-kinine (Ile-Ser-BK). Les membres les plus étudiés de cette famille sont la BK et la KD et leurs métabolites actifs produits par l'action enzymatique de la kininase I (des-Arg⁹-BK, des-Arg¹⁰-KD). Ces peptides produisent leurs effets biologiques via l'activation de deux types de récepteurs, nommés B₁ (B₁R) et B₂ (B₂R), à sept domaines transmembranaires et couplés à une protéine G. Le B₂R est un récepteur constitutif exprimé dans la plupart des tissus; il est activé par la BK, la KD et la T-kinine (chez le rat seulement). Contrairement au B₂R, le B₁R est absent ou faiblement exprimé dans les conditions physiologiques. Sélectivement activé par la des-Arg⁹-BK et la des-Arg¹⁰-KD, le B₁R est induit dans les conditions d'inflammation, en présence de cytokines, de facteurs de croissance ou d'endotoxines bactériennes.

Les kinines, peptides vasoactifs libérés localement, sont impliquées dans la perméabilité vasculaire, la vasodilatation, la contraction des muscles lisses, la douleur ainsi que dans des pathologies telles que le diabète, l'inflammation et les maladies cardiovasculaires. Ces peptides seraient aussi des neuromédiateurs centraux impliqués dans les voies associées à la nociception et au contrôle autonome des fonctions cardiovasculaires.

Des études en autoradiographie effectuées dans la moelle épinière et le cerveau confirment la présence du B₁R des kinines chez les rats STZ (streptozotocine, toxine qui détruit les cellules β du pancréas) (Ongali, Campos, 2004; Campos, Ongali, 2005), un modèle de diabète de type 1 ainsi que chez les rats traités au glucose, un modèle de résistance à l'insuline et de syndrome métabolique (El Midaoui et al., 2005). Dans ce modèle de résistance à l'insuline, les rats manifestent une hyperinsulinémie, une hypertension, une légère augmentation de la glycémie, une augmentation du stress oxydatif (anion superoxyde dans l'aorte) et des allodynies (El Midaoui et de Champlain 2002; 2005; Lungu et al., 2007; Ismael et al., 2008).

Cette thèse comporte trois objectifs. L'objectif premier a été de mieux comprendre le rôle du B₁R des kinines dans les complications diabétiques : hypertension et polyneuropathies dans un modèle de résistance à l'insuline. Nous avons étudié plus précisément l'effet d'un antagoniste non peptidique du B₁R des kinines (SSR240612, 10 mg/kg/jour pendant 7 jours) sur la pression systolique, les anomalies sensorielles telle que l'allodynie tactile et au froid chez des rats traités au glucose pendant 9 et 13 semaines. Nous avons aussi analysé par la même approche pharmacologique, la possibilité de l'implication du stress oxydatif dans les complications diabétiques et le possible lien entre le stress oxydatif et l'induction du B₁R. Le stress oxydatif augmente l'inflammation (Schulz, 2011) et une augmentation de l'anion superoxyde, un marqueur du stress oxydatif, a été observée dans l'aorte des rats traités au glucose (El Midaoui et de Champlain, 2002;2005). Des études *in vivo et in vitro* sur l'aorte isolée ont montré dans nos études que l'activation du B₁R des kinines avec un agoniste augmente la production de l'anion superoxyde. Le deuxième objectif a été d'analyser l'effet du SSR240612, 10 mg/kg/jour pendant 7 jours, sur des marqueurs inflammatoires dans l'aorte des rats traités au glucose pendant 9 semaines. Le troisième objectif a été d'étudier la présence de l'obésité chez le rat traité au glucose pendant 12 semaines et l'effet du SSR240612, 10 mg/kg/jour pendant 7 jours, sur le profil lipidique plasmatique, le gain de poids et la masse adipeuse de ces rats.

Ces études ont généré trois articles qui sont inclus dans cette thèse

1. **Jenny Pena Dias**, Sébastien Talbot, Jacques Sénécal, Pierre Carayon et Réjean Couture; Kinin B₁ receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. PLoS One. 2010 Sep 7;5(9):e12622.
2. **Jenny Pena Dias** et Réjean Couture; Suppression of vascular inflammation by kinin B₁ receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. Journal of Cardiovascular Pharmacology (JCVP-11-473, Sous presse).
3. **Jenny Pena Dias** et Réjean Couture; Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. Diabetes Obes Metab. 2012 Mar;14(3):244-53

Chapitre 1 : Introduction générale : Kinines, résistance à l'insuline, douleur et hypertension

1.0 Le système kallibréine-kinines

Le système kallibréine-kinines a été découvert en 1909 lorsque Abelous et Bardier ont montré que l'urine humaine injectée par voie intraveineuse au lapin produit une hypotension (Frey et al., 1926). Depuis lors, ce système suscite l'intérêt des chercheurs dû à sa dualité et à sa complexité. Il inclut les kinines, les précurseurs (kininogènes), les enzymes de synthèse (kallibréines), les enzymes de dégradation (kininases) et les récepteurs B₁ et B₂. Les kinines sont des peptides vasoactifs et autacoïdes qui incluent la bradykinine (BK), la kallidine (KD ou Lys-BK) et leurs métabolites actifs, la desArg⁹-bradykinine ainsi que la desArg¹⁰-kallidine. De plus, chez le rat on trouve une autre kinine, la T-kinine et son métabolite actif la desArg¹¹-T-kinine (Okamoto et Greenbaum, 1983) (Figure 1).

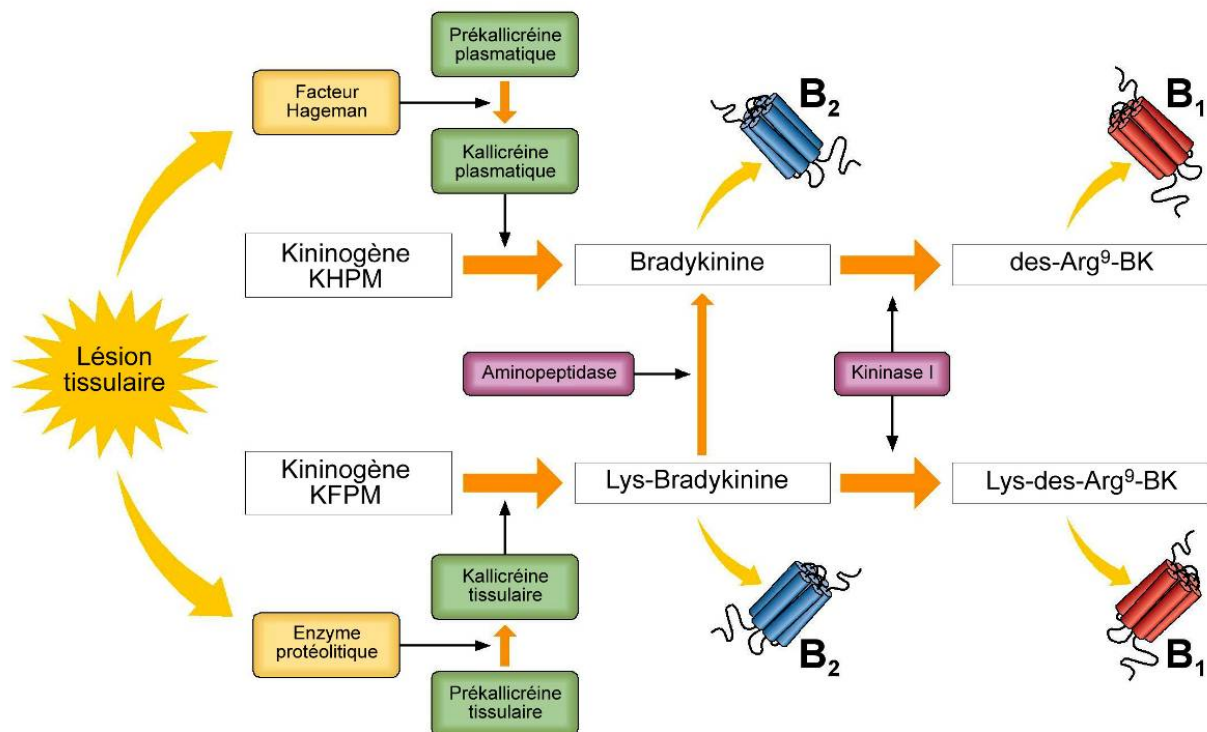


Figure 1. Le système kallibréine-kinines
Adapté d'après Rodi et al., 2005

1.1.0 Les kininogènes

Les kininogènes, précurseurs des kinines et substrats des enzymes kallibréines, sont composés de 6 domaines différents (Weisel et al., 1994). Chez l'humain, on retrouve deux types de kininogènes hépatique : le kininogène de haut poids moléculaire (KHPM) et le kininogène de faible poids moléculaire (KFPM). Ils sont produits par l'épissage alternatif du gène K localisé sur le chromosome 3q26. Le gène K contient 11 exons dont le 9^e code pour les chaînes lourdes du KHPM et du KFPM, le 10^e exon code pour la BK et la chaîne légère de KHPM, tandis que le 11^e exon code pour la chaîne légère du KFPM (Kitamura et al., 1985). Le KHPM est une glycoprotéine (α -globuline) circulante dans le plasma à des concentrations de 70 à 90 $\mu\text{g/ml}$ et dont le poids moléculaire est de 88-120 kDa (Adam et al., 1985). Le quatrième domaine du KHPM contient la séquence de la BK (Higashiyama et al., 1987). Le KFPM, précurseur de la KD, est une glycoprotéine (β -globuline) circulante dans le plasma à des concentrations de 170-220 $\mu\text{g/ml}$ et dont le poids moléculaire est de 50-68 kDa (Adam et al., 1985).

Chez le rat, on trouve le T- kininogène (68 kDa) provenant de la duplication du gène T. Ce kininogène a deux isoformes protéiques, T-I et T-II avec 96% d'homologie entre eux (Okamoto et Grennbaum 1983). Sur la base de leur structure, les gènes K et T sont des dérivés d'un gène ancestral commun (Nakanishi, 1987; Cole et Schreiber, 1992).

1.1.1 Les kallibréines

Les kinines sont générées par des enzymes protéolytiques les kallibréines, protéases à sérine. Il y a deux voies principales de production des kinines : la voie tissulaire et la voie plasmatique.

La kallibréine tissulaire, synthétisée sous forme de pro-kallibréine (forme inactive), est codée par de multiples gènes dépendant de la cellule glandulaire (glande salivaire, pancréas, système nerveux central, rein, pancréas, glande surrénale, intestin, prostate, etc) qui la sécrète par voie exocrine. Ces kallibréines tissulaires (25 à 45 kDa) (Bhoola et al., 1992) clivent le lien Met³⁷⁹-

Lys³⁸⁰ et Arg³⁸⁹-Ser³⁹⁰ de la KFPM pour libérer la kallidine (Fogaca et al., 2004). Chez le rat, on compte 13 kalllicréines tissulaires différentes (Gerald et al., 1986; Wines et al., 1989; 1991).

La kalllicréine plasmatique est synthétisée sous forme de prékalllicréine (forme inactive et circulante) par un seul gène au niveau du foie. La kalllicréine plasmatique est activée lorsque le plasma entre en contact avec une surface endothéliale chargée négativement entraînant la liaison et l'autoactivation du facteur XII (facteur Hageman) de coagulation en facteur XIIa. Ce dernier interagit avec la prékalllicréine couplée au KHPM. Cette interaction induit la transformation de la prékalllicréine en kalllicréine qui laisse échapper la BK du KHPM (Kaplan et al., 1997).

Les kinines sont des substances endogènes très puissantes impliquées dans les signes cardinaux de l'inflammation: douleur, chaleur, érythème, œdème (Couture et al., 2001). Ces peptides sont aussi des neuromédiateurs dans le système nerveux central (Couture et Lindsey, 2000) qui contrôlent les informations nociceptives (Laneuville et al., 1989), la pression artérielle (Madeddu et al., 1990; Lopes et Couture 1992; Lindsey et al., 1997) et bien d'autres phénomènes biologiques (Couture et Lindsey, 2000).

1.1.2 Dégradation des kinines : par les kininases

Les kinines sont très rapidement métabolisées par de nombreuses peptidases (la demie-vie de la BK est de 10 ± 1 sec chez le rat) (Décarie et al., 1996) dans le plasma, les tissus et les liquides biologiques. Trois grands groupes de kininases sont identifiés : les aminopeptidases, les endopeptidases et les carboxypeptidases (Lindsey et al., 1989).

Les aminopeptidases

Les aminopeptidases sont des enzymes qui agissent à l'extrémité N-terminale de la T-kinine, de la KD et de leurs métabolites actifs desArg¹¹-T-kinine et desArg¹⁰-kallidine pour former respectivement la BK et la desArg⁹-BK (Wolfrum et al., 1999). On compte deux types d'aminopeptidases : l'aminopeptidase M (KD et desArg¹⁰-KD) et l'aminopeptidase P (T-kinine et desArg¹¹-T-kinine) chez le rat (Chen et al., 1991) (**Figure 2**).

Les carboxypeptidases

Les kininases I, la kininase II ou enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ECA) et l'enképhalinase (encéphaline) ou endopeptidase neutre (EPN) font partie des carboxypeptidases. Elles agissent à l'extrémité C-terminale des kinines (**Figure 2**).

Les kininases I

Les kininases I sont aussi connues sous le nom de carboxypeptidase M (dans les membranes cellulaires) et de carboxypeptidase N (dans le plasma). Elles clivent le lien entre l'arginine en C-terminal (position 9) et la phénylalanine (position 8) pour former des métabolites actifs (la desArg¹¹-T-kinine, la desArg¹⁰-kallidine et la desArg⁹-BK) (**Figure 2**).

La kininase II et l'endopeptidase neutre

La kininase II (ECA) et l'endopeptidase neutre (EPN) appartiennent au dernier groupe des carboxypeptidases. La kininase II est une glycoprotéine métallo-protéase à Zinc. Chez l'humain, deux types de kininase II sont exprimés : 1- une protéine de 150-180 kDa, présente dans la plupart des tissus, est responsable de la dégradation des deux tiers de la BK du sérum (Décarie et al., 1996); 2- une protéine de 100-110 kDa retrouvée dans les testicules et contribuant à la fertilité masculine (Williams et al., 1992; Fuchs et al., 2005). L'EPN et la kininase II produisent le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ en position C-terminal et le métabolite inactif BK (1-7). La BK (1-7) est clivée par l'EPN (en position 4) entre la glycine et la phénylalanine pour générer la BK (1-4), peptide inactif. La kininase II clive à son tour les kinines entre la phénylalanine (en position 5) et la sérine (en position 6) pour générer le BK (1-5) (Erdős, 1990 a et b) (**Figure 2**).

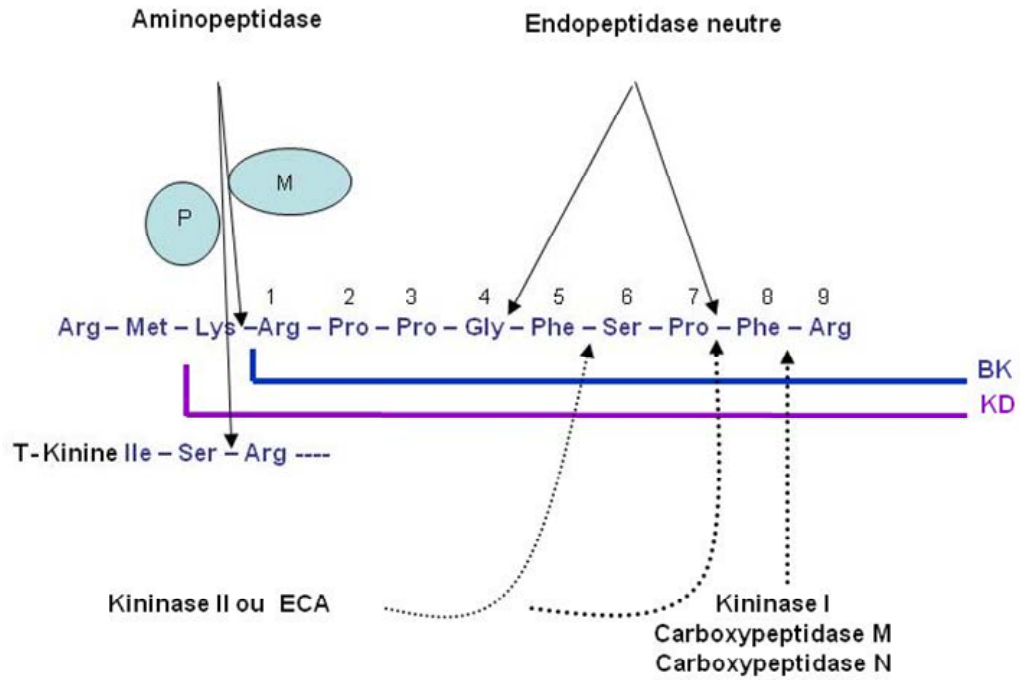


Figure 2. Sites d'action des enzymes protéolytiques des kinines
Adapté de Regoli et Barabé, 1980.

1.1.3. Les récepteurs des kinines

Les kinines et leurs métabolites actifs agissent par l'activation de deux types de récepteurs nommés B₁ et B₂. Ces récepteurs font partie de la grande famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G (Faussner et al., 1998). La BK, la kallidine et la T-kinine sont les agonistes endogènes du récepteur B₂ tandis que la desArg⁹-BK et la desArg¹⁰-kallidine sont les agonistes sélectifs du récepteur B₁ (Gabra et al., 2003). Chez l'humain, ces deux récepteurs sont codés par des gènes distincts (Powell et al., 1993; Webb et al., 1994) situés sur le chromosome 14, en position q32 (Kammerer et al., 1995). De plus, ces récepteurs ont une homologie de 36% entre eux, la même masse moléculaire (40-41 kDa) (Menke et al., 1994; Schanstra, Bataille, 1998) et sont composés de 364 (B₂) et de 353 acides aminés (B₁) (Menke et al., 1994). Il existe des différences notables au niveau de l'extrémité C-terminale et des boucles intracellulaires 2 et 3 des récepteurs (Raidoo et Bhoola, 1998; Prado et al., 2002).

Le récepteur B₂

Le récepteur B₂ (B₂R) est exprimé de façon constitutive dans la plupart des tissus : les cellules endothéliales, les fibroblastes, les neurones, les muscles lisses (Bhoola et al., 1992). Ce récepteur est à l'origine de la vasodilatation et de l'augmentation de la perméabilité vasculaire. L'augmentation de la perméabilité vasculaire est due à la contraction des cellules endothéliales vasculaires et à l'augmentation de la pression hydrostatique dans les capillaires causée par la dilatation des artérioles pré-capillaires et par la constriction des vaisseaux post-capillaires. L'activation du B₂R entraîne l'augmentation de l'AMPc/GMPc indirectement via la libération des prostacyclines et du NO qui causent la vasodilatation (Gabra et al., 2003). La BK cause l'inflammation neurogénique en activant les fibres sensorielles de type C qui libèrent la substance P et le peptide relié au gène de la calcitonine (CGRP). Ceci entraîne aussi la libération des prostaglandines, des médiateurs des mastocytes (histamine et sérotonine) et des cytokines (Dray, 1997; Couture et al., 2001). La BK demeure l'agoniste le plus utilisé bien que le [Tyr(Me)⁸]-BK et le [Hyp³, Tyr((Me)⁸]-BK soient des agonistes B₂ plus puissants et plus sélectifs que la BK (Regoli et al., 1991). Dans les cellules en culture, l'activation du B₂R occasionne une redistribution cellulaire, une désensibilisation et une endocytose permettant l'internalisation du récepteur. En condition physiologique, la stimulation du B₂R par l'agoniste BK cause l'hydrolyse

de l'inositol phosphate et l'augmentation du calcium intracellulaire conduisant au cycle de désensibilisation/endocytose qui dure environ 15 min où il se produit la perte des B₂R de la surface cellulaire et son internalisation. La désensibilisation du B₂R implique la phosphorylation serine/thréonine à l'extrémité C-terminale du récepteur (Blaukat et al., 1996). La stimulation du B₂R par la BK produit une internalisation induisant une redistribution cellulaire vers les cavéoles. Suite à quoi, il y a une complète resensibilisation ce qui recycle le récepteur à la membrane (Bachvarov et al., 2001; de Weerd and Leeb-Lundberg, 1997; Leeb-Lundberg et al., 2005).

Tableau 1. Quelques antagonistes du récepteur B2 des kinines.

Code	Structure	pA ₂	Référence
Hoe 140	D-Arg-[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,D-Tic ⁷ ,Oic ⁸]-BK	8	Féléto et al., 1995
FR173657	(8-[3-[N-[(E)-3-(6-acetamidopyridin-3-yl)acryloyl]glycyl]-N-m ethylamino]-2,6-dichlorobenzoyloxy]-2-methylquinoline),	8,2	Rizzi et al., 1997
LF16-0687	(1-[[2,4-dichloro-3-[[2,4-dimethylquinolin-8-yl)oxy] methyl]phenyl]sulfonyl]-N-[3-[[4-(aminoimethyl) phenyl] carbonylamino]propyl]-2(S)-pyrrolidinecarboxamide)	9,1	Pruneau et al., 1999
MEN11270	H-D-Arg-Arg-Pro-Hyp-Gly-Thi-c(Dab-DTic-Oic-Arg)c(7γ-10 α)	8,14	Meini et al., 1999

pA₂ = mesure d'affinité de l'antagoniste. Les valeurs de pA₂ dans ce tableau ont été mesurées dans la veine ombilicale humaine.

L'ordre d'affinité des antagonistes du B₂R a été analysé dans les fibroblastes humains: Icatibant (Hoe140) (pK_i = 10.6) ≈ MEN 11270 (pK_i = 10.3) ≈ B9430 (pK_i = 10.0) > B9858 (pK_i = 8.0) > FR173657 (pK_i = 7.6) > WIN64338 (pK_i = 7.2) > Lys-[des-Arg⁹,Leu⁸]-BK (pK_i < 6) > [des-Arg⁹,Leu⁸]-BK (pK_i < 5) (Meini et al., 1999). L'antagoniste non peptidique FR173657 est efficace oralement dans des modèles d'inflammation et de douleur (Allogho et al., 1995; Asano et al., 1999) et le LF16-0687 empêche l'hypertension intracrâniale (Zweckberger et al., 2009) et les œdèmes au niveau du cerveau (Kaplanski et al., 2003) (**Tableau 1**).

Le récepteur B₁

Le récepteur B₁ est généralement absent ou faiblement exprimé dans les tissus normaux. Il est induit par des lésions tissulaires, l'inflammation, les facteurs de croissance et les cytokines pro-inflammatoires: l'interleukine-1 β (IL-1 β) et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α) (Marceau et al., 1998). L'induction du récepteur B₁ par les cytokines est relayée en partie par le facteur de transcription nucléaire (NF- κ B) et par la MAP-kinase (p-38 et JNK) (Schanstra et al., 1998). Il y a des éléments de régulation du lipopolysaccharide (LPS), de l'IL-1 β , du TNF- α et du NF- κ B dans le gène du récepteur B₁ (Calixto et al., 2001).

Les deux agonistes endogènes, la desArg⁹-BK et la desArg¹⁰-KD, ont une affinité distincte pour le récepteur B₁ selon l'espèce. Chez l'humain et le lapin, l'affinité de la desArg¹⁰-kallidine est 2000 et 150 fois plus élevée que celle de la desArg⁹-BK, respectivement. Chez la souris, la desArg⁹-BK est de 2-3 fois plus puissante sur le B₁R (Hess et al., 1996).

Le récepteur B₁ diffère du récepteur B₂, car il n'a pas de sérine ni de thréonine à l'extrémité C-terminale qui pourraient être phosphorylées (Blaukat et al., 1999a). Ainsi, il a une faible désensibilisation (heures) par internalisation (Smith et al., 1995; Mathis et al., 1996). Le B₁R peut s'internaliser de manière constitutive sans qu'il y ait stimulation avec son agoniste (Fortin et al., 2003). Une fois internalisé, il est dégradé par les lysosomes (Enquist et al., 2007).

Tableau 2. Quelques antagonistes du récepteur B1 des kinines.

Code	Structure	pA ₂	Référence
Leu ⁸ -des-Arg ⁹ -BK	Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Leu-OH	5.9	Abbas et al., 1998
[des-Arg ¹⁰]-Hoe 140	Des-Arg ⁹ -D-Arg-[Hyp ³ ,Thi ⁵ ,D-Tic ⁷ ,Oic ⁸]-BK	6.2	Sardi et al., 1997
R-914	Ac-Lys-Lys-[^α (Me)Phe ⁵ , D-βNal ⁷ ,Ile ⁸]des-Arg ⁹ -BK	8.65	Gobeil et al., 1999
R-715	Ac-Lys-[D-βNal ⁷ ,Ile ⁸]des-Arg ⁹ -BK	8.4-8.5	Neugebauer et al., 2002
R-954	Ac-Orn-[Oic ² , ^α (Me)Phe ⁵ , D-βNal ⁷ ,Ile ⁸]des-Arg ⁹ -BK	8.4-8.6	Neugebauer et al., 2002
LF-22-0542	<i>N</i> -[[4-(4,5-dihydro-1 <i>H</i> -imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]- <i>N</i> -methylacetamide fumarate	9.7	Porreca et al., 2006
SSR240612	[(2R)2[[[(3R)3(1,3-benzodioxol-5-yl)3[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]3(4[[[2R,6S]2,6-dimethylpiperidiny]methyl]phenyl)- <i>N</i> -isopropyl- <i>N</i> -methylpropanamide hydrochloride]	9.4	Gougat et al., 2004

Les valeurs de pA₂ ont été mesurées dans la veine ombilicale humaine sauf pour le SSR240612 qui a été mesuré dans l'iléon du rat.

Les antagonistes peptidiques du récepteur B₁ : Leu⁸-des-Arg⁹-BK et [des-Arg¹⁰]-Hoe 140, sont plus susceptibles à la dégradation enzymatique et sont moins stables que les antagonistes peptidiques modifiés R-914, R-715, R-954 (Gobeil et al., 1999 ; Simard et al., 2002) qui sont plus résistants à la dégradation. Les antagonistes non peptidiques LF-22-0542 et SSR240612 ont une efficacité de longue durée et une bonne biodisponibilité (**Tableau 2**). De plus, le SSR240612 a une autre particularité, il est actif par voie orale.

1.1.4. Les mécanismes de signalisation des récepteurs des kinines

La stimulation des récepteurs B₁ et B₂ déclenche plusieurs mécanismes de signalisation intracellulaires (**Figure 3**) via l'activation des protéines Gα_{i2} et Gα_q (Prado et al., 2002). On note différents seconds messagers dans les mécanismes de signalisation :

- 1- L'activation directe et indirecte de l'adénylate cyclase et de la guanylate cyclase, celles-ci forment de l'adenosine monophosphate cyclique (AMPC) et de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc).
- 2- L'activation de la phospholipase A₂ ou l'action d'une lipase via le diacylglycérol (DAG) mène à la production de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires permettant la libération de prostaglandines (PGE₂) et de prostacycline (PGI₂) (Yamasaki et al., 2000).
- 3- L'activation de la phospholipase C (PLC) entraîne l'augmentation intracellulaire de l'inositol triphosphate (IP₃) et du DAG. Ce dernier active la protéine kinase C (PKC) (Francel et al., 1987). Pour sa part, l'IP₃ augmente les niveaux intracellulaires de Ca²⁺ et active l'enzyme NOS favorisant la relâche du NO, lequel cause une vasodilatation par l'augmentation de la concentration du GMPc dans le muscle lisse vasculaire (Su et al., 2003).

Malgré la similitude des voies de signalisation des récepteurs B₁ et B₂, il y a quelques différences. Par exemple, la stimulation du récepteur B₁ résulte en une élévation de calcium soutenue dû à la faible internalisation de ce récepteur comparativement à la libération du calcium qui est transitoire suite à la stimulation du B₂R. (Moreau et al., 2005).

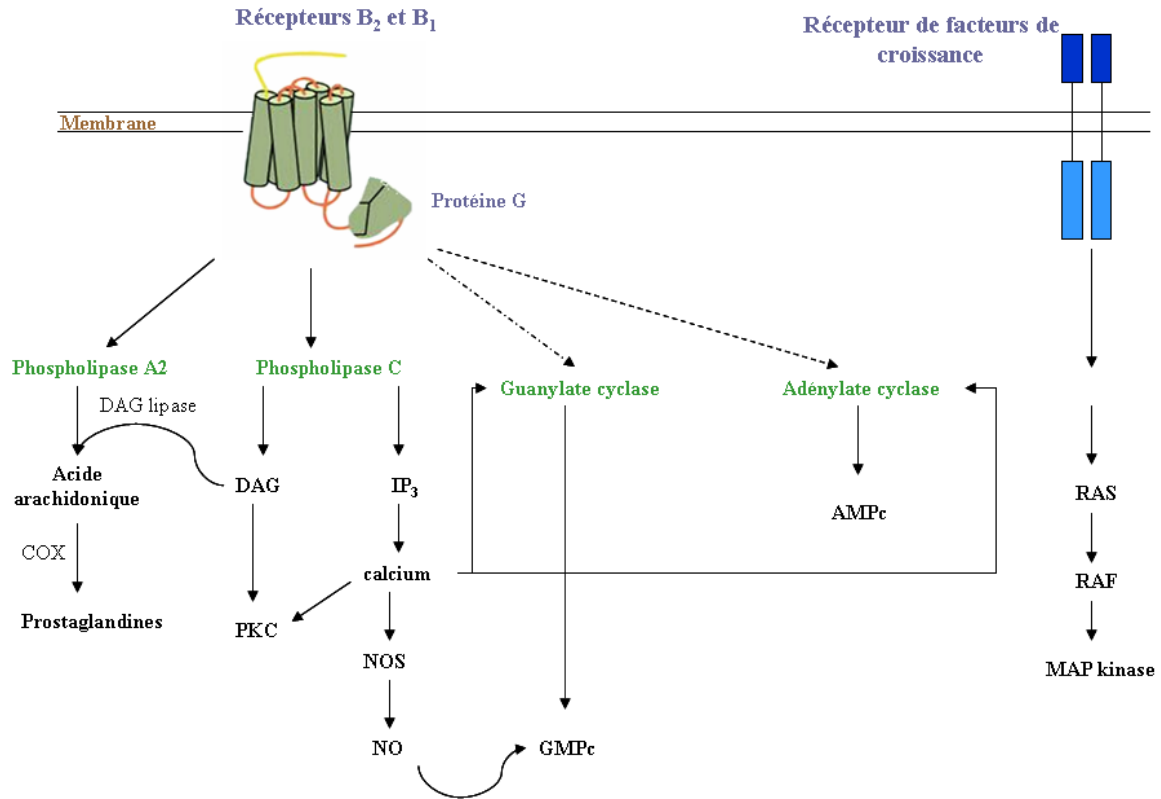


Figure 3. Mécanismes de signalisation intracellulaires des récepteurs B1 et B2 des kinines.
Adapté selon Gabra et al. 2003.

Le récepteur B₂ est couplé à d'autres cascades de signalisation comme :

- 1- L'activation de protéines à activité tyrosine kinase cytoplasmiques. L'autophosphorylation des récepteurs tyrosine kinase stimule la PLC γ qui relâche le calcium intracellulaire (Ca²⁺) via IP₃, la phosphorylation de MAPK particulièrement ERK1/2 par l'intermédiaire de l'activation de voies de signalisation calcium/calmoduline, β arrestine, Src, PKC et la MAPK kinase (Luttrell et al., 1999; Velarde et al., 1999; Greene et al., 2000).
- 2- La phosphorylation de la tyrosine des récepteurs des facteurs de croissance incluant EGF, IGF, VEGF et TGF- β . Par exemple, l'activation du récepteur EGF induit l'activation de la Ras kinase (Gabra et al., 2003) ainsi que l'activation du Raf et la MAP-kinase.
- 3- L'activation de la phospholipase D (PLD) augmente l'acide phosphatidique et le DAG.

1.2. Homéostasie du glucose

Dans le stade de postabsorption (à jeun), l'énergie est délivrée de la lyse du stockage des graisses endogènes, de la lyse du glycogène hépatique, de la gluconéogenèse hépatique ainsi que de la production de glucose rénal afin de maintenir la glycémie (augmentation du glucagon des cellules α du pancréas, diminution d'insuline des cellules β). Cependant, en postprandiale, l'organisme favorise le stockage de l'énergie. L'ingestion de nourriture (phase postprandiale) fait augmenter le glucose, les acides gras, les acides aminés et les incretines qui stimulent la relâche d'insuline afin de faire entrer le glucose dans les muscles et les adipocytes via les transporteurs au glucose (GLUT). Ceci supprime la production de glucose hépatique et rénal ce qui fait diminuer la glycémie (Figure 4).

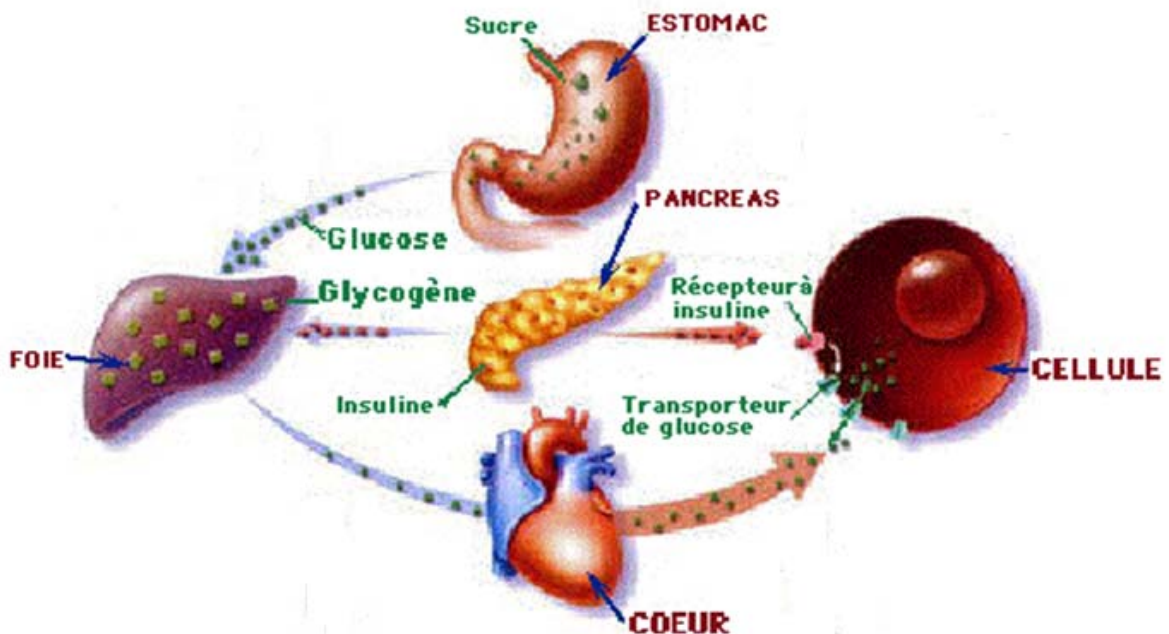


Figure 4. La régulation du glucose dans l'organisme et son interaction avec l'insuline.

Adapté selon <http://lesconseilsdupharmacien.info/diabete.htm>

1.3. Diabète

Le diabète mellitus est caractérisé par une hyperglycémie chronique avec dérèglement du métabolisme des carbohydrates, des graisses et des protéines résultant d'un dysfonctionnement de la sécrétion d'insuline ou de l'action de l'insuline ou des deux. Le diabète conduit à plusieurs complications à long terme qui affectent plusieurs organes et causent des maladies cardiovasculaires, la rétinopathie, la neuropathie, la néphropathie et l'ulcération des pieds. Les symptômes sont la soif, la polyurie, la vision embrouillée, la perte de poids, la polyphagie, la cétoacidose et le coma.

Le Diabète Mellitus inclut quatre catégories où le diabète de type 1 et le diabète de type 2 remplacent l'ancienne terminologie (diabète insulino-dépendant et non insulino-dépendant) (**Tableau 3**).

Tableau 3. Étiologique du Diabète Mellitus.

I. Diabète Type 1 (5-10%)
A. Auto-immune ou Type 1A
B. Idiopathique ou Type 1B
II. Diabète Type 2 (90%)
III. Types spécifiques de Diabète (2-5%)
A. Défaut génétique des cellules β du pancréas
B. Défaut génétique de l'action de l'insuline
C. Maladie de la fonction exocrine du pancréas
D. Endocrinopathie
E. Induction par molécules chimiques (médicaments)
F. Infections
IV. Diabète gestationnel (1-14%)

Tableau 4. Critères de diagnostique du diabète.

	Normal	Intolérance au glucose à jeun	Intolérance au glucose	Diabète mellitus
à jeun				
mg/dL	< 100	100 -125	-	≥ 126
mmol/L	< 5.6	5.6 – 6.9	-	≥7.0
2h post hyperglycémie provoquée				
(75 g ou 100 g de glucose)				
mg/dL	< 140	-	140 – 199	≥ 200
mmol/L	< 7.8	-	7.8 – 11.0	≥ 11.1

(Clinical Practice Recommendations, 2011)

La mesure de l'hémoglobine glycosylée (HbA_{1c}) pour fin de diagnostique n'est pas encore recommandée dû au manque d'uniformité mondiale. Cependant, selon l'Association Américaine du diabète, un patient avec une HbA_{1c} ≥ 6.5% devrait être considéré diabétique (Clinical Practice Recommendations, 2011).

L'intolérance au glucose peut être mesurée par l'hyperglycémie provoquée (OGTT en anglais). Au Canada, le test d'hyperglycémie provoquée est effectué à jeun suivant l'ingestion de 75 g de glucose par kilogramme de poids corporel et des mesures de glycémie sont faites pendant 2h à différents intervalles (**Tableau 4**). Par contre, le diabète peut être diagnostiqué suivant une glycémie supérieure à 11.1 mmol/L à n'importe quel moment de la journée.

1.3.1. Épidémiologie du Diabète

L'ethnie, l'âge, l'histoire familiale, l'environnement ainsi que la génétique jouent un rôle dans l'apparition du diabète de type 1 et de type 2. Des facteurs environnementaux comme l'exposition au lait de vache, au virus cosackie B, au cytomégalovirus et à l'antigène HLA augmente les risques d'avoir le diabète de type 1. Voici un tableau avec certains facteurs de risque pour le diabète de type 2 (Leu et Zonszein, 2010).

- ✓ ≥ 45 ans
- ✓ Obésité (index de masse corporelle ≥ 30 kg/m²)
- ✓ Histoire familiale de diabète
- ✓ Inactivité physique
- ✓ Ethnie (américain hispanique, américain autochtone, américain-africain, américain-asiatique, natif des îles du pacifique)
- ✓ Histoire de diabète gestationnel
- ✓ Identification de l'intolérance au glucose
- ✓ Hypertension ($\geq 140/90$ mmHg)
- ✓ HDL cholestérol ≤ 35 mg/dL (0.90 mmol/L) et/ou triglycérides ≥ 250 mg/dL (2.82 mmol/L)
- ✓ Histoire de maladie vasculaire
- ✓ Syndrome ovaire polykystique

En 2000, la prévalence mondiale estimée du diabète chez les adultes était de 2.8% ou 171 millions de personnes. Au Canada à la même année, la prévalence était de 4.5% (excluant les territoires) (Millar et Young, 2003) tandis qu'en 2008, elle a augmenté à 5% ainsi qu'à 4.9% pour la province de Québec (Canadian Community Health survey, 2008). En 2020, les experts s'attendent à 26, 2 % de prévalence du diabète et du prédiabète donc environ une personne sur quatre (http://www.diabetes.ca/documents/get-involved/WEB_FR_CDA_Report.pdf). De plus, de nombreux cas de diabète sont inconnus, car ils ne sont pas dépistés. L'organisation mondiale de la santé s'attend à ce que la prévalence mondiale du diabète augmente à 4.4% ou 366 millions de personnes d'ici 2030 (Chamany et Tabaei, 2010).

Tableau 5. Incidence du diabète selon le pays, projection vers 2030.

Rang	2000	2000	2030	2030
	Pays	Pers avec diabète (millions)	Pays	Pers avec diabète (millions)
1	Inde	31.7	Inde	79.4
2	Chine	20.8	Chine	42.3
3	USA	17.7	USA	30.3
4	Indonésie	8.4	Indonésie	21.3
5	Japon	6.8	Pakistan	13.9
6	Pakistan	5.2	Brésil	11.3
7	Fed. Russe	4.6	Bangladesh	11.1
8	Brésil	4.6	Japon	8.9
9	Italie	4.3	Philippine	7.8
10	Bangladesh	3.2	Égypte	6.7

Selon Wild et al., 2004

L'Inde continuera à être le pays ayant le plus d'individus atteints de diabète. La plus grande augmentation de la prévalence du diabète sera dans les pays en voie de développement où la plus grande proportion d'individus avec le diabète se situe entre 45-64 ans (**Tableau 5**). De plus, les personnes avec le diabète seront de plus en plus jeunes. La prévalence du diabète est plus grande chez les hommes. Cependant, puisque la prévalence du diabète augmente avec l'âge et que les femmes vivent plus longtemps que les hommes, il y a donc plus de femmes diabétiques que d'hommes (Wild et al., 2004).

1.3.2. Mortalité

Le diabète était la sixième cause de mortalité aux États-Unis en 2004 (Kung, Hoyert, 2005). Les individus avec le diabète souffrant de maladies cardiovasculaires ont une mortalité augmentée de 2 à 4 fois comparativement aux individus sans diabète (Gu et al., 1998; Gregg et al., 2007). La

majorité des individus atteints du diabète de type 1 meurent à la suite d'un coma aigu, de maladies rénales ou cardiovasculaires. Les causes principales de mortalité pour le diabète de type 2 sont les maladies du cœur et les accidents cérébrovasculaires (Geiss et al., 1985). L'espérance de vie des diabétiques est entre 55 et 74 ans, soit environ 4 à 8 ans de moins que les personnes sans diabète.

1.3.3 Diabète de type 1

1.3.3.1. Auto-immun ou Type 1A

Cette forme de diabète compte pour 5 à 10% de toutes les catégories de diabète. Le type 1 est causé par la destruction auto-immune des cellules β du pancréas, sécrétant l'insuline, par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et par les macrophages qui s'infiltrent dans les îlots de Langerhans (Atkinson, Maclaren, 1994). Les anticorps auto-immuns dirigés contre les cellules (ICAs), l'insuline (IAAs), l'acide glutamique décarboxylase (GAD_{65}) et la protéine *tyrosine phosphatase-like* IA-2 et IA-2 α induisent la destruction des cellules β pancréatiques. Environ 90% des patients présentent un de ces antigènes dans la phase d'initiation du diabète de type 1 (Zimmet et al., 1994; Landin-Olsson et al, 2002). Les patients qui ont besoin d'insuline afin de survivre peuvent être plus susceptibles à développer des maladies autoimmunes comme la maladie de Graves, la thyroïdite de Hashimoto, la maladie d'Addison, le vitiligo et l'anémie pernicieuse (Gabriel et al., 2002). Il existe plusieurs stades dans le diabète de type 1 en commençant par des susceptibilités génétiques qui aboutissent à une complète destruction des cellules β du pancréas.

1.3.3.2. Idiopathique ou Type 1B

Ce type de diabète de type 1, d'origine héréditaire est moins bien compris dû au manque d'évidence de la destruction auto-immune des cellules β du pancréas. Ce diabète peut se manifester à la suite d'une forte baisse de la quantité d'insuline qui peut causer une cétoacidose (Reich et al., 2001). Ce type de diabète a une grande association avec les gènes qui se retrouvent dans le *major histocompatibility complex* (MHC) et les allèles spécifiques du loci humain DQ-A et DQ-B (Gabriel et al., 2002). Le type 1B est caractérisé par un faible niveau d'insuline et de

peptide-C, les patients ont besoin d'insuline exogène afin de survivre comme c'est le cas pour le type 1A.

Plusieurs études suggèrent que la dysfonction des cellules β du pancréas peut-être produite par une exposition prolongée des cellules à de fortes concentrations de glucose. Les cellules β du pancréas sont très sensibles aux espèces réactives d'oxygène (ERO), car elles possèdent de faibles quantités d'enzymes antioxydantes comme la catalase et la superoxyde dismutase qui détoxifient les ERO. Les ERO dans la cellule β pancréatique détruisent le *duodenum homeobox-1* (PDX-1), un régulateur essentiel de l'activité du promoteur de l'insuline affectant la fonction sécrétoire de la cellule (Robertson et al., 2003). De plus, ils activent le NF- κ B qui contribue à l'induction de l'apoptose des cellules β du pancréas et au déclenchement de la réponse inflammatoire (Yerneni et al., 1999). Les ERO suppriment la première phase de la sécrétion de l'insuline induite par le glucose en inhibant l'activité de GAPDH (glyceraldéhyde 3 phosphatate déhydrogenase), un enzyme glycolytique (Sakai et al., 2003). Ces études suggèrent que le stress oxydatif est le médiateur de la glucotoxicité et de la lipotoxicité des cellules β du pancréas.

La transplantation du pancréas est une thérapie afin de remplacer les cellules β . Celle-ci a un taux de succès plus grand chez les patients qui sont au début de la maladie (Ryan et al., 2006) et elle est seulement recommandée pour les patients avec des hypoglycémies ou hyperglycémies sévères. Les résultats à long terme de cette dernière thérapie ne sont pas très encourageants puisque après 5 ans post-transplantation, les fonctions de la greffe déclinent (de Kort et al., 2011) et environ 10% des patients seulement deviennent insulino-indépendant (Ryan et al., 2005; Harlan et al., 2009). L'administration des anticorps monoclonaux anti-CD3 à des patients diabétiques de type 1 maintient la fonction des cellules β résiduelles (Keymeulen et al., 2005). Enfin, la combinaison de plusieurs thérapies (Van Belle et al., 2011) incluant la régénération des cellules β ainsi que l'administration d'anticorps monoclonaux contre IL-1, anti-CD3 et anti-CD20 (Sutherland et al., 2009; Mandrup-Poulsen, Pickersgill et al., 2010; Van Belle et al., 2011) pourrait aider à prévenir le diabète de type 1 dans l'avenir (Van Belle et al., 2011).

1.3.4. Pathogenèse de la résistance à l'insuline et le diabète de type 2

La pathophysiologie du diabète de type 2 est complexe et plusieurs éléments contribuent à causer cette maladie. Le diabète de type 2 affecte 90% des diabétiques et il est causé par une composante génétique et environnementale. Le diabète de type 2 inclut la résistance à l'insuline et une dysfonction des cellules β du pancréas (Weir, 1982). Il semble que la résistance à l'insuline puisse affecter environ 25% des adultes aux États-Unis (Meigs et al., 1997). Nous allons expliquer davantage la résistance à l'insuline qui fait l'objectif de cette thèse (**Figure 5**).

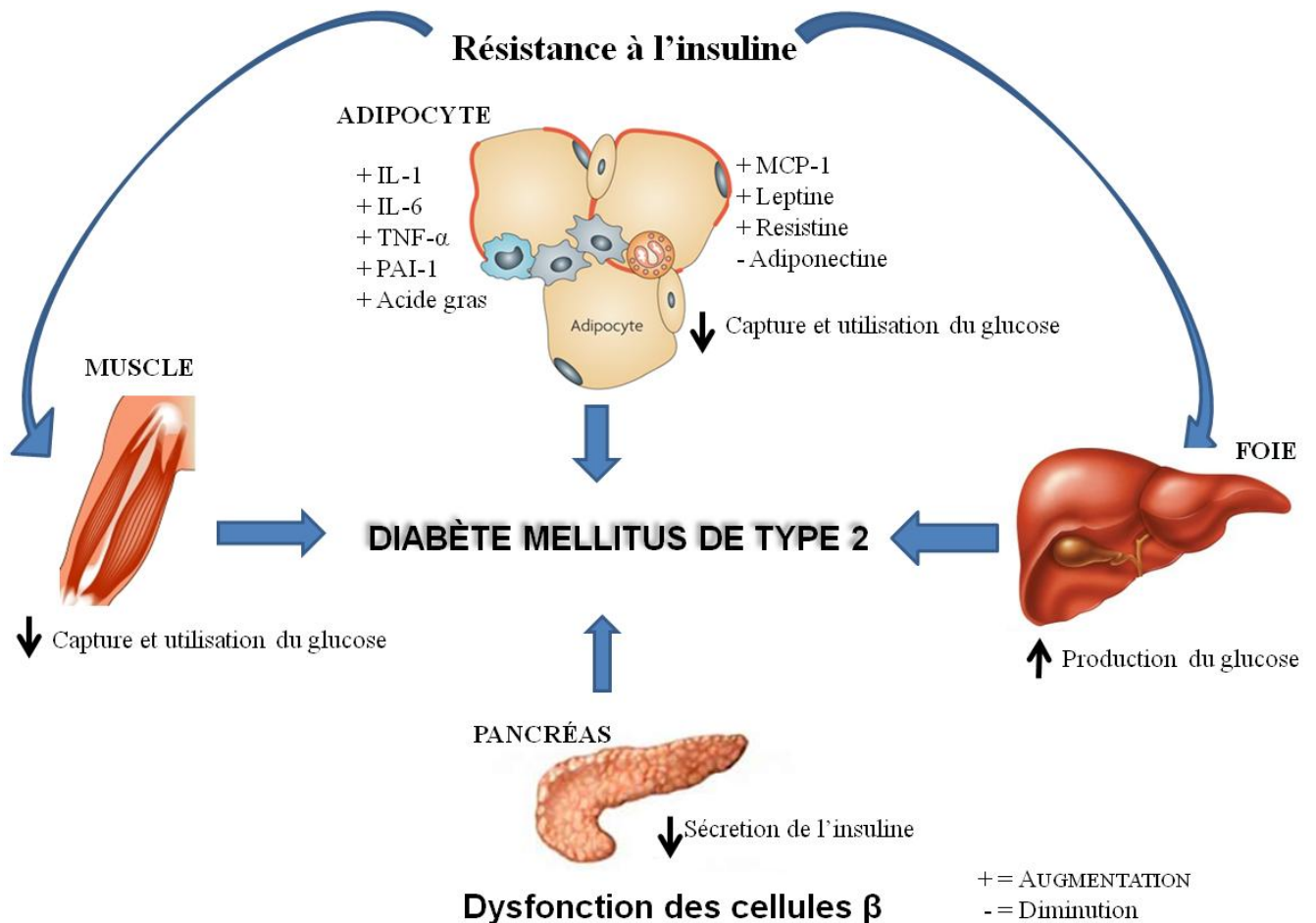


Figure 5. La physiopathologie du diabète de type 2.

Voici quelques causes du syndrome de **la résistance à l'insuline**

- 1- Anticorps anti-insuline
- 2- Anticorps autoimmuns contre le récepteur à l'insuline
- 3- Mutation génétique des gènes du récepteur à l'insuline
- 4- Défaut au niveau des tissus cibles à l'insuline
- 5- Diminution de la clairance de l'insuline
- 6- Autres causes : excès de glucocorticoïdes, de l'hormone de croissance, des catécholamines, du glucagon et des acides gras libres.

Ces causes peuvent entraîner une diminution de la biosynthèse du récepteur, l'accélération de la dégradation du récepteur et la dysfonction de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline et de molécules de signalisation.

1.3.4.1. La génétique

Plusieurs gènes sont étudiés comme candidats pour la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Un des gènes candidat est calpain 10, un membre ubiquitaire de la famille cystéine protéase sur le chromosome 2. Ce gène est connu pour contribuer à environ 30% du diabète de type 2 chez les Mexicains-Américains (Hanis et al., 1996) et il a aussi une implication dans la régulation de l'exocytose de l'insuline (Marshall et al., 2005). Les îlots pancréatiques chez des sujets atteints du diabète de type 2 ont une réduction de 90% de l'expression du gène ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) (Gunton et al., 2005). Les souris invalidées pour ce gène développent une intolérance au glucose ainsi qu'une dysfonction dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose (Leahy, 2008). Le polymorphisme de gènes candidats de la résistance à l'insuline a été étudié : le gène IRS1, le gène IRS2 (Porzio et al., 1999), le gène du récepteur β 3 adrénergique et du promoteur variant -308 G/A et le gène TNF α (Stumvoll et al., 2005). L'accumulation de dépôts de triglycérides ectopiques dans les viscères, principalement le foie, suggère un problème au niveau de l'oxydation des lipides dans la mitochondrie. Cela est dû entre

autres au polymorphisme du gène du PPAR γ . Le PPAR γ , un facteur transcriptionnel nucléaire, est principalement exprimé dans les tissus adipeux malgré qu'il puisse se retrouver dans plusieurs autres cellules de l'organisme. Il est responsable de l'oxydation des acides gras, de la synthèse d'ATP dans la mitochondrie, de la différenciation des adipocytes, du stockage des acides gras et de l'homéostasie du glucose (Petersen et al., 2004; Scacchi et al., 2007). Les facteurs de transcription TCF7L2 (Grant et al., 2006), KLF11 (Neve et al., 2005) sont aussi étudiés pour leur implication dans l'homéostasie du glucose.

1.3.4.2. L'environnement

Le développement du diabète de type 2 est influencé par une série de facteurs environnementaux. En voici quelques-uns : le surpoids, la dépression, la faible activité physique, le faible niveau d'éducation, une nourriture riche en graisses et en carbohydrates. La religion, le statut socio-économique et la culture ont aussi un grand rôle à jouer dans l'alimentation et les habitudes de vie. L'abstinence à fumer et une consommation modérée d'alcool sont des facteurs protecteurs du diabète de type 2 (Boyington et al., 2008; Caballero et al., 2006).

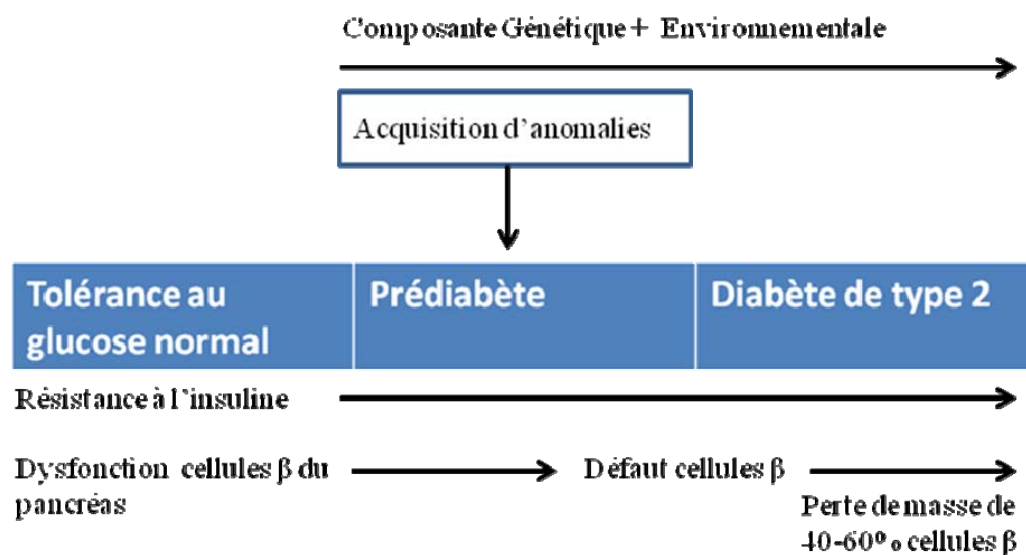


Figure 6. Séquences menant au diabète de type 2.
Adapté selon Leahy, 2008

1.3.5. La résistance à l'insuline et la dysfonction des cellules β du pancréas

Après un repas ou phase postprandiale, le glucose plasmatique est rapidement absorbé par l'intestin pour se retrouver dans la circulation. Une sécrétion d'insuline en deux phases se produit après cette augmentation du glucose plasmatique. La première phase de sécrétion d'insuline, rapide et de courte durée, est perdue chez les diabétiques, tandis que la deuxième phase est prolongée et soutenue (Salsali et Nathan, 2006). L'insuline plasmatique augmente en réponse à l'augmentation de glucose et stimule la translocation des transporteurs de glucose comme GLUT4 aux membranes plasmatiques. Les transporteurs de glucose GLUT4 sont exprimés principalement dans les muscles squelettiques, les muscles lisses, le cœur et le tissu adipeux. Ce sont les tissus qui répondent à l'insuline en augmentant le transport de glucose. Cette translocation de GLUT4 permet l'entrée de glucose dans les cellules et diminue ainsi les taux circulants de glucose (Rea et James, 1997). Pour sa part, le glucagon plasmatique diminue en réponse à cette élévation de glucose. Lorsque la concentration en glucose dans le sang est trop élevée pendant une période prolongée, le pancréas sécrète plus d'insuline que la normale. Une hyperinsulinémie s'installe. Il existe une relation hyperbolique entre le fonctionnement des cellules β ou la sécrétion d'insuline et l'action de l'insuline. Lorsque l'action de l'insuline diminue et les concentrations sanguines de glucose restent élevées, le corps réagit en augmentant la sécrétion en insuline pour compenser (Dinneen et al., 1992). Ce qu'on appelle la résistance à l'insuline est une diminution de la sensibilité ou de la réponse des tissus insulino-dépendants à l'insuline; ainsi cette hormone ne peut pas exercer ses fonctions biologiques. Dans le contexte du diabète de type 2, on retrouve une diminution des transporteurs de glucose (GLUT4) dans le muscle (capture 80-85% du glucose périphérique) et les adipocytes (Kim et al., 2000; Abel et al., 2001), une augmentation de la production hépatique de glucose, une accumulation des lipides au niveau hépatique, une diminution du stockage des triglycérides en augmentant la lipolyse dans les adipocytes et une diminution de la synthèse protéique. Ces changements métaboliques ne se manifestent pas seulement dans le muscle, le foie et les adipocytes mais aussi dans les cellules endothéliales et vasculaires, où l'insuline contribue comme vasodilatateur et dans les neurones, où elle contribue à faire entrer le glucose à des fins d'homéostasie énergétique (DeFronzo, 2004). Une des causes de la résistance à l'insuline est le mauvais fonctionnement des mécanismes de signalisation du récepteur à l'insuline (Duez et Lewis, 2008). La résistance à l'insuline peut être présente même si les valeurs de glucose sanguin sont normales (Lillioja et al., 1988;1993). Ce phénomène arrive lorsqu'il n'y a pas de dysfonction des

cellules β , mais une augmentation de la masse des cellules β qui produisent une sécrétion d'insuline compensatoire réussissant à contrôler la glycémie. Toutefois, avec le temps, s'il y a constamment un surdosage de glucose sanguin, la compensation perd de son efficacité et il se produit la dysfonction et la destruction des cellules β du pancréas. Le pancréas commence à perdre 40-60% de sa masse en cellules β (Butler et al., 2003; Yoon et al., 2003), ce qui oblige plusieurs patients avec le diabète de type 2 à recevoir une thérapie d'insuline lorsque la maladie progresse (Vague et al., 1982; Butler, Janson et al., 2003). Il existe plusieurs causes de dysfonction des cellules β du pancréas chez les diabétiques de type 2 : toxicité au glucose, épuisement des cellules β , défaut de la synthèse de la proinsuline, lipotoxicité, défaut de l'effet des incretines. Ces hormones du petit intestin augmentent la sécrétion d'insuline après l'ingestion d'un repas (**Figure 6**).

1.3.5.1. La signalisation du récepteur à l'insuline

Le récepteur à l'insuline est une glycoprotéine hétérotétramérique constituée de 2 sous-unités α et de 2 sous-unités β identiques ($\alpha_2\beta_2$) reliées par des ponts disulfures. Les sous-unités α sont extracellulaires et possèdent le domaine de reconnaissance de l'hormone. Les sous-unités β sont principalement intracellulaires avec une activité tyrosine kinase.

À la suite de la liaison de l'insuline sur les sous-unités α , il se produit une auto-phosphorylation des tyrosines situées sur les sous-unités β du récepteur à l'insuline entraînant la phosphorylation des IRS et Shc sur des résidus tyrosines. La phosphorylation des Shc mène à la prolifération et à la croissance (mitogénèse) via la signalisation de GRB2, SOS, Ras, Raf, MEK1/2, ERK1/2.

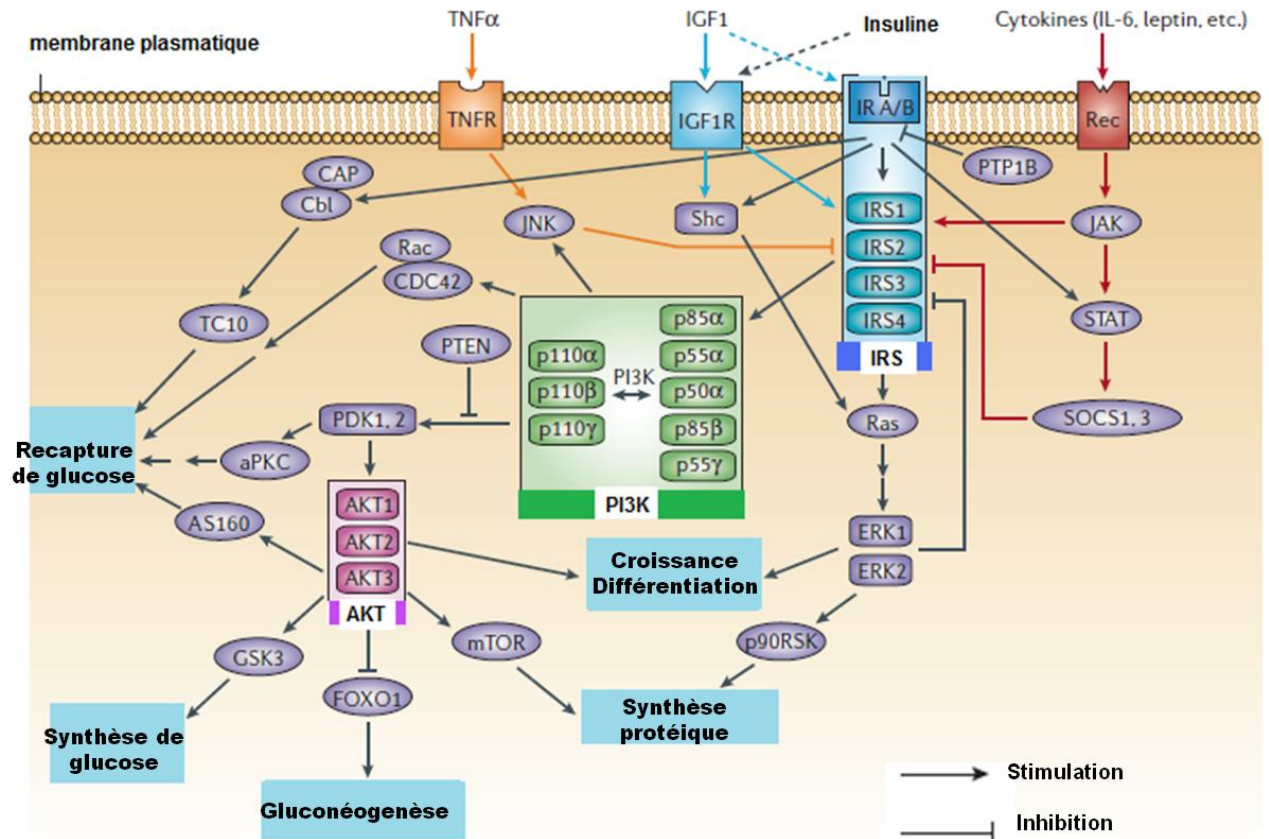


Figure 7. Principales voies de signalisation du récepteur à l'insuline.

Adapté selon Taniguchi et al., 2006)

La phosphorylation des tyrosines de l'IRS-1 à 6 (insulin receptor substrat) mène au contrôle de la vasodilatation et des effets métaboliques suivants : transport du glucose, synthèse des acides gras, synthèse de glycogène, anti-lipolyse et synthèse protéique ainsi que l'anti-apoptose via la signalisation de PI3K (sous unité régulatrice p85, p55, p50 et catalytique p110) et de la Akt, sérine kinase contenant un domaine N-terminal PH (Faresse et al., 2005). Les IRS-1 et IRS-2 sont exprimés dans la plupart des tissus, l'IRS-1 joue un rôle majeur dans les muscles squelettiques contrairement à IRS-2 qui contribue à la régulation hépatique de l'action de l'insuline et à la sécrétion de l'insuline. IRS-4 est exprimé dans les glandes thyroïdes et l'hypophyse. IRS-3 est exprimé chez les rongeurs, mais les humains ne possèdent pas un gène fonctionnel IRS-3 (Sesti et al., 2001; Brummer et al., 2010). Le PDK1 est l'effecteur majeur de PI3K. PDK1 a plusieurs substrats : aPKC, PKCξ, PKC λ (Alessi et al., 1997; Faresse, 2001). L'insuline stimule le transport du glucose et la translocation de GLUT4 via cette voie (Valverde et al., 2000). Un autre substrat

de PDK1 est la sérine kinase AKt/PkB, l'activation de Akt requière la liaison de $PtIns(3,4,5)P_3$ dans le domaine PH et la phosphorylation de PDK1 (Alessi et al., 1997; Cross et al., 1995). Chez les diabétiques de type 2, les voies de signalisation de PI3K et de AKt sont bloquées par l'hyperglycémie et les cytokines (Varma et al., 2005; Venkatachalam et al., 2008) (Figure 7).

1.3.5.2. La régulation du récepteur à l'insuline via la phosphorylation sérine/thréonine de IRS-1

Les phosphatases sont des protéines tyrosine phosphatase capables de déphosphoryler les sous-unités β du récepteur à l'insuline et de déphosphoryler la tyrosine de l'IRS et de l'inactiver. (Bailey, 2007). La phosphorylation de la sérine des protéines IRS peut produire soit un feedback de control négatif de la signalisation de l'insuline ou un mécanisme d'inhibition qui conduit à un défaut de la signalisation à l'insuline et produit une résistance à l'insuline (Zick, 2001; Boura-Halfon et al., 2009).

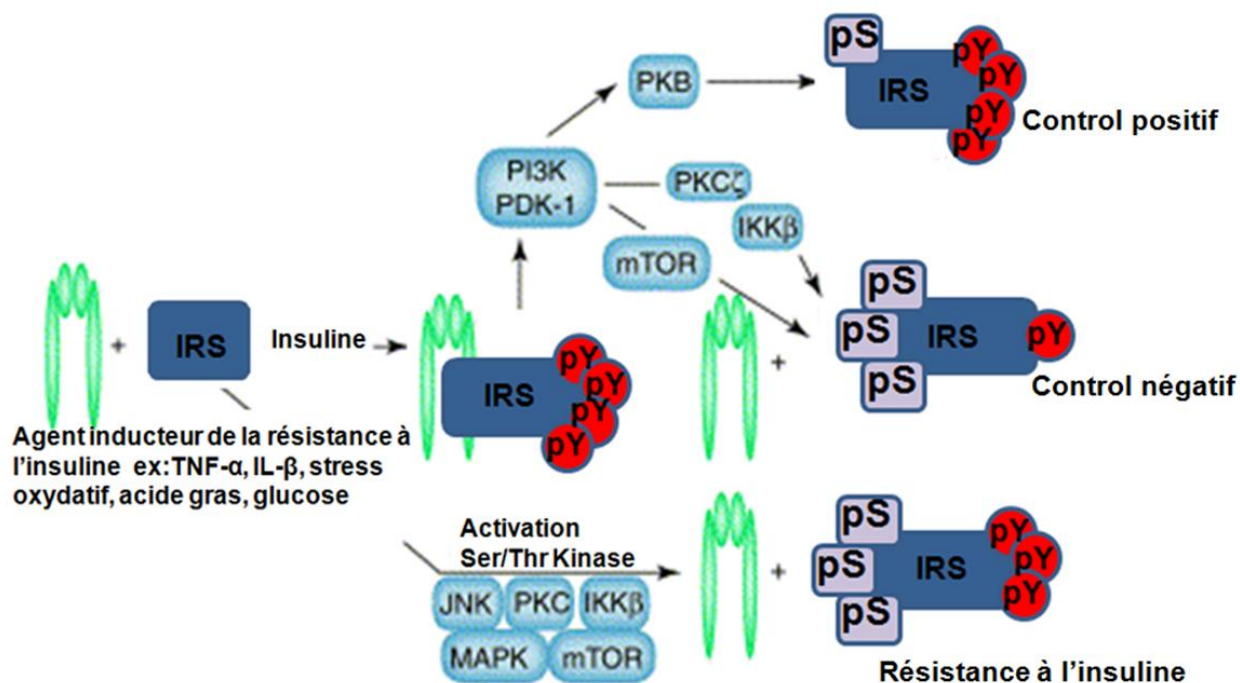


Figure 8. Modulation du récepteur à l'insuline via l'IRS.

Adapté selon Zick et al., 2001.

Dans des conditions normales, la phosphorylation de Ser/Thr a deux fonctions : promouvoir le signal de l'insuline ou l'arrêter. La phosphorylation de la tyrosine sur IRS-1 stimule le signal de l'insuline (control positif). Par contre, si cette phosphorylation est suivie d'une phosphorylation de la sérine sur IRS-1 par PI3K (activation de Ser/Thr kinase : PKC, IKK β , mTOR) ceci induit une diminution du signal de l'insuline (control négatif).

Lors d'une augmentation des niveaux d'acide gras, de glucose, de stress oxydatif et de cytokines (TNF- α , IL-1 β), il se produit une stimulation des Serine/Thréonine kinases (mTOR, IKK β , PKC, MAPK, JNK). Ces derniers phosphorylent de façon constante la sérine sur IRS-1 ce qui induit une polyubiquitination de cette protéine d'ancrage et favorise sa destruction par des protéosomes pouvant conduire à la résistance à l'insuline (Zick, 2001; Xu et al., 2008; Wang et al., 2009) (**Figure 8**).

Mécanismes inhibiteurs de la signalisation de l'insuline (Bigginger et Kahn, 2006) (**Figure 9**)

- 1- Phosphorylation de la serine/thréonine sur l'IRS-1 : le signal de l'insuline se propage par IRS-1 vers les autres molécules de signalisation afin de créer l'effet biologique. Les diabétiques de type 2 ont une diminution de la stimulation de l'IRS-1 puisqu'ils présentent une diminution de la phosphorylation d'IRS-1 en tyrosine et une augmentation en serine. (Zick, 2001; Pratipanawat et al., 2001, Aguirre et al., 2002) par PKC, ERK, JNK, IKK et p38. Les tyrosines phosphatases SHP2, PTEN et SHIP causent une diminution de l'activité de IRS-1/PI3K. La phosphatase PP2A inhibe PKC λ et PKC ζ responsables de la translocation du transporteur de glucose (GLUT4) et elle inhibe aussi l'Akt.
- 2- L'accumulation de triglycérides ainsi que la dysfonction de la capture du glucose par le muscle diminuent l'oxydation des acides gras et augmentent les ERO qui causent des défauts mitochondriaux ce qui affecte Akt (Petersen et al., 2004).
- 3- Dans l'inflammation, la surexpression de l'iNOS produit du NO qui se transforme en peroxy-nitrite par la liaison à l'anion superoxyde. Ceci inhibe l'IRS-1 (Libby et al., 2009).

- 4- La diminution de l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline par le *suppressor of cytokine signalling 3* (SOCS3) et la phosphatase PTP1B.
- 5- De fortes concentrations de glucose, d'acides gras ainsi que la relâche d'adipokines comme TNF- α interfèrent avec la cascade de l'insuline par PKC_{theta} qui induit la phosphorylation de la serine de l'IRS-1 (Kim et al., 2004). De plus, le TNF- α stimule c-Jun N-terminal kinase (JNK) ainsi que IkappaB/NfkappaB (Perseghin et al., 2003) et (SOCS-3) (Ueki et al., 2004) conduisant à la résistance à l'insuline via la phosphorylation de la serine de l'IRS. Les souris invalidées pour le TNF- α ne développent pas la résistance à l'insuline dans l'obésité (Oshida et al., 1989; Moller, 2000).
- 6- Le ratio disproportionné des sous-unités (p110, p85) de la PI3K conduit à la résistance à l'insuline.
- 7- Tous ces facteurs et d'autres causent plus de dégradation et moins de synthèse du récepteur à l'insuline et des protéines IRS.

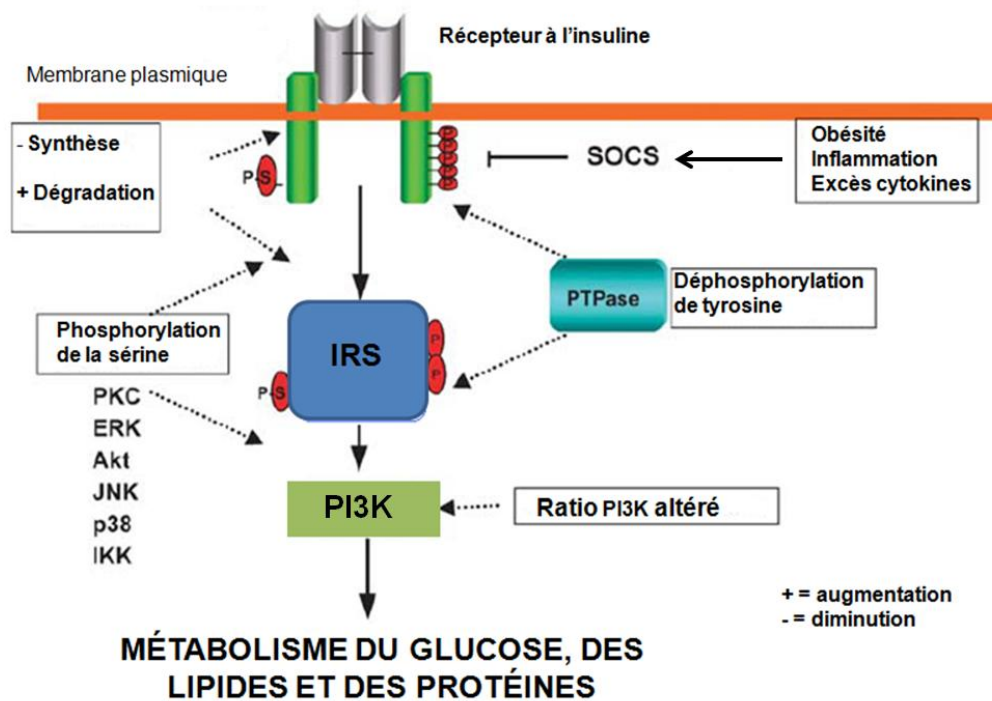


Figure 9. Mécanismes inhibiteurs de la signalisation de l'insuline.
Adapté selon Biddinger et Kahn, 2006

1.3.5.3. Le NF- κ B et JNK dans la résistance à l'insuline

Le NF- κ B et JNK jouent un rôle important dans l'induction de la résistance à l'insuline dans l'inflammation. En effet, ces mécanismes de signalisation (NF- κ B et JNK) se manifestent dans l'obésité lorsqu'on retrouve de l'inflammation et du stress oxydatif dans les tissus adipeux. Ces voies de signalisation induisent la résistance à l'insuline par des mécanismes distincts. JNK est une stress kinase qui phosphoryle le c-Jun du facteur de transcription AP-1. JNK induit la résistance à l'insuline en phosphorylant le résidu de la sérine de l'IRS-1 (Aguirre et al., 2000; 2002; Shoelson et al., 2006). Contrairement à JNK, l'IKK β ne phosphoryle pas IRS-1 pour causer la résistance à l'insuline, mais agit plutôt par l'activation de NF- κ B qui conduit à la production de cytokines proinflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-1 β et resistine) qui causent la résistance à l'insuline (Feinstein et al., 1993; Hotamisligil et al., 1994; Spranger et al., 2003). L'ablation du IKK β dans le foie des souris les protège contre l'induction de la résistance à l'insuline causée par une diète riche en graisse. De plus, ces souris ne développent pas d'intolérance au glucose et ont une

réduction des dépôts lipidiques au niveau du foie (Arkan et al., 2005). Entre autres, des médicaments utilisés dans le contrôle du diabète (le salicylate, les thiazolidinediones et les statines) sont en mesure de bloquer la voie NF- κ B (**Figure 10**).

À la suite d'une diète riche en graisse, les niveaux de TNF- α , IL-6 et IL-1 sont augmentés dans les adipocytes et les hépatocytes (Uysal et al., 1997). Ainsi, on peut comprendre que IL-1 β , IL-6, TNF- α et CRP soient augmentés chez les obèses insulino-résistants (Hotamisligil et al., 1993; Yudkin et al., 1999). Les niveaux de TNF- α sont élevés dans la circulation et les tissus périphériques des souris insulino-résistantes. La neutralisation de cette cytokine chez ces souris contribue à l'amélioration de la résistance à l'insuline (Hotamisligil et al., 1993; Hartge et al., 2007).

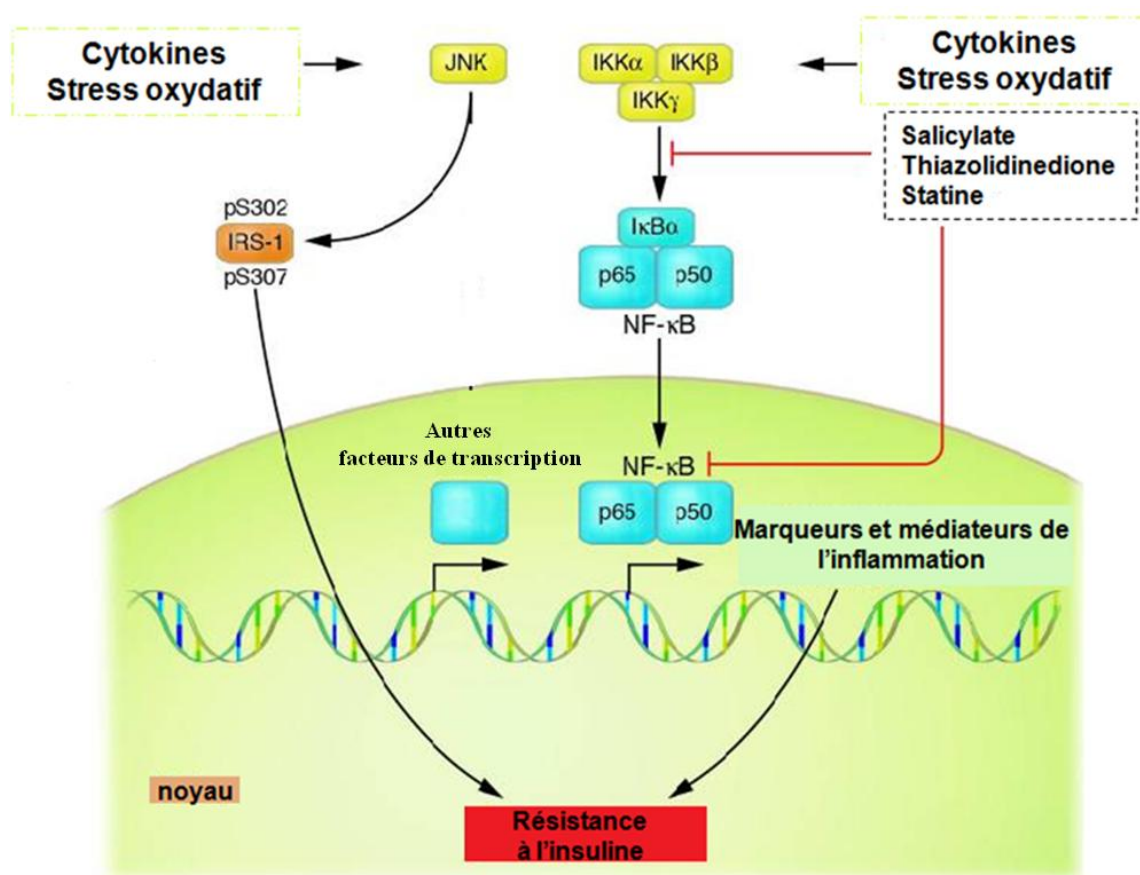


Figure 10. NF- κ B et JNK, médiateurs de la résistance à l'insuline dans l'obésité en lien avec l'inflammation.

Adapté selon Shoelson et al., 2006

La résistance à l'insuline dans des organes spécifiques chez la souris : le foie, le muscle, les adipocytes et le cerveau.

Le **foie** contrôle le métabolisme du glucose et des lipides. Afin de mieux comprendre la résistance à l'insuline hépatique, des analyses ont été faites sur des foies invalidés pour le récepteur à l'insuline chez la souris (LIRKO). Les souris LIRKO présentent une légère hyperglycémie à jeun, une augmentation de la production hépatique de glucose, une diminution de la clairance à l'insuline menant à l'hyperinsulinémie, une augmentation de la résistance à l'insuline périphérique, une diminution de la sécrétion des triglycérides et des acides gras libres (Ginsberg et al., 2005; Biddinger et Kahn, 2006).

Après une charge de glucose, le **muscle squelettique** régule la capture du glucose d'environ 60 à 90%. Les souris (MIRKO) invalidées pour le récepteur à l'insuline dans le muscle squelettique présentent une diminution de la capture du glucose musculaire, une glycémie normale, une sécrétion d'insuline normale, une augmentation de capture du glucose dans les adipocytes, une augmentation de triglycérides et d'acides gras libres. Ces changements amènent à une augmentation de l'adiposité (Bruning et al., 1998; Kim et al., 2000; Cariou et al., 2004; Biddinger et Kahn, 2006).

Le **tissu adipeux** est considéré comme un organe endocrinien et un tissu de stockage de l'énergie. Après une charge de glucose, il effectue approximativement 5 à 15% de la capture du glucose. Les souris (FIRKO) invalidées pour le récepteur à l'insuline dans les adipocytes présentent une sécrétion d'insuline normale, une amélioration de la glycémie, une diminution de triglycérides, une intolérance au glucose et une dyslipidémie. Il est aussi observé chez ces souris une augmentation des adipokinines dont l'adiponectine qui protège contre l'obésité. Le mécanisme par lequel la résistance à l'insuline dans les adipocytes de ces souris mène à cet effet bénéfique est encore inconnu (Bluher et al., 2002; Bluher et al., 2003; Biddinger et Kahn, 2006).

Le **cerveau** est le principal consommateur de glucose à l'état basal et la présence du récepteur à l'insuline a été démontré dans ce tissu (Havrankova et al., 1981, Biddinger et Kahn, 2006). Une augmentation de la production de glucose hépatique, une augmentation de la sécrétion à l'insuline, une hyperphagie et l'obésité sont présentes chez la souris dont le récepteur à l'insuline a été invalidé dans le cerveau (NIRKO). Ces complications sont accompagnées d'une augmentation de

triglycérides, une diminution de gonadotrophines (LH, FSH) et d'infertilité. En plus, des susceptibilités aux maladies neurodégénératives ont été observées chez ces souris comme l'augmentation de la phosphorylation de Tau, une manifestation initiale de la maladie de Alzheimer (Bruning et al., 2000; Schubert et al., 2004).

1.3.5.4. Kinines et hyperglycémie dans le diabète

Le récepteur B₂

L'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules β du pancréas est le principal signal de la sécrétion de l'insuline lors d'une hyperglycémie (Moura, 2000; Ye et al., 2007). La sécrétion de l'insuline induite par la BK dépend de la concentration du glucose circulant (Damas et al., 1999). Chez la souris invalidée pour le récepteur B₂, on a observé une résistance à l'insuline, ce qui appuie le rôle du récepteur B₂ dans la sensibilité à l'insuline (Duka et al., 2001). Une amélioration de la tolérance au glucose dans les tissus des rats Zucker, modèle de diabète de type 2, a été démontrée après l'administration chronique de la BK (Henriksen et al., 1998). La BK peut réduire le niveau de glucose plasmatique en augmentant l'apport de glucose aux muscles à la suite d'une vasodilatation ou en augmentant la capture du glucose par les transporteurs de glucose GLUT4 directement ou via la voie de l'insuline par la phosphorylation de l'IRS-1 dans les muscles (Miyata et al., 1998) ou dans les adipocytes (Isami, 1996). Ainsi, les kinines sont impliquées dans l'effet bénéfique du traitement des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ECA) chez le diabétique puisque les antagonistes sélectifs pour le récepteur B₂ diminuent la recapture du glucose produit par les ECA (Henriksen, 1996, 1999; Kohlman, 1995). Chez les souris diabétiques, Akita, la délétion des deux récepteurs (B₂R et B₁R) produit une augmentation des complications diabétiques incluant une augmentation de l'excrétion urinaire d'albumine, une glomérulosclérose et l'ostéoporose. Ceci souligne l'importance des kinines dans le diabète (Kakoki et al., 2010).

Le récepteur B₁

Le récepteur B₁ est surexprimé dans le diabète de type 1 et de type 2. Il est induit par l'hyperglycémie, les cytokines et le stress oxydatif (Couture et Girolami, 2004) présents dans le diabète. Les niveaux tissulaires de kallibréine sont augmentés dans le diabète de type 2 (Campbell et al., 2010). Cependant, chez le rat traité au fructose, une injection du gène de la kallibréine réduit l'hypertension et l'hyperinsulinémie (Zhao et al., 2003). Le blocage prolongé du B₁R renverse l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie (Dias et al., 2010, 2011). De plus, l'antagoniste du B₁R (R-954) en aigu chez les rats diabétiques (STZ) de 8, 12 et 18 jours a réussi à réduire la courbe de tolérance au glucose aux valeurs normales de glycémie (Catanzaro et al., 2010). Les mécanismes exacts par lesquels le B₁R augmente la glycémie et l'insulinémie sont inconnus. La littérature suggère fortement que le B₁R serait en mesure d'interagir avec des médiateurs de l'inflammation comme les macrophages, IL-1 β et iNOS qui amplifient le stress oxydatif et l'inflammation au niveau des organes cibles contribuant à l'hyperglycémie et au diabète de type 2 (Couture and Girolami, 2004; Catanzaro et al., 2010).

1.3.6. Stress oxydatif et la production de l'anion superoxyde

Le stress oxydatif est une condition de déséquilibre entre la production de radicaux libres et les mécanismes de défense antioxydants, ceci résulte en une altération du métabolisme du glucose et une dysfonction d'une variété d'enzymes avec des fonctions diverses (Ceriello et al., 2004). Les cellules se retrouvent dans un milieu élevé en oxygène moléculaire ou en dérivés d'oxygène nommés espèces réactives d'oxygène (ERO) comme : l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l' H_2O^{\cdot} , le peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$), le radical hydroxyl (OH^{\cdot}) et le monoxyde d'azote (NO^{\cdot}) (Cai et Kang, 2001). Il existe aussi d'autres catégories de molécules hautement réactives en plus des ERO comme les espèces réactives d'azote et de chlore. Le peroxynitrite lorsqu'il se lie avec le résidu tyrosine des protéines donne la nitrotyrosine. Les sources les plus importantes des ERO sont les mitochondries, les cellules phagocytaires, les neurones, l'endothélium des cellules vasculaires, le métabolisme des acides aminés et des neurotransmetteurs, les cytochromes P450 et la formation de AGEs. En excès les ERO réagissent rapidement avec l'ADN, les protéines et les lipides et provoquent des dommages moléculaires, cellulaires et tissulaires. Ces dommages affectent l'ADN, le fonctionnement des récepteurs, des enzymes et des transporteurs de protéines (Rosen et al., 2001) (Figure 11).

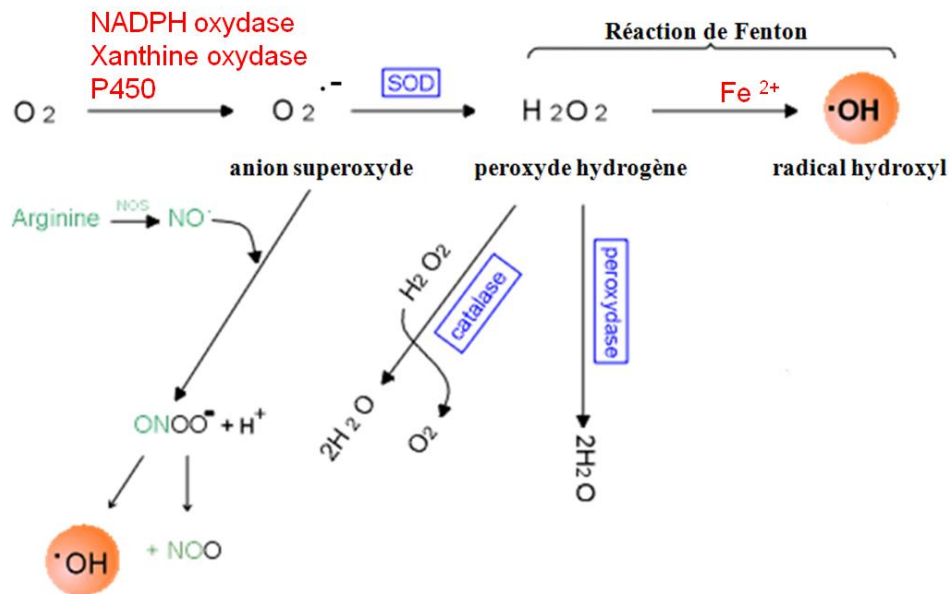


Figure 11. Voies de formation des radicaux libres de l'oxygène ou des espèces réactives d'oxygène (ERO).

Adapté selon <http://www.hon.ch/Dossier/Ageing/French/Radicaux.gif>

Les ERO ont une demie-vie très courte; elles sont nécessaires aux neutrophiles, aux macrophages et aux autres cellules pour la défense immunitaire de l'organisme. On retrouve dans la mitochondrie des enzymes antioxydantes : la catalase, la peroxydase dont la glutathione peroxydase, la superoxyde dismutase qui éliminent, réduisent les ERO et diminuent leur réactivité (Thornalley et al., 1998; Zeman et al., 2006; Zhang et al., 2007).

La superoxyde dismutase, enzyme antioxydante, est le mécanisme majeur de défense contre l'augmentation de la production de l'anion superoxyde. Elle produit le peroxyde d'hydrogène. Il y a 3 isoformes de cette enzyme, la cytosolique SOD1 (Cu, Zn-SOD), la mitochondriale manganèse SOD2 (MnSOD) et l'extracellulaire SOD3 (EC-SOD) (Mendez et al., 2005; Faraci et al., 2004; Fukai et al., 2002). La catalase, une autre enzyme antioxydante, réduit le peroxyde d'hydrogène en H₂O comme la glutathione peroxydase (GPx) (Kirkman et al., 1999; Gaetani et al., 2005). La catalase est extrêmement importante lorsqu'il y a une réduction du contenu ou de l'activité de GPx. Pour sa part, la GPx est une enzyme antioxydante contenant du sélénium qui réduit efficacement le H₂O₂ et les lipides peroxydés en H₂O et en alcool lipidique; cette réaction oxyde le glutathion en glutathion disulfure. Le glutathion réduit joue un rôle dans la régulation de l'état redox intracellulaire des cellules vasculaires. Lors d'une diminution de l'activité ou de l'expression de GPx ou des niveaux de glutathion, il se produit la réaction de Fenton causant une augmentation du radical libre OH⁻ et des radicaux peroxy lipidiques en faisant interférer le Fe²⁺, Fe²⁺ + H₂O₂ en Fe³⁺ + OH⁻ + OH⁻. Il existe 4 isoformes de GPx : GPx-1 (cellulaire), GPx-2 (gastrointestinal), GPx-3 (extracellulaire) et GPx-4 (hydroperoxyde phospholipidique) (Schafer et al., 2001; Leopold et al., 2005).

Les cytochromes P450 sont un groupe d'enzymes monooxygénases responsables du métabolisme des hydrocarbures toxiques (Puntarulo et al., 1998; Fleming et al., 2001). Les familles CYP2 et CYP4 sont exprimées dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Il a été démontré que ces cytochromes sont capables de produire des ERO dans les tissus vasculaires (Fleming et al., 2001; Fisslthaler et al., 1999).

Plusieurs enzymes sont responsables de produire l'O₂⁻ dans le diabète de type 2: xanthine oxydase, le découplage de eNOS, la NADPH oxydase et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale (Cohen et Tong, 2010). La xanthine oxydase s'exprime dans les cellules endothéliales, la vasculature et dans la circulation plasmatique. Elle produit l'anion superoxyde en

catalysant la xanthine et la hypoxanthine. La xanthine oxydase dans la vasculature participe à l'hypertension puisque le blocage de cette enzyme par l'allopurinol et l'oxypurinol (antagonistes de l'enzyme) diminue la pression artérielle chez les rats SHR et hypertendus avec hypercholestérolémie (Berry et al., 2004 ; Suzuki et al., 1998; Minami et al., 2005).

Dans des conditions physiologiques avec des cellules endothéliales stimulées, si l'apport en tétrahydrobioptérine (BH₄) et en arginine est suffisant, les deux sous-unités oxygénases de la eNOS fonctionnent ensemble et produisent du L-citrulline et le NO à partir de L-Arginine. Cependant, dans le diabète et l'hypertension, un découplage de la eNOS produit une grande quantité d'anion superoxyde (Dixon et al., 2005; Katusic, 2001). Le découplage se produit en absence de BH₄ et/ou d'apport insuffisant en L-Arginine; les deux sous-unités oxygénases de la eNOS fonctionnent alors indépendamment et produisent simultanément du NO et de l'anion superoxyde. Ces deux entités réagissent ensemble pour former le peroxyde ONOO⁻, un oxydant puissant (Landmesser et al., 2001) qui endommage l'ADN et inhibe la synthèse d'ATP (Ceriello et al., 2004). Le découplage de la eNOS est grandement impliqué dans les maladies vasculaires diabétiques (Molnar et al., 2005).

Plusieurs études suggèrent que la majorité des O₂⁻ générés dans les parois vasculaires est causée par l'augmentation de l'activité de l'enzyme NAD(P)H oxydase (Griendling et al., 2000; Pop-Busuil et al., 2006).

L'activité des transporteurs de protons exprimés dans la membrane interne de la mitochondrie est diminuée lors d'un excès d'anions superoxyde et elle est responsable de la fuite des protons à travers la membrane interne vers les repliements de la mitochondrie. Cette diminution entraîne un excès d'entrée de NADH dans la chaîne de transfert d'électrons (Hagen et al., 2000). Lorsqu'il y a un excès de NADH ou que celle-ci ne peut plus être réduite par la phosphorylation oxydative ou par d'autres mécanismes, le gradient de protons à l'intérieur de la membrane interne de la mitochondrie augmente et les électrons sont transférés aux oxygènes menant à la formation des radicaux libres, particulièrement l'anion superoxyde (Mohazzab et al., 1994). En effet, l'oxydation NADH/NAD et NADPH/NADP⁺ couplé avec une déficience NADPH, en GSH réductase et NOS potentialise le stress oxydatif dans les nerfs périphériques et dans les vaisseaux (Cameron et al., 1997; Greene et al., 1999). Les patients atteints du diabète de type 2 ont une concentration plasmatique élevée en acides gras libres. Lors d'une réduction de la capacité

oxydante, ces acides gras ne pouvant plus être oxydés s'accumulent dans les muscles. Ainsi, les acides gras neutres rentrent dans la matrice mitochondriale où ils seront déprotonés, pour devenir des anions d'acides gras. La combinaison des ERO et des anions d'acides gras produira la peroxydation des lipides qui augmente la résistance à l'insuline et les dysfonctions mitochondriales observées dans le diabète de type 2 (Delarue et Magnan, 2007).

1.3.6.1. Mécanisme d'amplification du stress oxydatif

Une hyperglycémie, un excès d'acides gras et une augmentation de l'angiotensine provoquent une surproduction de l'anion superoxyde dans plusieurs tissus et les organelles (mitochondrie) (Ceriello et al., 2004 ; Cohen et Tong, 2010). Cette surproduction de l'anion superoxyde mène à l'activation de plusieurs mécanismes comme la NADPH oxydase, la PKC, la voie du polyol, la formation de AGE, les NOS et le NF- κ B en lien avec l'inflammation (Ceriello et al., 2004 ; Cohen et Tong, 2010). Ces derniers contribuent aussi à l'augmentation du stress oxydatif. Le récepteur B₁ des kinines perpétue la production de l'anion superoxyde (Dias et al., 2010). Comme nous l'avons vu, le stress oxydatif est très complexe et son rôle pathophysiologique dans le diabète est dû à une série de mécanismes qui ne peuvent pas tous être abordés dans cette thèse comme le flux hexosamine et la diminution des différents antioxydants (**Figure 12**).

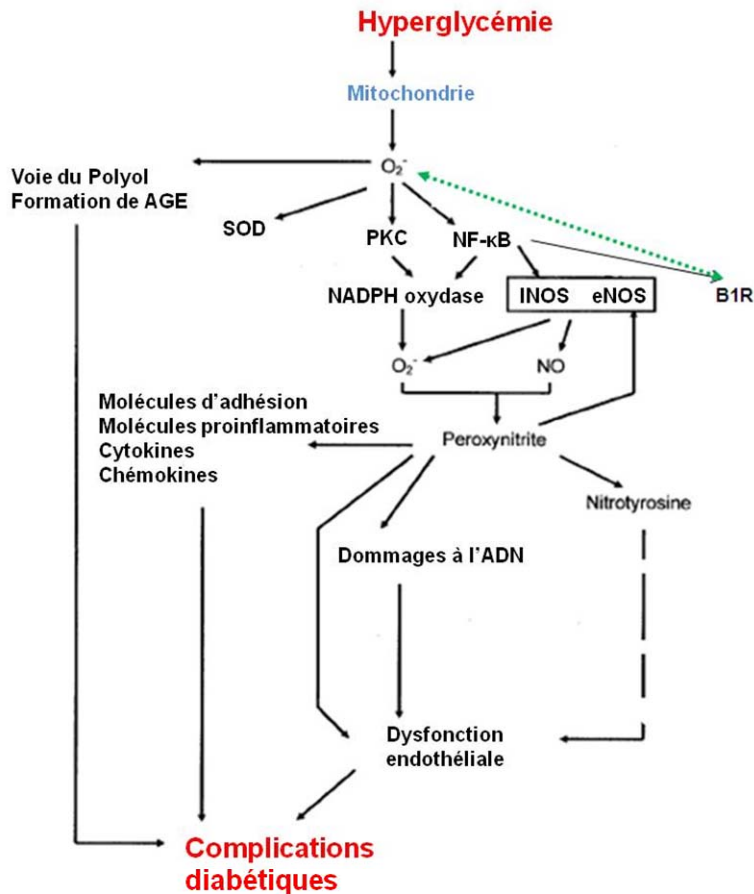


Figure 12. Les complications diabétiques causées par l'hyperglycémie et l'anion superoxyde.

Adapté selon Ceriello et al., 2004

NADPH oxydase dans la vasculature

La production de O_2^- active la voie du polyol, la formation de AGE, la PKC, le NF-κB, la superoxyde dismutase (SOD) et induit l'expression du B₁R. Ces événements mènent à l'augmentation de molécules d'adhésion, de molécules proinflammatoires et aux dommages à l'ADN, ce qui conduit à la dysfonction endothéliale et aux complications diabétiques (**Figure 12**). La famille de NOX de la NADPH oxydase sont des protéines qui transfèrent des électrons à travers des membranes biologiques. La NADPH oxydase catalyse le transfert d'électrons de NADPH ou de NADH à l'oxygène via ses sous-unités catalytiques afin de générer l' O_2^- et le H_2O_2 (Bjorkman et al., 1984; Martyn et al., 2005; Thomas et al., 2008; Wu et al., 2010). Dans l'hyperinsulinémie et le diabète, une des principales sources de stress oxydatif (O_2^-) est la

NADPH oxydase (Cave et al., 2006; Gao et Mann, 2009). La NADPH oxydase contribue dans les tissus cardiovasculaires à plusieurs autres pathologies que le diabète dont les maladies cardiovasculaires, l'athérosclérose et l'hypertrophie cardiaque. La NADPH oxydase a premièrement été identifiée dans les neutrophiles et autres cellules phagocytaires (Patriarca et al., 1971).

Il existe 7 homologues pour les NOX : NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2. Les NOX ont besoin de protéines de régulation afin d'être actives. La NOX-4 (Martyn, Frederick, von Loehneysen, 2005) et DUOX1/2 (Dupuy et al., 1991; Nakamura et al., 1991; Leseney et al., 1999) produisent du H₂O₂, mais pas directement. Une explication possible serait que les enzymes à l'intérieur de certaines organelles relâchent du O₂⁻ dans la lumière; celui-ci serait alors transformé rapidement par la superoxyde dismutase en H₂O₂ (Bedard et Krause, 2007).

Voici les différentes protéines associées à NOX

- 1- Les protéines de régulation: p22^{phox}
- 2- Les sous-unités organisatrices : p47^{phox} et NOXO1
- 3- Les protéines activatrices : p67^{phox} et NOXA1
- 4- p40^{phox}, une protéine cytosolique qui coimmunoprécipite avec p47^{phox} et p67^{phox}
- 5- La protéine Rac GTPases qui n'est pas une sous-unité NOX.

La majeure différence entre p47^{phox} et NOXO1 est la présence d'un domaine autoinhibiteur de p47^{phox}. Ces protéines ont un grand degré de ressemblance et ont des fonctions similaires (Bedard et Krause, 2007). p47^{phox} et NOXO1 peuvent se combiner de façon interchangeable avec les protéines activatrices p67^{phox} et NOXA1. Ces protéines activatrices ont une structure et une interaction protéique très similaires. Le **tableau 6** montre la distribution tissulaire des NOX ainsi que les protéines régulatrices auxquelles ils sont associés.

Tableau 6. Homologues de NAD(P)H oxydase

NOXs	Distribution cellulaire	Régulation de l'activité enzymatique
NOX1	<u>Colon</u> , vasculature, rein, rétine, prostate, utérus,	p22 ^{phox} , NOX01, NOXA1, Rac1
NOX2	<u>Phagocyte</u> , vasculature, cœur, poumon, muscle squelettique, foie	p22 ^{phox} , p47 ^{phox} , NOX01, Rac
NOX3	<u>Intérieur de l'oreille</u> , rein, foie, poumon, rate fœtal	p22 ^{phox} , NOX01, Rac1
NOX4	<u>Rein</u> , vasculature, cœur, os, ovaire, muscle squelettique, neurones, yeux, placenta	p22 ^{phox}
NOX5	<u>Tissu lymphoïde</u> , testicules, vasculature, prostate, sein, cerveau, pancréas, utérus, ovaire	activation de calcium
DUOX1	<u>Tyroïde</u> , épithélium de la voie respiratoire, épithélium de la langue, cervelet, testicule	p22 ^{phox} (ne contribue pas à l'activité), activation de calcium
DUOX2	<u>Tyroïde</u> , glande salivaire et rectal, épithélium de la voie respiratoire, utérus, vésicule biliaire, îlot pancréatique	activation de calcium

Les mots soulignés ont une haute expression en NOXs selon Bedard et Krause, 2007; Gao et Mann, 2009.

Il n'existe pas d'isoformes NOX spécifiques à la vasculature, mais plutôt différentes isoformes NOX dépendamment du type cellulaire et de la région du système vasculaire. Les artères contiennent NOX1, NOX2, NOX4 et NOX5. Dans les cellules endothéliales NOX2 et NOX4 sont prédominantes à environ 90% (Thomas et al., 2008; Gao et Mann, 2009) et la NOX4 est plus abondante que NOX2 (Griendling, 1994). Dans les cellules du muscle lisse, on retrouve la NOX1, NOX2, NOX4; la NOX1 est plus exprimée dans les conduits larges (Lassegue et al., 2001) et NOX2 est majoritairement exprimée dans les vaisseaux résistants (Griendling, 2004). En résumé, la NOX4 est prédominante dans les cellules endothéliales et les fibroblastes, les NOX1 et NOX4 dans les cellules musculaires lisses et la NOX2 dans les macrophages (**Figure 13**).

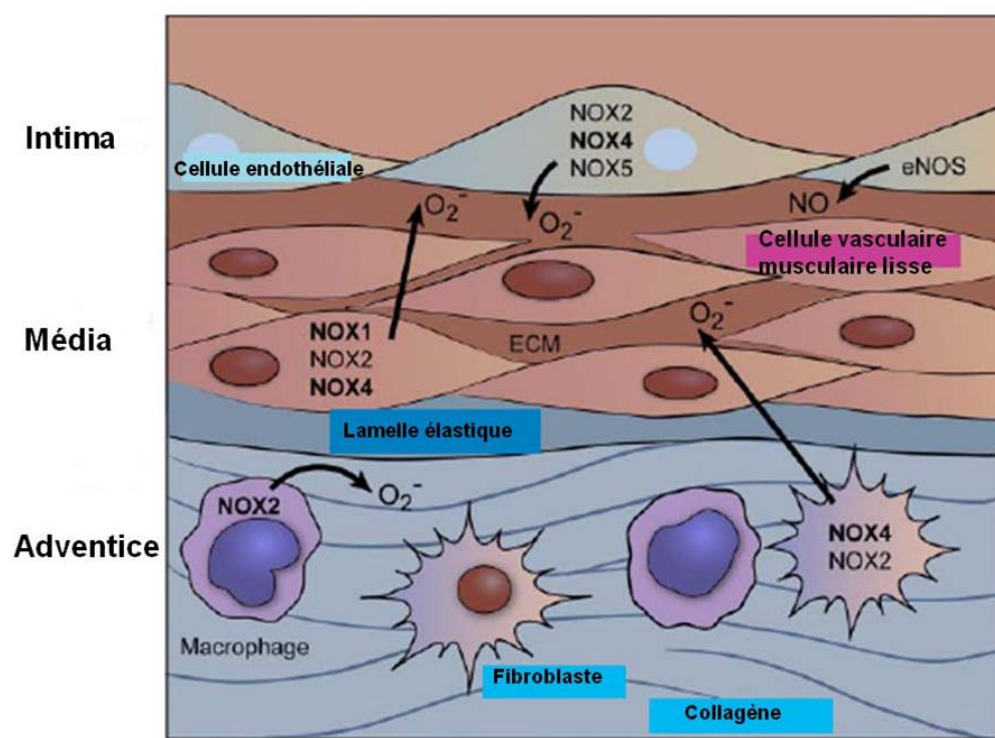


Figure 13. Les NOX dans la paroi d'un vaisseau.
Adapté selon Bedard et Krause, 2007

Puisque la NOX2 contient le plus de protéines de régulation afin d'être active, nous allons seulement décrire l'assemblage de cet isoforme. À l'état de repos, NOX2 et p22^{phox} sont à l'intérieur de la membrane cellulaire dans le cytosol. Ces deux protéines existent en association, en se costabilisant l'une l'autre. Lors de l'activation, il y a un échange de GDP à GTP sur la Rac, la phosphorylation de p47^{phox} permet l'interaction avec la p22^{phox}. Ainsi le mouvement de p47^{phox} amène d'autres sous-unités cytosoliques p67^{phox} et p40^{phox} afin de former le complexe actif de la NOX2. Une fois activée, il y a une fusion de l'enzyme à la membrane plasmique et l'enzyme transporte les électrons de la NADPH du cytoplasme vers la partie extracellulaire en générant de l'O₂⁻ (Bedard et Krause, 2007) (**Figure 14**).

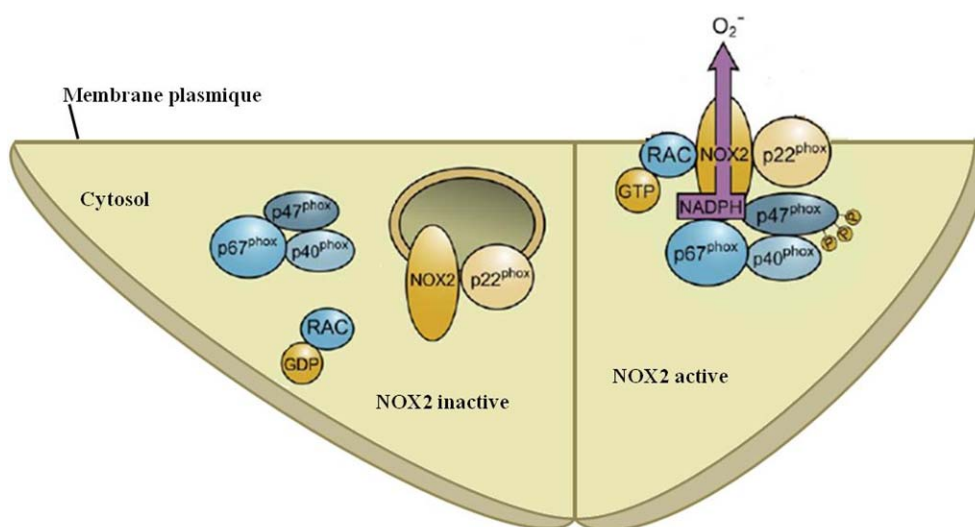


Figure 14. L'assemblage et l'activation de la NOX2.

(Coté gauche) La NOX2 inactive se retrouve dans le cytosol. (Coté droite) La NOX2 activée à la membrane plasmique Adapté selon Bedard et Krause, 2007

Quelques inhibiteurs de la NADPH oxydase : Diphenylene iodonium (DPI), Apocynin, 4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluoride (AEBSF), gp91ds-tat

L'activation de la PKC

L'augmentation des niveaux de diacylglycérol (DAG) par l'hyperglycémie augmente l'activité de la PKC. En effet, l'augmentation des isoformes α , β 1/2 et δ de la PKC a été rapportée dans la rétine, l'aorte, le cœur, les glomérules rénaux et les macrophages en circulation dans le diabète (Inoguchi et al., 2003; Gao et Mann, 2009). L'activité de la NADPH oxydase est abolie chez les souris invalidées pour la PKC β (Ohshiro et al., 2006), ce qui indique que l'activation de la NADPH oxydase est dépendante de la voie PKC. D'autres isoformes PKC ont aussi été impliquées dans le diabète comme la PKC α induite par l'activation AGE-RAGE produit par les ERO dans les reins du rat diabétique (Thallas-Bonke et al., 2008); la PKC δ est responsable de l'induction des ERO dans des conditions de haut taux de glucose dans les adipocytes de souris (Taylor et al., 2005); l'activation de PKC ζ est requise afin de produire des ERO dans les cellules mésangiales (Kwan et al., 2005).

La voie du polyol aussi appelée voie du sorbitol

Dans un milieu à forte concentration de glucose se produit la conversion du glucose en sorbitol par l'aldose reductase (AR), lequel est transformé par la suite en fructose par la sorbitol déhydrogénase (SDH) (Obrosava et al., 2005), une réduction parallèle avec le cofacteur NAD⁺ en NADPH (Brownlee, 2001). L'activation en excès de cette voie diminue le rapport NADP⁺/NADPH responsable d'une réduction de l'antioxydant glutathione ce qui augmente le stress oxydatif (Dijkstra et al., 1996). La voie métabolique du polyol en association avec l'aldose réductase permet d'expliquer en partie les effets délétères du glucose à court et à long terme sur les complications nerveuses diabétiques. L'aldose réductase contribue au stress oxydatif dans les nerfs périphériques ainsi qu'à la production d'anion superoxyde dans l'endothélium vasculaire (Bagnasco et al., 1988; Burg et al., 1988; Boucek, 2006). Chez des patients diabétiques, il y a une association entre l'augmentation de sorbitol dans le nerf sural et une diminution de la densité des fibres myélinisées (Dyck et al., 1988). Des inhibiteurs spécifiques de l'aldose réductase renversent ou atténuent plusieurs défauts de la vitesse de la conduction nerveuse (Sima et al., 1988; Greene et al., 1999).

La formation de AGE

La voie de l'aldose réductase et celle de l'autoactivation du glucose participent à la formation des produits terminaux de glycation (AGEs). Les AGEs sont un groupe hétérogène de protéines, de lipides et d'acides nucléiques formés par des réactions de glycation, d'oxydation et par plusieurs intermédiaires non enzymatiques (Vlassara et al., 1984; Peyroux et Sternberg., 2006). L'accumulation de AGEs induit des complications dans le diabète sucré (Thornalley et al., 1998; Ahmed et al., 2005). Les AGEs ont trois types de récepteurs: le RAGE, le DN-RAGE et sRAGE (Schmidt et al., 2001). Cependant, RAGE est le seul récepteur qui produit des effets intracellulaires après son activation; il est exprimé à la surface de presque toutes les cellules de l'organisme comme les macrophages, les cellules endothéliales et les neurones (Gilcrease et Hoover, 1990). Le gène RAGE possède deux sites pour le NF- κ B sur sa région promotrice (Haslbeck et al., 2004; Alves et al., 2005). La liaison des AGEs aux récepteurs de RAGE fait aussi augmenter le stress oxydatif qui induit l'activation du NF- κ B (Nitti et al., 2007). Ainsi, cette activation stimule des molécules d'adhésion cellulaire, des protéines de la matrice extracellulaire et la production de cytokines (Baldwin et al., 1996; Iwasaki et al., 2007) ce qui contribue au diabète de type 2.

Le NO et la NOS

Le NO est dérivé de la L-Arginine et de l'oxygène par l'activité enzymatique de la monoxyde d'azote synthase (NOS). Le NO est un puissant vasodilatateur qui régule le tonus vasculaire et la défense immunitaire, en plus d'être un neurotransmetteur. Il existe 3 isoformes : la NOS 1 ou neuronale (nNOS), NOS 2 ou inducible (iNOS) et la NOS 3 ou endothéliale (eNOS). Ces enzymes sont exprimés dans la plupart des cellules, malgré que la nNOS se retrouve principalement dans les neurones, eNOS dans les cellules endothéliale et la iNOS au sein des macrophages (Bruckdorfer et al., 2005). Tous les isoformes contiennent un domaine oxygénase en N-terminal et un domaine réductase en C-terminal. Le domaine oxygénase contient les sites de liaison pour les substrats L-Arginine, l'oxygène, la tétrahydrobioptérine (BH4) et l'hème (groupement fer-protoporphyrine), où le NO est synthétisé. L'apport des électrons nécessaires à la synthèse de NO est assuré par le domaine réductase contenant les cofacteurs FMN, FAD et NADPH (Kuhr et al., 2010; Alderton et al., 2001) (**Figure 15**).

Les domaines oxygénases s'associent pour former des homodimères croisés dans lesquels le domaine réductase d'une sous-unité interagit avec le domaine oxygénase de l'autre. À l'interface des domaines se trouve un site de fixation pour le complexe calcium/calmoduline ($\text{Ca}^{2+}/\text{Cam}$) qui régule le transfert des électrons, donc l'activité de l'enzyme (Groves et Wang 2000). Un attachement de $\text{Ca}^{2+}/\text{Cam}$ rapproche deux domaines et distingue les deux isoformes nNOS et eNOS de l'isoforme inductible iNOS (Stuehr, 1996). Dans leur stade basal, nNOS et eNOS ont une faible affinité pour $\text{Ca}^{2+}/\text{calmoduline}$ donc leur activation est dépendante de l'augmentation des niveaux intracellulaires de Ca^{2+} . À l'opposé, iNOS se lie à la calmoduline avec grande affinité; donc son activation n'est pas dépendante de l'augmentation de calcium intracellulaire (Forstermann et al., 1995; Stuehr, 1996; Alderton et al., 2001).

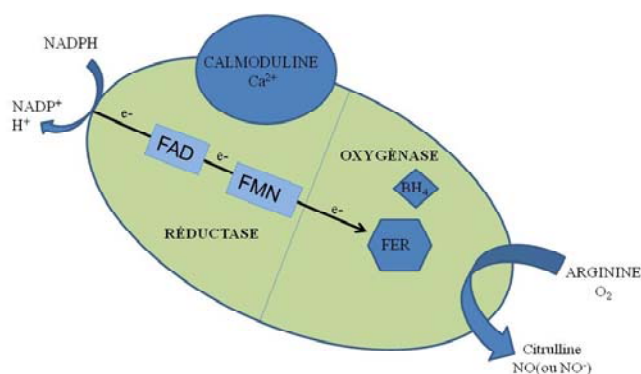


Figure 15. Domaines de la NOS dans différents types cellulaires des mammifères.
Adapté selon Alderton et al., 2001.

L'activation du B_2R des kinines active la eNOS par l'intermédiaire de la sous-unité $\text{G}\alpha_q$ de la protéine G qui stimule la PLC- β . Celle-ci libère le IP_3 qui produit l'augmentation de calcium intracellulaire et conduit à l'activation de la eNOS.

La voie B_2R -eNOS délivre dans une courte durée une faible quantité de NO. La cellule endothéliale est la principale source de NO dans des conditions normales. Cependant, sous des conditions inflammatoires, les cellules endothéliales peuvent exprimer la iNOS. Contrairement à la eNOS, la iNOS est induite par des médiateurs de l'inflammation comme les lipopolysaccharides (LPS) et les cytokines ($\text{IL-1}\beta$, IL-6 , interféron γ) (Forstermann et al., 1995; Aktan et al., 2003). Une fois exprimée, la iNOS génère continuellement une grande quantité de NO (de façon non régulé) et de manière prolongée comparativement à eNOS et nNOS

(Papapetropoulos et al., 1999). La production excessive de NO peut contribuer au développement de l'hypertension à travers la formation de ERO (Borisov et al., 2006; Brunori et al., 2006; Mizuno et al., 2010). Récemment, une régulation de la iNOS par l'activation du récepteur B₁R des kinines a été démontrée (Zhang et al., 2007; Kuhr et al., 2010). Le B₁R des kinines active la iNOS par l'intermédiaire de la sous-unité G α i ou la sous-unité β γ de la protéine G.

La iNOS et le B₁R sont induits dans les mêmes conditions inflammatoires tels le choc septique, suite à l'exposition à des cytokines, à des facteurs de croissance, à des bactéries (Campos et al., 2006; Pesquero et Bader, 2006; Dias et Couture, Journ. Cardio. Pharmacol., 2012). Le NO produit par la iNOS est utilisé contre les agresseurs tels les bactéries et les virus (Borisov et al. 2006; Brunori et al., 2006). L'activation de la iNOS via B₁R forme environ 800 nM NO et dure 90 min comparativement à la production de NO (165 nM) qui ne dure que 5 min après l'activation de la eNOS via B₂R (Kuhr et al., 2010). La production de NO spécifique à la iNOS peut être bloquée par un antagoniste spécifique au B₁R, des-Arg¹⁰-Leu⁹-KD, ou par un inhibiteur spécifique de la iNOS, le 1400W (Kuhr et al., 2010).

1.4. La douleur

1.4.1. Les nocicepteurs

Les stimuli nocifs et dommageables sont détectés par des organes sensoriels constitués de terminaisons nerveuses libres de type dendritique : le nocicepteur. On retrouve 3 types de nocicepteurs : les nocicepteurs mécaniques, les nocicepteurs mécaniques et thermiques ainsi que les nocicepteurs polymodaux. Certaines substances comme: la sérotonine, l'histamine, les prostaglandines, les leucotriènes et les enzymes protéolytiques peuvent sensibiliser les nocicepteurs polymodaux (Julius et Basbaum, 2001).

Les nocicepteurs mécaniques sont excités suite à une forte stimulation mécanique (pincement, pression élevée) au niveau des terminaisons des fibres A δ myélinisées. Les nocicepteurs thermiques et mécaniques sont stimulés par des températures (> 45 °C et < 15 °C) et par des stimuli mécaniques dommageables appliqués aux terminaisons des fibres A δ . Les nocicepteurs polymodaux pour leur part sont stimulés par des stimuli mécaniques, thermiques et chimiques à intensité élevée. Ces récepteurs sont associés à la douleur chronique. Ils sont constitués pour la

majorité des fibres sensorielles de type C. Ils se retrouvent dans la peau, les muscles squelettiques, les tendons et les ligaments (Byers et al., 2001). On retrouve aussi d'autres nocicepteurs appelés nocicepteurs silencieux dont le seuil diminue dans les conditions inflammatoires et après stimulation chimique, mais ils ne sont pas activés par les stimuli nocifs en condition physiologique normale (Messlinger et al., 1997).

1.4.2. Propagation de la douleur

Les influx nerveux déclenchés par la stimulation des nocicepteurs se rendent au système nerveux central par les fibres sensorielles (fibres C non myélinisées, fibres myélinisées A δ et en conditions pathologiques, les fibres myélinisées A β). Ces fibres sont des afférences sensibles des neurones de premier ordre ayant leur corps cellulaire dans les ganglions de la racine dorsale et dans les ganglions des nerfs crâniens.

Ces afférences sensibles primaires font synapse avec un neurone de 2^e ordre ou avec des interneurons dans la corne dorsale de la moelle épinière dans les couches superficielles. La plupart des neurones de deuxième ordre pénètrent dans la zone de Lissauer et font synapse avec un neurone de 2^e ordre qui projette du côté ipsilatéral ou remonte dans le cadran antéro-latéral du côté controlatéral jusqu'à leurs sites de projection pour former *les trois voies principales ascendantes* : **la voie spinoréticulée et les voies spinothalamiques et spinomésencéphalique** (Julius et Basbaum, 2001) ainsi que **la voie post synaptique de la colonne dorsale dans les douleurs viscérales** (Menétrey et al., 1989; Palecek et Willis, 2003) qui projettent à leur tour dans le cortex et autour des centres de perception de la douleur.

La transmission synaptique entre les nocicepteurs et les neurones de la moelle épinière est relayée par **les neurotransmetteurs des afférences sensibles primaires** :

- 1) acides aminés excitateurs : le glutamate est le principal neurotransmetteur des fibres A δ et C; il agit instantanément en activant les récepteurs NMDA et AMPA/kainate. L'aspartate est un autre neurotransmetteur des fibres A δ .
- 2) Peptides : La SP, la neurokinine A, le CGRP, la galanine et la cholécystokinine sont des peptides co-localisés dans les fibres A δ et C associées aux nocicepteurs polymodaux.
- 3) Monoxyde d'azote : le NO est libéré par les fibres A δ et C.

- 4) Les neurotransmetteurs sont synthétisés dans le corps cellulaire des fibres sensorielles et par la suite ils sont transportés vers la périphérie et la moelle épinière. Le NGF est libéré et produit au site de l'inflammation par les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules de Schwann, les cellules immunitaires et les neurones, puis il est transporté de façon rétrograde aux corps cellulaires. Il contribue à la régulation de l'expression des neuropeptides (SP et CGRP), du récepteur TRPV-1 (sensible à la capsaïcine), du récepteur B₂ des kinines et des canaux ioniques via son récepteur le TrkA (tyrosine kinase A) (Guilbard et al., 1997).

1.4.3. Traitement de la douleur chronique

La connaissance de l'origine de la douleur peut aider à choisir le traitement approprié. Il existe différents traitements pharmacologiques comme les anti-inflammatoires non stéroïdiens (les inhibiteurs des cyclooxygénases, COX-1 et COX-2), les anticonvulsivants (gabapentine) (Eisenberg et al., 2007), les opioïdes (Ledeboer et al., 2007; Wong et al., 2007; Enquist et al., 2011), les antidépresseurs (amitriptyline) (Huber et al., 2007), les antagonistes du récepteur TRPV1 (Joshi et al., 2006; Tang et al., 2007; Szallasi et al., 2007), les antagonistes des récepteurs NMDA (Soleimannejad et al., 2006; Bleakman et al., 2006) et des récepteurs AMPA (Lim et al., 2006), les cannabinoïdes CB₁ et CB₂ (Gutierrez et al., 2007; Liu et al., 2006), les bloqueurs calciques (Schroeder et al., 2006) et sodiques (Ekberg et al., 2006), les agonistes gabaergiques (Schoffnegger et al., 2006) et les antioxydants (resveratrol et curcumin) (Sharma et al., 2007; Woo et al., 2011).

1.4.4. La douleur neuropathique et la neuropathie diabétique

1.4.4.1. La douleur neuropathique

Les douleurs neuropathiques font partie d'un groupe hétérogène de douleur caractérisé par des lésions ou des dysfonctions du système nerveux central ou périphérique, généralement chronique et sévère. Plusieurs causes sont associées aux affections du cerveau, de la moelle épinière et des nerfs périphériques comme le diabète, le cancer, la sclérose en plaques, les névralgies post-herpétiques, les maladies virales comme le virus d'immunodéficience (HIV) et les maladies auto-immunes.

1.4.4.2. La sensibilisation périphérique ou centrale

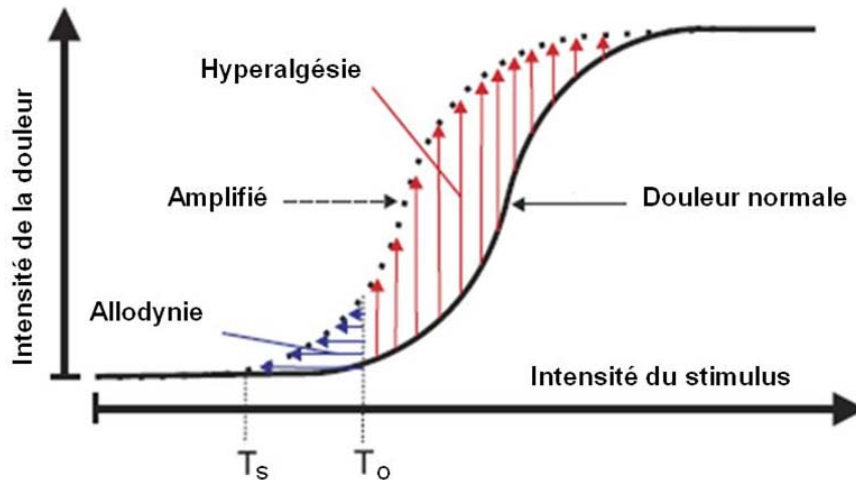
La stimulation répétée des nocicepteurs (sensibilité périphérique) ou des neurones de la corne dorsale (sensibilité centrale) cause une diminution du seuil d'activation et une réponse accentuée aux stimulations supraliminaires. La sensibilisation périphérique est une augmentation de la fréquence de décharges des fibres C ou une accumulation d'activités nociceptives sur les neurones secondaires de la moelle épinière (Li et al., 1999). Ce phénomène peut mener à une sensibilisation centrale (spinale) qui est une augmentation de l'excitabilité et de la décharge spontanée des neurones des cordons postérieurs de la moelle (Woolf et al., 1996).

Symptômes douloureux pertinents dans le modèle de résistance à l'insuline (rats traités au glucose)

- **Hyperalgésie (primaire et secondaire):** réponse exagérée à un stimulus douloureux. L'hyperalgésie primaire a lieu au site de la lésion suite à la libération de divers facteurs inflammatoires en périphérie (réponse à la stimulation thermique et mécanique). L'hyperalgésie secondaire est une sensation des tissus avoisinants la lésion: recrutement répété des fibres de type C (réponse à la stimulation mécanique).
- **Allodynie (tactile, au froid):** l'évocation d'une douleur par un stimulus non douloureux relayée par les fibres A β et A δ (ancienne définition). Nouvelle définition par IASP : seulement si la douleur est connue pour être causée par l'excitation de fibres sensorielles avec un faible seuil on peut parler d'allodynie (Sandkuhler, 2009). Cette thèse focusera sur ce symptôme. Il a été possible de démontrer que le blocage systémique prolongé du récepteur B1R des kinines chez les rats traités au glucose renverse l'allodynie tactile et au froid (Dias et al., 2010) (**Figure 16**).

L'hyperalgésie et l'allodynie

A



B

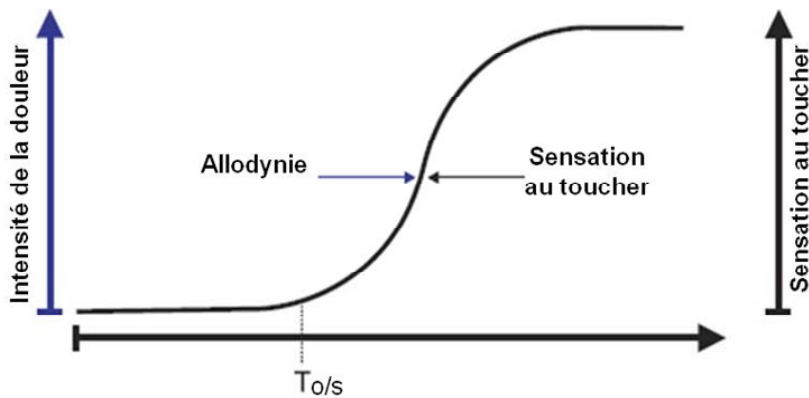


Figure 16. Hyperalgésie et Allodynie selon IASP en 2008

A) Ancienne définition : l'allodynie est une douleur induite par un stimulus non douloureux relayée par les fibres $A\beta$ et $A\delta$ (diminuant le seuil de la douleur) B) Nouvelle définition : Toutes les formes de douleur amplifiée incluant la baisse du seuil se résume par l'hyperalgésie. Allodynie : seulement les douleurs induites par des fibres sensorielles à faible seuil (Sandkuhler, 2009). T_o signifie le seuil normal de la sensation de la douleur, T_s signifie le seuil de la douleur après la sensibilisation. $T_{o/s}$ réfère au seuil normal de la sensation du toucher qui est identique ou près du seuil de stimulation de l'allodynie (adapté selon Sandkuhler, 2009).

1.4.4.3. Mécanisme de l'allodynie (douleur causée par les fibres A β)

Plusieurs évidences confirment la contribution des larges fibres myélinisées A β dans l'allodynie tactile (Gracely et al., 1992; Sandkuhler, 2009). Dans des conditions physiologiques, la stimulation des fibres sensorielles A β n'est pas en mesure de produire la nociception. Lors d'un stade inflammatoire, certaines fibres A β peuvent relâcher la substance P dans la corne dorsale de la moelle épinière et augmentent la réponse des neurones nociceptifs spinaux (Neumann et al., 1996). Ces fibres A β changent ainsi leur phénotype pour celui de la fibre C nociceptive. De plus, chez des animaux neuropathiques, une augmentation de l'activité neuronale a été démontrée dans la lamina II de la corne dorsale après stimulation répétée du toucher (Bester et al., 2000). Dans des modèles de ligature du nerf sciatique, les fibres A β produisent des bourgeonnements ou collatérales dans les couches nociceptives superficielles de la corne dorsale de la moelle épinière (Kohama et al., 2000; Kohno et al., 2003; Okamoto et al., 2001).

1.4.5. Neuropathie diabétique

La neuropathie diabétique est un groupe hétérogène de problèmes où l'on trouve la présence de symptômes ou de signes de dysfonctionnement des nerfs périphériques ou spinaux chez des individus diabétiques après l'exclusion d'autres causes. La dégénération des fonctions nerveuses comme le ralentissement de la vitesse de conduction des nerfs a lieu autant dans le diabète de type 1 que dans le diabète de type 2. Elle se produit de 2 à 5 ans après le début du diabète de type 1 contrairement au diabète de type 2 où elle est habituellement présente dès le diagnostic et progresse graduellement avec la durée du diabète (Ziegler et al., 1988; Feldman et al., 1997). Bien que le contrôle glycémique soit un facteur déterminant dans la prévention et le temps d'apparition des neuropathies diabétiques (Shakker et al., 2011), les complications diabétiques apparaissent chez 20-30% des patients malgré le contrôle de la glycémie (Feldman, 2003) nécessitant ainsi la recherche de d'autres interventions thérapeutiques. La morbidité est associée avec l'ulcération des pieds, précurseur de la gangrène qui augmente les risques d'amputation des membres.

1.4.5.1. Les types de neuropathie diabétique

Neuropathie diabétique sensorimotrice

Les nerfs avec les axones les plus longs sont habituellement affectés en premier. Les sensations de chaud, de froid et du toucher sont affectées lors de dommages aux petites fibres sensorielles. Par contre, les dommages aux larges fibres diminuent les sensations de vibrations, du positionnement et la force musculaire (Vinik et Mehrabyan, 2004).

La **polyneuropathie symétrique distale** est la plus commune des neuropathies périphériques, elle se développe autant dans les nerfs sensoriels que dans les nerfs moteurs et cela implique à la fois les grosses et les petites fibres. La dysfonction des plus gros nerfs arrive en premier (Vinik et Mehrabyan, 2004).

La **neuropathie diffuse** est constatée dans l'amyotrophie diabétique et la neuropathie fémorale, celles-ci commencent de façon graduelle ou raide avec des douleurs aux fesses suivies d'une faiblesse des muscles des membres inférieurs proximaux (Vinik et Mehrabyan, 2004).

La **neuropathie focale** est caractérisée par les mononeuropathies dues à une obstruction vasculaire affectant les nerfs crâniens III, VI, VII, ulnaire, médian et péronéal. Elles sont déclenchées soudainement et se résorbent de façon spontanée. De plus, la neuropathie focale peut être associée aux constrictions ou aux compressions nerveuses graduelles et progressives occasionnées par des os et/ou des ligaments aux nerfs médian, ulnaire, fémoral, péronéale, médial et plantaire latéral. Quelques symptômes: faiblesse musculaire, atrophie, paresthésie, crampe, engourdissement, mouvement antalgique (mouvement exécuté dans le but de minimiser ou d'éviter une douleur) (Vinik et Mehrabyan, 2004).

Neuropathie diabétique autonome

Les neuropathies diabétiques autonomes peuvent se produire à n'importe quel moment, mais elles apparaissent normalement lors d'une glycémie peu contrôlée ou après 20 ans avec la maladie.

La **neuropathie autonome cardiovasculaire** affecte les nerfs vagal et sympathique et provoque l'intolérance à l'exercice, tachycardie persistante du sinus carotidien.

La **neuropathie vasomotrice** affecte les lits vasculaires splanchnique et périphérique causant une hypotension orthostatique.

La **neuropathie sudomotrice** cause l'hyperhydrose et l'intolérance à la chaleur.

La **neuropathie gastro-intestinale** est caractérisée par une augmentation de l'activité sécrétoire du tube digestif par les nerfs parasympathiques. En effet, une affection dans le système parasympathique peut causer une paralysie à n'importe quel endroit du tractus digestif et aussi causer la constipation, la diarrhée et l'incontinence (Aring et al., 2005).

L'atteinte des nerfs périphériques dont le nerf pudendal peut être responsable de **dysfonction érectile** souvent associée à une atteinte de la vessie.

Infection et ulcération du pied (amputation)

La neuropathie périphérique typiquement commence par la partie distale des membres inférieurs et progresse dans les régions proximales. Les diabétiques ont tendance à avoir des coupures, des ecchymoses et des lésions mineures qui s'infectent avec des bactériens ou des champignons. Ces infections sont difficiles à traiter et à guérir. La répétition de traumatisme, de friction ou de pression au niveau des pieds mène à des formations de callosité qui peuvent se convertir en ulcération infectée et conduire à l'amputation du pied (Dray et al., 1997).

1.4.5.2. Le récepteur B₁ en lien avec la douleur

Le récepteur B₁ joue un rôle important dans les douleurs chroniques et l'inflammation. La stimulation par l'agoniste B₁R et B₂R conduit à l'induction du B₁R (Campos et al, 1996, Campos, Cabrini, 2001). Le B₁R est surexprimé avec la COX-2 et l'iNOS dans les mêmes conditions inflammatoires (Haddad et al., 2000; Dixon, 2004; Brovkovich et al., 2011). Les souris invalidées pour le récepteur B₁ manifestent une hypoalgésie thermique dans les modèles de la formaline et de la capsaïcine et une diminution du phénomène de sensibilisation dans la moelle épinière (Pesquero et al., 2000). Ces mêmes souris présentent une diminution de l'hyperalgésie thermique et de l'allodynie mécanique après l'injection de l'adjuvant de Freund (Ferreira et al. 2001). L'antagoniste non peptidique du récepteur B₁ actif oralement, le SSR240612, est antinociceptif dans une série de modèles de douleur inflammatoire ou neuropathique, incluant la ligature du nerf sciatique, l'irradiation aux UV et le traitement à la capsaïcine (Gougat et al., 2004). Très peu d'études ont été cependant réalisées sur le B₁R dans la douleur neuropathique d'origine diabétique. La présence du récepteur B₁ dans la moelle épinière chez les rats rendus diabétiques avec la streptozotocine (STZ) a été rapportée en autoradiographie et en hybridation in situ par Ongali et collaborateurs, 2004. Subséquemment, le récepteur B₁ a été identifié sur les astrocytes, la microglie et les fibres C (Talbot et al., 2009). L'inhibition de la microglie prévient les effets du B₁R sur la douleur neuropathique dans le modèle du rat STZ (Talbot et al., 2010). La distribution du récepteur B₁ a aussi été étudiée dans ce modèle STZ au niveau du cerveau (hippocampe, amygdale, lobes temporal et pariétal) ainsi que dans le cortex périrhinal et périforme où les sites de liaison du récepteur B₁ sont surexprimés (Campos et al., 2005). L'activation intraspinale du récepteur B₁ chez les rats STZ mène à l'hyperalgésie thermique (Couture et al., 2001). Un traitement chronique avec des antagonistes sélectifs du récepteur B₁ (R-715 et/ ou R-954) montre un blocage de l'hyperalgésie thermique chez les souris STZ (Gabra et Sirois., 2003) et les souris NOD diabétiques (Gabra et Sirois, 2005) et le rat *spontaneous BioBreeding/Worcester diabetic-prone* (BB/Wor-DP) traité avec STZ (Gabra et al., 2005). De plus, les souris diabétiques STZ invalidées pour le récepteur B₁ montrent une absence d'hyperalgésie thermique (Gabra et al., 2005). Ces études consolident le rôle du récepteur B₁ dans l'hyperalgésie thermique dans le diabète de type 1.

Dans notre modèle de résistance à l'insuline, des études en autoradiographie chez des rats traités au glucose pendant 4, 8 et 12 semaines montrent une augmentation des sites de liaison du

récepteur B₁ dans la moelle épinière (El Midaoui et al., 2005; Lungu et al., 2007; Dias et al., 2010). Notre laboratoire a montré que le blocage pharmacologique en aigu du B₁R améliore les allodynies tactile et au froid chez les rats traités au glucose (Dias et al., 2007). Ce modèle ne manifeste cependant pas d'hyperalgésie thermique (Lungu et al., 2007). Aucune autre étude sur la douleur et le B₁R dans le diabète de type 2 n'a été rapportée.

1.5. Hypertension et diabète de type 2

L'hypertension se définit comme étant une pression sanguine systolique et diastolique supérieure à 140/90 mmHg; elle est trois fois plus fréquente chez les diabétiques selon l'American Diabetes Association. De plus, les patients hypertendus sont plus susceptibles à développer un diabète (Fields et al., 2004). L'hypertension augmente les risques de maladies micro- et macro-vasculaires (Sowers et al., 2002). Dans le diabète de type 1, l'hypertension est rare s'il n'y a pas de dysfonction rénale. Dans le diabète de type 2, l'hypertension est retrouvée avec les autres syndromes métaboliques incluant l'obésité, la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'hypercoagulation (Sowers et al., 2002 ; Kurtz, 2006).

L'association entre l'hypertension, la résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie qui en découle fait l'objet de plusieurs études (Kotchen et al., 1991; Reaven et al., 1991). Les niveaux plasmatiques d'insuline corréleront directement avec la pression artérielle (Ferrannini et al., 1987). L'insuline a un effet antinatriurétique (DeFronzo et al., 1975; Reaven et al., 1988; Rocchini et al., 1991) favorisant l'augmentation de la pression artérielle. La consommation de calories peut moduler l'activité du système nerveux sympathique (SNS) (Landsberg et al., 1992). La perfusion d'insuline en condition euglycémique augmente l'activité sympathique dans le muscle squelettique mais non la pression artérielle chez des individus avec hypertension limite (Anderson et al., 1992). Chez des sujets normaux, l'insuline produit également une augmentation de l'activité sympathique et une vasodilatation musculo-squelettique sans altérer la pression artérielle (Rowe et al., 1981; Anderson et al., 1991). La perfusion aiguë d'insuline chez des patients diabétiques augmente aussi l'activité sympathique cardiaque (Takagi et al., 2003). L'activation du SNS cause une vasoconstriction et une réduction du flux sanguin aux muscles squelettiques ce qui affaiblit l'utilisation du glucose et contribue au développement ou au maintien de la résistance à l'insuline

(Landsberg et al., 1996). On retrouve de l'hyperinsulinémie et de la résistance à l'insuline chez les rats génétiquement hypertendus (Dahl hypertension et spontaneously hypertensive rat) (Kotchen et al., 1991; Reaven et al., 1991). Les diètes riches en carbohydrates (fructose, sucrose, glucose) développent aussi l'hypertension associée à la résistance à l'insuline (Hall et al., 1966; Young et Landsberg, 1981; Hwang et al., 1987; Dai et al., 1994; El Midaoui et de Champlain, 2002; 2005). Plusieurs changements physiologiques peuvent conduire à l'hypertension chez les patients diabétiques, entre autres, l'augmentation de l'activité sympathique, la sensibilité au sel, l'expansion volumique, la diminution du pouvoir de filtration glomérulaire au niveau du rein, la perte nocturne du cycle de la pression artérielle ainsi que du pulse (Sowers et al., 2002).

1.5.1. Traitements

Il est possible d'apporter des modifications aux habitudes de vie afin de réduire la pression artérielle, entre autres, perdre du poids excédentaire, faire de l'exercice, réduire la prise alimentaire de sodium, cesser de fumer, réduire la consommation d'alcool et favoriser une diète riche en fruits et légumes à faible teneur en carbohydrate et en graisse.

Voici quelques traitements pharmacologiques qui ont pour but de ramener l'hypertension à des valeurs $\leq 130/80$ mmHg: les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1, les bloqueurs du récepteur AT₁ de l'angiotensine II, les bloqueurs de l'endothéline, les bloqueurs beta adrénergiques, les bloqueurs des canaux calciques, les diurétiques, les bloqueurs des récepteurs de l'aldostérone et la combinaison de ces thérapies (Kaplan, 2001; Laffer et Elijovich, 2010)

Mécanismes d'intérêt causant l'hypertension

- 1) Système rénine-angiotensine
- 2) Dysfonction vasculaire endothéliale (diminution de la biodisponibilité du NO)

1.5.2. Le système rénine - angiotensine

Le système rénine-angiotensine inclut la rénine, l'enzyme de conversion de l'angiotensine-I et les récepteurs de types AT₁ et AT₂ de l'angiotensine II. Le récepteur de type AT₁ est exprimé dans tout le corps particulièrement dans le rein, dans le système circulatoire et dans le système nerveux central. Son activation induit une puissante vasoconstriction (Ito et al., 1995; Davisson et al.,

2000; Morris et al., 2002) et il joue un rôle important dans l'homéostasie de la pression artérielle. L'activation du récepteur AT₁ augmente l'appétit au sel ainsi que la relâche de la vasopressine et de l'aldostérone (Aguilera et al., 1992; Timmermans et al., 1993). La stimulation des nerfs rénaux sympathiques (Dibona et al., 1983) ainsi que l'action de l'aldostérone au niveau des tubules distaux du rein (Masilamani et al., 1999) causent une augmentation de la rétention du sodium rénal. L'angiotensine II augmente le tonus sympathique dans le système nerveux central et périphérique via la libération de norépinéphrine des terminaisons nerveuses (Muratani et al., 1996).

L'angiotensine II réduit la capacité des tissus adipeux d'emmagasiner les acides gras ce qui cause leur accumulation dans d'autres tissus menant à la résistance à l'insuline et au développement du diabète (Cooper, 2004). Elle affecte le métabolisme du glucose en agissant sur la signalisation du récepteur à l'insuline, en induisant le stress oxydatif par l'activation de la NAD(P)H oxydase, en diminuant le flux sanguin tissulaire, en stimulant le système nerveux sympathique, en inhibant la différenciation des adipocytes (Kurtz, 2006).

Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IECA) améliorent la sensibilité à l'insuline en interférant avec la génération de l'angiotensine II (Kurtz et Pravenec, 2004). Cependant, les propriétés antidiabétiques des IECA semblent aussi être relayées par l'augmentation des niveaux de BK. L'activation du récepteur B₂ des kinines augmente l'activité tyrosine kinase du récepteur de l'insuline. En effet, la BK transloque directement les GLUT4 à la membrane cellulaire et stimule la libération de NO (Kudoh et Matsuki, 2000; Bernobich et al., 2002; Shiuchi et al., 2002). Les inhibiteurs des récepteurs de l'angiotensine II diminuent aussi le risque de diabète de type 2 (Kurtz et Pravenec, 2004). Le telmisartan représente une nouvelle génération d'antagonistes du récepteur AT₁ de l'angiotensine II pour le traitement du diabète et de l'hypertension. Il est capable de bloquer la voie de l'angiotensine II en diminuant le stress oxydatif et activer la voie du PPAR γ qui diminue la résistance à l'insuline, la dyslipidémie et l'inflammation cellulaire (Kurtz et Pravenec, 2004).

1.5.3. Dysfonctions dans les cellules endothéliales (le stress oxydatif et le NO)

La détérioration du fonctionnement de l'endothélium peut intervenir à différents stades des maladies comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie, le diabète mellitus et l'athérosclérose (van Dam, 2002). Les dysfonctions endothéliales vasculaires peuvent être relayées par une réduction de la bioactivité des facteurs relaxants dérivés de l'endothélium incluant l'« endothelium-derived relaxing factor » (EDRF connu maintenant comme étant le monoxyde d'azote NO), la protacycline (PGI₂) et l'« endothelium-derived hyperpolarizing factor » (EDHF). Le NO et la PGI₂ sont capables de provoquer la relaxation du muscle lisse vasculaire (Hortobagyi et al., 2007). Le NO est considéré comme le principal médiateur de la relaxation dépendante de l'endothélium, bien qu'il faut aussi tenir compte d'un important régulateur du tonus vasculaire qui cause la relaxation des petits vaisseaux, le EDHF (Pierper et al., 1992; Langenstroer et Pieper, 1992; Higashi et al., 2006). La détérioration de la vasodilatation dépendante de l'endothélium est due à l'augmentation de ROS (Langerstroer et al., 1992; Hortobagyi et al., 2007). Nous savons que le NO est le plus susceptible de causer le stress oxydatif dans le diabète puisqu'il réagit rapidement avec l'anion superoxyde pour former du peroxydinitrite, molécule pro-oxydante. De plus, la diminution de production de NO dans l'endothélium produit une vasoconstriction (Darley-Usmar et al., 1997; Pacher et al., 2007).

1.5.4. Dysfonctions dans les muscles lisses vasculaires

L'augmentation des niveaux plasmatiques de glucose provoque des changements dans la fonction des muscles lisses vasculaires (Muniyappa et al., 1998). L'insuline atténue la réponse vasoconstrictrice des agonistes presseurs et accélère la relaxation des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Metsarinne et al., 1994; Trovati et Anfossi, 2002); cependant ces effets sont diminués ou absents lorsqu'il y a résistance à l'insuline (Zemel et al., 1990; 1991; 1992; Kim et Zemel, 1993). L'insuline réduit l'entrée du flux de calcium dans les CMLV en réduisant l'activité des canaux calciques voltage dépendant et non-voltage dépendant. Ceci limite la relâche de calcium des organelles intracellulaires et stimule la pompe Na⁺/K⁺ ATPase qui diminue le calcium intracellulaire entraînant la relaxation vasculaire (Tirupattur et al., 1993). Dans un état de résistance à l'insuline, la concentration de calcium libre intracellulaire dans les CMLV augmente chez les rats Zucker, ce qui cause l'augmentation de la réponse à l'arginine vasopressine, à

l'angiotensine II et à la norépinéphrine. L'insuline ne suffit plus alors à atténuer la vasoconstriction causée par l'angiotensine II et la norépinéphrine, lesquelles augmentent le calcium intracellulaire à partir du réticulum endoplasmique dans les CMVL (Standley et al., 1993).

1.5.5. Kinines et l'hypertension

Le récepteur B₂

En périphérie, les kinines sont des peptides vasoactifs causant une vasodilatation via la voie du NO et une chute de pression artérielle (Bhoola et al., 1992). De nombreuses études ont identifié plusieurs sites d'actions pour les kinines dans le SNC ayant un effet sur le système cardiovasculaire: l'aire latérale du septum (Corrêa et Graeff, 1976), les noyaux hypothalamiques (Diz et Jacobowitz, 1984; Diz, 1985), la portion ventrale du III^e ventricule (Lewis et Phillips, 1984), les aires péri-ventriculaires dorsales de la medulla oblongata (Lindsey et al., 1988; 1997; Fior et al., 1993), le noyau du tractus solitaire (NTS), le noyau du paratrijumeau (Pa5), l'aire postrema, le noyau dorsal moteur du nerf vague (X), le noyau du trijumeau (Lindsey et al., 1988; de Sousa et al., 2002; Privitera et al., 2003) et la moelle épinière (Lopes et Couture., 1992; Cloutier et al., 2002; Cloutier et al., 2004). L'injection de la BK dans ces structures augmente la pression artérielle en augmentant l'activité du système nerveux sympathique (Couture et Lindsey, 2000).

On connaît un effet cardioprotecteur au B₂R, car l'administration de la BK produit, via le NO et la PGI₂, la vasodilatation. Les souris déficientes pour le B₂R développent une hypertension suite à une consommation de sel (Alfie et al., 1997; Madeddu et al., 1997) ou un traitement aux minéralocorticoïdes (Emanuelli et Madeddu, 1999). Les IECA contribuent à la potentialisation de la BK en empêchant la désensibilisation de son récepteur par des mécanismes impliquant des phosphatases et la PKC et en prévenant la dégradation de BK (Marcic, 1999). Ainsi, la BK participe à l'effet bénéfique des IECA sur la pression artérielle (Benzing et al., 1999). De plus, l'activation des récepteurs AT₂ de l'angiotensine à la suite d'un blocage des récepteurs AT₁ cause une vasodilatation et une hypotension par la relâche de BK (Schiffrin et Touyz, 2003).

Le récepteur B₁

Le récepteur B₁ est induit et surexprimé dans divers organes dans des modèles de diabète et d'hypertension : les rats STZ, les rats traités au glucose ou à l'angiotensine II et les rats SHR (Petcu et al., 2005; Ongali et al., 2004; Campos et al., 2005; Fernandes et al., 2006; Hagiwara et al., 2004, Dias et al., 2010; Pouliot et al., 2011). La participation du B₁R dans la régulation de la pression artérielle et sa contribution à la dysfonction cardiovasculaire demeure controversée. L'activation du B₁R par la des-Arg⁹-BK via une injection i.v ou i.a produit une vasodilatation et l'hypotension chez le chien mais pas chez les autres espèces (Lamontagne et al., 1996; Su et al., 2000). Chez le chien, le B₁R serait constitutif. Chez les rats SHR, l'injection i.t d'agoniste B₁R n'affecte pas la pression artérielle (Cloutier et al., 2002). Par contre, dans ce même modèle, l'injection i.c.v. de Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, un agoniste stable du récepteur B₁, augmente la pression sanguine alors que l'injection d'un antagoniste du récepteur B₁, le R-715, diminue la pression sanguine (Emanuelli et al., 1999). La même approche pharmacologique n'a pas confirmé la participation du récepteur B₁ dans le contrôle central de la pression artérielle chez les SHR (Cloutier et Couture, 2002; 2004). En revanche, un traitement avec le SSR240612 chez le rat SHR, le rat perfusé à l'angiotensine II ou traité au glucose produit une forte réduction de la pression artérielle (De Brito et al., 2010; Dias et al., 2010). L'effet anti-hypertenseur serait principalement dû aux récepteurs B₁R centraux. Ceci s'explique puisqu'une administration dans ces modèles d'antagonistes peptidiques qui ne traversent pas la barrière hématoencéphalique (R-715 et R-954) affecte peu la pression artérielle (Lungu et al., 2007; De Brito et al., 2010).

Le B₁R semble être impliqué dans l'hypertension par son interaction avec le stress oxydatif et l'angiotensine II (Petcu et al., 2005; Lungu et al., 2007; Ismael et al., 2008; Dias et al., 2010). L'angiotensine II stimule la surexpression du B₁R dans les cellules musculaires lisses vasculaires de l'aorte de rat via le stress oxydatif (Ceravolo et al., 2007; Morand-Contant, 2010). Le B₁R est aussi impliqué dans la cardiomyopathie diabétique puisque les souris STZ déficientes en B₁R ont une amélioration de la dérégulation de la pression systolique et diastolique ainsi qu'une diminution de l'expression de p38 et une stabilisation de MMP-9 et de CXCL-5 dans le tissu cardiaque (Westermann et al., 2009).

Le rein est grandement impliqué dans la régulation de la pression artérielle à long terme. Le B₁R contribue à la maturation et à la détermination du néphron proximal (Bulut et al., 2009). En utilisant la souris déficiente en B₁R, ce dernier s'est avéré protecteur en prévenant l'hypotension lors du choc endotoxique induit par le LPS (Seguin et al., 2008), mais délétère dans la glomérulonéphrite (Klein et al., 2010) et la glomérulosclérose souvent retrouvée chez les diabétiques (Pereira et al., 2011) et dans la fibrose rénale (Wang et al., 2009).

Comparaison du B₁R versus le B₂R sur le système cardiovasculaire

Le B₁R contrairement au B₂R a des effets protecteurs et délétères sur le système cardiovasculaire selon le modèle expérimental. Le B₁R a un effet cardioprotecteur dans des modèles d'animaux d'infarctus du myocarde. Les souris déficientes en B₁R avec un infarctus du myocarde qui reçoivent des IECA ou des antagonistes de l'AT1 ont des dysfonctions cardiaques plus marquées (Xu et al., 2009). Il semble y avoir une relation entre AT1 et B₁R puisque la surexpression de AT1 réduit le B₁R et vice versa dans l'infarctus du myocarde (Tschöpe et al., 2004a) bien que le mécanisme soit inconnu. Chez les souris invalidées pour le B₂R ou le B₁R avec infarctus du myocarde, il a été démontré que le B₂R seul ne semble pas en mesure de produire un effet cardioprotecteur complet, il a besoin du B₁R (Duka et al., 2008). Les souris déficientes pour le B₂R surexpriment le B₁R; ces souris présentent une hypotension avec une perfusion d'agoniste B₁R et une hypertension artérielle avec une perfusion d'antagoniste B₁R avec une diète riche en sel ou pas. Ceci implique qu'en absence du B₂R, le B₁R remplit les fonctions hémodynamiques du B₂R (Duka et al., 2001; Duka, et al., 2003).

La kallibréine est impliquée dans la régulation de la pression artérielle (Chen et al., 1996; Sharma et Kesavarao, 2011). Les souris déficientes en kallibréine tissulaire sont incapables de produire des niveaux suffisants en kinines dans la plupart des tissus et développent l'hypertension (Couture et Girolami., 2004). Une équipe a démontré que ces souris ont des dysfonctions cardiaque et vasculaire avec une pression artérielle normale (Meneton et al., 2001).

Chapitre 2 : Premier article

2.1. Hypothèse : Le récepteur B₁ des kinines est induit par le stress oxydatif dans le diabète et serait responsable des complications cardiovasculaires (hypertension artérielle), des neuropathies douloureuses et des dysfonctions métaboliques. L'activation du récepteur B₁ est aussi capable de perpétuer le stress oxydatif. Ainsi, le blocage du récepteur B₁ des kinines dans un modèle de résistance à l'insuline devrait corriger les complications diabétiques, réduire la production des ERO et les dysfonctions métaboliques (hyperglycémie, hyperinsulinémie).

2.2. Objectifs : Évaluer les effets d'un antagoniste non peptidique et actif oralement du récepteur B₁ des kinines, SSR240612, sur la pression artérielle, les anomalies sensorielles (allodynie tactile et au froid), le stress oxydatif, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie qui sont produits dans un modèle de rat résistant à l'insuline. Analyser l'expression du récepteur B₁ dans divers tissus (foie, aorte, muscle, moelle épinière).

2.3. Approches expérimentales : (1) Le SSR240612 a été administré par gavage à une dose de 10 mg/kg/jour pendant 7 jours lors de la dernière semaine avant le sacrifice des rats qui ont reçu 10% glucose dans l'eau de boisson depuis 8 semaines. (2) Le SSR240612 a été administré de façon aiguë par gavage à différentes doses (3-30 mg/kg) avant le sacrifice afin de mesurer son effet anti-hypertenseur chez les rats traités au glucose pendant 12 semaines. Les effets sur la pression artérielle ont été mesurés par plethysmographie et ceux sur les allodynies avec des filaments de Von Frey et par évaporation d'une goutte (0,05ml) d'acétone à la surface plantaire des pattes postérieures. La glycémie a été mesurée avec un glucomètre et l'insuline plasmatique par essais radioimmunologique. Le stress oxydatif (mesure de l'anion superoxyde) a été déterminé par chimiluminescence avec la lucigénine dans l'aorte. L'expression du B₁R a été mesurée par PCR en temps réel et par autoradiographie dans des tissus périphériques et la moelle épinière.

2.4. Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication: **Jenny Pena Dias**, Sébastien Talbot, Jacques Sénécal, Pierre Carayon et Réjean Couture. Kinin B₁ receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. PLoS One. 2010 Sep 7;5(9):e12622

Kinin B₁ Receptor Enhances the Oxidative Stress in a Rat Model of Insulin Resistance: Outcome in Hypertension, Allodynia and Metabolic Complications

Jenny Pena Dias , Sébastien Talbot , Jacques Sénécal , Pierre Carayon , Réjean Couture

Abstract

Background: Kinin B₁ receptor (B₁R) is induced by the oxidative stress in models of diabetes mellitus. This study aims at determining whether B₁R activation could perpetuate the oxidative stress which leads to diabetic complications.

Methods and Findings: Young Sprague-Dawley rats were fed with 10% D-Glucose or tap water (controls) for 8–12 weeks. A selective B₁R antagonist (SSR240612) was administered acutely (3–30 mg/kg) or daily for a period of 7 days (10 mg/kg) and the impact was measured on systolic blood pressure, allodynia, protein and/or mRNA B₁R expression, aortic superoxide anion (O₂^{•-}) production and expression of superoxide dismutase (MnSOD) and catalase. SSR240612 reduced dose-dependently (3–30 mg/kg) high blood pressure in 12-week glucose-fed rats, but had no effect in controls. Eight-week glucose-fed rats exhibited insulin resistance (HOMA index), hypertension, tactile and cold allodynia and significant increases of plasma levels of glucose and insulin. This was associated with higher aortic levels of O₂^{•-}, NADPH oxidase activity, MnSOD and catalase expression. All these abnormalities including B₁R overexpression (spinal cord, aorta, liver and gastrocnemius muscle) were normalized by the prolonged treatment with SSR240612. The production of O₂^{•-} in the aorta of glucose-fed rats was also measured in the presence and absence of inhibitors (10–100 μM) of NADPH oxidase (apocynin), xanthine oxidase (allopurinol) or nitric oxide synthase (L-NAME) with and without Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (20 μM; B₁R agonist). Data show that the greater aortic O₂^{•-} production induced by the B₁R agonist was blocked only by apocynin.

Conclusions: Activation of kinin B₁R increased O₂^{•-} through the activation of NADPH oxidase in the vasculature. Prolonged blockade of B₁R restored cardiovascular, sensory and metabolic abnormalities by reducing oxidative stress and B₁R gene expression in this model.

Citation: Dias JP, Talbot S, Sénécal J, Carayon P, Couture R (2010) Kinin B₁ Receptor Enhances the Oxidative Stress in a Rat Model of Insulin Resistance: Outcome in Hypertension, Allodynia and Metabolic Complications. PLoS ONE 5(9): e12622. doi:10.1371/journal.pone.0012622

Editor: Krisztian Stadler, Louisiana State University, United States of America

Received: June 4, 2010; **Accepted:** August 12, 2010; **Published:** September 7, 2010

Copyright: © 2010 Dias et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was funded by Grants-in-Aid from the Canadian Diabetes Association (OG-3-07-2428) and the Canadian Institutes of Health Research (MOP-79471). Studentships Awards were obtained from the Canadian Diabetes Association (JPD), the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (JPD, ST) and the Canadian Institutes of Health Research (JPD). Dr Pierre Carayon at Sanofi-Aventis R&D provided SSR240612 and approved the submission of the article with intellectual contribution. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Dr P. Carayon from Sanofi-Aventis R&D and Dr R. Couture from Université de Montréal hereby declare a duality of interest in view of their holding a patent made available to public in 2008 for the use of a non-peptide kinin B₁ receptor antagonist in the treatment of hypertension (Publication No. 2916352). This does not alter adherence of these authors to all the PLoS ONE policies on sharing data and materials, as detailed online in the guide for authors. The other authors have nothing to disclose.

Introduction

Recent evidence suggests a link between insulin resistance, oxidative stress, pain polyneuropathy and the overexpression of kinin B₁ receptor [1,2,3]. Kinins are vasoactive peptides and pro-inflammatory pain mediators which act through the activation of two G-protein-coupled receptors (R), named B₁ and B₂. While the B₁R has a low level of expression in healthy subjects, it is induced and overexpressed after exposure to pro-inflammatory cytokines, bacterial endotoxins and hyperglycaemia-induced oxidative stress [4,5]. Bradykinin (BK) and Lys-BK are the natural agonists for the constitutive B₂R, while the kininase I metabolites des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK are the selective agonists for the B₁R [6].

Autoradiographic and molecular studies showed an increased density of B₁R binding sites and mRNA in the brain, spinal cord

and peripheral tissues of rats treated with D-Glucose (10% in drinking water) for a period of 4 and 12 weeks [2,3,7]. Glucose-fed rats displayed higher plasma levels of glucose and insulin, insulin resistance, arterial hypertension, enhanced production of superoxide anion (O₂^{•-}) in the heart and aorta [8,9,10] and pain polyneuropathy as assessed by the presence of tactile and cold allodynia [1,2,3]. Recently, we reported that all these abnormalities including B₁R overexpression were reduced with a diet containing alpha-lipoic acid or N-Acetyl-L-Cysteine, two potent antioxidants [2,3], supporting a link between the upregulation of B₁R, diabetic complications and the oxidative stress. An acute treatment with B₁R antagonists (LF22-0542, SSR240612 and R-715) reversed tactile and cold allodynia in high glucose feeding [1,2]. However, only the brain penetrant B₁R antagonist (LF22-0542) and not the peripherally acting R-715 decreased high systolic blood pressure in glucose-fed rats [2].

The present study was undertaken to determine the beneficial effect of a prolonged treatment (1 week) with the centrally and peripherally acting B₁R antagonist SSR240612 on the main features and complications of diabetes in high glucose feeding. It is hypothesised that activation of B₁R increases oxidative stress (aortic O₂^{•-}) and that its prolonged inhibition reverses oxidative stress and the subsequent upregulation of B₁R which is responsible for arterial hypertension and pain polyneuropathy. The source of O₂^{•-} was identified with the use of specific inhibitors of oxidative enzymes. The status of the antioxidant defence was determined by measuring the vascular expression of two selected antioxidant enzymes, superoxide dismutase (MnSOD) and catalase. MnSOD metabolises O₂^{•-} to hydrogen peroxide which is converted to water by catalase. The data highlight a detrimental role for B₁R in diabetes through a mechanism involving the oxidative stress and NADPH oxidase.

Materials and Methods

Animals and Procedures

Young male Sprague-Dawley rats (24–28 days old weighting 50–75 g, Charles River Laboratories, St-Constant, Quebec, Canada) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (22°C) and humidity (43%), on a 12-hour light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet and tap water (control rats) or 10% D-glucose in the drinking water during 8 or 12 weeks for chronic and acute studies, respectively. All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of our University (CDEA approval ID: 09-066).

Acute effect of SSR240612 on blood pressure

A first series of experiments was performed in 12-week glucose-fed rats to assess the acute effects of several doses of SSR240612 on systolic blood pressure in order to select the optimal dose for chronic experiment. SSR240612 was administered by gavage at doses of 3, 10 and 30 mg/kg and effects were measured up to 48 h post-administration in unanaesthetized rats. At the end of this protocol, rats were euthanized by CO₂ inhalation. Doses were selected on the basis of previous studies performed in various *in vivo* models of inflammation, pain and diabetes in rats and mice [11,12,13]. Moreover, these doses of SSR240612 were found appropriate to block acutely allodynia in the model of glucose-fed rats [1].

Chronic effect of SSR240612 on blood pressure, allodynia and other parameters

These studies were carried out in 4 groups of 8-week glucose feeding and control rats (diabetic and control ± vehicle, diabetic and control ± SSR240612). The dose of 10 mg/kg SSR240612 was selected for the chronic study on the basis of the dose-response curve constructed on blood pressure (present study) and allodynia [1]. This dose was administered by gavage once a day in the morning for one week in control rats and in rats fed with D-Glucose. Thus, effects of 10 mg/kg of SSR240612 were determined on allodynia and arterial hypertension at 0 h, 3 h, 6 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h and 168 h post-gavage. On day 7, overnight-fasted rats were anaesthetized and then euthanized by CO₂ inhalation, 3 h after the last treatment with SSR240612, to collect tissues and blood samples for biochemical and molecular studies.

Measurement of plasma glucose, insulin and insulin resistance

At the end of protocol, overnight-fasted rats were slightly anaesthetized with CO₂ inhalation and blood was rapidly collected from sectioned carotid arteries and immediately transferred into a chilled tube of 6 ml containing 10.8 mg EDTA. The plasma was obtained by centrifugation and kept frozen at -20°C for the later measurement of glucose with a glucometer Accu-Chek (Roche Diagnostics Inc, Laval, Quebec, Canada) and insulin by radioimmunoassay (rat insulin RIA kit, Linco Research, St Charles, MO, USA) using 100 µl of plasma. The Homeostasis Model Assessment index (HOMA) was used as an index of insulin resistance and calculated with the following formula: [insulin (µU/ml) x glucose (mM)/22.5] [14].

Measurement of systolic blood pressure

Systolic arterial blood pressure was measured by tail-cuff plethysmography (Harvard Apparatus Ltd, Kent, UK) with the use of a cuff placed around the tail and registered on a MacLab/8 system. For each measurement, three individual readings were averaged [2,3].

Measurement of Allodynia

Tactile and cold allodynia were assessed with the rats placed on a wire mesh floor beneath an inverted plastic cage. The rats were allowed to adapt for about 15 min or until explorative behaviour ceased. Tactile allodynia was assessed by measuring the hindpaw withdrawal threshold to the application of a calibrated series of six von Frey filaments (bending forces of 2, 4, 6, 8, 10 and 15 g) applied perpendicularly to the mid-plantar surface as described previously [1,2,3]. Cold allodynia was assessed using the acetone drop method applied to the plantar surface of the hindpaws as previously described [1,2,3]. The frequency of paw withdrawal was expressed as a percentage (the number of paw withdrawals ÷ number of trials × 100).

Measurement of superoxide anion and NADPH oxidase activity in the aorta

Superoxide anion (O₂^{•-}) production was measured in frozen isolated thoracic aorta rings using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method as described previously [15,16]. Briefly, isolated aortas cut in 2–5 mm rings were pre-incubated at 37°C for 30 min in Krebs-HEPES buffer (saturated with 95% O₂ and 5% CO₂). Aortic rings were then transferred in duplicate to glass scintillation vials containing 200 µl of lucigenin (5 µM), which was previously dark adapted for 30 min. The chemiluminescence was recorded every minute for 10 min at room temperature using a liquid scintillation counter (Wallac 1409; Perkin Elmer Life Science, St Laurent, Quebec, Canada). Lucigenin counts were expressed as counts per minute per milligram of dry weight tissue (cpm/mg). The estimation of NADPH oxidase activity was achieved by adding to the aorta vials NADPH (10⁻⁴ M) before counting for another 6 min. Basal superoxide-induced luminescence was subtracted from the luminescence value induced by NADPH. Background counts were determined from vessel-free incubation media containing lucigenin and subtracted from the readings obtained with vessels.

Experiments designed to study the source of O₂^{•-} were carried out as indicated above in freshly isolated aorta with the addition of vehicle or one of the following inhibitors: N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 100 µM, nitric oxide synthase inhibitor) [17], allopurinol (100 µM, xanthine oxidase inhibitor) [16], apocynin (10 µM, NADPH oxidase inhibitor) [18]. One hour

later, the B₁R agonist Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (20 μM) [19] was added to the solution for a further period of 15 min. In vivo experiments were also carried out in glucose-fed rats in which the B₁R agonist Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (1 mg/kg, i.p.) was administered 30 min after apocynin (50 mg/kg, i.p.). After a systemic exposure of 30 min to the B₁R agonist or its vehicle, rats were sacrificed under CO₂ inhalation, the aortas isolated and processed for O₂^{•-} measurement as indicated above.

The in situ level of O₂^{•-} in the aorta was also evaluated by the oxidative fluorescent dye dihydroethidine as described earlier [20]. Cells are permeable to dihydroethidine and, in the presence of O₂^{•-}, it is oxidized to fluorescent ethidium bromide (EtBr) which is trapped by intercalation with DNA. EtBr is excited at 518 nm with an emission spectrum of 605 nm. Unfixed frozen aorta segments from the four experimental groups of rats (4 controls, 4 controls + SSR240612, 4 glucose-treated, 4 glucose-treated + SSR240612) were cut into 20-μm thick sections and placed on glass slides. Dihydroethidine (2 μM) was applied to tissue sections and coverslipped. The slides were then incubated in a light-protected humidified chamber at 37°C for 30 min. Images were obtained with a Leica TCS SP confocal microscope equipped with an argon laser (Leica microsystem Co., Germany). Tissues from the four groups were processed and imaged in parallel. Laser settings were identical for acquisition of images from all sections. Computer based analysis was performed with Image J software and calculated by the following equation: $I = \sum I / (A/N)$, where I is the fluorescence intensity, $\sum I$ is the summation of all nuclei intensity, A is the total area of the nuclei, and N is the number of nuclei used. Data are expressed as an average of total nuclei fluorescence quantified in triplicate of 4 rats.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Once the blood was collected after sacrifice, approximately 10 mg of each isolated tissue (thoracic aorta and spinal cord, liver, gastrocnemius muscle) were put in RNeasy lysis reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). Total RNAs were extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). qRT-PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer and signal detected using a Mx3000p device (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as described [21]. For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1).

PCR conditions were: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The cycle

threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background [22]. The relative quantification of gene expression was analyzed by the 2^{-ΔΔCt} method [23].

Density and distribution of kinin B₁ receptors by autoradiography

After sacrifice of rats, part of the thoracic spinal cord (T3–T7) was immediately frozen in 2-methylbutane cooled at -45 to -55°C with liquid nitrogen and kept at -80°C. Spinal cords were mounted in a gelatine block, serially cut into 20 μm thick coronal sections on a cryostat and stored at -80°C for 1 month. Thereafter sections were thawed at room temperature, preincubated for 10 min in 25 mM PIPES-NH₄OH buffer (pH 7.4) and then incubated at room temperature for 90 min in the same buffer containing peptidase inhibitors and 200 pM of [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 [2,3,24]. The non-specific binding was determined in the presence of 1 μM of the B₁ receptor antagonist: R715 (AcLys[D-βNal⁷,Ile⁸]des-Arg⁹-BK [6]. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAXTM MR[®] (Amersham Pharmacia Biotech Canada) were juxtaposed onto the slides in the presence of [¹²⁵I]-microscales and exposed at room temperature for 5–7 days. Autoradiograms were quantified by densitometry using an MCIDTM image analysis system. A standard curve from [¹²⁵I]-microscales was used to convert density levels into femtomoles per milligram of protein [25]. Specific binding was determined by subtracting values of non-specific binding from that of total binding. Total binding and non-specific binding were measured separately on 4 sections per rat with 6–8 rats per group.

Western blot analysis

Western blot analysis of protein expression was performed as described earlier [26]. After sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the separated proteins were electrophoretically wet transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) at 100 V for 1 h. After transfer, the membranes were washed twice in PBS-Tween 20 and incubated in PBS containing 5% skim milk at room temperature for 1 h. The blots were cut in pieces according to the molecular weight of the protein and then incubated with the specific antibodies for MnSOD (1/500, cat number: sc-18503), catalase (1/500, cat number: sc-34285), dynein (1/5000, cat number: sc-13524) and β-actin (1/10000, cat number A5441) in PBS-Tween 20 at 4°C overnight. Dynein and β-actin were used as standard proteins. After three washings in PBS-Tween 20 buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature in PBS-Tween 20 containing 5% milk with secondary antibody that is bovine anti-goat IgG-HRP (1/5000, cat number: sc-2350) or anti-mouse IgG-HRP (1/5000, cat number sc-2005) (for β-actin and dynein). β-

Table 1. Primer pairs used in qRT-PCR analysis.

Gene	Sequences	Position	Gen Bank
B ₁ receptor forward	5'GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT 3'	367–391	NM_030851
B ₁ receptor reverse	5'CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT 3'	478–454	NM_030851
18S forward	5'TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT 3'	363–386	X01117
18S reverse	5'TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT 3'	470–447	X01117
MnSOD forward	5'ACG CGA CCT ACG TGA ACA ATC TGA 3'	175–198	Y00497
MnSOD reverse	5'TCC AGC AAC TCT CCT TTG GGT TCT 3'	367–344	Y00497

doi:10.1371/journal.pone.0012622.t001

actin antibody was purchased from Sigma-Aldrich Canada while other antibodies were from Santa Cruz Biotechnology, CA, USA. The blots were then washed three times with PBS-Tween 20 before the reaction with enhanced-chemiluminescence, Western blotting detection reagents (Amersham). A quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the enhanced laser densitometer, LKB Ultrosan XL, and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Quebec, Canada).

Drugs

The selective non-peptide B₁R antagonist SSR240612 ((2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide,fumarate) was obtained from Sanofi-Aventis R&D (Montpellier, France) [12]. Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK and HPP-des-Arg¹⁰-Hoe140 (3-(4-hydroxyphenyl)propionyl-des-Arg⁹-D-Arg⁰[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]Bradykinin) were synthesized at the Research Institute of Biotechnology, National Research Council of Canada (Montreal, Quebec, Canada). R-715 was kindly provided by Dr D. Regoli (Pharmacology, University of Ferrara, Italy). Iodination of HPP-des-Arg¹⁰-Hoe140 was performed with the chloramine T method as described earlier [24]. SSR240612 was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, 0.5% v/v) and then ethanol (5% v/v) and Tween-80 (5% v/v) were added in this sequence. The solution was completed in distilled water. The drug was administered orally by gavage in a volume of 1 ml per 100 g of body weight. D-Glucose, apocynin, allopurinol, NADPH, lucigenin and L-NAME were purchased from Sigma-Aldrich Canada. Dihydroethidine was obtained from Molecular Probes (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) and suspended in DMSO at a concentration of 10⁻³ M, and stored at -20°C until use. Subsequent dilutions were made in PBS. All other chemicals used were purchased from standard commercial suppliers and were of analytical grade.

Statistical analysis of data

Data are expressed as mean ± s.e.m of values obtained from (n) rats in each group. Statistical analysis of data was calculated with GraphPad Prism (version 4.00) software. Statistical differences were evaluated with Student's t-test on unpaired samples (B₁R binding sites). Multiple comparisons were analysed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni post-test. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Acute effect of SSR240612 on systolic blood pressure

Systolic blood pressure was significantly increased ($P < 0.001$, $n = 6-12$) in the four groups of 12-week glucose-treated rats when compared to control rats and was dose-dependently reduced by the oral administration of SSR240612 (Baseline values of Glucose + vehicle: 151.2 ± 5.7 mmHg; Glucose + SSR240612 (3 mg/kg): 152.2 ± 2.0 mmHg; Glucose + SSR240612 (10 mg/kg): 160.4 ± 3.2 mmHg; Glucose + SSR240612 (30 mg/kg): 156.5 ± 4.7 mmHg; Control + SSR240612 (10 mg/kg): 125.3 ± 3.3 mmHg; Control + SSR240612 (30 mg/kg): 129.7 ± 1.9 mmHg) (Figure 1A). When the area under the curve was measured between 0 h to 48 h post-administration, the dose of 3 mg/kg did not reach statistical significance. However, doses of 10 and 30 mg/kg SSR240612 decreased significantly high blood pressure when compared with vehicle ($P < 0.05$). In contrast, doses of 10 and 30 mg/kg

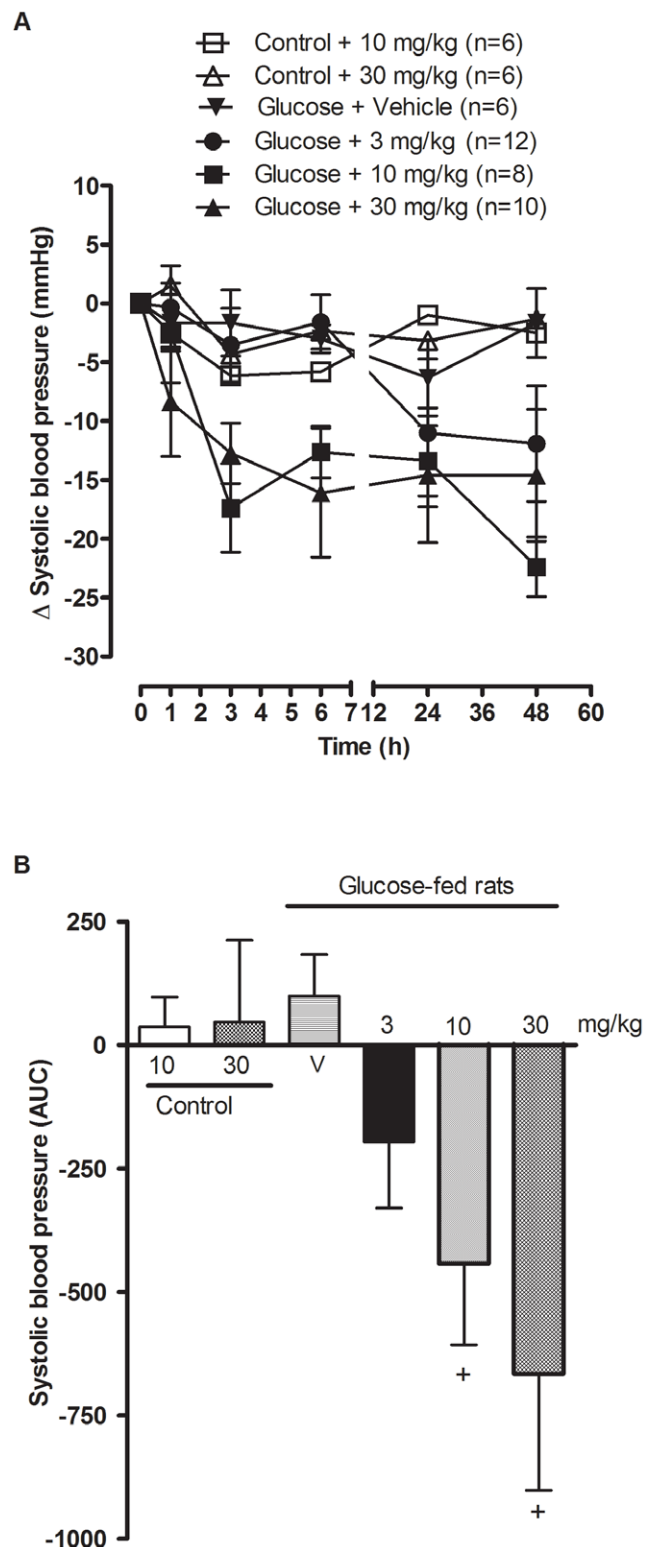


Figure 1. Acute effect of orally administered SSR240612 on systolic blood pressure in 12-week glucose-fed rats. Doses of 10 mg/kg and 30 mg/kg of SSR240612 were given to control rats and doses of 3, 10, 30 mg/kg of SSR240612 or vehicle were given to glucose-fed rats. Data are mean ± s.e.m of values obtained from (n) rats and represent changes of systolic blood pressure in mmHg (A) or Area Under the Curve (B). Statistical comparison with vehicle (V) in glucose-fed rats (+) is indicated by + $P < 0.05$. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g001

SSR240612 administered to control rats had no significant effect on systolic blood pressure (Figure 1B). Therefore, the dose of 10 mg/kg SSR240612 was selected for chronic treatment in the remainder of the study.

Chronic effect of SSR240612 on systolic blood pressure

As shown in figure 2, systolic blood pressure was significantly higher ($P < 0.001$) in glucose-fed rats when compared to age-matched control rats. A one-week treatment with SSR240612 (10 mg/kg) reduced significantly high blood pressure in glucose-fed rats at 6 h on day 0 and during the remaining period of treatment when compared to age-matched glucose-fed rats receiving the vehicle. The reduction of blood pressure was incomplete during the premier 2 days of treatment but became sustained and reached control values from day 3 to day 7. In contrast, the same treatment with SSR240612 for a period of one week had no significant effect on systolic blood pressure in control rats when compared to untreated control rats.

Chronic effect of SSR240612 on allodynia

As shown in figure 3A, glucose-fed rats displayed significant and sustained tactile allodynia ($P < 0.001$) when compared to age-matched control rats from day 0 to day 7. Chronic treatment with 10 mg/kg SSR240612 caused a significant reduction of tactile allodynia in glucose-fed rats at 3 and 6 h post-gavage on day 0 when compared to glucose-fed rats treated with vehicle. The inhibition was entirely reversible at 24 h but not on the subsequent days until the completion of the treatment on day 7. The higher paw withdrawal threshold occurring between day 3 to day 7 in glucose-fed rats treated with SSR240612 was not significantly different from control values. Finally, daily administration of 10 mg/kg SSR240612 for 7 days had no significant effect on paw-withdrawal threshold to tactile stimulation in control rats when compared to untreated control rats.

hold to tactile stimulation in control rats when compared to untreated control rats.

As shown in figure 3B, glucose-fed rats also displayed significant cold allodynia ($P < 0.001$) when compared to age-matched control rats from day 0 to day 7. Significant reduction of cold allodynia was seen at 3 and 6 h after treatment with 10 mg/kg SSR240612 on day 0 when compared to glucose-fed rats treated with vehicle. This inhibition was no longer significant at 24 h. On the following days, daily treatment with SSR240612 led to a striking and irreversible inhibition of cold allodynia. From day 2 to day 7, response frequency to cold stimulation was not significantly different between control and glucose-fed rats treated with SSR240612. In contrast, the same treatment with SSR240612 for one week had no significant effect on paw-withdrawal threshold to cold stimulation in control rats when compared to untreated control rats.

Chronic effect of SSR240612 on various parameters

As shown in table 2, body weight was not significantly different between the four groups. Plasma levels of glucose and insulin were significantly increased in rats fed with 10% D-Glucose when compared with age-matched control rats. Plasma glucose levels in glucose-fed rats treated for 1 week with 10 mg/kg SSR240612 were not significantly different from control values. High plasma insulin levels were significantly reduced in glucose-fed rats treated with SSR240612 when compared with glucose-fed rats treated with vehicle. Insulin resistance as assessed by the HOMA index was increased by 5.6-fold in glucose-fed rats when compared with age-matched control rats. This value was significantly reduced though not completely normalised by one-week treatment with SSR240612. The same regimen with SSR240612 failed to affect plasma levels of glucose and insulin and the HOMA index in control rats. Water intake was increased by 2-fold in glucose-fed

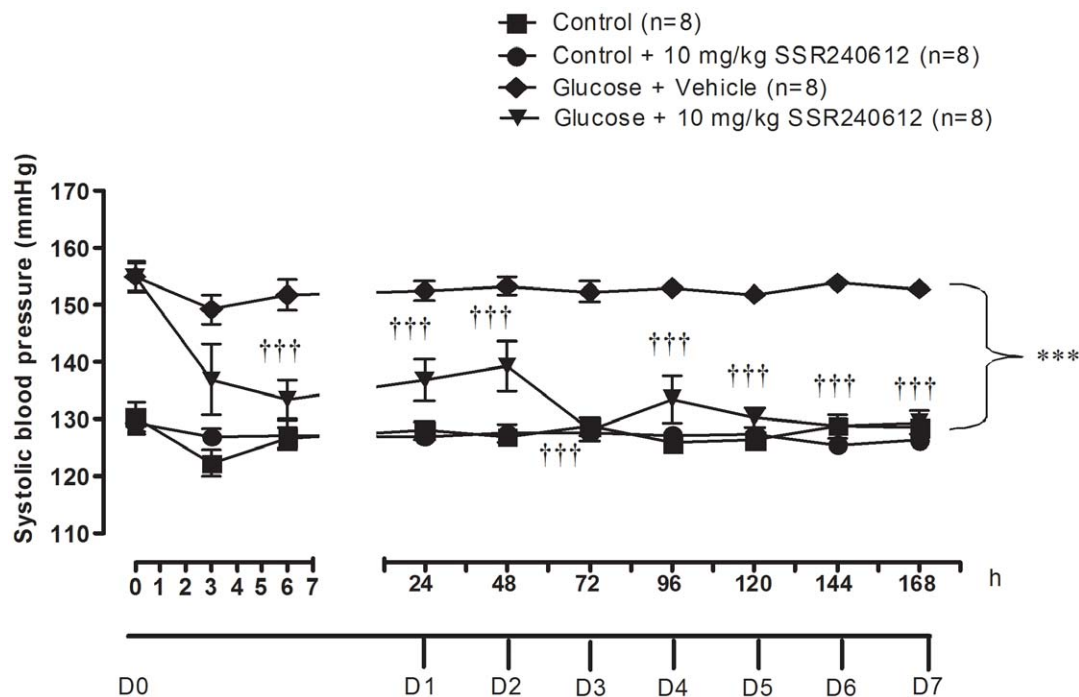


Figure 2. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on systolic blood pressure in glucose-fed rats. From day (D) 1 to 7, measurements were taken prior to the morning treatment with SSR240612. Data are mean \pm s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by ***††† $P < 0.001$. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g002

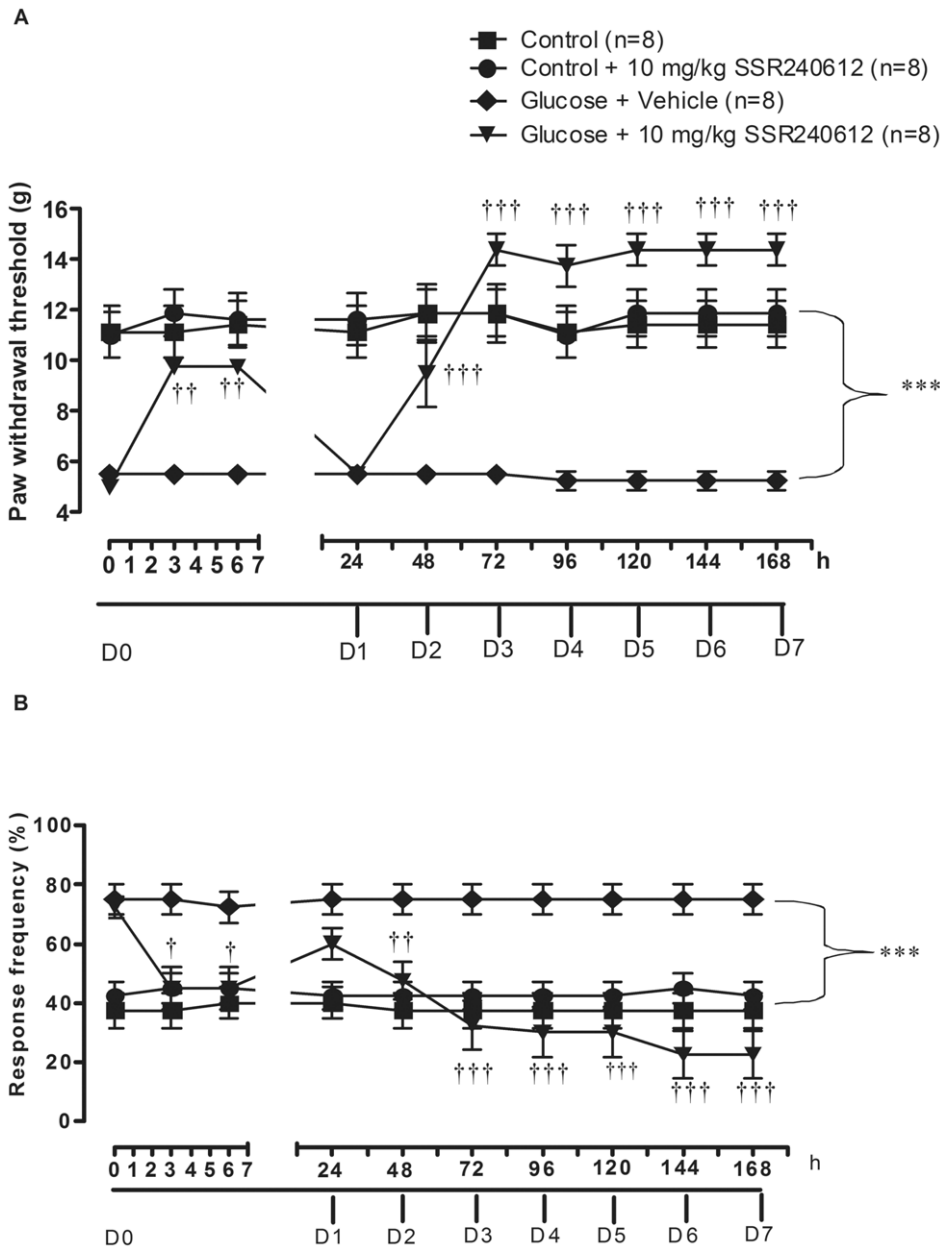


Figure 3. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on (A) tactile allodynia and (B) cold allodynia in glucose-fed rats. From day (D) 1 to 7, measurements were taken prior to the morning treatment with SSR240612. Data are mean ± s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by †P< 0.05, ††P< 0.01, †††P< 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g003

Table 2. Effects of SSR240612 (10 mg/kg/day ×7 days) in rats treated with glucose.

Parameters	Control n=6	Control + SSR240612 n=6	Glucose-fed + Vehicle n=8	Glucose-fed + SSR240612 n=8
Body weight (g)	392.0±12.3	397.2±5.9	408.4±7.3	387.6±12.9
Plasma glucose (mmol/L)	5.8±0.2	6.3±0.2	7.8±0.8 *	6.6±0.4
Plasma insulin (ng/ml)	1.0±0.3	0.8±0.2	7.0±1.4 ***	2.1±0.3 ** †††
HOMA index	5.2±1.3	4.9±1.1	29.2±2.8 ***	10.4±1.8 * †††
Drinking (ml)	58.2±2.2	59.7±1.2	119.1±5.0 **	112.6±8.5 **
Food intake (g)	30.9±0.2	30.6±0.2	20.7±1.1 **	22.5±0.8 **

Values represent the mean ± s.e.m of (n) rats. Statistical comparison to control rats (*) or to glucose + vehicle (†) is indicated by * P<0.05; ** P<0.01; *** ††† P<0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.t002

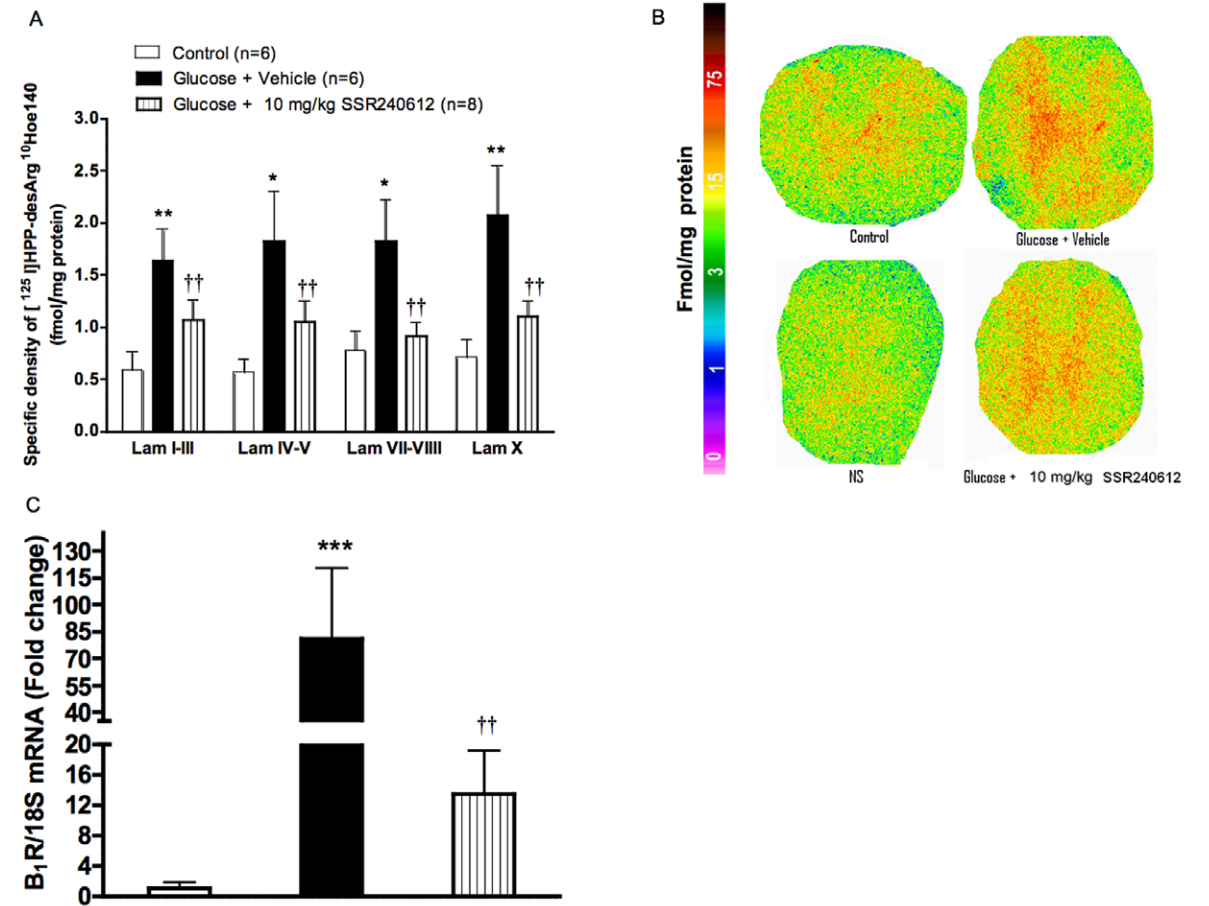


Figure 4. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on B₁R expression in the thoracic spinal cord. A: Quantification of specific density of [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 to B₁R in various spinal cord laminae (Lam). B: Autoradiograms of thoracic spinal cord for B₁R. The non-specific binding (NS) was obtained by the co-addition of 1 μM R-715 (B₁R antagonist) with [¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140. C: Bars represent fold change in gene expression for B₁R. Data are mean ± s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by * P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g004

rats and this was compensated by a 33% reduction of food intake. SSR240612 treatment for 7 days had no effect on drinking or eating behaviour in both glucose-fed rats and controls rats (Table 2).

Chronic effect of SSR240612 on B₁R binding sites and B₁R mRNA in spinal cord

Quantitative autoradiography showed a significant increase of specific density of kinin B₁R binding sites through laminae I to X of the thoracic spinal cord in glucose-fed rats when compared to age-matched control spinal cord (Figure 4A and 4B). This overexpression of B₁R binding sites in glucose-fed rats was significantly reduced in all laminae by the one-week treatment with 10 mg/kg SSR240612. As shown in figure 4C, B₁R mRNA was underexpressed in the spinal cord of control rats. In glucose-fed rats, however, B₁R mRNA was increased by 80-fold. Again, the overexpression of B₁R mRNA in the spinal cord of glucose-fed rats was significantly and markedly decreased by SSR240612.

Chronic effect of SSR240612 on B₁R mRNA levels in peripheral organs

Similarly to the spinal cord, levels of B₁R mRNA were relatively low in aorta, liver and gastrocnemius muscle of control

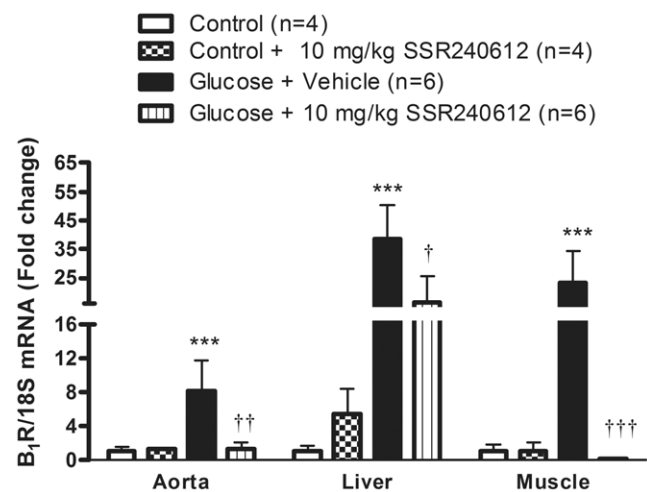


Figure 5. B₁R mRNA levels in aorta, liver and skeletal muscle after orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days). Data are mean ± s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by † P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g005

rats (Figure 5). However in glucose-fed rats, B1R mRNA levels were markedly and significantly upregulated in the same tissues. The one-week treatment with 10 mg/kg SSR240612 reversed completely B1R mRNA overexpression in aorta and skeletal muscle and reduced significantly B1R mRNA level in the liver of glucose-fed rats. The antagonist was without effect on the basal expression of B1R mRNA in control rats.

Chronic effect of SSR240612 on oxidative stress

Effects of 8-week treatment with glucose on basal and NADPH-stimulated $O_2^{\cdot-}$ production measured in the aorta using lucigenin-enhanced chemiluminescence are shown in figure 6. Glucose feeding resulted in a 1.9-fold increase of basal $O_2^{\cdot-}$ production in the aorta when compared to control aorta (Figure 6A). The one-week treatment with SSR240612 normalised the higher production of $O_2^{\cdot-}$ in glucose-fed rats to control levels. SSR240612 failed, however, to alter basal $O_2^{\cdot-}$ production in the aorta of control rats (Figure 6A). Moreover, NADPH oxidase activity was significantly increased by 2-fold in the aorta of glucose-fed rats. Again, the increase of NADPH

oxidase activity in glucose-fed rats was significantly reduced by the one-week treatment with SSR240612. The latter treatment with the B₁R antagonist failed to alter $O_2^{\cdot-}$ production induced by NADPH in the aorta of control rats (Figure 6B).

The production of $O_2^{\cdot-}$ evaluated with the oxidative fluorescent dye dihydroethidine was also markedly increased in vascular smooth muscle cells of the aorta in glucose-fed rats (Figures 7C and 8). Daily treatment with 10 mg/kg SSR240612 for a week abolished the fluorescent labelling seen in the aorta of glucose-fed rats to control levels (Figures 7D and 8). However, the weak labelling displayed in the aorta of control rats was not affected by the B₁R antagonist (Figures 7A-B and 8).

Pro-oxidative effect of B₁R

To further substantiate the contribution of B₁R in the production of $O_2^{\cdot-}$, aortas from glucose-fed rats were incubated in the presence of the B₁R agonist Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (20 μ M). Results presented in figure 9 show that the B₁R agonist

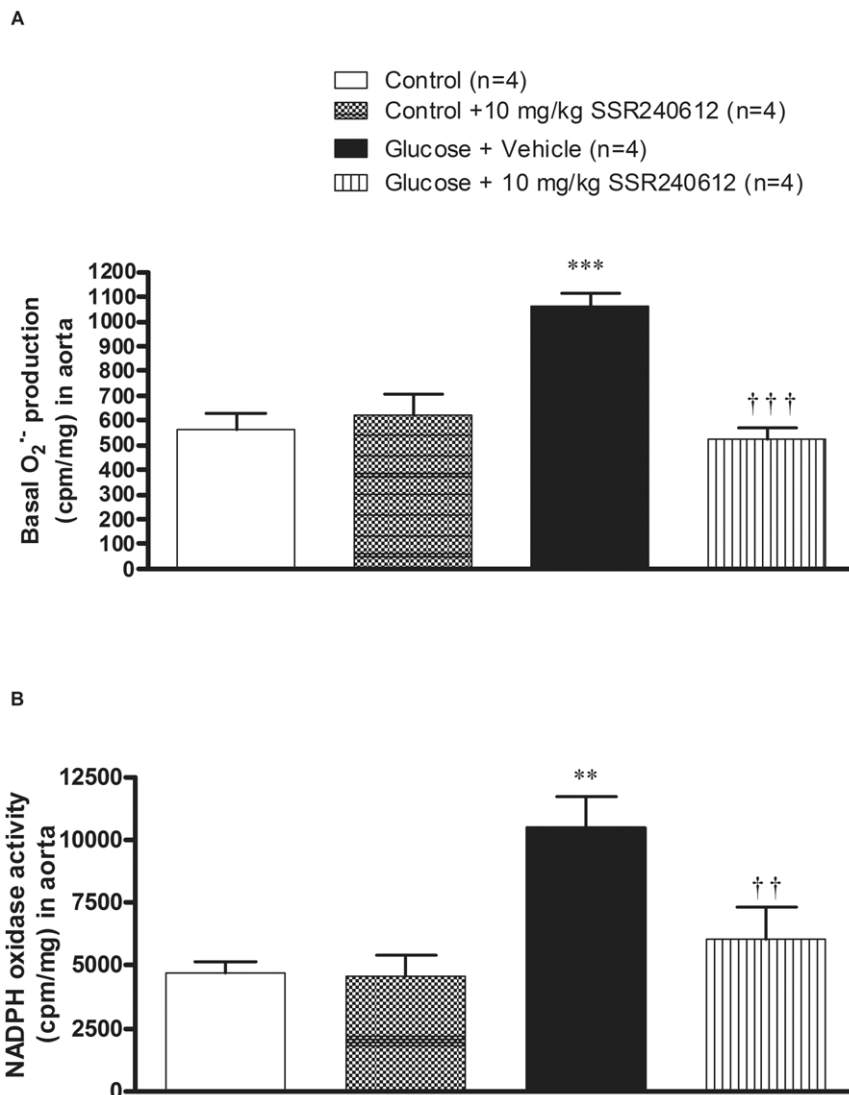


Figure 6. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on oxidative stress. (A) Basal superoxide anion production, (B) NADPH oxidase activity in the aorta of glucose-fed rats. Data are mean \pm s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by **††P < 0.01, ***†††P < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g006

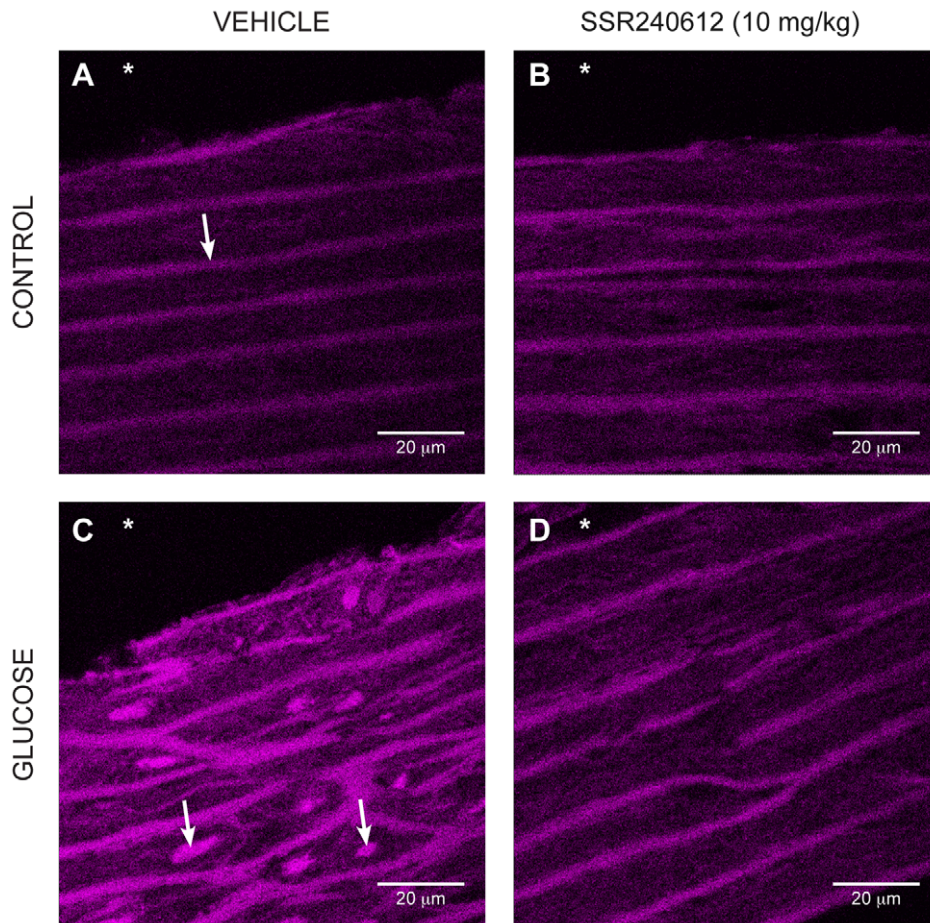


Figure 7. Superoxide anion production on histological sections of the aorta marked with dihydroethidine. Control (A, B) and glucose-treated rats (C, D) after 7-day treatment with Vehicle (A, C) or 10 mg/kg/day SSR240612 (B, D). Asterisk (*) indicates the lumen side of the section. The arrow (in A) represents the elastic lamina of the smooth muscle cells while the two arrows (in C) show the increase of fluorescent ethidium bromide in the nucleus of smooth muscle cells in the aorta of glucose-treated rat. The fluorescent marker is reduced after treatment with SSR240612 (in D). Scale bar is 20 µm in each panel. Images are representative of 4 aortas in each group. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g007

enhanced by 4-fold the production of $O_2^{\cdot-}$. Whereas the oxidative response to Sar[D-Phe8]des-Arg9-BK was not significantly affected by allopurinol (xanthine oxidase inhibitor) and L-NAME (a non-selective inhibitor of all NOS isoforms), it was completely blocked by apocynin (NADPH oxidase inhibitor). Baseline values of $O_2^{\cdot-}$ production in glucose-treated aortas were either slightly reduced (L-NAME) or normalized (apocynin and allopurinol) by these inhibitors.

The intraperitoneal administration of Sar[D-Phe8]des-Arg9-BK (1 mg/kg) in 8-week glucose-fed rats also enhanced by 4-fold the production of $O_2^{\cdot-}$ in aorta (Figure 10). Similarly to the *in vitro* protocol, systemic treatment with apocynin (50 mg/kg) abolished the effect of the B₁R agonist on the production of $O_2^{\cdot-}$. It is worth mentioning that apocynin normalized the increasing effect of glucose on baseline $O_2^{\cdot-}$ production. These findings suggest that B₁R activation can increase the production of superoxide anion primarily through NADPH oxidase.

Chronic effect of SSR240612 on superoxide dismutase and catalase expression

The impact of SSR240612 was evaluated on the vascular antioxidant defence. Firstly, the mRNA and protein expressions of MnSOD were markedly increased in the aorta of glucose-fed rats

when compared to age-matched control rats (Figure 11A and 11B). The up-regulation of this antioxidant enzyme was reversed (mRNA) or significantly reduced (protein) by the one-week treatment with 10 mg/kg SSR240612. Secondly, the protein expression of catalase was significantly increased in the aorta of 8-week glucose-fed rats and the one-week treatment with SSR240612 reduced it significantly (Figure 12). In contrast, the prolonged treatment with the B₁R antagonist had no significant effect on MnSOD or catalase expression in the aorta of control rats (Figures 11–12).

Discussion

This study provides the first demonstration that the activation of B₁R increased the oxidative stress through the activation of NADPH oxidase in the vasculature and that the sustained inhibition of B₁R for one-week with SSR240612 reversed the oxidative stress and the subsequent B₁R upregulation in a model of insulin resistance. Indeed, activation of B₁R with a selective agonist either *in vitro* or *in vivo* enhanced the production of aortic superoxide anion which was abolished by apocynin, a selective inhibitor of NADPH oxidase. The inhibition of B₁R had positive outcome on diabetic complications in the model of glucose-fed rat.

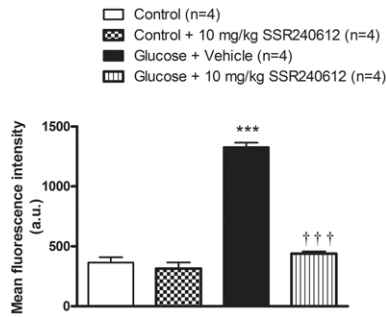


Figure 8. Fluorescence intensities of superoxide (dihydroethidium) staining in aortic sections from control and 8-week glucose-treated rats shown in Figure 7. Data are expressed as fluorescence intensity in arbitrary unit (a.u.) and represent the mean \pm s.e.m of 4 rats in each group. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by ***†††P < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g008

SSR240612 treatment had no effect on drinking and food intake in both control and glucose-fed rats, excluding an indirect effect of the drug on glucose intake.

Our findings on B₁R-induced allodynia are in keeping with the role of B₁R in hyperalgesia in inflammatory, diabetic and painful processes [27,28,29] and with the therapeutic effect of SSR240612 in neuropathic and inflammatory pain [12,30].

Relationship between oxidative stress, B₁R and glucose-induced hypertension and allodynia

It is known that diets containing high refined carbohydrates such as fructose, sucrose and glucose elevate blood pressure in rats [10,31,32,33]. Simple carbohydrate feeding to rat and high glucose infusion for 2 days elevate reactive oxygen species (ROS) [9,34,35]. Increased production of O₂^{•-} is correlated with high blood pressure in glucose-fed rats [8,9]. Alpha-lipoic acid attenuates aortic and heart mitochondrial O₂^{•-} production in glucose-fed rats [7,10] and reverses hypertension in fructose and glucose-fed rats [2,10,36]. The antioxidant N-acetyl-L-cysteine

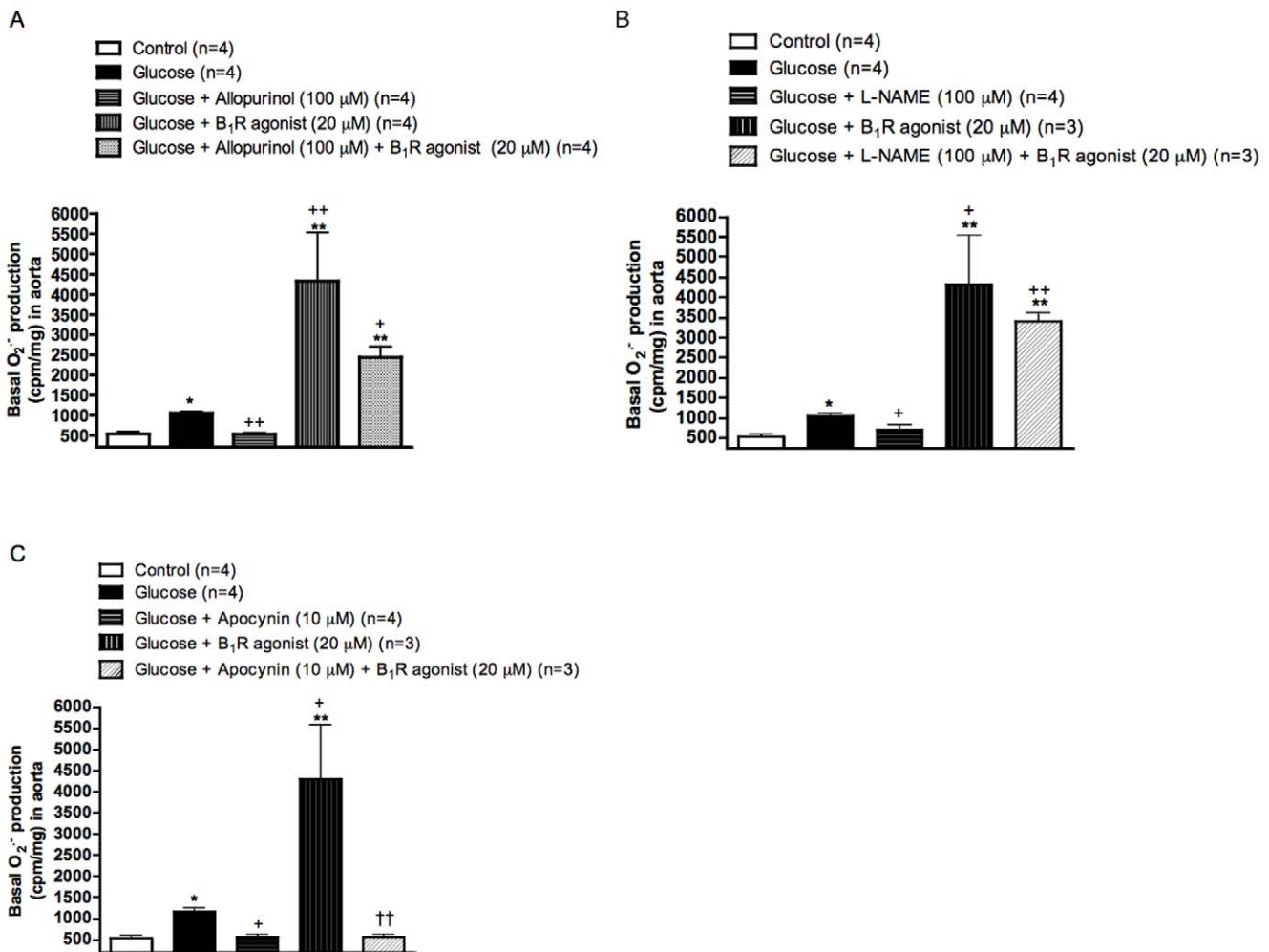


Figure 9. Effects of *in vitro* B₁R activation on superoxide anion production in the aorta of glucose-fed rats pre-treated or not with oxidative enzyme inhibitors. Basal and stimulated production of superoxide anion in the presence of the B₁R agonist Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (20 μM) were measured in the presence of (A) Allopurinol (xanthine oxidase inhibitor), (B) L-NAME (inhibitor of all NOS isoforms) and (C) Apocynin (NADPH oxidase inhibitor) at the indicated concentrations (see methods). Data are mean \pm s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with control (*), glucose (+) or Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (†) is indicated by * + P < 0.05, ** ††† P < 0.01. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g009

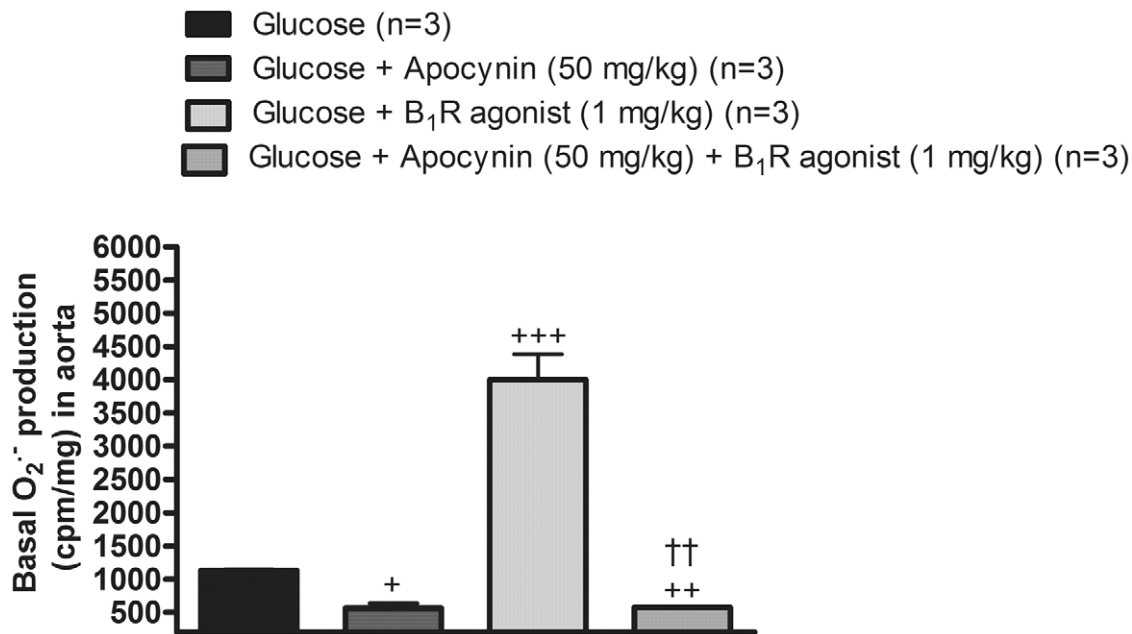


Figure 10. Effects of *in vivo* B₁R activation on superoxide anion production in the aorta of glucose-fed rats pre-treated or not with the NADPH oxidase inhibitor. Basal and stimulated production of superoxide anion with the B₁R agonist Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (1 mg/kg, i.p.). Apocynin (50 mg/kg, i.p.) was administered 30 min prior to the B₁R agonist (see methods). Data are mean \pm s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with glucose (+) or Sar[D-Phe⁸]des-Arg⁹-BK (†) is indicated by + P < 0.05, ++ ††P < 0.01, +++P < 0.001. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g010

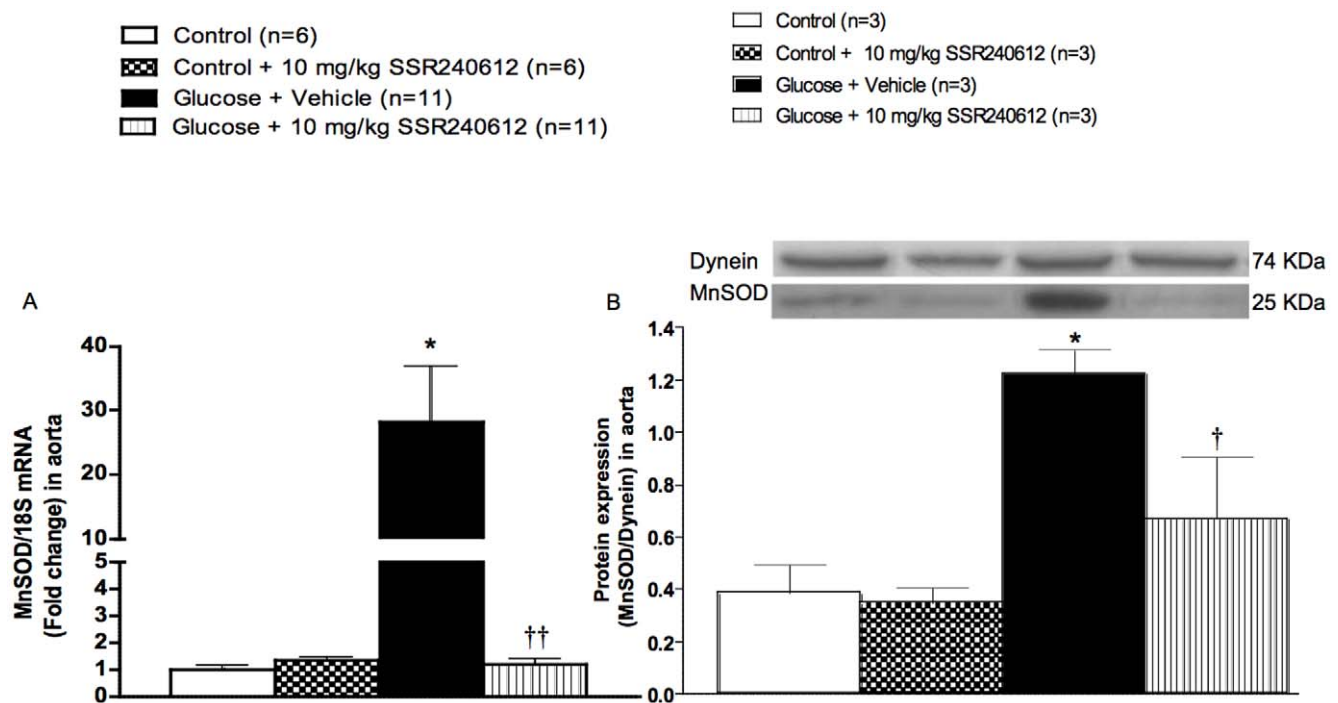


Figure 11. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on vascular expression of superoxide dismutase. The expression of MnSOD was measured at (A) mRNA level by qRT-PCR, and (B) at protein level by Western blot in the aorta of glucose-fed rats. Data are mean \pm s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *†P < 0.05, ††P < 0.01. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g011

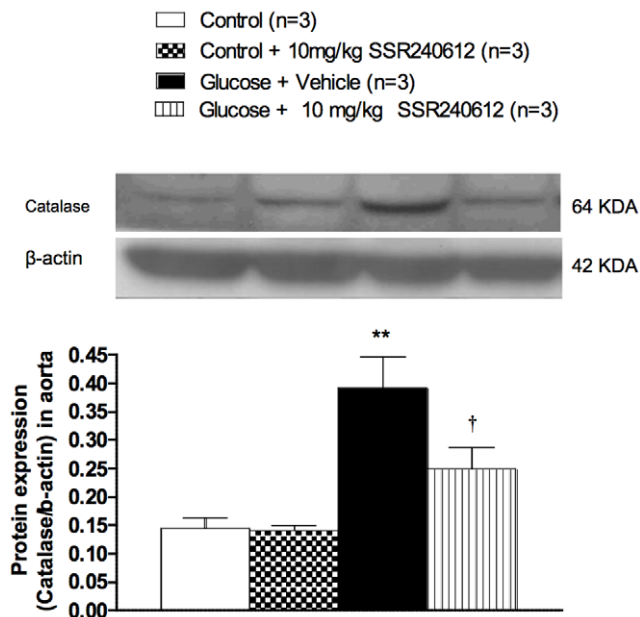


Figure 12. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on vascular expression of catalase. The expression of catalase was measured at protein level by Western blot in the aorta of glucose-fed rats. Data are mean \pm s.e.m of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by † $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. doi:10.1371/journal.pone.0012622.g012

also prevents high blood pressure in fructose and glucose feeding rats [3,37].

It is also well established that increased oxidative stress causes diabetic neuropathy, especially through the polyol pathway (high activity of the aldose reductase). Hyperglycemia induces nerve loss and reduces nerve velocity through oxidative stress. These problems are alleviated by alpha-lipoic acid [38]. In our model of high glucose feeding, alpha-lipoic acid and N-acetyl-L-cysteine were able to reduce simultaneously vascular oxidative stress, B₁R upregulation, hypertension and allodynia [2,3,7]. This is consistent with the increased B₁R mRNA and protein expression following a 12 h exposure of mesenteric vascular endothelial cells with 25 mM glucose [39]. The corollary of these findings is that the oxidative stress is likely the primary mechanism involved in the induction of B₁R in the model of insulin resistance induced by high glucose intake. The oxidative stress can activate the nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway [40,41] which is directly involved in the upregulation of B₁R [4]. B₁R may therefore represent a molecular marker of the oxidative stress.

Source of superoxide anion and pro-oxidative effect of B₁R in glucose-fed rats

The NADPH oxidase is a predominant source of ROS production ($O_2^{\cdot-}$) in cardiovascular tissues in response to high glucose, growth factors and vasoactive peptides [42,43,44]. NADPH oxidase activity and $O_2^{\cdot-}$ levels were increased in cultured vascular smooth muscle cells exposed to high glucose concentration [45], in animal and clinical models of hypertension and diabetes [42,44,46]. In our study, the complete inhibition of increased glucose-induced superoxide anion by apocynin confirmed the predominant contribution of NADPH oxidase. However, the complete inhibition $O_2^{\cdot-}$ levels with allopurinol and its partial inhibition with L-NAME suggest multiple sources of

ROS in this model, including xanthine oxidase and uncoupling eNOS. Xanthine oxidase was also proposed as a source of ROS in the vasculature in models of hypertension [42]. Furthermore, the increased NADPH activity observed in the present study is in agreement with data reported in the aorta of db/db mice, a type 2 model of diabetes [46].

A key finding of the present study was the demonstration that a one-week treatment with SSR240612 reversed the vascular oxidative stress and normalized B₁R up-regulation in glucose-fed rats. This contrasts with the acute treatment with SSR240612 which did not affect $O_2^{\cdot-}$ production in aorta [1]. The inhibition of NADPH oxidase activity may represent a molecular mechanism by which SSR240612 reduces the oxidative stress. This statement is supported by the increased production of $O_2^{\cdot-}$ by the B₁R agonist in isolated aorta of glucose-fed rats, whose effect was sensitive to the NADPH oxidase inhibitor apocynin. This observation was confirmed in aorta isolated from glucose-fed rats treated *in vivo* with apocynin prior to the B₁R agonist. Xanthine oxidase and uncoupling eNOS are unlikely involved in $O_2^{\cdot-}$ production by the B₁R agonist since their respective inhibitors (allopurinol and L-NAME) did not affect significantly the pro-oxidative effect of the B₁R agonist despite they reduced glucose-induced oxidative stress. Thus the inhibition of the oxidative stress by SSR240612 is likely due to the inhibition of the NADPH dependent pro-oxidative effect of B₁R activation. The inhibition and down-regulation of B₁R-induced oxidative stress following chronically administered SSR240612 may explain the persistent normalization of high blood pressure, allodynia and insulin resistance in glucose-fed rats.

Antioxidant defence and SSR240612

It is generally believed that the exposure of cells to oxidative stress is associated with increased antioxidant enzyme activity [47]. Exposure of human endothelial cells to 20 mM glucose for 1–2 weeks increased mRNA expression of CuZnSOD and MnSOD [48]. Likewise, porcine aortic vascular smooth muscle cells cultured in 25 mM glucose for 10 days increased MnSOD mRNA expression [49]. SOD activity was similarly increased in the plasma of 3-week glucose-fed rats [10]. Moreover, SOD and catalase activity were significantly increased during the early stage of diabetes in streptozotocin-treated rats [50]. Thus, the increased expression of MnSOD and catalase in the aorta of 8-week glucose-fed rats is congruent with previous studies and may reflect a compensatory mechanism to the enhanced oxidative stress in glucose-fed rats. It is therefore logical that the reduction of the oxidative stress by chronic treatment with B₁R antagonist resulted in a normalization of the MnSOD and catalase expression. This further links B₁R to the generation of the oxidative stress and suggests that the inhibitory effect of SSR240612 on the antioxidant defence is indirect and likely due to the inhibition of the production of ROS.

Link between B₁R and angiotensin II (ANG II)

Endogenous ANG II was found to enhance B₁R expression via AT₁ receptor in endothelium of small cardiac arteries and cardiomyocytes in two-kidney-one-clip hypertensive rats [51]. Also the experimental model of hypertension induced by chronic infusion of ANG II induced B₁R expression in rat aorta [52] and spinal cord [53] as previously shown in cultured vascular smooth muscle [54] through a mechanism associated with the oxidative stress and NF- κ B. ANG II can activate NF- κ B through increases of vascular superoxide production following membrane NADPH oxidase activation [55,56]. NF- κ B is the transcription factor that allows the increased expression of B₁R [57]. Likewise the model of

insulin resistance induced by glucose feeding, the anti-hypertensive effect of SSR240612 was recently demonstrated in ANG II-hypertensive rats and spontaneously hypertensive rats [58].

Putative role of B₂R and its relationship with B₁R expression

Acute treatment with the B₂R antagonist Icatibant (1 mg/kg) reversed allodynia but not hypertension in rats treated with D-glucose for 12 weeks [59]. Further studies are, however, necessary to determine the influence of B₂R on the oxidative stress-induced pathological changes in this model. In addition to its pronociceptive and pro-inflammatory effects, increasing evidence shows that the B₂R is nephro- and cardioprotective [60,61,62,63,64,65], partly due to nitric oxide (NO) release, and could contribute to the benefit of angiotensin 1-converting enzyme (ACE) inhibitors in models of diabetes and cardiovascular diseases [5,60,66,67].

Whereas the B₁R is associated with leptin resistance and obesity [13], its beneficial or detrimental role in cardiac ischemia remains conflicting [65,68,69,70] and recently, B₁R was found implicated in renal fibrosis [71]. The lack of both kinin B₁R and B₂R enhances diabetic complications, including nephropathy and neuropathy in Akita diabetic mice [64]. In addition, genetically diabetic mice that lack the B₂R develop a more severe kidney pathology by age 6 months and develop senescence-associated phenotypes by age 12 months [72,73]. However, the expression of B₁R is markedly enhanced in B₂R knockout mice [72,74]. Renal expression of B₂R is also significantly enhanced in B₁R knockout mice [75], suggesting that the absence of one kinin receptor is compensated by the over-expression of the remaining kinin receptor. Thus, investigation on the respective role of B₁R and B₂R in diabetes using genetically modified mice must be cautiously

interpreted since it does not simply reflect the absence of a given receptor and may explain apparent contradiction with pharmacological studies. Furthermore, other important genes are affected by genetic deletion of either kinin receptor. For instance, genetic disruption of B₁R or B₂R and both receptors decreased ACE and ANG II AT₁R function and expression in mice abdominal aorta, indicating that kinin receptors regulate AT₁ receptors and ACE [76,77]. Moreover, B₂R knockout mice have increased ANG II AT₂R mRNA and protein expression that contributes to elevation of NO as compensatory protective mechanism in thrombosis [78]. Finally, our study addressed the role of B₁R in insulin resistance which corresponds to the early phase of diabetes. The therapy with B₁R antagonists in a more advanced phase of diabetes as in Akita diabetic mice remains to be clarified.

Conclusion

The present study provides the first evidence that the B₁R can perpetuate the oxidative stress by increasing the production of superoxide anion following the activation of NADPH oxidase in a model of insulin resistance. Prolonged inhibition of B₁R with SSR240612 reversed hypertension, pain polyneuropathy and metabolic alterations in glucose-fed rats. Part of the beneficial effects of SSR240612 appears to be associated with the normalization of B₁R gene and protein expression which is dependent on the oxidative stress.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JPD PC RC. Performed the experiments: JPD ST JS. Analyzed the data: JPD ST JS. Contributed reagents/materials/analysis tools: PC. Wrote the paper: JPD RC.

References

- Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, et al. (2007) The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 152: 280–287.
- Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, et al. (2007) Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41: 375–387.
- Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R (2008) Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetylcysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol* 589: 66–72.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, et al. (2002) Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunol* 2: 1729–1739.
- Couture R, Girolami JP (2004) Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500: 467–485.
- Regoli D, Nsa AS, Rizzi A, Gobeil FJ (1998) Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348: 1–10.
- El Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de Champlain J, et al. (2005) Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* 26: 1323–1330.
- El Midaoui A, Wu R, de Champlain J (2002) Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens* 20: 1407–1412.
- El Midaoui A, de Champlain J (2005) Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* 23: 581–588.
- El Midaoui A, de Champlain J (2002) Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 39: 303–307.
- Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB (2006) Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27: 646–651.
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, et al. (2004) SSR240612 [(2R)-2-[[[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]-methyl]phenyl]-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 661–669.
- Mori MA, Araujo RC, Reis FC, Sgai DG, Fonseca RG, et al. (2008) Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* 57: 1491–1500.
- Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, et al. (1985) Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412–419.
- Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, Harrison DG (1995) Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95: 187–194.
- Heitzer T, Wenzel U, Hink U, Krollner D, Skatchkov M, et al. (1999) Increased NAD(P)H oxidase-mediated superoxide production in renovascular hypertension: evidence for an involvement of protein kinase C. *Kidney Int* 55: 252–260.
- Loomis ED, Sullivan JC, Osmond DA, Pollock DM, Pollock JS (2005) Endothelin mediates superoxide production and vasoconstriction through activation of NADPH oxidase and uncoupled nitric-oxide synthase in the rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 1058–1064.
- Tawfik HE, Cena J, Schulz R, Kaufman S (2008) Role of oxidative stress in multiparity-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295: H1736–H1742.
- 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.
- Miller EJ, Jr., Gutterman DD, Rios CD, Heistad DD, Davidson BL (1998) Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis. *Circ Res* 82: 1298–1305.
- Aoki S, Su Q, Li H, Nishikawa K, Ayukawa K, et al. (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.
- Wada R, Tift CJ, Proia RL (2000) Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 10954–10959.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.

24. Cloutier F, de Sousa BH, Ongali B, Couture R (2002) Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 135: 1641–1654.
25. Nazarali AJ, Gutkind JS, Saavedra JM (1989) Calibration of 125I-polymer standards with 125I-brain paste standards for use in quantitative receptor autoradiography. *J Neurosci Methods* 30: 247–253.
26. Anand-Srivastava MB, de Champlain J, Thibault C (1993) DOCA-salt hypertensive rat hearts exhibit altered expression of G-proteins. *Am J Hypertens* 6: 72–75.
27. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA, Jr., et al. (2000) Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 8140–8145.
28. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, et al. (2004) Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 143: 803–818.
29. Gabra BH, Berthiaume N, Sirois P, Nantel F, Battistini B (2006) The kinin system mediates hyperalgesia through the inducible bradykinin B1 receptor subtype: evidence in various experimental animal models of type 1 and type 2 diabetic neuropathy. *Biol Chem* 387: 127–143.
30. Quintao NL, Passos GF, Medeiros R, Paszcuk AF, Motta FL, et al. (2008) Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J Neurosci* 28: 2856–2863.
31. Hall CE, Hall O (1966) Comparative ability of certain sugars and honey to enhance saline polydipsia and salt hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 122: 362–365.
32. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512–516.
33. Vasdev S, Longrich L, Gill V (2004) Prevention of fructose-induced hypertension by dietary vitamins. *Clin Biochem* 37: 1–9.
34. Cavarape A, Feletto F, Mercuri F, Quagliaro L, Daman G, et al. (2001) High-fructose diet decreases catalase mRNA levels in rat tissues. *J Endocrinol Invest* 24: 838–845.
35. Nyby MD, Abedi K, Smutko V, Eslami P, Tuck ML (2007) Vascular Angiotensin type 1 receptor expression is associated with vascular dysfunction, oxidative stress and inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res* 30: 451–457.
36. Thirunavukkarasu V, Nitha Nandhini AT, Anuradha CV (2004) Effect of alpha-lipoic acid on lipid profile in rats fed a high-fructose diet. *Exp Diabetes Res* 5: 195–200.
37. Vasdev S, Ford CA, Longrich L, Parai S, Gadag V, et al. (1999) Aldehyde induced hypertension in rats: prevention by N-acetyl cysteine. *Artery* 23: 10–36.
38. Pop-Busui R, Sima A, Stevens M (2006) Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 22: 257–273.
39. Rodriguez AI, Pereira-Flores K, Hernandez-Salinas R, Boric MP, Velarde V (2006) High glucose increases B1-kinin receptor expression and signaling in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345: 652–659.
40. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006) Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116: 1793–1801.
41. Csizsar A, Wang M, Lakatta EG, Ungvari Z (2008) Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol* 105: 1333–1341.
42. Paravicini TM, Touyz RM (2008) NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care Suppl* 2: S170–80. Review.
43. Tong X, Schroder K (2009) NADPH oxidases are responsible for the failure of nitric oxide to inhibit migration of smooth muscle cells exposed to high glucose. *Free Radic Biol Med* 47: 1578–1583.
44. Gao L, Mann GE (2009) Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res* 82: 9–20.
45. Li Y, Descorbeth M, Anand-Srivastava MB (2008) Role of oxidative stress in high glucose-induced decreased expression of Galpha proteins and adenyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294(6): H2845–54.
46. San Martín A, Du P, Dikalova A, Lassègue B, Aleman M, et al. (2007) Reactive oxygen species-selective regulation of aortic inflammatory gene expression in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 5: H2073–82.
47. Clerch LB, Massaro D (1993) Tolerance of rats to hyperoxia. Lung antioxidant enzyme gene expression. *J Clin Invest* 91: 499–508.
48. Ceriello A, Dello RP, Amstad P, Cerutti P (1996) High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 45: 471–477.
49. Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, McMaster D, Catherwood MA, et al. (1998) Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes. *Diabetes* 47: 801–809.
50. Majithiya JB, Balaraman RJ (2005) Time-dependent changes in antioxidant enzymes and vascular reactivity of aorta in streptozotocin-induced diabetic rats treated with curcumin. *J Cardiovasc Pharmacol* 46(5): 697–705.
51. Fernandes L, Ceravolo GS, Fortes ZB, Tostes R, Santos RA, et al. (2006) Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. *Regul Pept* 136: 92–97.
52. Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, et al. (2007) Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension* 50: 756–761.
53. Petcu M, Ongali B, El Midaoui A, de Champlain J, Couture R (2005) Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides* 26: 1331–1338.
54. Kintsurashvili E, Duka I, Gavras I, Johns C, Farmakiotis D, et al. (2001) Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1778–H1783.
55. Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, et al. (1996) Angiotensin II-mediated hypertension in the rat increases vascular superoxide production via membrane NADH/NADPH oxidase activation. Contribution to alterations of vasomotor tone. *J Clin Invest* 97: 1916–1923.
56. Mehta PK, Griendling KK (2007) Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C82–C97.
57. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005) International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27–77.
58. De Brito GH, Carayon P, Ferrari B, Couture R (2010) Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides* 44: 191–198.
59. Dias JP, Étude du rôle des kinines dans les neuropathies et l'hypertension artérielle chez le rat diabétique, Thesis-Université Montreal, cote W4U58 2008 v.020 ex., 2.
60. Buleon M, Allard J, Jaafar A, Pradaud F, Dickson Z, et al. (2008) Pharmacological blockade of B2-kinin receptor reduces renal protective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in db/db mice model. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F1249–F1256.
61. Chao J, Yin H, Gao L, Hagiwara M, Shen B, et al. (2008) Tissue kallikrein elicits cardioprotection by direct kinin B2 receptor activation independent of kinin formation. *Hypertension* 52: 715–720.
62. Chao J, Shen B, Gao L, Xia CF, Bledsoe G, et al. (2010) Tissue kallikrein in cardiovascular, cerebrovascular and renal diseases and skin wound healing. *Biol Chem* 391: 345–355.
63. Methner C, Donat U, Felix SB, Krieg T (2009) Cardioprotection of bradykinin at reperfusion involves transactivation of the epidermal growth factor receptor via matrix metalloproteinase-8. *Acta Physiol (Oxf)* 197: 265–271.
64. Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, et al. (2010) Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10190–10195.
65. Savvatis K, Westermann D, Schultheiss HP, Tschöpe C (2010) Kinins in cardiac inflammation and regeneration: insights from ischemic and diabetic cardiomyopathy. *Neuropeptides* 44: 119–125.
66. Messadi-Laribi E, Griol-Charhbil V, Gaies E, Vincent MP, Heudes D, et al. (2008) Cardioprotection and kallikrein-kinin system in acute myocardial ischaemia in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35: 489–493.
67. Kakoki M, Smithies O (2009) The kallikrein-kinin system in health and in diseases of the kidney. *Kidney Int* 75: 1019–1030.
68. Xu J, Carretero OA, Sun Y, Shesely EG, Rhaleb NE, et al. (2005) Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 45: 747–753.
69. Lagneux C, Bader M, Pesquero JB, Demenge P, Ribout C (2002) Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *Int Immunopharmacol* 2: 815–822.
70. Duka I, Kintsurashvili E, Duka I, Ona D, Hopkins TA, et al. (2008) Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors. *Hypertension* 51: 1352–1357.
71. Wang PH, Cenedeze MA, Campanholle G, Malheiros DM, Torres HA, et al. (2009) Deletion of bradykinin B1 receptor reduces renal fibrosis. *Int Immunopharmacol* 9: 653–657. S1567-5769.
72. Kakoki M, Takahashi N, Jennette JC, Smithies O (2004) Diabetic nephropathy is markedly enhanced in mice lacking the bradykinin B2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13302–13305.
73. Kakoki M, Kizer CM, Yi X, Takahashi N, Kim HS, et al. (2006) Senescence-associated phenotypes in Akita diabetic mice are enhanced by absence of bradykinin B2 receptors. *J Clin Invest* 116: 1302–1309.
74. Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, et al. (2001) Vasoactive potential of the B(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* 88: 275–281.
75. Seguin T, Buleon M, Destrube M, Ranera MT, Couture R, et al. (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.
76. Rodrigues ES, Martin RP, Felipe SA, Bader M, Oliveira SM, et al. (2009) Cross talk between kinin and angiotensin II receptors in mouse abdominal aorta. *Biol Chem* 390: 907–913.
77. Rodrigues ES, Martin RP, Pesquero JB, Shimuta SI (2010) Lack of kinin receptors affected ACE expression in mice abdominal aorta. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 107(suppl.1, paper No: 2813).
78. Shariat-Madar Z, Mahdi F, Warnock M, Homeister JW, Srikanth S, et al. (2006) Bradykinin B2 receptor knockout mice are protected from thrombosis by increased nitric oxide and prostacyclin. *Blood* 108: 192–199.

Chapitre 3 : Introduction générale sur l'inflammation vasculaire

3.1. Dysfonction endothéliale et l'inflammation vasculaire

Le stress oxydatif accompagné par l'inflammation contribue à la dysfonction endothéliale et à la résistance à l'insuline. La dysfonction endothéliale est fortement associée au diabète de type 2 (Frisbee et al., 2001; Kawano et al., 2011). L'initiation de l'inflammation vasculaire est multifactorielle (Cohen et Tong, 2010). Chez les diabétiques, on retrouve le processus typique de l'inflammation dans la vasculature (Koh, Han, Quon, 2005).

Une lésion de la paroi vasculaire causée par l'hyperglycémie et le défaut de la signalisation de l'insuline affectent la voie PI3K-Akt ce qui diminue l'activation de eNOS (Cusi et al., 2000). Le NO est un puissant vasodilatateur et la diminution de sa biodisponibilité est un important initiateur de l'athérosclérose, maladie des vaisseaux artériels. La dysfonction endothéliale est associée à une diminution du NO, à une augmentation des ERO et à l'augmentation de l'endothéline et d'angiotensine II ainsi qu'à la synthèse et à la relâche de cytokines proinflammatoires (Koh et al., 2005). En effet, le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses lors de sa libération des cellules endothéliales, et stimule la guanylate cyclase soluble qui augmente le GMPc. Cette hausse du taux de GMPc entraîne au niveau des cellules musculaires lisses une activation de PKG causant la phosphorylation de protéines responsables de la contraction cellulaire. Ceci favorise la recapture du Ca^{2+} par le reticulum sarco-endoplasmique Ca^{2+} -ATPase et mène à une relaxation des cellules musculaires lisses (Wilkins et al., 2008).

Le processus inflammatoire vasculaire est dû à l'infiltration des leucocytes, des lymphocytes et au recrutement des molécules d'adhésion et des LDL oxydés qui induisent la sécrétion de chemokines et de cytokines (Weisberg et al., 2006; Libby et al., 2009). La synthèse de plusieurs protéines est associée à ce processus inflammatoire incluant COX-2, iNOS, des chemokines (MIP-1 α , MCP-1, CCL5, CXCL4), des molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1), des cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN γ , M-CSF, MIF), des facteurs de croissance (VEGF, FGF, PDGF) et des substances thrombogéniques (PAI-1) (Azcutia et al., 2010; Matesanz et al., 2007; Stentz et al., 2004) (**Figure 17**).

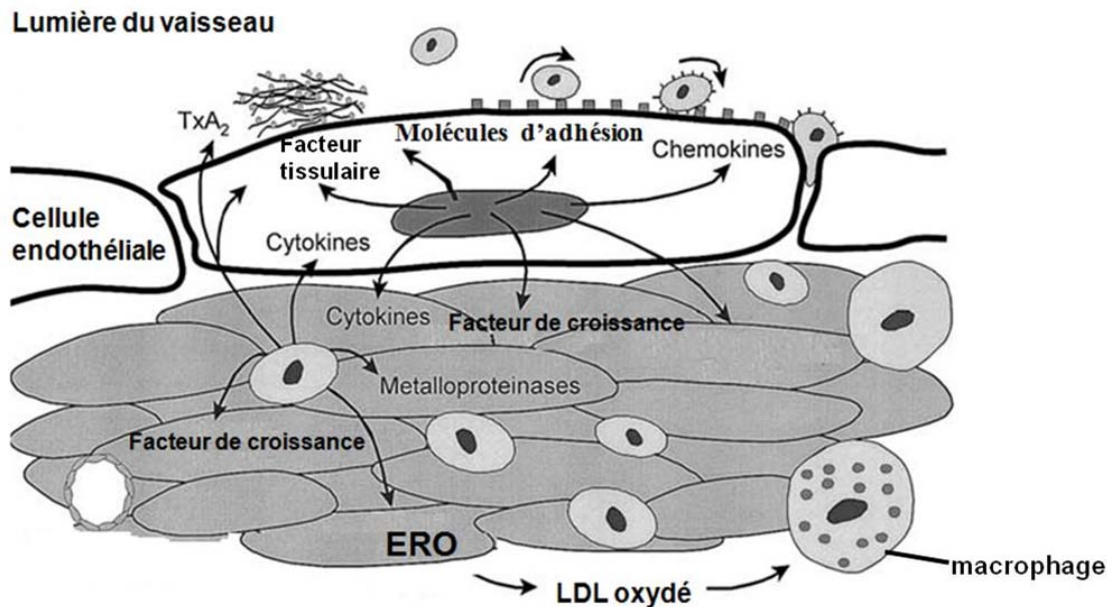


Figure 17. Médiateurs de l'inflammation vasculaire.

Adapté selon Koh KK, Han, Quon 2005

Une lésion de la surface artérielle du vaisseau active les cellules endothéliales et initie la synthèse de protéines proinflammatoires comme dans le cas de **l'athérosclérose**. Le diabète est un facteur de risque de l'athérosclérose (Libby et al., 2002). Les maladies cardiovasculaires dont l'athérosclérose présentent une des principales causes de mortalité chez les diabétiques (Gonzalez-Chavez et al., 2011, Nandish et al., 2011). Cette maladie s'initie lorsqu'il y a un excès de lipoprotéines non métabolisées (LDL) dans la circulation sanguine résultant en la formation de la plaque athérosclérotique (Libby et al., 2009). Ainsi, cette plaque diminue la paroi du vaisseau artériel et crée un processus inflammatoire vasculaire. Les monocytes circulants traversent l'endothélium et se différencient en macrophages dans l'espace sous endothélial afin de phagocyter les LDL oxydés. La quantité des LDL oxydés et accumulés à l'intérieur de ceux-ci dépasse leur capacité à phagocyter. De plus, ces macrophages produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires qui auto-amplifient le processus inflammatoire. Ainsi, ces macrophages se transforment en cellules spumeuses qui demeurent dans l'intima du vaisseau et constituent les premières lésions d'athérome. La plaque athéroscléreuse adulte se caractérise par

la formation d'une chape fibromusculaire (riche en collagène, élastine, protéoglycans, lipides intracellulaire et extracellulaire) qui isole le centre lipidique de la lumière artérielle. L'évolution de cette plaque se développe sur de nombreuses années et elle est souvent responsable de l'angine de poitrine (Libby et al., 2002; Caligiuri, 2004).

Également, les ERO stimulent et activent le facteur de transcription NF- κ B qui régule plusieurs gènes proinflammatoires: molécules d'adhésion (VCAM-1, ICAM-1, E-selectine), molécules proinflammatoires et molécules attractant de macrophages et monocytes (TNF- α , IL-1 β , IL-6, PAI-1, MCP-1, MIF, M-CSF) (Koh et al., 2005; Drexler, 1997; Vincent et al., 2003). En effet, l'activité de NF- κ B est sous le contrôle de la signalisation de stimuli extracellulaires. Au repos I κ B (inhibiteur de κ B) séquestre le NF- κ B dans le cytosol des cellules et ainsi prévient sa localisation nucléaire et sa fonction de transcription. Lorsque les stimuli (cytokines, LDL oxydé, Angiotensine II et autres) initient la cascade de signalisation du NF- κ B, il se produit l'activation de l'inhibiteur de κ B kinase (IKK), un complexe incluant les sous-unités catalytique IKK α et IKK β et régulatrice NEMO (IKK γ) (Hayden et Ghosh, 2008). Ainsi, la phosphorylation du complexe IKK produit la dégradation de I κ B et la relâche de NF- κ B qui est transloqué au noyau afin d'induire la transcription de gènes proinflammatoires (Baker et al., 2011) (**Figure 18**).

Les macrophages activés sont des médiateurs importants de la résistance à l'insuline puisqu'ils relâchent des cytokines proinflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α) et chemokines (MIP-1 α , MCP-1) (Koh, 2001; Shoelson et al., 2006). Ainsi, la propagation du signal proinflammatoire se fait à travers tout l'organisme dû à l'infiltration de macrophages dans les tissus périphériques incluant les tissus insulino-dépendants dont le foie, les adipocytes et le muscle. Il existe donc une boucle continue, les cytokines locales activent NF- κ B qui stimule la relocalisation des macrophages et leur activation au site d'inflammation (Baker et al., 2011). Toutes les molécules discutées dans cette section sont considérées comme des biomarqueurs prédictifs du diabète et de ses complications (Goldberg et al., 2009; Baker et al., 2011).

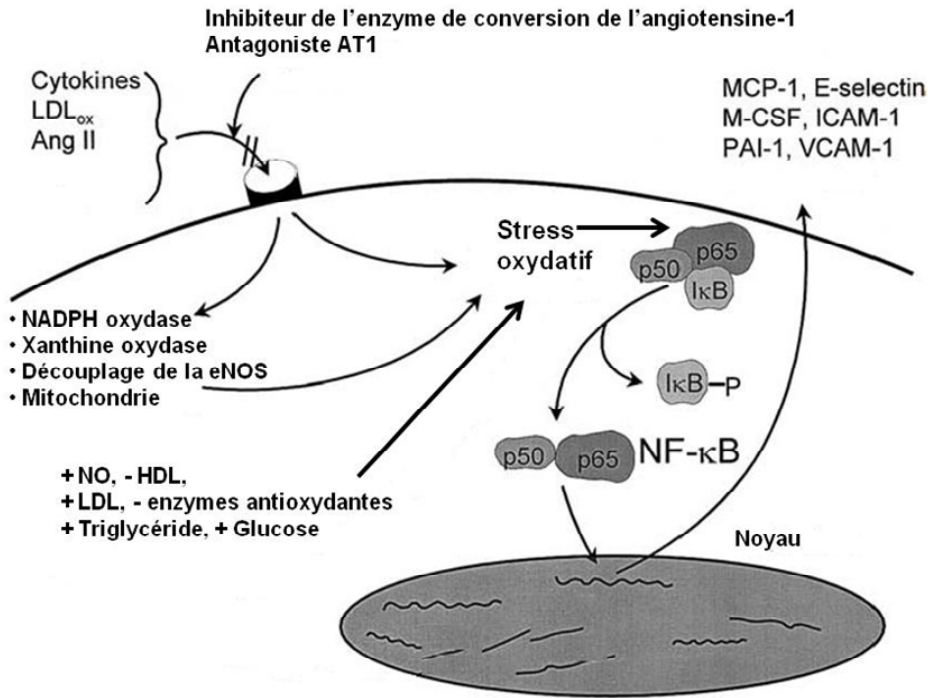


Figure 18. Mécanismes d'activation des médiateurs de l'inflammation vasculaire.
Adapté selon Koh et al., 2005.

3.1.1. Le récepteur B₁ en lien avec l'inflammation vasculaire

Le récepteur B₁ est impliqué dans la migration et l'activation de neutrophiles et de cellules inflammatoires dans les tissus (Ehrenfeld et al., 2006; Duchene et Ahluwalia, 2009). L'injection intrapleurale de des-Arg⁹-BK augmente les cellules mononuclées et les neutrophiles chez les rats STZ (Vianna et al., 2003). À la suite d'un traitement avec l'IL-1 β chez les souris (*air pouch model*), l'activation du B₁R provoque une migration des neutrophiles. Dans plusieurs études, il a été démontré que la délétion du B₁R ou l'antagoniste du B₁R bloque complètement ou partiellement le recrutement de neutrophiles et l'infiltration de cellules mononuclées (Vianna et al., 1998; McLean et al., 2000; Duchene et al., 2007). Le SSR240612 démontre des propriétés anti-inflammatoires dans un modèle de dysfonction rénale chez la souris puisqu'il a réussi à diminuer l'infiltration des macrophages (Klein et al., 2010) et réduit le recrutement des neutrophiles dans l'artère splénique chez le rat suite à l'ischémie à la reperfusion (Gougat, 2004). Il est aussi connu que l'activation du B₁R altère l'activité endothéliale en induisant l'expression de chemokine CXCL5 qui participe à l'adhésion des neutrophiles (Duchene et Ahluwalia, 2009). De plus, l'expression de molécules (IL-1 β , MCP-1 ou CCL2 chemokine) qui attirent les monocytes diminue chez les souris déficientes en kininogène sous une diète riche en graisse lorsque comparé au témoin (Brown Norway) (Kaschina et al., 2004). Les cytokines dont IL-1 augmentent l'expression de ICAM-1 et de E-selectine sur l'endothélium (Pober et al., 1986). L'inhibition du récepteur B₁ ou la délétion génétique de ce récepteur réduit la migration des leucocytes ainsi que la surexpression de ICAM-1 et VCAM-1 dans un modèle de souris affectées par l'encéphalomyélite auto-immune (Gobel et al., 2011).

Chapitre 4 : Deuxième article

4.1. Hypothèse : Le récepteur B₁ des kinines perpétue et amplifie le stress oxydatif. Ainsi, il pourrait contribuer à l'inflammation vasculaire entraînant la dysfonction endothéliale et la résistance à l'insuline.

4.2. Objectif : Examiner l'effet d'un blocage prolongé du récepteur B₁ dans l'inflammation vasculaire dans un modèle de résistance à l'insuline.

4.3. Approche expérimentale : Le SSR240612 a été administré par gavage à une dose de 10 mg/kg/jour pendant 7 jours lors de la dernière semaine avant le sacrifice des rats qui ont reçu 10% glucose dans l'eau de boisson depuis 8 semaines. L'expression protéique de marqueurs inflammatoires a été mesurée par western blot et l'expression génique (ARNm) par PCR en temps réel dans l'aorte.

4.4. Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication:

Jenny Pena Dias et Réjean Couture. Suppression of vascular inflammation by kinin B₁ receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (JCVP-11-473, Sous presse, mars 2012).

Suppression of vascular inflammation by kinin B₁ receptor antagonism in a rat model of insulin resistance

Jenny Pena Dias and Réjean Couture

Abstract

Background: Kinin B₁ receptor (B₁R) intervenes in a positive feedback loop to amplify and perpetuate the vascular oxidative stress in glucose-fed rats, a model of insulin resistance. This study aims at determining whether B₁R blockade could reverse vascular inflammation in this model.

Methods/Results: Young male Sprague-Dawley rats were fed with 10% D-glucose or tap water (controls) for 8 weeks and during the last week, rats were administered the B₁R antagonist SSR240612 (10 mg/kg/day, gavage) or the vehicle. The outcome was determined on glycemia, insulinemia, insulin resistance (HOMA index) and on protein or mRNA expression of the following target genes in the aorta (by Western blot and qRT-PCR): B₁R, eNOS (endothelial nitric oxidase synthase), iNOS (inducible nitric oxidase synthase), macrophage CD68, macrophage/monocyte CD11b, IL-1 β (interleukin-1 β), TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-6 (interleukin-6), MIF (macrophage migration inhibitory factor), ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1) and E-selectin (endothelial adhesion molecule). Data showed increased expression of all these markers in the aorta of glucose-fed rats except eNOS and TNF- α which were not affected. SSR240612 reversed hyperglycemia, hyperinsulinemia, insulin resistance and the upregulation of B₁R, iNOS, macrophage CD68 and CD11b, IL-1 β , ICAM-1, MIF and E-selectin in glucose-fed rats, yet it had no significant effect on IL-6 and in control rats.

Conclusion: Kinin B₁R antagonism reversed the upregulation of its own receptor and several pro-inflammatory markers in the aorta of glucose-fed rats. These data provide the first evidence that B₁R may contribute to the low-grade vascular inflammation in insulin resistance, an early event in the development of type 2 diabetes.

Key words: Adhesion molecules, bradykinin, cytokines, insulin resistance, kinin B₁ receptor, macrophage, vascular inflammation

INTRODUCTION

Vascular inflammation can be initiated by sustained hyperglycaemia-induced oxidative stress which activates a series of receptors and transcriptional factors leading to increased levels of cellular adhesion molecules, macrophage and leukocyte infiltration in the vasculature and to endothelial dysfunction¹. Recent studies highlight mechanisms of vascular inflammation as early targets and suggest that a very modest rise of pro-inflammatory cytokines can gradually foster insulin resistance and constitutes a predictive factor of development of diabetes in groups of people still considered sound^{1,2,3}. Pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF- α)^{4,5,6} promote chemokines secretion from endothelial cells and monocytes to increase the expression of cell-surface adhesion molecules such as ICAM-1 (inter-cellular adhesion molecule-1), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), integrins, selectins^{7,8,9} and infiltration of macrophages^{4,10}. Endothelial cells are also very sensitive to MIF (macrophage migration inhibitory factor), a pro-inflammatory cytokine constitutively expressed in various tissues and released by monocytes and macrophages¹¹. MIF also promotes the production of TNF- α , COX-2, PGE₂, amplifying the inflammatory reaction. In turn, TNF- α increases MIF expression and its release by macrophages, that generates a positive-feedback loop. MIF also increases the expression of the adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1), which mediate monocyte adherence to the vascular endothelium. A strong relationship occurs between MIF and insulin resistance, obesity and type 2 diabetes¹².

Kinins are pro-inflammatory peptides which act through the activation of two G-protein-coupled receptors (R), named B₁ and B₂. While the B₁R is weakly expressed in healthy subjects, it is induced and overexpressed after exposure to pro-inflammatory cytokines, hyperglycaemia-induced oxidative stress and after activation of the transcriptional nuclear factor kappa B (NF-κB)^{13,14,15}. Bradykinin (BK) and Lys-BK are the natural agonists for the constitutive B₂R, while the kininase I metabolites des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK are the selective endogenous ligands for the B₁R¹⁶. Although the B₂R is believed to be involved in acute inflammatory processes, this receptor exerts cardioprotective effects involving the NO pathway^{14, 17,18}.

Recent evidence has shown that kinin B₁R contributes to the maintenance of insulin resistance^{19, 20, 21}. Rats fed for a period of 4, 8 and 12 weeks with 10 % D-glucose in drinking water exhibited enhanced production of superoxide anion (O₂^{•-}) and B₁R expression in cardiovascular tissues, which were associated with insulin resistance, hypertension and pain neuropathy^{19,20,21,22}. These abnormalities were all prevented in glucose-fed rats receiving co-treatment with anti-oxidant diets (α-lipoic acid or N-acetyl L-cysteine) and reversed after 1-week treatment with the orally active B₁R antagonist SSR240612^{19,20,21}. Hence, B₁R may represent a therapeutic target which could contribute to vascular inflammation by increasing the oxidative stress through the activation of NADPH oxidase²¹. Reactive oxygen species (ROS) are potent activators of pro-inflammatory genes^{1,11} through the NF-κB pathway²³. For instance, the expression of TNF-α, IL-1β, iNOS and macrophages is enhanced in retroperitoneal adipose tissue of glucose-fed rats through a mechanism involving B₁R as 1-week treatment with SSR240612 reduced their expression along with body and tissue fat gain²⁴. Adiposity increases the circulating levels of these cytokines which contribute to insulin resistance in various tissues by causing systemic inflammation²⁵.

The present study was undertaken to define further the contribution of B₁R in vascular inflammation in the rat model of insulin-resistance induced by chronic glucose intake. This was achieved by measuring the expression of the above-mentioned markers of inflammation in the aorta of glucose-fed rats and by determining the impact of 1-week treatment with SSR240612. While eNOS is involved in the regulation of vascular function, iNOS can enhance vascular inflammation through the generation of peroxynitrite. As both eNOS and iNOS are targets of kinin receptors²⁶, their protein expression was also determined in the present study.

MATERIALS AND METHODS

Animals and Procedures

All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of our University (CDEA protocol: 09-066). Young male Sprague-Dawley rats (24-28 days old, weighing 50-75 g, Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (22°C) and humidity (43%), on a 12-hour light-dark cycle and allowed free access to normal chow diet and tap water (control rats) or 10% D-glucose in the drinking water for 8 weeks. The study was designed with 4 groups of rats: (Control + Vehicle, Control + SSR240612, Glucose + Vehicle, Glucose + SSR240612). SSR240612 was administered per gavage daily at 9 A.M. (10 mg/kg/day) for 7 days in control rats and in rats fed with D-glucose. SSR240612 was dissolved in dimethylsulphoxide (0.5%), and then ethanol (5%) and Tween-80 (5%) were added in this sequence. The solution was completed in distilled water and represents the vehicle. The rationale

for this regimen was provided in a previous study ²¹. On day 7, overnight-fasted rats were euthanized by CO₂ inhalation 3 h after the last treatment with SSR240612 to collect tissues and blood samples for biochemical and molecular studies. SSR240612 was kindly provided by Dr. Pierre Carayon (Sanofi-Aventis, Montpellier, France) [(2R)-2-[(3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride] ²⁷. SSR240612 is a highly potent, selective non-peptide B₁R antagonist in all species tested (rat, mouse, rabbit and human). The selectivity for B₁ versus B₂ receptors was in the range of 500- to 1000-fold and it was highly specific when tested on over 100 (mainly human) receptor-binding, ion channel-binding, and enzyme assays. SSR240612 was found orally active at the doses of 3 and 10 mg/kg in several models of pain and inflammation, including in glucose-fed rats ^{21, 27, 28}.

Plasma Analysis

Blood samples from fasted rats were centrifuged at 2500 RPM for 15 min at 4⁰C and plasma stored at -20⁰C for further measurements of glucose and insulin. Plasma insulin concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) using the double antibody/polyethylene glycol technique (Rat Insulin RIA Kit) from Linco Research Inc. (St-Charles, MO, USA). Plasma glucose concentration was determined with an Accu-chek glucometer from Roche (Laval, Qc, Canada). The Homeostasis Model Assessment index (HOMA) was used as an index of insulin resistance and calculated with the following formula: [insulin (μU/ml) x glucose (mM) ÷ 22.5] ²⁹.

Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR)

At the time of sacrifice, approximately 10 mg of thoracic aorta was isolated and put in RNAlater stabilisation reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA) and frozen at -56 °C with liquid nitrogen. Total RNAs were extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). qRT-PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer and signal detected using a Mx3000p device (Stratagene, La Jolla, CA, USA). For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1).

PCR conditions were: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The cycle threshold (Ct) value represents the cycle number at which a fluorescent signal rises statistically above background. The relative quantification of gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method³⁰.

Western blot analysis

Western blot analysis of protein expression was performed as described earlier³¹. After sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), the separated proteins were electrophoretically wet transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad) at 100 V for 1 h. After transfer, the membranes were washed twice in Phosphate-buffer saline (PBS)-Tween 20 and incubated in PBS containing 5% skim milk at room temperature for 1 h. The blots were cut in pieces according to the molecular weight of the protein and then incubated with the specific

antibodies (Table 2) for eNOS, iNOS, CD68, CD11b, IL-1 β , TNF- α , IL-6 and B₁R in PBS-Tween 20 at 4 °C overnight. Dynein and β -actin were used as standard proteins. After three washings in PBS-Tween 20 buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature in PBS-Tween 20 containing 5% milk with secondary antibodies: donkey anti-rabbit (1/5000, cat number: sc-2077), goat anti- hamster Armenian (1/5000, cat number: sc- 2443) or goat anti-mouse IgG-HRP (1/5000, cat number: sc-2005). The blots were then washed three times with PBS-Tween 20 before the reaction with enhanced-chemiluminescence, Western blotting detection reagents (Amersham). A quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the enhanced laser densitometer, LKB Ultrosan XL, and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Qc, Canada).

Data analysis

All data were presented as mean \pm SEM of values obtained from n rats. Statistical differences between groups were determined by using one-way ANOVA and *post hoc* Bonferroni test in all graphs and table 3. All analyses were performed using GraphPad Prism version 5 Windows (San Diego, CA, USA). P value of < 0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Baseline parameters

The body weight was not significantly different between 8-week glucose-fed rats and control rats. However, high glucose intake caused significant increases in levels of plasma glucose (1.3-fold), plasma insulin (8.8-fold) and HOMA index of insulin resistance (4.9-fold). One-week

treatment with SSR240612 normalized or reduced significantly these three parameters (Table 3). In contrast, the B₁R antagonist had no significant effect in control rats.

Impact of SSR240612 on B₁R protein expression

Low protein expression of B₁R was detected in control aorta, and sometimes the band was undetectable. B₁R protein levels were significantly enhanced in the aorta of glucose-fed rats when compared to age-matched control rats. The overexpression of B₁R in aorta was significantly abolished by the 1-week treatment with 10 mg/kg SSR240612. In contrast, the same treatment with the B₁R antagonist had no significant effect on B₁R expression in the aorta of control rats (Fig. 1).

Impact of SSR240612 on endothelial and inducible nitric oxide synthase protein expression

The impact of SSR240612 was evaluated on the expression of two isoforms of nitric oxide synthase (Fig. 2). Whereas the protein expression of eNOS was not changed in the aorta of glucose-fed rats, iNOS protein levels were significantly increased when compared to age-matched control aorta. This upregulation was entirely reversed by the 1-week treatment with 10 mg/kg SSR240612. The prolonged treatment with the B₁R antagonist had no significant effect on eNOS or iNOS expression in the aorta of control rats (Fig. 2A-2B).

Impact of SSR240612 on macrophage protein expression

To further understand the contribution of B₁R in the production of inflammatory markers, the expression of two macrophage populations was measured in the aorta. The expression of macrophage CD68 (Fig. 3-A) and macrophage/monocyte CD11b (Fig. 3-B) was significantly

increased in the aorta of glucose-fed rats. The overexpression of the two macrophage markers was normalized by the 1-week treatment with 10 mg/kg SSR240612. The prolonged treatment with the B₁R antagonist had no significant effect on either of the two macrophage protein expression in the aorta of control rats (Fig. 3).

Impact of SSR240612 on cytokines protein expression

Following the previous results, we looked at three cytokines in the aorta. Glucose feeding for 8 weeks increased significantly IL-1 β and IL-6 but did not alter TNF- α protein expression in aorta when compared to control rats. The 1-week treatment with 10 mg/kg SSR240612 reversed the upregulation of IL-1 β but had no significant impact on IL-6 expression. The prolonged treatment with the B₁R antagonist had no significant effect on IL-1 β , IL-6 or TNF- α protein expression in the aorta of control rats (Fig. 4).

Impact of SSR240612 on mRNA expression of adhesive molecules and MIF

Glucose feeding increased ICAM-1, E-selectin and MIF mRNA expression in aorta of glucose-fed rats when compared to control rats. The 1-week treatment with 10 mg/kg SSR240612 in glucose-fed rats reduced ICAM-1 mRNA expression to values significantly lower than control levels and normalized the expression of E-selectin and MIF mRNA. However, the same treatment with the B₁R antagonist had no significant effect on ICAM-1, E-selectin and MIF mRNA expression in the aorta of control rats (Fig. 5).

DISCUSSION

This study shows the upregulation of several representative inflammatory markers in the aorta of glucose-fed rats (pro-inflammatory cytokines, macrophage/monocyte, vascular adhesion molecules) and their normalization following pharmacological blockade of B₁R for a week. We found previously that this treatment with SSR240612 could also reverse inflammation in retroperitoneal adipose tissue and fat gain in this model²⁴. Thus, it appears that B₁R contributes to insulin resistance by promoting systemic inflammation that may occur in response to ROS generation following the activation of NADPH oxidase. ROS are known to trigger the expression of a myriad of pro-inflammatory genes following the activation of NF- κ B²⁵. In turn, pro-inflammatory cytokines can enhance the oxidative stress through the same pathway. Thus, cytokines, ROS and B₁R may work in concert to amplify and perpetuate local inflammation. Collectively, data suggest that inhibiting B₁R may interrupt this auto-maintaining inflammatory loop. Thus, the inhibition of low-grade vascular inflammation by B₁R antagonism may represent a credible mechanism by which SSR240612 can reverse insulin resistance, an early event in the development of type 2 diabetes.

NOS synthase in glucose feeding

B₁R agonist stimulation in glucose-fed rats both *in vivo* and *in vitro* enhanced superoxide anion production via NADPH oxidase in aorta²¹. Oxidative stress and early vascular inflammation in this model could be affected by changes in NO bioavailability secondary to changes in NO synthase expression or activity. We found no change in aortic eNOS protein expression in 8-week glucose-fed rats which is congruent with the failure of 6 weeks treatment with sucrose to affect aortic eNOS protein expression in rats³². NO generated by eNOS acts as an anti-inflammatory molecule by inhibiting leukocyte adhesion to the endothelium, platelet

activation and smooth muscle cell proliferation and contraction^{33,34}. However, high levels of NO could also be generated by iNOS in the vasculature following exposure to ROS or pro-inflammatory cytokines^{35,36}. In turn, high concentration of NO can rapidly react with superoxide anion to form peroxynitrite, a highly toxic molecule which may contribute to increased inflammation and oxidative stress³⁷. Whereas activation of B₂R causes transient release of NO from eNOS and thereby vasodilatation, B₁R activation can generate high and prolonged amount of NO through iNOS^{26,38}. It is suggested that B₁R-mediated iNOS activation plays a pivotal role in inflammation as both B₁R and iNOS are upregulated by the oxidative stress^{21,36}. Hence, the inhibition of oxidative stress reported earlier with SSR240612²¹ can account for the normalisation of iNOS. The production of ROS by B₁R-induced activation of NADPH oxidase²¹ could provide a rationale explanation for the induction of B₁R by its own agonist³⁹ and the normalization of B₁R expression with prolonged treatment with SSR240612.

Cytokines, immune cells in the induction of B₁R

Furthermore, B₁R expression is also induced by various pro-inflammatory cytokines (IL- β , TNF- α) and growth factor such as EGF⁴⁰. These cytokines activate different signalling pathways such as NF- κ B, the main transcriptional factor responsible for B₁R upregulation^{41,42}. In turn, B₁R activates NF- κ B⁴³ and its activation could play a key role in inflammatory cell recruitment. For instance, B₁R is expressed on neutrophils in rodent and human^{44,45}. B₁R agonist induced neutrophil migration in murine air pouch model^{46,47} and in carrageenan- and diabetic-induced pleurisy models^{48,49}. Neutrophil recruitment induced by B₁R agonist was absent in pleurisy induced by carrageenan in knockout mice B₁R^(-/-)⁴⁸. Also SSR240612 reduced neutrophil recruitment in rat intestine following splanchnic artery ischemia and reperfusion⁵⁰. Once activated, neutrophils are able to release cytokines, prostaglandins as well as ROS to promote

inflammation. Through indirect mechanisms, neutrophils promote the expression of adhesion molecules and chemoattraction of immune cells⁵¹. However, in our model of insulin resistance this needs further investigation. B₁R is also expressed in macrophages from different species, tissue and differentiation/activation stages^{52,53,54}. Macrophages can release various inflammatory mediators after kinin stimulation such as IL-1 β , TNF- α ^{52,55,56}, which maintain the inflammatory process.

A prolonged administration of SSR240612 (10 mg/kg/daily) for 2 weeks blocked chemokines expression and macrophage F4/80 infiltration in the kidney of nephrotoxic serum-induced glomerulonephritis in mice⁵⁷. In our model of insulin resistance, protein expression levels of macrophage CD68 and CD11b and IL-1 β were also enhanced through a B₁R receptor mechanism in the vasculature. IL-6 is also a biomarker of vascular inflammation and the increase of this multifunctional cytokine in the circulation was associated with atherosclerosis, cardiovascular diseases and metabolic syndrome⁵⁸. IL-6 is highly inducible in response to IL-1, TNF α and oxidative stress^{59,60}. However, the increased aortic protein expression of IL-6 in glucose-fed rats was not altered by the blockade of B₁R, suggesting the absence of interaction between B₁R and this particular cytokine.

Whereas increased levels of TNF- α are often observed in the plasma of diet-induced obesity and insulin resistance in rats^{61,62}, TNF- α expression in the aorta of glucose-fed rats was unchanged and remained similar to that of age-matched control. Likewise, plasma levels of TNF- α were unchanged in 8-week fructose-fed rats compared to age-matched control⁶³. Also, protein expression of IL-1 β and IL-6 was not significantly different in aorta of obese mice fed with high fat diet for 16 weeks⁶⁴. This indicates that diet duration and composition (fat versus

carbohydrates) may play a crucial role in the induction of cytokines expression in insulin resistance.

MIF is another pro-inflammatory cytokine involved in inflammatory diseases and in the development of insulin resistance and type 1 and type 2 diabetes^{9,12}. MIF released by macrophage and monocyte^{12,65} contributes to promote the production of IL-1 β receptor^{12,66}, ICAM-1^{12,67}, the secretion of insulin by pancreatic beta cells^{12,68} and to decrease insulin signaling^{12,69}. Our study is the first to show a decrease in MIF mRNA expression after B₁R blockade. MIF blockade is known to reduce aortic inflammation in (ApoE^{-/-}) atherosclerotic mice by decreasing several markers such as ICAM-1 and TNF- α ⁷⁰. The inhibition of MIF expression under B₁R blockade could also explain the decrease of other inflammatory markers because MIF is an essential upstream component of the inflammatory cascade⁷¹.

B₁R and adhesion molecules

Adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 on the endothelium and leukocytes are involved in mediating cell-cell adhesion, which is an initial step in the leukocyte migration response⁷². Cytokines such as IL-1 may upregulate the expression of ICAM-1 and E-selectin on the luminal surface of vessels⁷³. ICAM-1 is important for leukocyte recruitment during a wide range of inflammatory circumstances⁷⁴ following its binding to integrins located on the cell surface of leukocytes⁷⁵. (ICAM-1^{-/-}) mice diminished tissue infiltration by neutrophils despite normal production of pro-inflammatory cytokines^{76,77}. B₁R inhibition or its genetic deletion had a protective effect in a murine model of autoimmune encephalomyelitis by reducing leukocyte

trafficking and the upregulation of ICAM-1 and VCAM-1 in cerebral endothelial cells⁷⁸. Interestingly, ocular application of LF22-0542, a water soluble non-peptide B₁R antagonist, reversed leukocyte infiltration and the upregulation of ICAM-1, IL-1 β and B₁R expression in the retina of streptozotocin-diabetic rats⁷⁹. In agreement with these findings, specific blockade of B₁R in our model showed a suppression of ICAM-1 and E-selectin mRNA expression. Further investigation is, however, needed to elucidate the mechanism underlying the inhibition of ICAM-1 mRNA below control levels in aorta of glucose-fed rats treated with SSR240612. Functional interaction between the various inflammatory mediators on the stability and turnover of ICAM-1 mRNA is completely unknown at this time and could be a contributive factor to this phenomenon.

CONCLUSION

The expression of representative inflammatory biomarkers (B₁R, iNOS, macrophage CD68 and CD11b, IL-1 β , ICAM-1, MIF and E-selectin) were increased in the aorta of glucose-fed rat, a model of insulin resistance. The inhibition of B₁R by 1-week treatment with SSR240612 reversed the upregulation of all these inflammatory markers together with insulin resistance. These data provide the first evidence that B₁R may contribute to the low-grade vascular inflammation in insulin resistance, an early event in the development of type 2 diabetes mellitus.

ACKNOWLEDGMENTS

Supported by a Grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Quebec (to RC). JPD holds a Studentship Award from the Canadian Institutes of Health Research (Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships-Doctoral Award).

CONFLICT OF INTEREST

The Authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Feng L, Matsumoto C, Schwartz A, Schmidt AM, Stern DM, Pile-Spellman J. Chronic vascular inflammation in patients with type 2 diabetes: endothelial biopsy and RT-PCR analysis. *Diabetes Care*. 2005; 28:379-384.
2. Liu S, Tinker L, Song Y, Rifai N, Bonds DE, Cook NR, Heiss G, Howard BV, Hotamisligil GS, Hu FB, Kuller LH, Manson JE. A prospective study of inflammatory cytokines and diabetes mellitus in a multiethnic cohort of postmenopausal women. *Arch Intern Med*. 2007; 167:1676-1685.
3. Bertoni AG, Burke GL, Owusu JA, Carnethon MR, Vaidya D, Barr RG, Jenny NS, Ouyang P, Rotter JI. Inflammation and the incidence of type 2 diabetes: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Diabetes Care*. 2010; 33:804-810.
4. Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N. [Cytokines and inflammation]. *Rev Prat*. 1993; 43:547-552.
5. El-seweidy MM, El-Swefy SE, Ameen RS, Hashem RM. Effect of angiotensin receptor blocker and/or anti-inflammatory coadministration in relation to glycation, oxidative stress and cytokine production in streptozotocin diabetic rats. *Pharmacol Res*. 2002; 45:391-398.
6. Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Romacho T, Nevado J, Rodriguez-Manas L, Moncada S, Peiro C, Sanchez-Ferrer CF. The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *J Hypertens*. 2008; 26:478-485.

7. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002; 420:868-874.
8. Ruotsalainen E, Stancakova A, Vauhkonen I, Salmenniemi U, Pihlajamaki J, Punnonen K, Laakso M. Changes in cytokine levels during acute hyperinsulinemia in offspring of type 2 diabetic subjects. *Atherosclerosis*. 2010; 210:536-541.
9. Goldberg RB. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009; 94:3171-3182.
10. Cavaillon JM. [Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms]. *Pathol Biol. (Paris)* 1993; 41:799-811.
11. Schleicher E, Friess U. Oxidative stress, AGE, and atherosclerosis. *Kidney Int Suppl*. 2007;S17-S26.
12. Toso C, Emamaullee JA, Merani, S, Shapiro AM. The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia*. 2008; 51:1937-1946.
13. Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol*. 2002; 2:1729-1739.
14. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol*. 2004; 500:467-485.
15. Deblois D, Bouthillier J, Marceau F. Effect of glucocorticoids, monokines and growth factors on the spontaneously developing responses of the rabbit isolated aorta to des-Arg9-bradykinin. *Br J Pharmacol* 1988; 93:969-977.
16. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1998; 348:1-10.
17. Emanuelli C, Maestri R, Corradi D, Marchione R, Minasi A, Tozzi MG, Salis MB, Straino S, Capogrossi MC, Olivetti G, Madeddu P. Dilated and failing cardiomyopathy in bradykinin B(2) receptor knockout mice. *Circulation*. 1999; 100:2359-2365.
18. Loiola RA, Reis FC, Kawamoto EM, Scavone C, Abdalla DS, Fernandes L, Pesquero JB. Role of vascular Kinin B1 and B2 receptors in endothelial nitric oxide metabolism. *Peptides*. 2011; 32:1700-1705.
19. Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, Couture R. Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides*. 2007; 41:375-387.
20. Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R. 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*. 2008; 589:66-72.

21. Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*. 2010; 5(9):e12622
22. El-Midaoui A, de Champlain J. Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens*. 2005; 23:581-588.
23. Koh KK, Han SH, Quon MJ. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2005; 46:1978-1985.
24. Dias JP, Couture R. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*. 2012; 14(3):244-53
25. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; 116:1793-1801.
26. Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*. 2010; 44:145-154.
27. Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie P, Finance O, Le FG. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl]amino]-3-(4-[[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride)], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 309:661-669.
28. Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, Couture R. The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 2007; 152:280-287.
29. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28:412-419.
30. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25:402-408.
31. Pouliot M, Hetu S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res*. 2011; 92(6):482-9.
32. Blouet C, Mariotti F, Mathe V, Tome D, Huneau JF. Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007; 232:1458-1464.

33. Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25:434-456.
34. Javanmard SH, Nematbakhsh M, Mahmoodi F, Mohajeri MR. l-Arginine supplementation enhances eNOS expression in experimental model of hypercholesterolemic rabbits aorta. *Pathophysiology.* 2009; 16:9-13.
35. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004; 75:639-653.
36. Wu F, Tyml K, Wilson JX. iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 2008; 217:207-214.
37. Kuhlencordt PJ, Chen J, Han F, Astern J, Huang PL. Genetic deficiency of inducible nitric oxide synthase reduces atherosclerosis and lowers plasma lipid peroxides in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation.* 2001; 103:3099-3104.
38. Kuhr FK, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. Beta-arrestin 2 is required for B1 receptor-dependent post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *FASEB J.* 2010; 24:2475-2483.
39. Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL. 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* 1998 101:2080-2091.
40. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005; 57:27-77.
41. Passos GF, Fernandes ES, Campos MM, Araujo JG, Pesquero JL, Souza GE, Avellar MC, Teixeira MM, Calixto JB. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. *J Immunol.* 2004; 172:1839-1847.
42. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol.* 2004; 143:803-818.
43. Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL. 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.* 1998; 101:2080-2091.
44. Araujo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, Bader M. Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol Chem.* 2001; 382:91-95.

45. Saxena P, Shaw OM, Misso NL, Naran A, Shehatha J, Newman MA, d'Udekem Y, Thompson PJ, Konstantinov IE. Remote Ischemic Preconditioning Stimulus Decreases the Expression of Kinin Receptors in Human Neutrophils. *J Surg Res*. 2009; 171(1):311-6.
46. Ahluwalia A, Perretti M. Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J Immunol*. 1996; 156:269-274.
47. Duchene J, Ahluwalia A. The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 2009; 9:125-131.
48. Pesquero JB, Araujo RC, Heppenstall PA, Stucky CL, Silva JA Jr, Walther T, Oliveira SM, Pesquero JL, Paiva AC, Calixto JB, Lewin GR, Bader M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:8140-8145.
49. Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R. Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br J Pharmacol*. 2003; 138:13-22.
50. Souza DG, Lomez ES, Pinho V, Pesquero JB, Bader M, Pesquero JL, Teixeira MM. Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J Immunol*. 2004; 172:2542-2548.
51. Wright HL, Moots RJ, Bucknall RC, Edwards SW. Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford)*. 2010; 49:1618-1631.
52. Burch RM, Connor JR, Tiffany CW. The kallikrein-kininogen-kinin system in chronic inflammation. *Agents Actions*. 1989; 27:258-260.
53. Bockmann S, Paegelow I. Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol*. 2000; 68:587-592.
54. Legedz L, Randon J, Sessa C, Baguet JP, Feugier P, Cerutti C, Bourdillon MC, Bricca G. Induction of tissue kallikrein in human carotid atheroma does not lead to kallikrein-kinins pathway activation. *J Hypertens*. 2005; 23:359-366.
55. Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett*. 1989; 247:189-192.
56. Tsukagoshi H, Shimizu Y, Horie T, Fukabori Y, Shimizu Y, Iwamae S, Hisada T, Ishizuka T, Iizuka K, Dobashi K, Mori M. Regulation by interleukin-1beta of gene expression of bradykinin B1 receptor in MH-S murine alveolar macrophage cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 259:476-482.
57. Klein J, Gonzalez J, Decramer S, Bandin F, Neau E, Salant DJ, Heeringa P, Pesquero JB, Schanstra JP, Bascands JL. Blockade of the kinin B1 receptor ameliorates glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*. 2010; 21:1157-1164.

58. Hou T, Tieu BC, Ray S, Recinos Iii A, Cui R, Tilton RG, Brasier AR. Roles of IL-6-gp130 Signaling in Vascular Inflammation. *Curr Cardiol Rev.* 2008; 4:179-192.
59. Akira S. IL-6-regulated transcription factors. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997; 29:1401-1418.
60. Ramar K, Caples SM. Vascular changes, cardiovascular disease and obstructive sleep apnea. *Future Cardiol* 2011; 7:241-249.
61. Moller DE. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab.* 2000; 11:212-217.
62. Terra X, Pallares V, Ardevol A, Blade C, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Salvado J, Arola L, Blay M. Modulatory effect of grape-seed procyanidins on local and systemic inflammation in diet-induced obesity rats. *J Nutr Biochem.* 2011; 22:380-387.
63. Behr-Roussel D, Oudot A, Caisey S, Coz OL, Gorny D, Bernabe J, Wayman C, Alexandre L, Giuliano FA. Daily treatment with sildenafil reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in an animal model of insulin resistance. *Eur Urol.* 2008; 53:1272-1280.
64. Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens.* 2010; 28:2111-2119.
65. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med.* 1994; 179:1895-1902.
66. Toh ML, Aeberli D, Lacey D, Yang Y, Santos LL, Clarkson M, Sharma L, Clyne C, Morand EF. Regulation of IL-1 and TNF receptor expression and function by endogenous macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol.* 2006; 177:4818-4825.
67. Amin MA, Haas CS, Zhu K, Mansfield PJ, Kim MJ, Lackowski NP, Koch AE. Migration inhibitory factor up-regulates vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 via Src, PI3 kinase, and NFkappaB. *Blood.* 2006; 107:2252-2261.
68. Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:4782-4787.
69. Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J Immunol.* 2007; 179:5399-5406.
70. Burger-Kentischer A, Gobel H, Kleemann R, Zerneck A, Bucala R, Leng L, Finkelmeier D, Geiger G, Schaefer HE, Schober A, Weber C, Brunner H, Rutten H, Ihling C, Bernhagen J.

Reduction of the aortic inflammatory response in spontaneous atherosclerosis by blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Atherosclerosis*. 2006; 184:28-38.

71. Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M, de Vries-van der Weij, Leng L, van Bockel JH, van Dijk K.W, Fingerle-Rowson G, Bucala R, Kleemann R. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res*. 2009; 105:99-107.

72. Malik AB. Endothelial cell interactions and integrins. *New Horiz*. 1993; 1:37-51.

73. Pober JS, Gimbrone MA Jr, Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol*. 1986; 137:1893-1896.

74. Sumagin R, Sarelius IH. A role for ICAM-1 in maintenance of leukocyte-endothelial cell rolling interactions in inflamed arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293:H2786-H2798.

75. Dejana E, Breviario F, Caveda L. Leukocyte-endothelial cell adhesive receptors. *Clin Exp Rheumatol*. 1994; 12 Suppl 10:S25-S28.

76. Sligh JE Jr, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:8529-8533.

77. Xu H, Gonzalo JA, St Pierre Y, Williams IR, Kupper TS, Cotran RS, Springer TA, Gutierrez-Ramos JC. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med*. 1994; 180:95-109.

78. Gobel K, Pankratz S, Schneider-Hohendorf T, Bittner S, Schuhmann MK, Langer HF, Stoll G, Wiendl H, Kleinschnitz C, Meuth SG. Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking. *J Autoimmun*. 2011 (electronic).

79. Pouliot M, Talbot S, Sénécale J, Dotigny F, Vaucher E, Couture R. Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in Streptozotocin-Diabetic rats. *PLoS One* 2012 (in press).

Table 1. Primers used to measure mRNA expression in aorta

Primer	Forward	Reverse	Gen Bank
E-selectin	5'TGAGCACAGTTTCACATTGCAGGG3' Position (1008-1031)	5'GGGAAGCTTTGCACAGTGGGATT3' Position (1099-1076)	L25527.1
MIF	5'CCCAGAACCGCAACTACAGCAA3' Position (295-316)	5'CGTTGGCTGCGTTCATGTCGTAAT3' Position (402-379)	NM_031051.1
ICAM-1	5'TGCAGGTGAACTGCTCTTCCTTT3' Position (161-184)	5'AGCTCCAGTTGTGTCCACTCGAT 3' Position (263-240)	NM_012967
18S	5'TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT3' Position (363-385)	5'TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT 3' Position (470-447)	X01117

Table 2. Antibodies used to measure protein expression in aorta

Antibody	Catalogue number	Dilution
Kinin B ₁ R, rabbit polyclonal	Produced in the lab ^{24,31}	1/1000
Dynein, mouse monoclonal	Sc-13524	1/5000
β-actin, mouse monoclonal	A-5441	1/10000
eNOS, rabbit polyclonal	Sc-653	1/1000
iNOS, mouse monoclonal	Sc-7271	1/1000
CD68, mouse monoclonal	MAB 1435	1/200
CD11b, mouse monoclonal	CBL1512	1/500
IL-1β, mouse monoclonal	Sc- 74135	1/500
TNF-α, hamster Armenian monoclonal	Ab-93588	1/500
IL-6, mouse monoclonal	Sc-57315	1/500

Symbols: A and Ab (Sigma-Aldrich Canada), Sc (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)
and MAB and CBL (Millipore Billerica, MA, USA)

Table 3. Baseline parameters determined in glucose-fed rats treated with B₁R antagonist.

Parameters	Control + Vehicle	Control +SSR240612	Glucose-fed + Vehicle	Glucose-fed + SSR240612
Body weight (g)	412.9±11.5	419.5± 8.5	428.5±13.9	413.3±14.2
Plasma glucose (mmol/L)	5.7±0.2	5.5± 0.2	7.6±0.2*	6.3±0.3
Plasma insulin (ng/ml)	0.9±0.1	1.0±0.1	7.9±0.2***	2.0±0.2***††
HOMA index	5.4±0.7	5.7±0.5	26.6±0.9***	12.7±1.2***†††

Data are mean ± SEM of values obtained from 8 rats in each group. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *P< 0.05; **P< 0.01; ***†††P< 0.001.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on B₁R protein expression in the aorta of 8-week glucose-fed rats. Data are mean ± SEM of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (+) is indicated by *P < 0.05; ++ P < 0.01.

FIGURE 2. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on protein expression of eNOS (A) and iNOS (B) in the aorta of 8-week glucose-fed rats. Data are mean ± SEM of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (+) is indicated by *+ P < 0.05.

FIGURE 3. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on protein expression of CD68 (A) and CD11b (B) in the aorta of 8-week glucose-fed rats. Data are mean ± SEM of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (+) is indicated by *+ P < 0.05; ***+ P < 0.01.

FIGURE 4. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on protein expression of IL-1β (A), IL-6 (B) and TNF-α (C) in the aorta of glucose-fed rats. Data are mean ± SEM of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (+) is indicated by ++ P < 0.05; ** P < 0.01.

FIGURE 5. Effect of orally administered SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) on mRNA levels of ICAM-1 (A), E-selectin (B) and MIF-1 (C) in the aorta of glucose-fed rats. Data are mean ± SEM of values obtained from (n) rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (+) is indicated by *P < 0.05; ****+ P < 0.001.

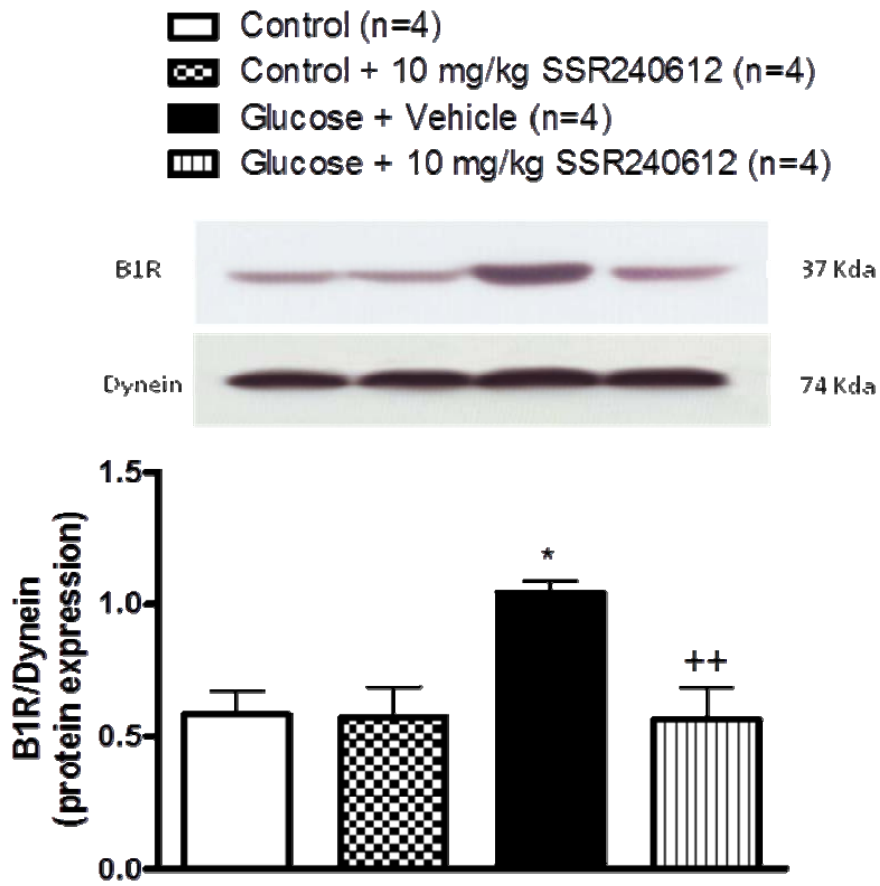


Figure 1.

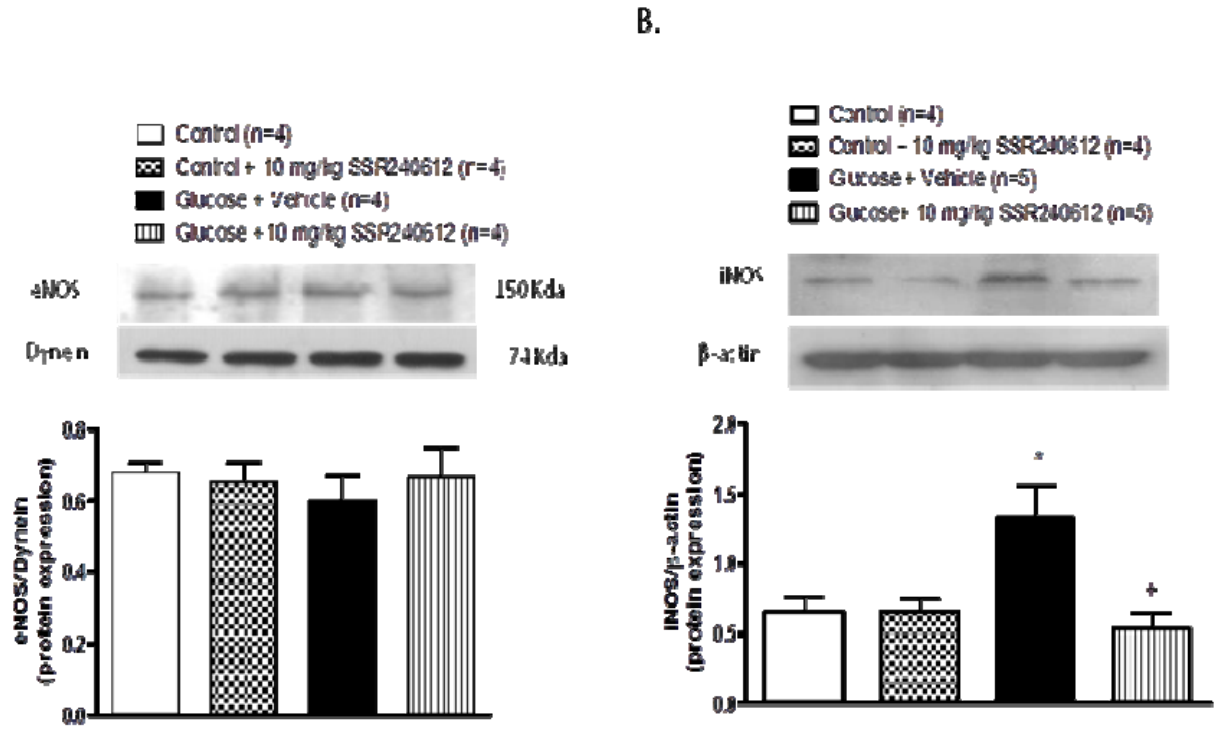
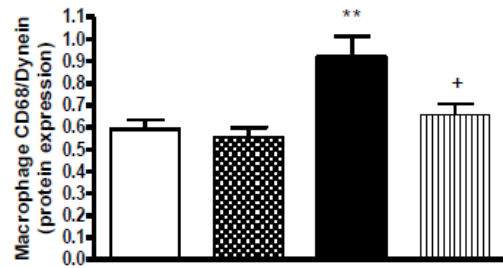
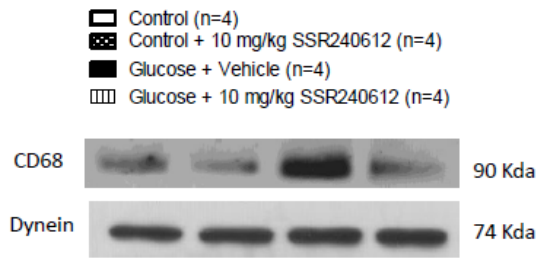


Figure 2.

A.



B.

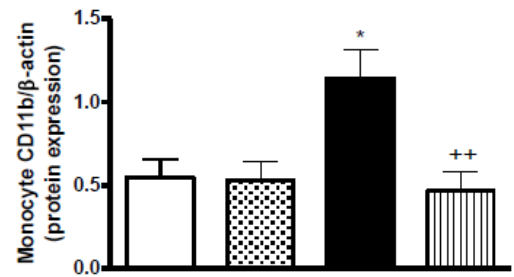
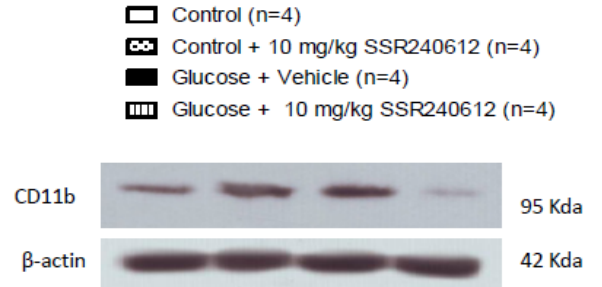


Figure 3.

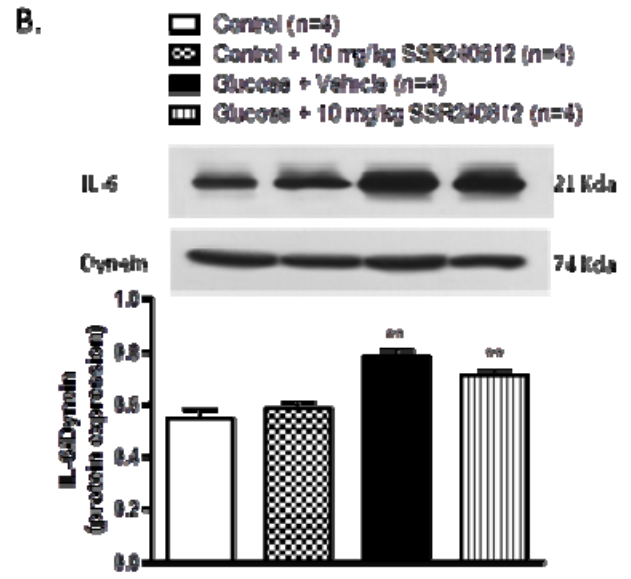
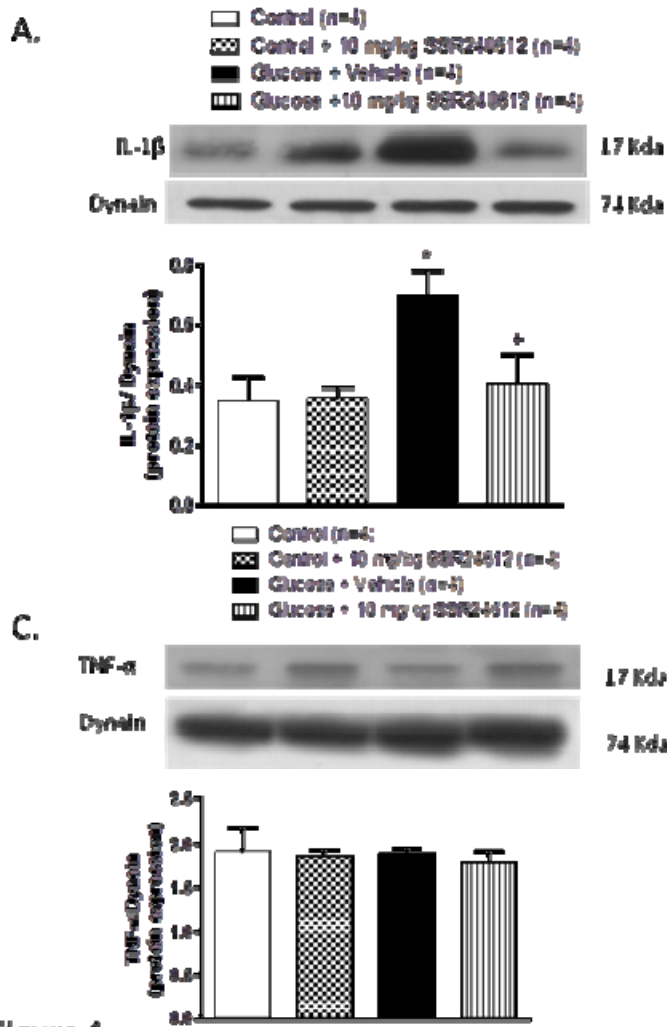


Figure 4.

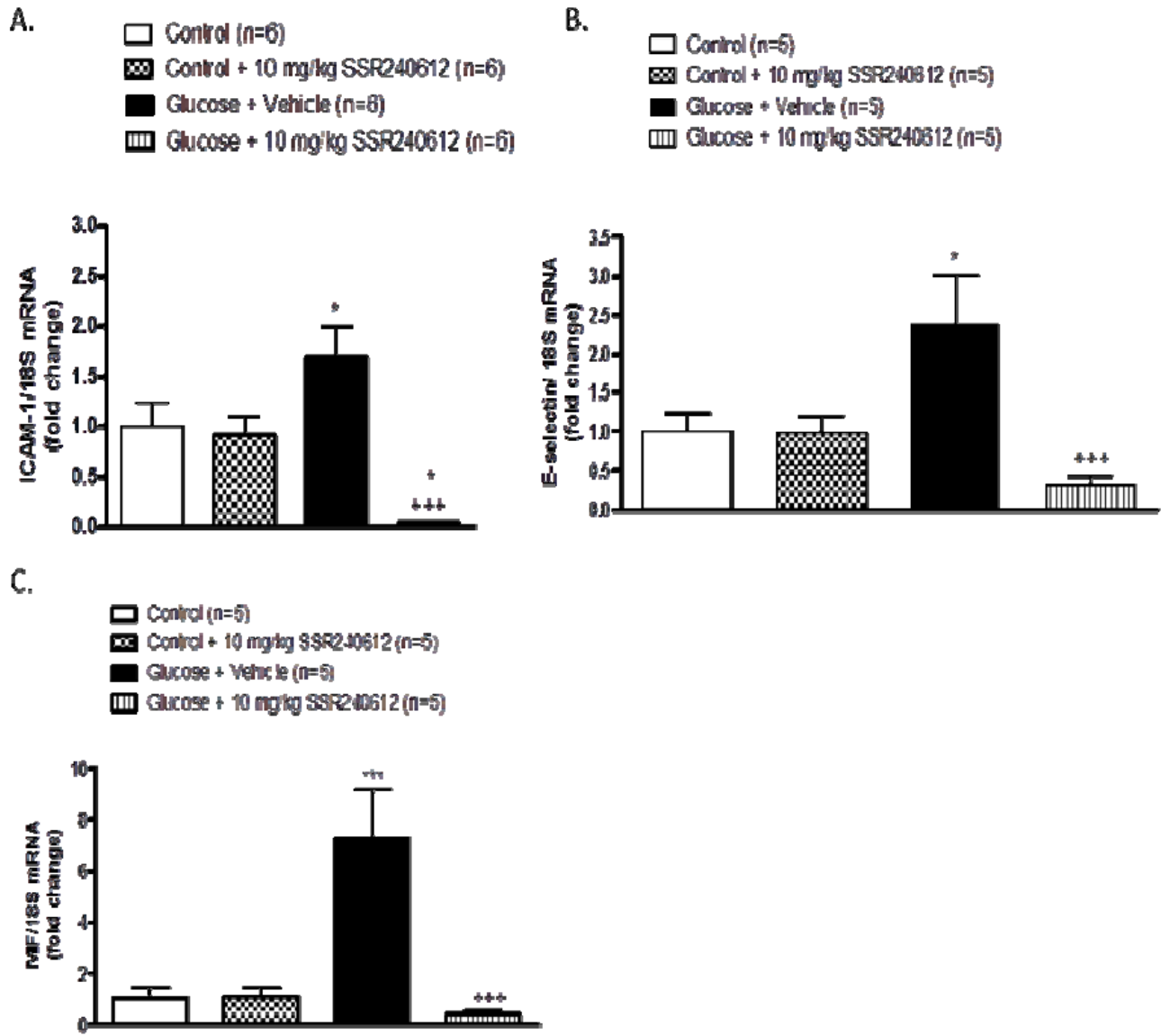


Figure 5.

Chapitre 5 : Introduction générale sur l'obésité

5.1. Obésité

L'obésité se définit comme un excès de masse grasse résultant de l'accumulation chronique de lipides due au stockage de surplus d'énergie. L'obésité intra-abdominale se définit comme une accumulation excessive de tissu adipeux entourant les viscères à l'intérieur de la cavité abdominale. Elle tient compte à la fois des dépôts viscéraux (derrière les muscles abdominaux et autour des organes internes) et des dépôts sous-cutanés (entre la peau et les muscles abdominaux) de tissus adipeux. Or, des différences métaboliques notables distinguent ces deux types de dépôts. In vitro, des études ont démontré que les adipocytes provenant des régions viscérales abdominales sont plus sensibles aux stimuli lipolytiques et plus résistants à la suppression de la lipolyse par l'insuline que les adipocytes dans la région sous-cutanée glutéo-fémorale (Calle et al., 1999). L'obésité est un facteur élevé de risque pour le développement du diabète de type 2, de la résistance à l'insuline, de maladies cardiovasculaires, pulmonaires, endocriniennes, l'apnée du sommeil et l'hyperlipidémie (Hamdy et al., 2006).

Il y a plusieurs méthodes pour déterminer la quantité de graisse corporelle dont la densitométrie, le dual-energy x-ray absorptiometry, la résonance magnétique nucléaire et la résonance magnétique par imagerie (EchoMRI). Le tour de taille élevé chez la femme (>80 cm) et chez l'homme (>85 cm) est un signe d'obésité (Lacoursière et Hébert, 2011).

On peut classer l'obésité selon l'indice de masse corporelle (IMC) (**Tableau 7**).

Tableau 7. Classification de l'obésité chez l'adulte en fonction de l'indice de masse corporelle

	Obésité grade	IMC (kg/m ²)
Maigre (dénutrition)		< 18,5
Normale		18.5 - 24.9
Surpoids		25 – 29.9
Obésité	I	30.0-34.9
	II	35.0-39.9
Extrême obésité	III	≥ 40

Selon l'OMS en 1998.

L'obésité est associée à l'augmentation de la taille des cellules adipeuses, à l'augmentation des acides gras libres et VLDL (very low-density lipoprotein), à des dépôts ectopiques de gras dans le foie (stéatose hépatique) et dans les muscles squelettiques (lipides intramyocellulaire), et à la résistance à l'insuline.

L'obésité est causée par des interactions complexes entre des facteurs génétiques (déficiency en leptine, POMC (très rare), récepteur MC4 (plus fréquent), *neurotrophin receptor TrkB* et autres) et des facteurs environnementaux dont le manque d'activité physique ainsi qu'une surconsommation de calories (**Figure 19**).

Les individus obèses ne réussissent pas à réduire leur apport énergétique en dessous de leur dépense énergétique.

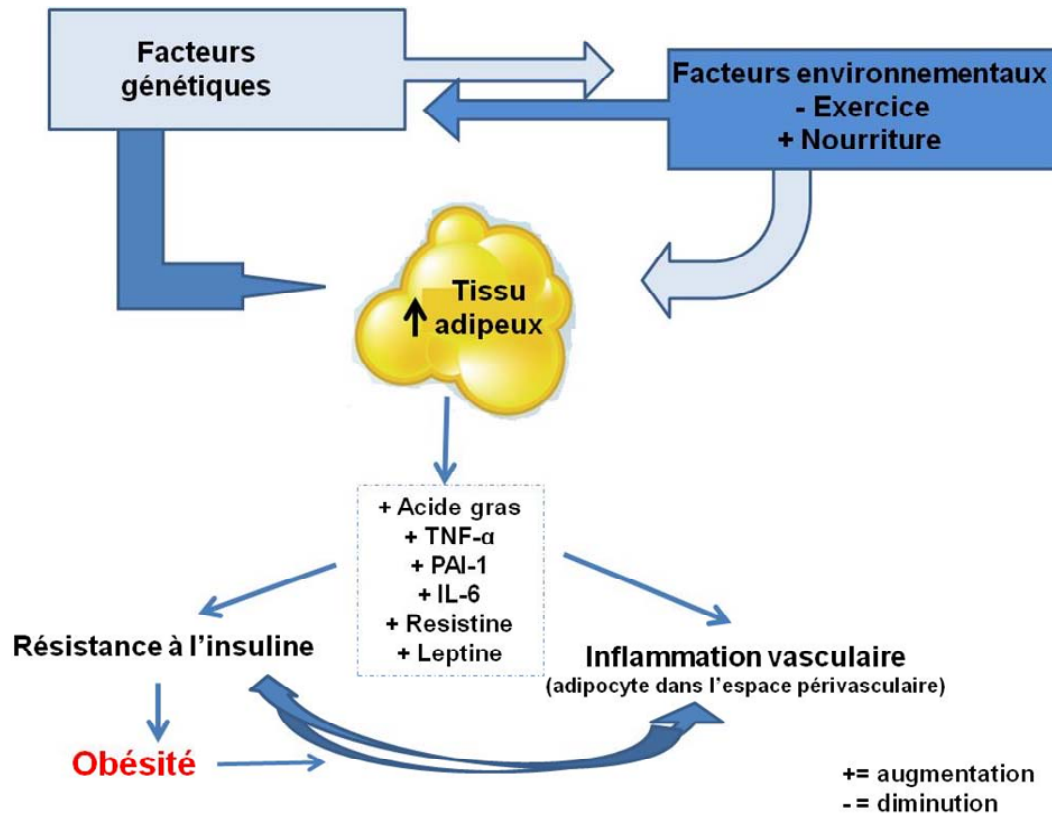


Figure 19. Facteurs conduisant à l'obésité.
Adapté selon Hamdy et al., 2006

5.2. Rôle des adipocytes

Le tissu adipeux est constitué d'adipocytes matures, de préadipocytes, de cellules vasculaires, neuronales et immunitaires. Il est vu comme un organe endocrinien avec une haute activité métabolique. Les adipocytes produisent et sécrètent plusieurs hormones qui agissent dans la régulation de la prise alimentaire et dans la dépense énergétique. Ces hormones et molécules aussi appelées adipokines dont les plus connues sont : leptine, TNF- α , IL-6, IL-1 β , angiotensinogène, plasminogène activator inhibitor -1 (PAI-1), adiponectine, resistine (Trayhurn et Beattie, 2001) (**Figure 19**). L'augmentation des acides gras libres dans la circulation contribue à la résistance à l'insuline dans le foie, les muscles squelettiques et les adipocytes ainsi qu'à la libération de plusieurs cytokines proinflammatoires. Celles-ci ou les acides gras peuvent aussi augmenter le stress oxydatif via l'activation de NF- κ B ce qui produit une dysfonction des tissus insulino-dépendants. L'état inflammatoire joue un rôle clef dans le développement de la résistance à l'insuline locale et systémique (Itani et al., 2002 ; Cai et al., 2005; Andersson et al., 2008).

L'augmentation des adipocytes contribue aux dysfonctions endothéliale et vasculaire en stimulant la relâche de nombreux facteurs proinflammatoires. Ces facteurs inflammatoires induisent l'expression de molécules d'adhésion sur l'endothélium dont P- et E-selectine, VCAM-1 et ICAM-1. Ces dernières dirigent les cellules immunitaires dans la paroi du vaisseau et contribuent à l'inflammation en association avec MIPs, MCP-1, MIF, PAI-1 et des cytokines proinflammatoire : IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , Rantes et autres (Meijer et al., 2011). D'autre part, le tissu adipeux contient jusqu'à 40% de monocytes/macrophages; ces cellules aussi collaborent dans l'obésité et la dysfonction endothéliale via l'infiltration des macrophages dans les parois du vaisseau et par leur capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoire (Meijer et al., 2011). La réduction de la masse grasse est corrélée avec la diminution des niveaux sériques de leptine, de resistine et de cytokines proinflammatoires (IL-6, TNF- α) (Pariz et al., 2011).

Quelques adipokines :

Leptine : Elle est produite dans les adipocytes par le gène ob. Une déficience en leptine ou la résistance à la leptine conduit à une sévère résistance à l'insuline et à l'obésité chez les rongeurs et les humains (Zhang et al., 1994; Wallis et al., 2002; Mantzoros et al., 2011) (Ondrak et Hackney, 2010). Une relation positive existe entre le pourcentage de gras, la concentration plasmatique de leptine et l'expression du gène de la leptine dans les adipocytes. La leptine contribue à la diminution de l'appétit, à la perte de poids, au métabolisme des lipides et à la survie des adipocytes (Ahima et al., 1996 ; Friedman et al., 1998; Farooqi et al., 2002). Malgré que les récepteurs à la leptine se retrouvent dans plusieurs tissus, son effet antiobésité s'effectue principalement via le cerveau.

Résistine : La resistine augmente la production hépatique de glucose. Elle est augmentée dans l'obésité chez les souris (ob/ob ou db/db) (Steppan et al., 2001) et les patients obèses (McTernan et al., 2002) et contribue à la résistance à l'insuline (Muse et al., 2004; Park et al., 2011). Chez les rongeurs, la perfusion de resistine ou sa surexpression augmente le glucose hépatique (Patel et al., 2004 ; Satoh et al., 2004). Cette adipokine est réduite par les anti-diabétiques thiazolidinediones (rosiglitazone, pioglitazone, troglitazone) qui sont des ligands PPAR γ améliorant la sensibilité à l'insuline (Henry, 1997; Steppan et al., 2001).

Adiponectine : Un des facteurs les plus abondants des adipocytes impliqués dans l'inhibition de l'inflammation vasculaire et dans l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Ouchi et al., 1999; Bremer et al., 2011; Turer et al., 2011). Chez les obèses, les niveaux sériques d'adiponectine sont bas et augmentent suite à une baisse de poids (Vendrell et al., 2004). L'adiponectine est inversement proportionnelle à l'incidence du diabète (Hanley et al., 2011). Cette hormone réduit le poids sans affecter l'appétit; elle est capable d'inhiber la production hépatique de glucose chez les rongeurs (Combs et al., 2001) et active la AMP kinase dans les muscles et le foie (Yamauchi et al., 2002).

La leptine, la resistine et l'adiponectine sont impliquées dans la régulation de la balance énergétique et leurs dysfonctions peuvent contribuer à l'obésité.

TNF- α : Cette cytokine proinflammatoire sécrétée par les adipocytes induit une limitation sur la taille des adipocytes, induit l'apoptose des adipocytes matures et contribue à la résistance à l'insuline (Coppack, 2001). Elle réduit l'expression de GLUT4 (Stephens et Pekala, 1991), diminue l'activité de LPL (Feingold et Grunfeld, 1992), diminue la phosphorylation de la tyrosine sur le récepteur à l'insuline (Hotamisligli et al., 1994), augmente la phosphorylation d'IRS-1 en serine résultant en une diminution de sa phosphorylation en tyrosine, diminue PPAR- γ (Zhang et al 1996). En effet, TNF- α agit dans les muscles, le foie et le cerveau afin de réguler la balance du glucose.

5.3. La régulation de l'appétit

L'insuline et la leptine via leurs récepteurs hypothalamiques diminuent la voie anabolique en inhibant l'expression de neuropeptides orexigéniques et stimulent la voie catabolique en augmentant les neuropeptides anorexigéniques. Ceci augmente la dépense énergétique et diminue la prise alimentaire. En effet, ces hormones agissent dans le noyau arqué en inhibant les neurones NPY/AgRP et en activant les neurones de la POMC. Ces deux sous-groupes de neurones projettent vers d'autres aires hypothalamiques : noyau paraventriculaire, aire hypothalamique latérale et périfornicale. Les projections de ces aires hypothalamiques font des connections vers le noyau du tractus solitaire (NTS) dans le rhombencéphale puis le nerf vague diminue la

production hépatique de glucose (Schwartz et al., 2000; Morton, 2007; Woods et D'alessio, 2008) (**Figure 20**). Durant un repas, des signaux périphériques comme CCK, GLP-1, la distension de l'estomac et de l'intestin déclenchent des influx nerveux dans les nerfs afférents sensoriels (vague) qui communiquent vers le rhombencéphale au NTS produisant une modulation de la dimension du repas (Havel, 2001). La ghréline libérée par l'estomac agit sur le nerf vague et stimule directement les neurones dans le noyau arqué. Il existe des signaux de courte et de longue durées de la régulation de la prise alimentaire et de l'homéostasie de l'énergie. L'insuline et la leptine sont les deux régulateurs les plus importants des signaux de longue durée tandis que la CCK et la GLP-1 sont de courte durée (Woods et D'alessio, 2008).

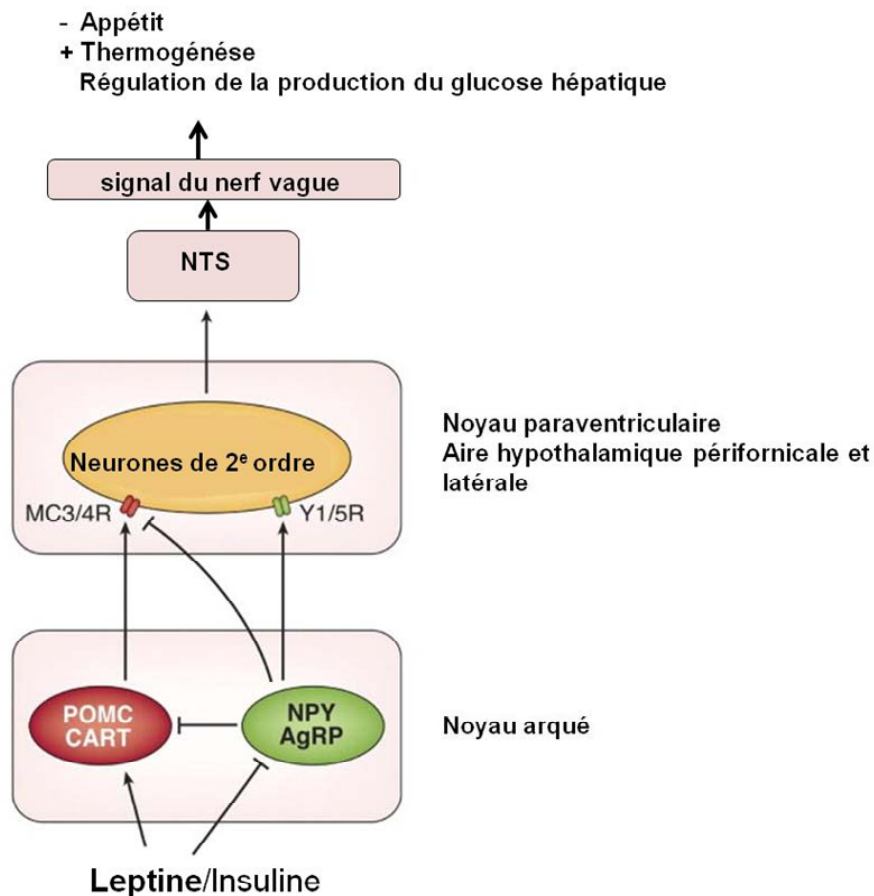


Figure 20. Circuits neuronaux hypothalamiques dans la régulation du métabolisme du glucose.

Adapté selon Badman et Flier, 2007

5.4. La nutrition, l'augmentation de la consommation de breuvage sucré et l'augmentation de poids

5.4.1. Différence entre les diètes riches en glucose et fructose dans l'induction de l'obésité

En postprandial, le fructose, contrairement au glucose, ne provoque pas de sécrétion d'insuline dû à l'absence des récepteurs au fructose (GLUT5) sur les cellules β pancréatiques (Bray et al., 2004). Ainsi, la consommation de nourriture et de boissons contenant du fructose produit une plus petite courbe postprandiale de libération d'insuline comparativement à la consommation de produits riches en glucose. De plus, le fructose ne stimule pas la sécrétion de la leptine, puisque celle-ci est régulée par l'insuline après un repas (Bray et al., 2004; Basciano et al., 2005). La leptine augmente après l'ingestion d'un repas entre 2-4h et elle est connue comme un modulateur de la balance énergétique à long terme (Havel, 2001). Le fructose est plus lipogénique que le glucose et se transforme préférentiellement en lipides dans le foie (**Figure 21**) menant à l'augmentation d'acide gras et de triglycérides associés à la résistance à l'insuline et aux maladies cardiovasculaires (Elliot et al., 2002; Havel, 2005; Basciano et al., 2005).

Il est bien connu aujourd'hui que des diètes riches en graisse ou en carbohydrates ou un mélange des deux causent l'obésité chez les animaux et les humains (Hariri et al., 2010, Patro et al., 2010; Shahkhalili et al., 2011; Zaman et al., 2011). Les carbohydrates (glucose, sucrose, fructose) dans les boissons sucrées (HFCS-55: 55% fructose, 42% glucose et 3% larges sucres) produisent un excès de poids et augmentent le développement du diabète et de l'obésité (Raben et al., 2002; Malik et al., 2010; Salas-Salvado et al., 2011). Le lien entre les boissons sucrées et le gain de poids est dû à la diminution de la satiété ainsi qu'à la réduction incomplète de l'apport énergétique aux repas suivants après la consommation de calories liquides (effet compensatoire) (Mattes et al., 1996; DiMeglio et al., 2000). Plusieurs évidences suggèrent que la consommation de fructose pourrait contribuer au développement de dépôts de graisses viscérales et ectopiques, à l'altération du métabolisme des lipides, à la formation de lipogenèse de novo, à l'hypertension et à la diminution de la sensibilité à l'insuline (Stanhope et al., 2009; Collino et al., 2011). Le glucose semble produire toutes ces complications (El Midaoui et de Champlain, 2002; Dias et al., 2010). Par contre, les effets dépendent des concentrations en glucose et de la durée de consommation de ce carbohydrate.

Une étude chez des adultes obèses a comparé deux groupes, un consommant du glucose et l'autre du fructose. Ainsi, le groupe qui a consommé le fructose montre une augmentation de l'adiposité viscérale en comparaison au groupe traité au glucose (Stanhope et al., 2008; Teff et al., 2009). Les niveaux sériques d'acides gras libres, de triglycérides et de cholestérol sont similaires chez des rats de 8 semaines traités au sucrose, glucose ou fructose pendant 2 semaines (Lindqvist et al., 2008). Dans la glycolyse, le glucose est transformé en fructose et vice versa par la phosphohexose isomérase et implique l'action de différentes enzymes. Ces transformations métaboliques appuient les effets communs (résistance à l'insuline, hypertension, obésité) entre les modèles de rats traités au glucose, au fructose et au sucrose (El Midaoui et de Champlain 2002; 2005; Tran et al., 2009; Dias et al., 2010; Coelho et al., 2010; Ruiz Ramirez et al., 2011; Panchal et al., 2011).

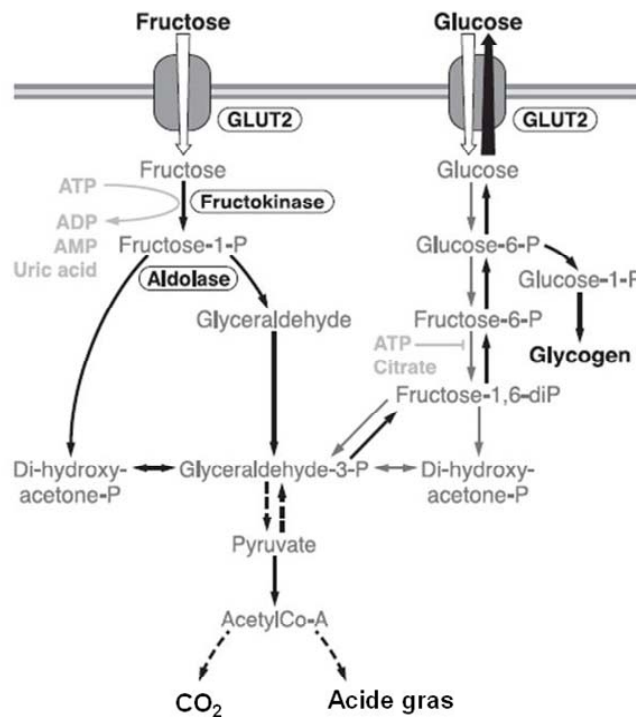


Figure 21. Métabolisme dans le foie du fructose et du glucose.
Adapté selon Tappy et Le, 2010.

Le métabolisme du fructose (flèche en gris) est différent de celui du glucose (flèche en noire). Le fructose a une extraction hépatique complète ainsi que des enzymes et réactions distinctes du glucose dans l'étape d'initiation métabolique.

5.5. Traitements pharmacologiques de l'obésité

Les traitements pharmacologiques pour l'obésité fonctionnent pour un nombre limité de patients. Seulement deux médicaments ont été approuvés aux États-Unis pour le traitement de l'obésité à long terme (orlistat et sibutramine). Pour le traitement à court terme, plusieurs médicaments qui affectent le système adrénergique, noradrénergique et sérotoninergique sont indiqués par exemple : phentermine et diethylpropion. Cependant, ces médicaments ont été retirés du marché canadien dû à leurs effets secondaires importants.

De plus, la metformine est connue pour réduire le poids corporel, un médicament utilisé pour le contrôle de la glycémie chez les patients diabétiques (Pi-Sunyer, 2005).

L'orlistat (inhibiteur de la lipase intestinale) permet de perdre de 5 à 15 kg par la diminution de l'absorption intestinale des graisses. Il est inhabituel de maintenir la perte de poids de 2 à 3 ans après la thérapie. Ce médicament a comme effet secondaire, l'indigestion. Le **sibutramine** (inhibiteur de la recapture de sérotonine et des catécholamines) permet de réduire l'appétit et augmente la thermogénèse. La perte de poids est similaire à l'orlistat et ses effets secondaires sont l'hypertension et la tachycardie (Seagle et al., 1998)

5.6. La nomenclature des acides gras

La nomenclature des acides gras repose sur le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons. C : y n-z ou C chiffre :y ω-z, (n ou ω). Le C représente le nombre d'atomes de carbone ou C avec le nombre en chiffre de carbone, y représente le nombre de doubles liaisons carbone-carbone dans la molécule et z correspond à la position de la double liaison carbone-carbone en comptant de l'extrémité méthyl vers la carboxyl, ex : C18 :1n-9, acide oléique est un acide gras à 18 atomes de carbone comportant une double liaison située à 9 carbones de l'extrémité méthyle (CH₃). Une autre nomenclature est celle de C : yΔ^x, x identifie où la double liaison carbone-carbone est localisée dans la molécule en comptant de l'extrémité carboxyle (COOH) vers l'extrémité méthyl (**Figure 22**).

De plus, ces deux nomenclatures peuvent être écrites ensemble afin de donner plus d'information sur l'acide gras comme dans la **figure 23**. Afin d'effectuer la biosynthèse des acides gras, plusieurs enzymes sont nécessaires dont les élongases (elo) qui permettent l'élongation des molécules d'acides gras et les désaturases identifiées par Δ chiffre sur les flèches (**Figure 23**), celles-ci enlèvent 2 atomes d'hydrogènes sur la molécule de carbone de l'acide gras afin de créer une double liaison selon (International Union of Pure and Applied Chemistry and International Union of Biochemistry Commission on Biochemical, nomenclature en 1978).

Les acides gras contribuent à différentes fonctions physiologiques dont l'acylation des protéines, la fluidité membranaire, la régulation de l'inflammation, l'agrégation plaquettaire et comme substrats énergétique pour la cellule.

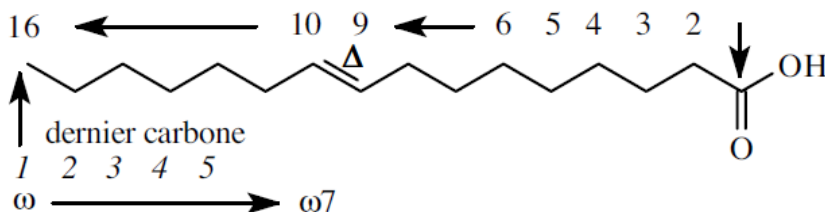


Figure 22. Structure de l'acide palmiloléique, C16 :1Δ9ω7 ou C16 :1Δ9n-7

5.5.1. Classification

- 1- Longueur : 4 à 24 carbones ou plus; Chaînes courtes moins de 6 carbones; chaînes moyenne 6 à 12 carbones; chaînes longues à partir de 12 carbones, chaînes très longues plus de 22 carbones.
- 2- Degré d'insaturation : nombre de double liaison carbone-carbone dans la molécule. Les acides gras saturés (sans double liaison), monoinsaturés (une double liaison) et polyinsaturés (plusieurs doubles liaisons).

Les acides gras indispensables ou essentiels sont l'acide linoléique C18 :2n-6 et l'acide α -linoléique C18 :3n-3. Ils sont dit essentiels car les mammifères peuvent seulement les retrouver dans leur alimentation. Ils servent de précurseurs à plusieurs acides gras dont les Omega 3, 6 et les dérivés de l'acide arachidonique. Une insuffisance de ces acides essentiels cause un retard de croissance, une chute de poils, une desquamation de la peau et une altération de la reproduction (Hopewell et al.,1993; Takenaka et al., 2000).

5.5.2 Les acides gras et la résistance à l'insuline

L'altération du métabolisme des lipides contribue de façon considérable à la résistance à l'insuline (McGarry, 2002). L'apparition d'hyperglycémie postprandiale se produit après la détection de la dyslipidémie, ce qui suggère que les modifications du métabolisme des lipides survient bien avant le développement du diabète de type 2 (Lewis et al., 2009). En effet, les acides gras ont un rôle dans la modulation de la résistance à l'insuline (Kusunoki et al., 2006). Le profile des acides gras dans le plasma, le sérum ainsi que dans les érythrocytes reflète la diète et la modulation de la biosynthèse des acides gras (Zhou et al., 2009). Les acides gras sont les constituants majeurs de différentes classes de lipides : triglycérides, phospholipides et esters de cholestérol.

Les acides gras saturés (AGS) sont synthétisés en particulier par le foie, le cerveau et le tissu adipeux et avec ceux de l'alimentation, ils participent de façon importante à la dépense énergétique. Quelques AGS : acides stéarique (C18 :0), palmitique (C16 :0), myristique (C14 :0), acide laurique (C12 :0). Sources majoritaires dans l'alimentation : beurre, viande, fève, fromage, huile de palme, huile de coco. Les AGS augmentent le cholestérol total ainsi que la glycémie (Vessy, 1994; Hughes, 1996). Une des désaturases importantes dans la conversion des AGS en acides gras mono-insaturés (AGMI) est la désaturase $\Delta 9$. Elle convertit les acides gras C16 :0 et C18 :0 respectivement en C16:1n-7 et C18 :1n-9 (Zhou et al., 2009).

Les AGMI comme les AGS proviennent de la synthèse endogène et de l'alimentation. Quelques AGMI : C14:1n-5, C16:1n-7, C18:1n-7, C18:1n-9, C22:1n-9. Sources majoritaires dans l'alimentation : olive, canola, huile d'arachides, avocat et noix.

Les acides gras polyinsaturés (AGPI) sont des dérivés de l'acide linoléique, de l'acide linoléique et de l'acide arachidonique C20:4 n-6. L'acide arachidonique est le substrat des enzymes cyclooxygénase et lipoxygénase; cet acide gras est le précurseur des prostaglandines, des thromboxanes et des leucotriènes (Mamalakis et al., 1998). Les AGPI sont connus pour leur implication dans l'inflammation, l'augmentation de la pression artérielle et dans l'agrégation plaquettaire. Quelques AGPI : Omega 6 : C18:2n-6, C18 :3n6, C20 :3n6, acide arachidonique et ses dérivées dont 22 :4n6, 22 :5n6; Omega 3 : C18 :3n3, EPA ou C20 :5n3, DHA ou 22 :6n3. Les sources majoritaires dans l'alimentation : gras de poisson, huile végétale et margarine liquide hydrogénée. Les AGPI sont en mesure de réduire les maladies cardiovasculaires (Massaro et al.,

2010; Yurko-Mauro K, 2010). Les $\Delta 5$ et $\Delta 6$ sont des désaturases intéressantes permettant d'analyser la production de l'acide arachidonique et l'utilisation de l'acide linoléique puisque $\Delta 5$ convertit l'acide $C_{20:3n-6}$ en $C_{20:4n-6}$ et la $\Delta 6$ convertit $C_{18:2n-6}$ en $C_{18:3n-6}$. Les différents ratios des acides gras nous renseignent sur l'activité des désaturases comme $\Delta 5$, $\Delta 6$ et $\Delta 9$ et leur métabolite.

On connaît un patron du profil lipidique qui indique la présence de la résistance à l'insuline chez les individus et les animaux (Vessby et al., 1994; Laaksonen et al., 2002; Kusunoki et al., 2006).

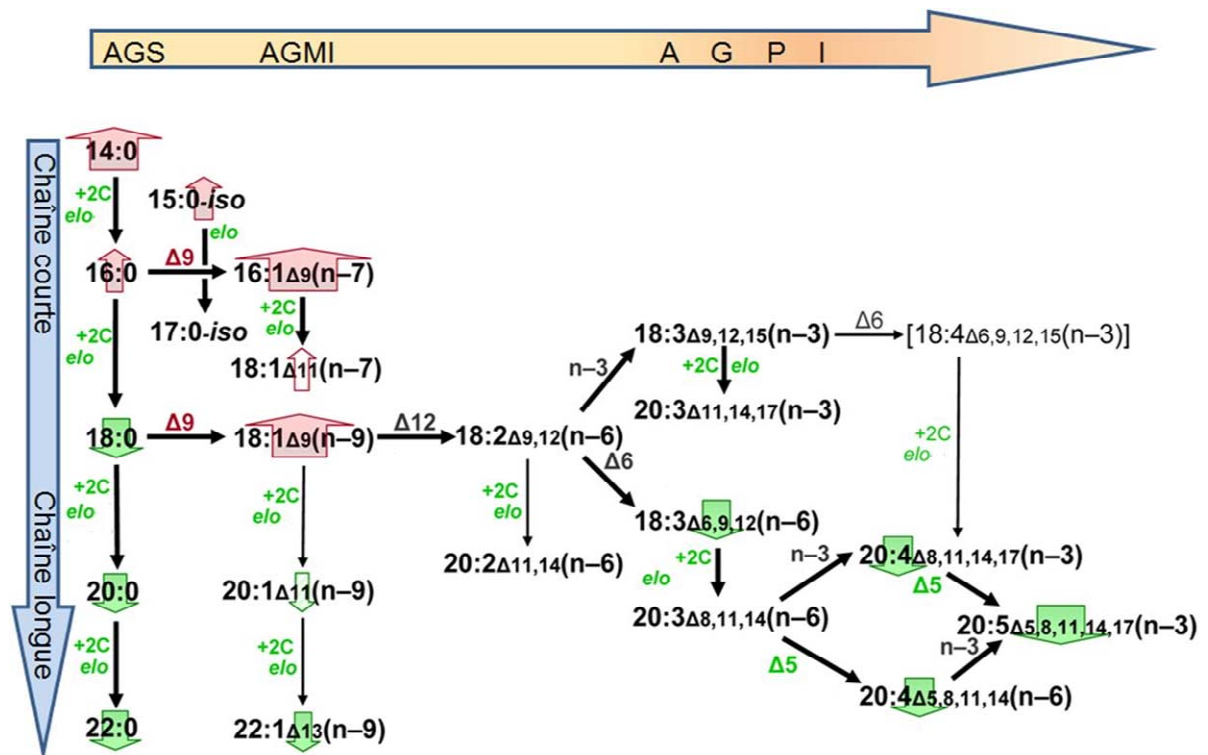


Figure 23. Biosynthèse des acides gras montrant le patron de la résistance à l'insuline dans le plasma.

Adapté selon Shmookler et al., 2011.

Le profil des acides gras suivants est altéré chez les individus insulino-résistants (**Figure 23**).

- 1- Augmentation plasmatique ou tissulaire des acides gras saturés (entre autres de l'acide myristique (C14 :0), de l'acide palmitique (C16 :0)). À jeun, ils sont prédicteurs de dysfonctions dans la glycémie et de diabète de type 2 (Vessby et al., 1994; Laaksonen et al., 2002).
- 2- Augmentation plasmatique ou tissulaire d'acides gras monoinsaturés. Le C16 :1n-7 et le C18 :1n9 sont particulièrement augmentés suite à une diète riche en carbohydrates chez les rongeurs (Miyazaki et al., 2001; Fukuchi et al., 2004; Dias et al., 2011) et les humains (Mangravite, Dawson, Davis, 2007). Ils sont connus pour être positivement lié à la résistance à l'insuline (Kusunoki et al., 2007; Dias et al., 2011). Il y a une forte association entre l'augmentation de la désaturase $\Delta 9$ (16:1n-7/16:0) ou/et $\Delta 9$ (18:1n-7/18:0) et l'indice Homa ainsi qu'avec le tour de taille d'un individu (Vessby, 2000; Zhou et al., 2009)
- 3- Diminution plasmatique ou tissulaire d'acides gras polyinsaturés, en particulier l'acide linoléique C18:2n-6 qui reflète une diminution de l'acide gras γ - linoléique C18 :3n6 lors d'une résistance à l'insuline accentuée. L'acide arachidonique (20:4n-6) diminue aussi et, par conséquent, on observe une augmentation des desaturases $\Delta 6$ (C18:3n-6/C18:2n-6) et une diminution de $\Delta 5$ (20:4n-6/20:3n-6) (Vessby, 2000; Kusunoki et al., 2007).

En résumé, le profil lipidique plasmatique et tissulaire qui signale la résistance à l'insuline correspond à une augmentation des acides gras saturés (C 14:0; C16 :0) et monoinsaturés (C16 :1n-7; C18 :1n9) et à une diminution des acides gras polyinsaturés (C18 :3n-6; C20 :4n-3; C20 :5n-3; C20 :4n-6) (Shomookler et al., 2011) (**Figure 23**).

5.6. Modèle animal de diabète de type 2, syndrome métabolique

La plupart des modèles de rongeur de diabète de type 2 ont le syndrome métabolique. Le syndrome métabolique est une constellation d'anomalies physiologique et biochimique qui se définit par la présence d'au moins 3 des symptômes suivants : obésité surtout obésité abdominale, résistance à l'insuline, hypertension, dyslipidémie et tolérance au glucose (Gupta et al., 2010; Simmons et al., 2010). Ceci comprend :

- 1- Niveau plasmatique élevé de triglycérides
- 2- Niveau plasmatique bas de HDL
- 3- Pression artérielle élevée
- 4- Glycémie à jeun élevée
- 5- Large circonférence de la taille

Voici les modèles d'animaux les plus populaires qui ont permis d'étudier le diabète de type 2 et le syndrome métabolique. Il existe des modèles génétiques et des modèles inductibles du syndrome métabolique. Il faut souligner que dépendamment de l'âge ou de la durée du traitement qui induit le syndrome métabolique, les anomalies métaboliques varient. Dans le tableau qui suit, les symptômes sont indiqués indépendamment de l'âge de l'animal ou de la durée du traitement causant le syndrome métabolique ou le diabète de type 2 (**Tableau 8**).

Tableau 8. Modèles de rongeurs ayant le syndrome métabolique.

Adapté selon la revue Panchal et Brown, 2011

Rongeur	Obésité	Hypertension	Dyslipidémie	Dysfonction cardiaque	Hyperglycémie Intolérance au glucose	Foie gras	Dysfonction rénale	Références
Souris ob/ob	✓	○	○	✓	✓	✓	○	Tarzi al., et 2004
Souris db/db	✓	○	✓	✓	✓	✓	✓	Peppa et al., 2006
Rat ZDF	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Panchal et Brown, 2011
Rat OLETF	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Panchal et Brown, 2011
Rat Gotokakizaki	○	○	✓	✓	✓	✓	✓	Panchal et Brown, 2011
Souris sous diète riche en gras	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Panchal et Brown, 2011
Rat sous diète de fructose	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Panchal et Brown, 2011
Rat sous diète de sucrose	✓	✓	✓	✓	✓	✓	○	Panchal et Brown, 2011
Rat sous diète de glucose	✓	✓	○	○	✓	○	n.d	Pilon et al., 2009, Dias et al., 2011
Rat sous diète riche en gras et en carbohydate	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Ohtomo et al., 2010

Crochet = présence, cercle vide = absence

5.6.1. Modèles génétiques

Les souris ob/ob obèses ont une mutation monogénétique autosomale récessive du gène de la leptine (Enser, 1972).

Les souris db/db et les rats Zucker (ZDF) obèses ont des mutations du récepteur à la leptine (Dong et al., 2010; Scarda et al., 2010).

Les rats Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ont des cellules pancréatiques insensibles à l'action de la cholécystokinine dû à l'absence du récepteur CCK-1 (Moran et al., 2006).

Les rats Goto-Kakizaki sont non obèses, mais ils ont un diabète spontané dû à un problème pendant la gestation qui diminue la néogenèse, la différenciation et la prolifération des cellules β pancréatiques (Portha et al., 2010).

Les rats SHR (Spontaneously hypertensive rats) sont les rats génétiquement modifiés les plus utilisés pour l'étude de l'hypertension. Ces rats exposés à une diète riche en graisse développent une inflammation rénale, l'albuminurie, des taux plasmatiques élevés en cholestérol, triglycérides, insuline et acides gras libres (Chung et al., 2010).

Autres modèles

Le *Nile rat* (*african grass rat*) et le *sand rat* (*Psammomys obesus*) sont des rats sauvages. Dans la nature, ils ne présentent aucun symptôme de diabète de type 2 ou de syndrome métabolique. Cependant, une fois que ces animaux sont gardés en laboratoire avec une diète normale, ils deviennent diabétique et développent l'hyperglycémie, la dyslipidémie l'hyperinsulinémie, la stéatose hépatique, l'hypertension et des dépôts de gras abdominal (Maislos et al., 2006; Noda et al., 2010).

5.6.2. Modèles nutritionnels

Les diètes riches en **carbohydrates** chez l'humain

Le **fructose** est un important ingrédient dans les diètes nord-américaines (Le et Tappy, 2006; Tappy et Le, 2010). Les principales sources de fructose dans la diète sont le sucrose, le sirop de maïs, les fruits et le miel. La consommation per capita de sucrose et de sirop de maïs à haute teneur en fructose (sucre ajouté) a augmenté de 26% entre les années 1970 à 1997 (Elliot et al., 2002), ce qui est confirmé par l'étude sur la consommation de carbohydrates faite entre 1970 et 2006 (Tappy et Le, 2010). La disponibilité (la quantité maximale possible de consommation) de sucre et de sirop de 2006 à 2009/2010 per capita a diminué au Canada et aux États- Unis signalant la sensibilisation des pays à réduire la consommation de sucre dû aux effets néfastes de celui-ci.

Les **diètes riches en gras** (huile de palme, huile d'olive, huile de coco) sont des modèles d'obésité, de dyslipidémie et de la résistance à l'insuline (Panchal et Brown, 2011). En effet, différentes diètes contenant 30 à 78% de graisses en énergie ont été utilisées (Buettner et al., 2006; Hariri et Thibault, 2010) afin de produire l'obésité chez les animaux. Les souris qui

reçoivent une diète riche en graisse sont obèses, hyperglycémiques, hyperinsulinémiques, hyperleptinémiques et ont plusieurs autres complications métaboliques dont l'hypertrophie cardiaque, la fibrose cardiaque, la stéatose hépatique, une dysfonction endothéliale, l'hypertension, l'albuminurie, l'infiltration de macrophages dans la medulla rénale (Woods et al., 2003; Buettner et al., 2006; Deji et al., 2009; Kobayasi et al., 2010).

Les diètes riches en carbohydrates

Différentes concentrations variant de 15% à 68% de carbohydrates (fructose, sucrose, glucose) sont utilisées dans les modèles animaux (Herman et al., 1970, Blakely et al., 1981; Hallfrisch et al., 1979; Elliott et al., 2002; Dias et al., 2011). Les rats traités avec une diète riche en fructose développent des complications similaires aux rats traités au glucose dont la pression artérielle élevée et l'hyperinsulinémie accompagnées de la résistance à l'insuline, de l'intolérance au glucose et la dyslipidémie (Le et Tappy, 2006; Tran et al., 2009). La prise de fructose produit aussi des dysfonctions cardiaques comme la dilatation et l'hypertrophie ventriculaire, la diminution de la fonction contractile du ventricule, l'infiltration de cellules inflammatoires dans le cœur et la stéatose hépatique (Chang et al., 2007; Patel et al., 2009). L'augmentation du stress oxydatif (production de l'anion superoxyde) dans l'aorte et dans le cœur (Delbosc et al., 2005) a aussi été démontrée dans ce modèle. Le fructose induit une augmentation de poids conduisant à l'obésité (Elliot et al., 2002; Bocarsly et al., 2010), une augmentation des niveaux de triglycérides, de leptine, de cholestérol, d'acide gras libres et une résistance à la leptine (Shapiro et al., 2008). Ce modèle animal est aussi connu pour avoir des dysfonctions rénales dont des lésions rénales et, l'hyperplasie des tubules proximaux rénaux (Nakayama et al., 2010).

Les animaux recevant des **diètes riches en sucrose** se comportent de façon similaire aux rats recevant du fructose puisque la molécule de sucrose contient le fructose et le glucose. Le sucrose induit la lipogenèse chez les rats et augmente les niveaux plasmatiques en glucose, insuline, leptine, triglycérides, acides gras libres, l'intolérance au glucose (Lombardo et al., 1996; Coelho et al., 2010) et augmente la masse du ventricule gauche (Sharma et al., 2008). De plus, le sucrose induit l'hypertension et la stéatose hépatique (Huang et al., 2010). Par contre, aucun changement n'a été observé selon Andrews et collaborateurs en 1992 dans la fonction rénale chez des rats Wistar Kyoto. Une augmentation de l'albuminurie dans les urines et une hypertrophie glomérulaire ont été démontrées chez les rats Dahl hypertendus traités pendant 27 semaines au

sucrose (Konda et al., 2005). Les rats qui ingèrent du sucrose de façon chronique développent une diminution de la conduction nerveuse dans le nerf sciatique et une diminution du calibre axonal due à la déplétion de myo-inositol, un signe de neuropathie (Nakamura et al., 1997; Kamenov et al., 2006). L'ingestion chronique de galactose chez des rats ou des souris produit une déficience dans la vitesse de conduction nerveuse du nerf sciatique, un signe de neuropathie (Calcutt et al., 1990; Willars et al., 1991; Kalichman et al., 1998).

Les **rats traités au glucose** ont été beaucoup moins étudiés que les modèles au fructose et au sucrose. Le modèle de 10% de D-glucose a été décrit pour la première fois en 2002; l'étude de El Midaoui et De Champlain a démontré des complications diabétiques chez les rats traités au glucose pendant 3 semaines. Les auteurs ont démontré un nouveau modèle de résistance à l'insuline et l'on comparé au modèle de rats traités au fructose (Hwang et al., 1987). Les rats traités au glucose développent plusieurs des mêmes complications que l'on retrouve chez les rats traités au fructose et au sucrose comme l'hypertension, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, une augmentation de stress oxydatif (production de l'anion superoxyde) dans l'aorte et dans le cœur et des allodynies tactile et au froid (El midaoui, 2002; El Midaoui et al, 2005; Lungu et al, 2007; Dias et al., 2007; Dias et al., 2010; Dias et al., 2011). La diminution de la media de l'aorte a été rapportée dans ce modèle (El Midaoui et al., 2011). Toutefois aucune dysfonction cardiaque ou rénale et pas de signe d'hypertrophie cardiaque ou vasculaire ou de fibrose cardiaque n'ont été mesurés malgré un rein plus petit (Pilon et al., 2009).

Les **diètes mixtes riches en carbohydrates et en gras** sont beaucoup plus représentatives de la diète nord-américaine. La source de gras dans ces diètes mixtes varie et les carbohydrates les plus utilisés sont le fructose et le sucrose (concentration variant de 10 à 30%) tandis que les concentrations de gras varient de 20 à 40% (Murase et al., 2001; Sato et al., 2010). Les rongeurs sous ces diètes développent une augmentation du poids corporel, des dépôts de gras abdominal, l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie, l'hyperleptinémie, la stéatose hépatique (Parekh et al., 1998; Murase et al., 2001; Sato et al., 2010) et d'autres anomalies similaires aux rats traités avec une diète riche en carbohydrates ou en gras.

5.6.3. Kinines et obésité

Très peu est connu sur l'implication des kinines dans l'obésité. Il n'y a que 4 articles sur pubmed incluant l'article de cette thèse. En résumé, l'enalapril (IECA) est en mesure de réduire les niveaux de leptine, de la prise alimentaire, la graisse corporelle et le gain de poids chez des rats normotendus (Santos et al., 2008). Les souris ob/ob obèses ont une surexpression du B₁R dans les adipocytes, l'hypothalamus, le foie, l'aorte abdominale et l'estomac; par contre, le B₂R semble être faiblement exprimé dans les adipocytes et l'hypothalamus (Abe et al., 2007). Les souris déficientes pour le récepteur B₁R ont moins de contenu en graisse, elles présentent une hypoleptinémie, une augmentation de la sensibilité à la leptine et elles sont protégées contre la prise alimentaire et le gain de poids suite à la consommation d'une diète riche en graisse. Aussi, après un traitement avec l'antagoniste SSR240612 pendant plusieurs semaines, les souris sous une diète riche en graisse ont une diminution du gain de poids et de la consommation de nourriture. De plus, les souris ob/ob-B₁R(-/-) sont plus sensibles à la leptine exogène que les souris ob/ob, ce qui suggère que le B₁R contribue à l'obésité (Mori et al., 2008). Chez le rat traité au glucose, le blocage pendant une semaine du B₁R avec le SSR240612 n'affecte pas les niveaux plasmatiques de la leptine, mais permet de diminuer le gain de poids ainsi que le pourcentage de graisse corporelle et la masse grasse de l'épididyme et contribue à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline reflétée par les changements sur le profil des acides gras plasmatiques (Dias et Couture, 2011).

Chapitre 6 : Troisième article

6.1. Hypothèse : L'obésité, un état inflammatoire, est un facteur de risque de la résistance à l'insuline. En effet, l'augmentation de la masse grasse et des changements dans le profil lipidique ont été documentés dans des modèles de résistance à l'insuline chez le rat. Le B₁R pourrait contribuer à l'obésité ainsi qu'à l'inflammation adipocytaire dû à sa participation dans la résistance à l'insuline et l'inflammation.

6.2. Objectifs : Étudier la présence de l'obésité chez le rat traité au glucose pendant 12 semaines et l'effet du SSR240612 sur le profil lipidique plasmatique, sur l'obésité et sur l'inflammation adipocytaire de ces rats.

6.3. Approche expérimentale : (1) Le SSR240612 a été administré par gavage à une dose de 10 mg/kg/jour pendant 7 jours lors de la dernière semaine avant le sacrifice des rats qui ont reçu 10% glucose dans l'eau de boisson depuis 12 semaines. La composition corporelle des rats a été mesurée par EchoMRI tandis que les acides gras plasmatiques ont été analysés par HPLC. Les adipocytes ont été prélevés 3h après le dernier traitement au SSR240612 et l'expression (protéique et ARNm) de marqueurs inflammatoires a été mesurée par western blot et par PCR en temps réel.

6.4. Publication

Cette étude a fait l'objet d'une publication: **Jenny Pena Dias** and Réjean Couture. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab.* (2012) Mar;14(3):244-53.

Blockade of kinin B₁ receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance

J. P. Dias & R. Couture

Aim: Kinin B₁ receptor (B₁R) contributes to insulin resistance through a mechanism involving oxidative stress. This study examined the effect of B₁R blockade on the changes in plasma fatty acids composition, body and tissue fat mass and adipose tissue inflammation that influence insulin resistance.

Methods: Sprague–Dawley rats were fed with 10% D-glucose or tap water (Control) for 13 weeks and during the last week, rats were administered the B₁R antagonist SSR240612 (10 mg/kg/day, gavage) or vehicle. The following parameters were assessed: plasma fatty acids (by gas chromatography), body composition (by EchoMRI), metabolic hormone levels (by radioimmunoassay), expression of B₁R and inflammatory markers in adipose tissue (by Western blot and qRT-PCR).

Results: Glucose feeding significantly increased plasma levels of glucose, insulin, leptin, palmitoleic acid (16:1n-7), oleic acid (18:1n-9), $\Delta 6$ and $\Delta 9$ desaturases while linoleic acid (18:2n-6), arachidonic acid (20:4n-6) and $\Delta 5$ desaturase were decreased. SSR240612 reduced plasma levels of insulin, glucose, the homeostasis model assessment index of insulin resistance, palmitoleic acid and n-7 family. Alterations of $\Delta 5$, $\Delta 6$ and $\Delta 9$ desaturases were normalized by SSR240612. The B₁R antagonist also reversed the enhancing effect of glucose feeding on whole body and epididymal fat mass and on the expression of macrophage CD68, interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and inducible nitric oxide synthase in retroperitoneal adipose tissue. B₁R protein and mRNA were not detected in retroperitoneal adipose tissue.

Conclusion: Insulin resistance in glucose-fed rats is associated with low state inflammation in adipose tissue and plasma fatty acids changes which are reversed by B₁R blockade. These beneficial effects may contribute to insulin sensitivity improvement and the prevention of obesity.

Keywords: adipose tissue, fatty acids, inflammation, insulin resistance, Kinin B₁R, obesity

Date submitted 9 June 2011; date of first decision 18 July 2011; date of final acceptance 14 October 2011

Introduction

Kinins are pro-inflammatory peptide mediators, which act through the activation of two G-protein-coupled receptors (R), named B₁ and B₂. The natural agonists for the constitutive B₂R are Bradykinin (BK) and Lys-BK, whereas the kininase I metabolites des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK are the endogenous ligands for the B₁R.[1]. The B₁R has a low level of expression in healthy subjects; it is induced and overexpressed after exposure to pro-inflammatory cytokines [interleukin-1 β (IL-1 β), tumour necrosis factor (TNF- α)], bacterial endotoxins, hyperglycaemia-induced oxidative stress and activation of the transcriptional nuclear factor kappa B (NF- κ B) [2,3]. In turn, B₁R activation stimulates the release of IL-1 and TNF- α from murine macrophages [4] on which it is expressed [5]. Several lines of evidence support the hypothesis that B₁R blockade modifies the inflammatory response [6,7].

Recently, we reported that insulin resistance and the associated complications (hyperglycaemia, hyperinsulinemia, hypertension and pain polyneuropathy) could be reversed by blockade of kinin B₁ receptor in glucose-fed rats [8,9]. This model of insulin resistance displayed higher tissue expression levels of B₁R and enhanced production of superoxide anion (O₂^{•-}) in the heart and aorta [9–12]. B₁R overexpression, the enhanced oxidative stress and insulin resistance were prevented by antioxidant diets in glucose-fed rats, supporting a link between the upregulation of B₁R, the oxidative stress and diabetic complications [11–12]. This possibility was directly addressed in studies showing that the oxidative stress (O₂^{•-} production) was reversed by the B₁R antagonist, SSR240612, and further enhanced by B₁R agonist in aorta of glucose-fed rats [9].

Obesity associated with excess weight is a major risk factor of insulin resistance, diabetes, cardiovascular diseases and co-morbidities [13,14]. Weight gain and physiological changes in body fat and plasma-tissue lipid profile have been well documented in fructose and sucrose-fed rat models of metabolic syndrome [13,15–17]. Notable changes in liver and plasma fatty acids composition were shown in insulin

resistance, including higher proportion of saturated fatty acid (SAT) and palmitoleic acid (16:1n-7) as monounsaturated fatty acid (MUFA) vs. a lower proportion of linoleic acid (18:2n-6) as polyunsaturated fatty acid (PUFA) [18,19]. The role played by B₁R in the onset of obesity and alteration of fatty acids profile during insulin resistance is, however, completely unknown.

Weight gain involves the overproduction of various adipocytokines (e.g. IL-1 β , TNF- α , IL-6 and leptin) as markers of inflammation, which contribute to insulin resistance [20–22]. IL-1 β , TNF- α could trigger the expression of B₁R which in turn can amplify the inflammatory process by increasing the further production of pro-inflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS) from macrophages and adipocytes. Thus, blockade of B₁R could inhibit this positive feedback loop and the associated insulin resistance. Moreover, most pro-inflammatory genes [inducible nitric oxide synthase (iNOS), cytokines and B₁R] are expected to be upregulated following the stimulation of the NF- κ B pathway by ROS during hyperglycaemia. ROS is considered as an additional target for B₁R antagonist as documented earlier [9].

This study was undertaken to examine the effect of 1-week treatment with the kinin B₁R antagonist SSR240612 on the changes in plasma fatty acids composition, body and tissue fat mass, and in the expression of various markers of inflammation in retroperitoneal adipose tissues using the rat model of insulin resistance induced by high glucose feeding.

Materials and Methods

Model of Insulin Resistance

All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of our University (CDEA approved protocol: 09-066).

Young male Sprague–Dawley rats (3 weeks old) purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, Qc, Canada) were housed two per cage under controlled conditions of temperature (22 °C) and humidity (43%) on a 12-h light–dark cycle and allowed free access to normal chow diet and tap water (control rats) or 10% D-glucose in the drinking water for a period of 13 weeks.

Experimental Protocol

This study used four groups of rats: control (tap water), D-glucose + vehicle, control + SSR240612 (B₁R antagonist), D-glucose + SSR240612 (B₁R antagonist). The dose of 10 mg/kg SSR240612 was administered by gavage once a day for 7 days (10:00 hours) in control and 12-week glucose-fed rats. At the end of the treatment, overnight-fasted rats (glucose solution was also replaced by tap water) were euthanized by CO₂ inhalation 3 h after the last treatment with SSR240612. Then blood samples, thoracic aorta, retroperitoneal and epididymal adipose tissues were collected, weighted and stored at –80 °C for biochemical analyses. The dose of 10 mg/kg of SSR240612 reversed hypertension and neuropathic pain in this model and was selected in this study [8,9].

Physiological Parameters

Body weight and body length (nose to anus) were measured at the beginning and prior to sacrifice to assess the body mass index [body weight (g)/body length (cm)]. Food intake and water intake were measured daily. Rectal temperature (°C) was also measured daily using a digital thermometer lubricated with a smear of xylocaine jelly (lidocaine) from AstraZeneca Canada (Mississauga, ON, Canada).

Body Composition

Whole body composition (fat mass, lean mass and total body water) was determined in awake rats by using nuclear magnetic resonance technology with EchoMRI700™ instrument (Echo Medical Systems, Houston, TX, USA) before and at the end of the 7-day treatment with SSR240612. Data were analysed by the manufacturer's software Windows XP Professional Edition, Microsoft.

Plasma Analysis

Blood samples from fasted rats were centrifuged at 600 g for 15 min at 4 °C and plasma stored at –20 °C until lipid extraction, insulin and leptin measurements. Plasma insulin and leptin concentrations were determined by radioimmunoassay (RIA) using the double antibody/polyethylene glycol technique (Rat Insulin RIA Kit, Rat Leptin RIA Kit) from Linco Research (St-Charles, MO, USA). Plasma glucose concentration was determined with a glucometer Accu-chek from Roche (Laval, Qc, Canada). The homeostasis model assessment index (HOMA) was used as an index of insulin resistance and calculated with the following formula: [insulin (μ U/ml) \times glucose (mM)/22.5] [23].

Extraction of Lipids and Assay of Fatty Acids

Fatty acids in whole plasma were assayed by a method described previously [24,25]. Briefly, total lipids in each 100 μ l sample to be analysed were subjected to direct transesterification and then injected into a gas chromatograph by using a WCOT-fused silica capillary column (90 m \times 0.32 mm) VF-23ms coated with 0.25 μ m film thickness from Varian Canada (Mississauga, ON, Canada).

Western Blot Analysis

Western blot analysis of protein expression was performed as described [26]. After sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, the separated proteins were electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) at 100 V for 1 h. After transfer, the membranes were washed twice in PBS-Tween 20 and incubated in phosphate buffered saline containing 5% skim milk at room temperature for 1 h. The blots were cut in pieces according to the molecular weight of the protein and then incubated with the specific antibodies for B₁R (1/1000) developed in our laboratory [27], IL-1 β (1/500, Sc-74135), iNOS (1/1000, Sc-7271), macrophage CD68 (MAB 1435, 1/200), dynein (1/5000, Sc-13524) β -actin (1/10 000, A-5441) and in PBS-Tween 20 at

4 °C overnight. Dynein and β -actin were used as internal standard proteins. After three washings in PBS-Tween 20 buffer, the membranes were incubated for 1 h at room temperature in PBS-Tween 20 containing 5% milk with secondary antibody, namely donkey anti-rabbit (1/5000, Sc-2077) and goat anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (1/5000, Sc-2005). The blots were then washed three times with PBS-Tween 20 before the reaction with enhanced-chemiluminescence Western blotting detection reagents (Super-Signal[®], Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A quantitative analysis of the protein was performed by densitometric scanning of the autoradiographs employing the enhanced laser densitometer LKB Ultrascan XL and quantified using the gel-scan XL evaluation software (version 2.1) from Pharmacia (Baie d'Urfé, Qc, Canada). Antibodies were purchased from Santa Cruz biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) except CD68 from Millipore (Billerica, MA, USA) and β -actin from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA).

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

Approximately 60 mg of retroperitoneal adipose tissue was isolated from rats *post-mortem*, put in RNAlater stabilisation reagent from QIAGEN (Valencia, CA, USA) and frozen at -56 °C with liquid nitrogen. Total RNAs were extracted from tissue according to the manufacturer's instructions. PCR conditions were described elsewhere [28] and the primers are: B₁R Gen Bank (NM_030851) B₁R Forward: 5'GCA GCG CTT AAC CAT AGC GGA AAT3', position: 367–391, B₁R Reverse: 5'CCA GTT GAA ACG GTT CCC GAT GTT3', position: 478–454; Interleukin-1 β Gen bank (NM_031512)

Interleukin-1 β Forward: 5'TGT CAC TCA TTG TGG CTG TGG AGA3', position: 247–270, Interleukin-1 β Reverse: 5'TGG GAA CAT CAC ACA CTA GCA GGT3', position: 411–388; iNOS Gen bank (BC144126.1) iNOS Forward: 5'GCG TTA CTC CAC CAA CAA TGG CAA3', position: 877–900, iNOS Reverse: 5'ATA CCG GAT GAG CTG AGC ATT CCA3', position: 985–962. TNF- α Gen bank (NM_012675) TNF- α Forward: 5'ATG ATC CGA GAT GTG GAA CTG GCA3', position: 163–180, TNF- α Reverse: 5'AAT GAG AAG AGG CTG AGG CAC AGA3', position: 257–234; 18S Gen bank (X01117) 18S Forward: 5'TCA ACT TTC GAT GGT AGT CGC CGT3', position: 363–386, 18S Reverse: 5'TCC TTG GAT GTG GTA GCC GTT TCT3', position: 470–447.

Statistical Analysis

All data were presented as mean \pm s.e.m. of values obtained from *n* rats. Statistical significance of differences between the four groups were determined by using either one-way ANOVA followed by the *post-hoc* Bonferonni test (figures 1–3 and Table 1) or the nonparametric Tukey test and unpaired Student's *t*-test (Tables 2–4). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 5 Windows (San Diego, CA, USA). Only p value of less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

Main Phenotype of High Glucose Feeding Rats

Rats fed with 10% D-glucose for 13 weeks displayed insulin-resistance (as reflected by 4.8-fold increase of the HOMA

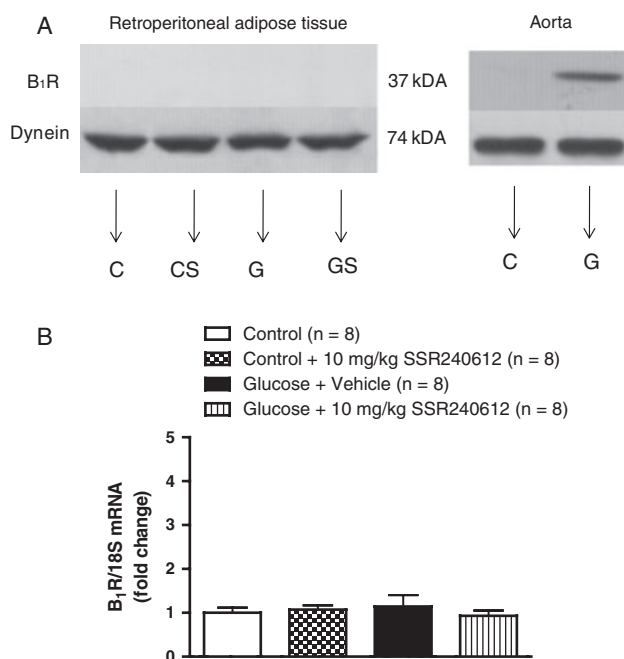


Figure 1. Levels of B₁R (A) protein and (B) mRNA expression in retroperitoneal adipose tissue isolated from rats in the control (C), control + SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days) (CS), glucose + vehicle (G) and glucose + SSR240612 (GS) groups. In (A), Western blot analysis shows the presence of B₁R protein expression in the aorta but not in adipose tissue. In (B), qRT-PCR data represent the mean \pm s.e.m. of values obtained from 8 rats per group. There was no statistical significance difference between the groups.

Table 1. Effect of 1-week B₁R blockade on physiological and metabolic parameters in glucose-fed rats.

Parameters	Control + vehicle	Control + SSR240612	Glucose + vehicle	Glucose + SSR240612
Plasma glucose (mmol/l)	5.8 ± 0.1	5.3 ± 0.2	7.4 ± 0.1*	5.8 ± 0.2†
Plasma insulin (ng/ml)	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.2	5.7 ± 0.7***	1.6 ± 0.2††
HOMA (index)	0.4 ± 0.1	0.3 ± 0.1	1.9 ± 0.2***	0.4 ± 0.1†††
Plasma leptin (ng/ml)	7.3 ± 1.0	7.7 ± 1.0	12.5 ± 1.5*	13.2 ± 2.2*
Body weight (g)	589.6 ± 15.6	575.8 ± 10.4	598.1 ± 11.4	597.1 ± 19.8
Body mass index	22.1 ± 0.5	21.8 ± 0.4	23.0 ± 0.6	23.3 ± 0.5
Body weight gain (g)	9.9 ± 4.7	0.5 ± 4.2	16.4 ± 4.3	1.3 ± 5.1†
Body fat mass (g)	90.9 ± 3.9	97.1 ± 7.4	120.0 ± 6.9**	124.3 ± 10.7**
Body fat gain (%)	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.3	1.7 ± 0.6*	0.3 ± 0.2†
Body lean mass (g)	413.4 ± 5.7	407.3 ± 7.2	400.7 ± 9.4	398.8 ± 8.4
Body lean gain (%)	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.2	0.3 ± 1.2	0.5 ± 0.4
Body total water (g)	325.1 ± 6.2	322.8 ± 5.2	319.6 ± 7.3	319.0 ± 7.2
Body total water gain (%)	-0.4 ± 0.3	-0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.7	-0.1 ± 0.3
Epididymal fat mass (g)/100 g of BW	0.84 ± 0.05	0.87 ± 0.06	1.1 ± 0.1**	0.84 ± 0.04††
Food intake (g/day)	31.2 ± 0.3	30.8 ± 0.4	22.3 ± 0.9**	21.5 ± 0.5**
Drinking (ml/day)	56.9 ± 1.9	57.2 ± 2.1	121.2 ± 4.8***	119.3 ± 7.1***
Rectal temperature (°C)	36.9 ± 0.3	36.6 ± 0.2	36.5 ± 0.2	36.7 ± 0.4

Data are mean ± s.e.m of values obtained from eight rats in each group. BW, body weight; HOMA, homeostasis model assessment index. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *†p < 0.05; **††p < 0.01; ***†††p < 0.001.

Table 2. Effect of 1-week B₁R blockade on saturated, monounsaturated and trans plasma fatty acids in glucose-fed rats.

Fatty acid	Control + vehicle %	Control + SSR240612 %	Glucose + vehicle %	Glucose + SSR240612 %
Saturated				
C14:0	0.46 ± 0.05	0.43 ± 0.03	1.06 ± 0.07***	0.73 ± 0.03***†††
C15:0	0.34 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.01*
C16:0	22.56 ± 1.37	23.31 ± 0.54	26.14 ± 0.41*	25.84 ± 0.74
C17:0	0.38 ± 0.03	0.35 ± 0.02	0.18 ± 0.02***	0.20 ± 0.02***
C18:0	8.69 ± 0.42	9.79 ± 0.78	9.59 ± 0.62	8.38 ± 0.58
C19:0	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01***	0.05 ± 0.00***
C20:0	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.08 ± 0.01
C22:0	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.01
C24:0	0.33 ± 0.06	0.36 ± 0.07	0.35 ± 0.07	0.26 ± 0.03
Monounsaturated				
C12:1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
C13:1	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.02 ± 0.00
C14:1n-5	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.00	1.00 ± 0.01***	0.06 ± 0.01†††
C16:1Tn-7	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C16:1n-7	1.19 ± 0.28	2.03 ± 0.11	7.07 ± 0.66***	4.61 ± 0.60***††
C17:1	0.11 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.11 ± 0.01	0.13 ± 0.01
C18:1n-7	2.25 ± 0.21	2.48 ± 0.21	4.83 ± 0.55***	3.52 ± 0.14*†
C18:1n-9	12.43 ± 0.94	12.93 ± 0.49	16.83 ± 0.70**	18.87 ± 0.76***
C20:1n-9	0.34 ± 0.01	0.27 ± 0.03	0.22 ± 0.02	0.21 ± 0.02
C20:1n-12	0.14 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.01***	0.05 ± 0.01***
C22:1n-9	0.48 ± 0.19	0.24 ± 0.03	0.77 ± 0.18	0.83 ± 0.26
C24:1n-9	0.71 ± 0.09	0.54 ± 1.00	0.82 ± 0.11	0.62 ± 0.07
Trans				
C18:2Tn-6	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00

The values of C7:0 to C13 were lower than 0.07% and not significantly different amongst groups. Data are mean ± s.e.m of values obtained from eight rats in each group. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *†p < 0.05; **††p < 0.01; ***†††p < 0.001.

index) and significant increases in plasma levels of glucose (1.3-fold), insulin (4.3-fold) and leptin (1.7-fold). No significant changes were detected in body weight, body mass index, lean mass, total water and body temperature as compared with age-matched control rats (Table 1). Nevertheless, increased

adiposity was present in glucose-fed rats as reflected by significant increases of the whole body and epididymal fat mass. Glucose-fed rats also exhibited a significant increase in drinking behaviour, which was compensated by a reduction of food intake (Table 1).

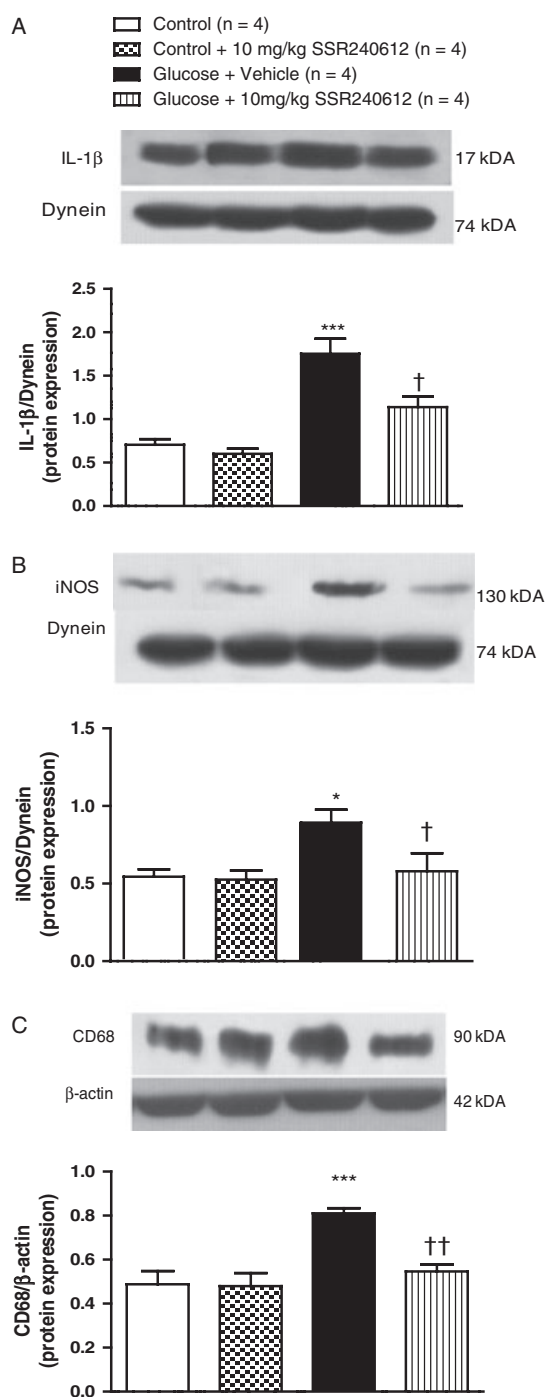


Figure 2. Levels of interleukin-1 β (IL-1 β) (A), inducible nitric oxide synthase (iNOS) (B) and CD68 (C) protein expression in retroperitoneal adipose tissue isolated from rats in the control and glucose-fed groups treated with vehicle or SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days). Data are mean \pm s.e.m of values obtained from four rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *†p < 0.05, ††p < 0.01, ***p < 0.001.

Effect of Kinin B₁R Blockade for 1 Week on Physiological Parameters

One-week treatment with SSR240612 reduced significantly or normalized hyperglycaemia, hyperinsulinemia, insulin

resistance, body weight gain, body fat gain and epididymal fat mass in glucose-fed rats. However, the B₁R antagonist failed to affect plasma levels of leptin, food and water consumption changes induced by glucose feeding. SSR240612 had no significant effect on any parameters in control rats (Table 1).

Effect of Glucose Loading on Plasma Fatty Acid Composition

Changes of plasma fatty acid levels in rats after 13 weeks of glucose loading are shown in Tables 2 and 3. The major components of plasma fatty acids detected were 16:0, 18:0, 16:1n-7, 18:1n-7, 18:1n-9, 22:6n-3, 18:2n-6 and 20:4n-6. Among them, SAT 14:0 and 16:0 were significantly increased in glucose-fed rats while 18:0 was unchanged. Glucose loading induced a significant increase in 20:3n-6 and MUFA (14:1n-5, 16:1n-7, 18:1n-7, 18:1n-9), yet it caused a significant decrease in PUFA (22:6n-3, 18:2n-6 and 20:4n-6). Indeed, n-7 and n-9 family and MUFA were increased contrarily to n-3 and n-6 family and PUFA which were decreased (Table 3). The other fatty acids presented in Table 2 had values less than 0.5% and were not affected by glucose feeding. The 1-week treatment with SSR240612 in glucose-fed rats decreased significantly 14:0, 16:1n-7, 18:1n-7, consequently n-7 family and 20:3n-6 when compared to rats treated with glucose + vehicle. SSR240612 increased 18:2n-6 (linoleic acid), reduced to control values 16:0 (palmitate) and increased to control values the anti-inflammatory marker (22:6n-3 or docosahexaenoic acid) and the precursor of inflammatory eicosanoids (20:4n-6 or arachidonic acid). Hence, predominant plasma fatty acid alterations that reflect insulin resistance were improved after B₁R blockade in glucose-fed rats.

Ratio of Fatty Acids

Glucose loading significantly increased the ratio of various families of fatty acids considered as a good index of insulin resistance [n-7 family/18:2n-6, Δ 6 desaturase (18:3n-6/18:2n-6), Δ 9 desaturase (16:1n-7/16:0)]. This is consistent with the significant decrease in PUFA/SAT and Δ 5 desaturase (20:4n-6/20:3n-6) (critical enzyme that produces 20:4n-6 in the body). One-week treatment with SSR240612 reversed or tended to normalize the effect of glucose intake on these ratios (Table 4).

Expression of B₁R and Other Markers of Inflammation in Retroperitoneal Adipose Tissue

Data show undetectable levels of B₁R mRNA and protein expression in retroperitoneal adipose tissue of glucose-fed rats, yet B₁R protein expression was up-regulated in the aorta of the same rats (figure 1). In glucose-fed rats, protein expression levels of IL-1 β , iNOS and CD68 macrophage were significantly enhanced in adipose tissue and significantly reduced or normalized by the 1-week treatment with SSR240612 (figure 2). Likewise, SSR240612 corrected the enhanced mRNA expression levels of IL-1 β , iNOS and TNF- α in retroperitoneal tissue of glucose-fed rats (figure 3). In contrast, the B₁R antagonist had no significant effect on protein or mRNA expression on any of those inflammatory markers in control adipose tissue (figures 2, 3).

Table 3. Effect of 1-week B₁R blockade on Omega 3, 6, 9, saturated, monounsaturated and polyunsaturated plasma fatty acids in glucose-fed rats.

Fatty acid	Control + vehicle %	Control + SSR240612 %	Glucose + vehicle %	Glucose + SSR240612 %
Omega 3				
C18:3n-3	0.47 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.23 ± 0.02***	0.27 ± 0.04
C20:3n-3	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
C20:5n-3 EPA	0.98 ± 0.16	0.83 ± 0.14	0.70 ± 0.07	0.55 ± 0.06
C22:5n-3 DPA	0.69 ± 0.08	0.86 ± 0.07	0.56 ± 0.05	0.48 ± 0.04
C22:6n-3 DHA	5.60 ± 0.38	5.09 ± 0.26	3.77 ± 0.19***	3.84 ± 0.18
Omega 6/9				
C18:2n-6	20.10 ± 0.83	19.79 ± 0.92	10.90 ± 0.78***	13.87 ± 1.09***†
C18:3n-6	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.17 ± 0.02
C20:2n-6	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.01
C20:4n-6	17.34 ± 1.60	14.94 ± 1.46	11.70 ± 0.92*	12.63 ± 0.92
C22:2n-6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00
C20:3n-6	0.57 ± 0.04	0.56 ± 0.03	1.00 ± 0.07***	0.76 ± 0.06†
C22:4n-6	0.16 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01
C20:3n-9	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
n-3 FAMILY	7.76 ± 0.60	7.19 ± 0.23	5.26 ± 0.23***	5.15 ± 0.21***
n-6 FAMILY	40.75 ± 1.30	35.34 ± 2.33	24.13 ± 1.36***	27.12 ± 1.58***
n-7 FAMILY	3.18 ± 0.66	4.64 ± 0.28	12.01 ± 1.15***	8.26 ± 0.71***††
n-9 FAMILY	14.01 ± 0.73	14.28 ± 0.47	18.60 ± 0.58**	20.67 ± 0.48***
SATURATED	33.55 ± 1.12	32.81 ± 0.54	35.71 ± 0.74	35.08 ± 0.71
MUFA	22.23 ± 0.62	20.38 ± 0.70	26.68 ± 1.13**	27.69 ± 0.89***
PUFA	42.76 ± 0.56	41.65 ± 2.34	29.80 ± 1.37***	32.57 ± 1.76***
TRANS	0.35 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.05	0.20 ± 0.03

Data are mean ± s.e.m of values obtained from eight rats in each group. MUFA, monounsaturated fatty acid; PUFA, polyunsaturated fatty acid. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *†p < 0.05; **†p < 0.01; ***p < 0.001.

Table 4. Effect of 1-week B₁R blockade on ratio of plasma fatty acids in glucose-fed rats.

Fatty acid	Control + vehicle Ratio	Control + SSR240612 Ratio	Glucose + vehicle Ratio	Glucose + SSR240612 Ratio
FAMILY n-7/18:2n6	0.21 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.92 ± 0.12***	0.59 ± 0.06††
24:0/22:0	1.87 ± 0.11	2.09 ± 0.20	1.53 ± 0.09*	1.52 ± 0.11
24:0/20:0	3.73 ± 0.48	4.02 ± 0.38	3.11 ± 0.41	1.91 ± 0.21†
PUFA/SAT	1.38 ± 0.07	1.20 ± 0.05	0.86 ± 0.04***	0.90 ± 0.03
EPA/DHA	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02
DHA/AA	0.25 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.02
ALA/LA	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
n-6/n-3	5.90 ± 0.32	5.93 ± 0.37	6.06 ± 0.51	5.46 ± 0.24
Δ6 : 18 : 3n-6/18:2n-6	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00***	0.01 ± 0.00††
Δ9 : 16 : 1n-7/16:0	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.02***	0.16 ± 0.01***†
Δ5 : 20 : 4n-6/20:3n-6	31.26 ± 3.64	27.70 ± 3.76	12.06 ± 1.49***	16.98 ± 1.41†

Data are mean ± s.e.m of values obtained from 12 rats in each group. PUFA, polyunsaturated fatty acid; SAT, saturated fatty acid. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *†p < 0.05; ††p < 0.01; ***p < 0.001.

Discussion

This study provides compelling evidence that the pharmacological blockade of B₁R decreased several inflammatory markers of obesity and insulin resistance in glucose-fed rats. The loss of body weight gain and fat mass gain with SSR240612 in glucose-fed rats was associated with a reduction of plasma MUFA (contributing to insulin resistance) [19] and the partial reestablishment of n-7 family of fatty acids and C18:2n6. These beneficial effects of SSR240612 were not because of interference with glucose consumption and were unlikely related to a central mechanism involving leptin as the

circulating level of this adipocytokine and food consumption remained unaltered. Data rather suggest a peripheral inflammatory mechanism at the level of the adipose tissue. Indeed, pro-inflammatory cytokines and pro-inflammatory genes (e.g. iNOS) were overexpressed in retroperitoneal adipose tissue which is consistent with a low grade state of inflammation reported in insulin resistance and obesity preceding the diabetic state. The reversal of this phenomenon with SSR240612 can account for the loss of body fat and inhibition of insulin resistance. Cytokines such as TNF-α and IL-1β activate JNK and the NF-κB intracellular signalling pathway

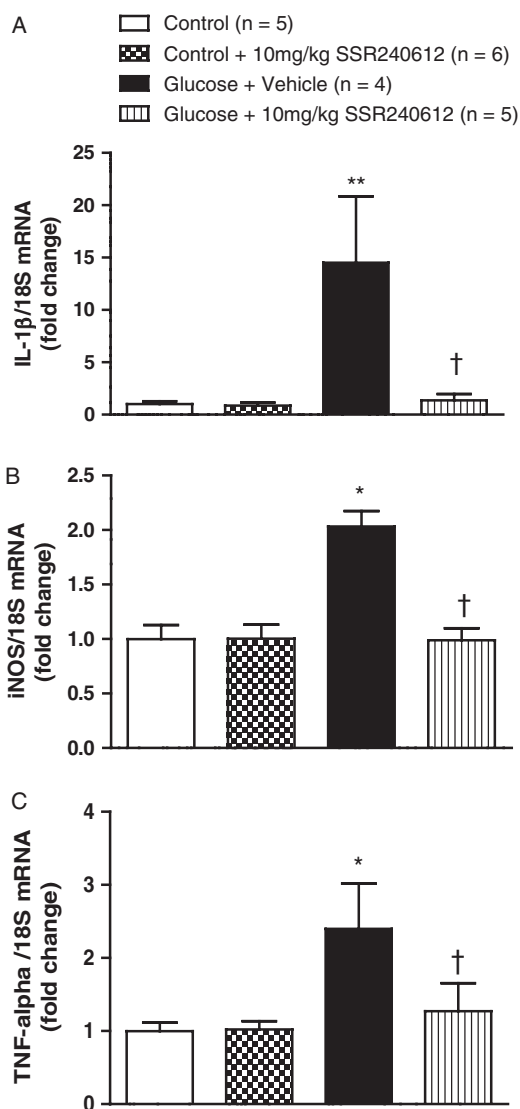


Figure 3. Levels of interleukin-1 β (IL-1 β) (A) inducible nitric oxide synthase (iNOS) (B) and tumour necrosis factor (TNF- α) (C) mRNA expression in retroperitoneal adipose tissue isolated from rats in control and glucose-fed groups treated with vehicle or SSR240612 (10 mg/kg/day for 7 days). Data are mean \pm s.e.m of values obtained from four rats. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats + vehicle (†) is indicated by *† $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

through classical receptor-mediated mechanisms that promote insulin resistance [29].

The absence of B₁R on adipocytes suggests an indirect effect. The exact mechanism by which SSR240612 decreases pro-inflammatory genes is unknown and could be mediated by the inhibition of oxidative stress that may involve the infiltration of macrophages.

Link between Kinin B₁R, Plasma Lipid Profile and Insulin Resistance

The contribution of B₁R in fatty acids metabolism has never been studied thus far. Analysis of individual fatty acid

components in the plasma of glucose-fed rats shows an increase in palmitoleic acid (16:1n-7) and oleic acid (18:1n-9) and a decrease in linoleic acid (18:2n-6) and arachidonic acid (20:4n-6) when compared to control animals. Consequently, glucose-fed rats also exhibit an increase in dihomo-gamma linolenic, Δ 6 desaturase (18:3n-6/18:2n-6) and Δ 9 desaturase (16:1n-7/16:0) and reduced activity of Δ 5 desaturase (20:4n-6/20:3n-6). This specific fatty acid pattern in plasma was an indication of insulin resistance in humans and rats treated with high carbohydrate diets [17,19]. Similarly, increased concentrations of 16:1n-7 and decreased proportions of 20:4n-6 and 22:5n-6 in plasma lipids appear to be early markers of metabolic syndrome in obese prepubertal children [30]. Circulating palmitoleic acid (16:1n-7) produced from adipocytes may directly regulate insulin resistance and metabolic dysregulation [31]. Thus, insulin sensitivity was associated with low proportion of (16:0) and (16:1n-7) and a high proportion of (18:2n-6) [18,19]. Improvement of insulin sensitivity by the blockade of B₁R in glucose-fed rats with SSR240612 is reflected by the decrease of specific plasma fatty acids [16:1n-7, 20:3n-6, n-7 family, the ratio of n-7/18:2n-6 and of Δ 6 desaturase (18:3n-6/18:2n-6)] and the increase of others [18:2n-6 and the ratio of Δ 5 desaturase (20:4n-6/20:3n-6)].

Link between Inflammatory Markers, Insulin Resistance and Obesity

Obesity is a chronic mild inflammation disease linked to increased levels of pro-inflammatory cytokines in the circulation and peripheral tissues [32]. It is now well understood that adipose tissue actively secretes a variety of adipocytokines (leptin, resistin, adiponectin, IL-1 β and TNF- α) [21,22,33]. In addition to contributing to the inflammatory process, these peptides are involved in energy balance, energy expenditure, appetite and satiety signals. Dysregulation of adipose tissue-derived IL-1 β and TNF- α results in impaired insulin signalling and lipid metabolism [20,29]. Lipid accumulation caused by excess energy intake (e.g. high glucose feeding) stimulates NADPH oxidase, which increases ROS production [34]. Pro-inflammatory cytokines and ROS activate JNK and NF- κ B pathways which play a role in inflammation-induced insulin resistance amplifying lipid accumulation. This may occur through two different mechanisms. First, JNK induces insulin resistance may occur through the phosphorylation of serine residues in insulin receptor substrate-1 (IRS-1). TNF- α is an inhibitor of insulin signalling by affecting IRS proteins through mechanisms involving proteasome-mediated degradation, phosphatase-mediated dephosphorylation and Ser phosphorylation of IRS-1 which converts IRS-1 as an inhibitor of insulin receptor Tyr kinase activity [22,35,36]. TNF- α is over-expressed in white adipose tissue in obese and insulin resistance state; immunoneutralization of TNF- α partially protected from obesity-induced insulin resistance [35,37,38]. This is keeping with the lower levels of TNF- α during weight loss [39]. Second, the phosphorylation of IKK β , a selective substrate of the I κ B protein inhibitor of NF- κ B, targets I κ B α for proteasomal degradation, which liberates NF- κ B for translocation into the nucleus. Once in the nucleus, NF- κ B promotes the expression of several pro-inflammatory genes (IL-1 β , TNF- α and

iNOS) causing a positive feedback loop that enhances insulin resistance via JNK [29] NF- κ B activation can also upregulate B₁R [3] that can contribute to the cascade of inflammation leading to insulin resistance. Indeed, inhibition of B₁R reduced the oxidative stress [9] and cytokines (present data).

Another player in insulin resistance and adiposity is nitric oxide (NO). In human isolated adipocytes, NO attenuates lipolysis, while nitric oxide synthase inhibition increases lipolysis [40]. iNOS is increased in skeletal and adipose tissue of type 2 diabetic patients [41]. iNOS gene disruption or treatment with iNOS inhibitor improves whole-body insulin action in high-fat-fed obese mice [42,43] and enhances insulin sensitivity in skeletal muscle by reversing the downregulation of IRS-1 in diabetic (ob/ob) mice [44]. The suppression of enhanced expression of iNOS in adipose tissue of glucose-fed rats by SSR240612 is probably to improve insulin sensitivity and lipolysis.

As B₁R was not detected in adipose tissue, the mechanism by which SSR240612 decreases inflammatory markers is still unknown. A possible mechanism could be that B₁R-induced infiltration of macrophages. B₁R activation on these cells causes the release of cytokines [4,45] and B₁R antagonist reversed the infiltration of macrophages in inflammatory tissue [46] and the overexpression of CD68 in retroperitoneal adipose tissue (present study). Macrophages represent an important source of pro-inflammatory cytokines known to propagate and amplify the inflammatory process in adipose tissue [47,48]. Furthermore, high levels of insulin can enhance phagocytic capacity and production of ROS (H₂O₂) by macrophages [49] and TNF- α secretion in adipocytes [20], which can exacerbate this inflammatory process.

The inhibition of oxidative stress by SSR240612 might represent another credible mechanism by which B₁R blockade could reduce adipose tissue inflammation and insulin resistance. ROS are known to activate JNK and NF- κ B [29], which are involved in the up-regulation of a myriad of pro-inflammatory genes, including the B₁R [50]. B₁R activation was able to enhance the production of superoxide anion in vessels through the activation of NADPH oxidase in glucose-fed rats [9]. Hence, the beneficial effect of SSR240612 on adiposity (decrease of fat mass) and insulin resistance may be because of the inhibition of the oxidative stress and cytokine pathway.

Regulation of Body Weight and Fat Accumulation by Kinin B₁R

B₁R deficiency in mice shows less fat content, hypoleptinemia, hypoinsulinemia, increased leptin sensitivity and protection against high-fat diet-induced weight gain [51]. While 1-week treatment with SSR240612 had no effect on body weight gain, food intake and energy expenditure in mice exposed to high-fat diet, a decrease in body weight gain occurred after 2 weeks of B₁R blockade and at least 4 weeks was needed to see a decrease in energy intake [51]. In our model of insulin resistance, significant reduction (5.6-fold) in percentage of body fat gain and of epididymal fat mass (1.3-fold) occurred after 1-week treatment with the same B₁R antagonist. Although differences

in models and treatment schedules may explain apparent discrepancies, data from both studies allude to a role of B₁R in obesity. However, our data provide the first evidence that the blockade of B₁R can protect from obesity through inhibition of inflammation in adipose tissue independently of changes in circulating leptin levels.

One-week treatment with SSR240612 reduced by 15 g the gain in body weight when compared to vehicle in glucose-fed rats. A similar effect could be achieved only after 4-week treatment with the cannabinoid CB1 receptor antagonist rimonabant (10 mg/kg/day) in obese and insulino-resistant JCR:LA-*cp* rats [52]. The monoamine reuptake inhibitor sibutramine (10 mg/kg/day) reduced significantly body weight after 2 weeks in the model of monosodium glutamate-treated obese rats [53]. Thus, SSR240612 is highly comparable with other anti-obesity drugs. It is accepted today that modest body weight reduction (5–10%) in obese patients contributes to improve cardiovascular diseases (reduction of blood pressure), diabetes, pain, endocrine and psychiatric disorders [54–57]. On the basis of the encouraging data of this study, a longer treatment period with SSR240612 should be considered to determine whether the reduction in body weight gain can be greater and more sustained without causing the harmful side effects reported with rimonabant and sibutramine, two drugs already withdrawn from the market [56].

In summary, the 1-week oral treatment with SSR240612 reestablished insulin sensitivity and reversed whole body and epididymal fat mass accumulation and plasma fatty acids changes in glucose-fed rats. Inhibition of adipose tissue inflammation may represent a putative mechanism which deserves further investigations.

Acknowledgements

Supported by a Grant-in-aid from the Heart and Stroke Foundation of Quebec (to R. Couture). J. P. Dias holds a Studentship Award from the Canadian Institutes of Health Research (Frederick Banting and Charles Best Canada Graduate Scholarships-Doctoral Award). Authors are most grateful to Dr Emile Levy's laboratory (Department of Nutrition, Ste-Justine Research Center, Université de Montréal) for the measurement of plasma fatty acids, to Dr Pierrette Gaudreau (Research Center-Technopole Angus-CHUM, Université de Montréal) for giving access to the EchoMRI.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

J. P. Dias contributed to the design, conducted the experiments, data analysis and drafted the manuscript. R. Couture contributed to the design of the study and edited the final version of the manuscript.

References

1. Regoli D, Nsa AS, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 1998; **348**: 1–10.

2. Marceau F, Sabourin T, Houle S, et al. Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol* 2002; **2**: 1729–1739.
3. Couture R, Girolami JP. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 2004; **500**: 467–485.
4. Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. *FEBS Lett* 1989; **247**: 189–192.
5. Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 2005; **57**: 27–77.
6. Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 2004; **143**: 803–818.
7. Campos MM, Leal PC, Yunes RA, Calixto JB. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* 2006; **27**: 646–651.
8. Dias JP, Ismael MA, Pilon M, et al. The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 2007; **152**: 280–287.
9. Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* 2010; **5**: e12622.
10. El Midaoui A, de Champlain J. Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* 2005; **23**: 581–588.
11. Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, Couture R. 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* 2008; **589**: 66–72.
12. Lungu C, Dias JP, Franca CE, et al. Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 2007; **41**: 375–387.
13. Collison KS, Zaidi MZ, Saleh SM, et al. Effect of trans-fat, fructose and monosodium glutamate feeding on feline weight gain, adiposity, insulin sensitivity, adipokine and lipid profile. *Br J Nutr* 2011; **24**: 1–10.
14. Meirelles CJ, Oliveira LA, Jordao AA, Navarro AM. Metabolic effects of the ingestion of different fructose sources in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2011; **119**: 218–220.
15. Barnard RJ, Roberts CK, Varon SM, Berger JJ. Diet-induced insulin resistance precedes other aspects of the metabolic syndrome. *J Appl Physiol* 1998; **84**: 1311–1315.
16. Coelho MS, Lopes KL, Freitas RA, et al. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept* 2010; **162**: 61–67.
17. Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, Sakata T, Yoshimatsu H. Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; **229**: 486–493.
18. Vessby B, Tengblad S, Lithell H. Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. *Diabetologia* 1994; **37**: 1044–1050.
19. Vessby B. Dietary fat and insulin action in humans. *Br J Nutr* 2000; **83**(Suppl. 1): S91–S96.
20. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011; **11**: 98–107.
21. Forsythe LK, Wallace JM, Livingstone MB. Obesity and inflammation: the effects of weight loss. *Nutr Res Rev* 2008; **21**: 117–133.
22. Nieto-Vazquez I, Fernandez-Veledo S, Kramer DK, Vila-Bedmar R, Garcia-Guerra L, Lorenzo M. Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. *Arch Physiol Biochem* 2008; **114**: 183–194.
23. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; **28**: 412–419.
24. Lepage G, Roy CC. Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 1986; **27**: 114–120.
25. Lepage G, Levy E, Ronco N, Smith L, Galeano N, Roy CC. Direct transesterification of plasma fatty acids for the diagnosis of essential fatty acid deficiency in cystic fibrosis. *J Lipid Res* 1989; **30**: 1483–1490.
26. Gomez-Ruiz A, Milagro FI, Campion J, Martinez JA, de Miquel C. High-fat diet feeding alters metabolic response to fasting/non fasting conditions. Effect on caveolin expression and insulin signalling. *Lipids Health Dis* 2011; **10**: 55.
27. Pouliot M, Hetu S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. Modulation of retinal blood flow by kinin B(1) receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 2011; **92**: 482–489.
28. Talbot S, Chahmi E, Dias JP, Couture R. Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B1 receptor in early diabetic pain neuropathy. *J Neuroinflammation* 2010; **7**: 36.
29. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 2006; **116**: 1793–1801.
30. Gil-Campos M, del Carmen Ramirez-Tortosa M, Larque E, et al. Metabolic syndrome affects fatty acid composition of plasma lipids in obese prepubertal children. *Lipids* 2008; **43**: 723–732.
31. Mozaffarian D, Cao H, King IB, et al. Trans-palmitoleic acid, metabolic risk factors, and new-onset diabetes in U.S. adults: a cohort study. *Ann Intern Med* 2010; **153**: 790–799.
32. Tataranni PA. Metabolic syndrome: is there a pathophysiological common denominator? *World Rev Nutr Diet* 2005; **94**: 75–83.
33. Ondrak KS, McMurray RG, Hackney AC, Harrell JS. Interrelationships among changes in leptin, insulin, cortisol and growth hormone and weight status in youth. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2011; **3**: 22–28.
34. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest* 2004; **114**: 1752–1761.
35. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 1993; **259**: 87–91.
36. White MF. Insulin signaling in health and disease. *Science* 2003; **302**: 1710–1711.
37. Yazdani-Biuki B, Stelzl H, Brezinschek HP, et al. Improvement of insulin sensitivity in insulin resistant subjects during prolonged treatment with the anti-TNF-alpha antibody infliximab. *Eur J Clin Invest* 2004; **34**: 641–642.
38. Stanley TL, Zanni MV, Johnsen S, et al. TNF-alpha antagonism with etanercept decreases glucose and increases the proportion of high molecular weight adiponectin in obese subjects with features of the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; **96**: E146–E150.
39. Pakiz B, Flatt SW, Bardwell WA, Rock CL, Mills PJ. Effects of a weight loss intervention on body mass, fitness, and inflammatory biomarkers in overweight or obese breast cancer survivors. *Int J Behav Med* 2011; **18**: 333–341.
40. Andersson K, Gaudiot N, Ribiere C, Elizalde M, Giudicelli Y, Arner P. A nitric oxide-mediated mechanism regulates lipolysis in human adipose tissue in vivo. *Br J Pharmacol* 1999; **126**: 1639–1645.

41. Engeli S, Janke J, Gorzelniak K, et al. Regulation of the nitric oxide system in human adipose tissue. *J Lipid Res* 2004; **45**: 1640–1648.
42. Dallaire P, Bellmann K, Laplante M, et al. Obese mice lacking inducible nitric oxide synthase are sensitized to the metabolic actions of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonism. *Diabetes* 2008; **57**: 1999–2011.
43. Perreault M, Marette A. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med* 2001; **7**: 1138–1143.
44. Sugita H, Fujimoto M, Yasukawa T, et al. Inducible nitric-oxide synthase and NO donor induce insulin receptor substrate-1 degradation in skeletal muscle cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 14203–14211.
45. Bouthillier J, Deblois D, Marceau F. Studies on the induction of pharmacological responses to des-Arg9-bradykinin in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 1987; **92**: 257–264.
46. Klein J, Gonzalez J, Duchene J, et al. Delayed blockade of the kinin B1 receptor reduces renal inflammation and fibrosis in obstructive nephropathy. *FASEB J* 2009; **23**: 134–142.
47. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; **112**: 1796–1808.
48. Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 2007; **56**: 16–23.
49. Costa Rosa LF, Safi DA, Cury Y, Curi R. The effect of insulin on macrophage metabolism and function. *Cell Biochem Funct* 1996; **14**: 33–42.
50. Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone* 2008; **43**: 72–83.
51. Mori MA, Araujo RC, Reis FC, et al. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* 2008; **57**: 1491–1500.
52. Russell JC, Kelly SE, Diane A, et al. Rimonabant-mediated changes in intestinal lipid metabolism and improved renal vascular dysfunction in the JCR:LA-cp rat model of prediabetic metabolic syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; **299**: G507–G516.
53. Nakagawa T, Ukai K, Ohyama T, Gomita Y, Okamura H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. *Exp Anim* 2000; **49**: 239–249.
54. Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, et al. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 2004; **12**: 962–971.
55. Amundson DE, Djurkovic S, Matwyloff GN. The obesity paradox. *Crit Care Clin* 2010; **26**: 583–596.
56. Forslund T, Raaschou P, Hjemdahl P, Krakau I, Wettermark B. Usage, risk, and benefit of weight-loss drugs in primary care. *J Obes* 2011; **2011**: 459263.
57. Wing RR, Lang W, Wadden TA, et al. Benefits of modest weight loss in improving cardiovascular risk factors in overweight and obese individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2011; **34**: 1481–1486.

Chapitre 7 : Discussion générale et Conclusion

7.1. Discussion générale

Cette thèse comportait trois objectifs visant à mieux comprendre la contribution du B₁R des kinines dans un modèle de résistance à l'insuline (le rat traité au glucose) en utilisant une approche pharmacologique qui consistait à bloquer le B₁R des kinines avec le SSR240612 (10 mg/kg/jour) pendant une période d'une semaine. L'objectif 1 consistait à étudier la contribution du B₁R des kinines dans les complications diabétiques dont l'hypertension, les polyneuropathies et la production de l'anion superoxyde dans l'aorte. L'objectif 2 portait sur l'étude du B₁R dans l'inflammation vasculaire. L'objectif 3 consistait à étudier le B₁R dans l'obésité en relation avec la composition corporelle et le profil lipidique plasmatique. Chez des rats traités au glucose pendant 8 ou 12 semaines, nous avons pu démontrer que l'activation du B₁R augmente le stress oxydatif (la production de l'anion superoxyde) dans l'aorte via l'activation de la NADPH oxydase. L'inhibition soutenue du B₁R par l'antagoniste SSR240612 renverse le stress oxydatif dans l'aorte ainsi que la surexpression du B₁R dans différents tissus dont le foie, l'aorte, le muscle squelettique et la moelle épinière. Le blocage prolongé du B₁R renverse aussi l'hypertension, les allodynies tactile et au froid et la résistance à l'insuline chez les rats traités au glucose (Dias et al., 2010). Nous avons aussi démontré une augmentation de l'expression de plusieurs marqueurs de l'inflammation : macrophages, cytokines (IL-1 β , TNF- α), iNOS, MIF et molécules d'adhésion (ICAM, E-sélectine) dans l'aorte de rats traités au glucose. L'expression de ces marqueurs de l'inflammation a été normalisée à la suite d'un traitement pharmacologique d'une semaine avec le SSR240612 (Dias et al., 2012, soumis au Journal of Cardiovascular Pharmacology). Finalement, le rat traité au glucose a été étudié comme modèle d'obésité. Les rats traités au glucose pendant 12 semaines manifestent une augmentation significative de la masse grasse corporelle et de la masse de l'épididyme lorsqu'ils sont comparés aux rats témoins du même âge. D'autre part, ces rats présentent un changement dans leur profil lipidique plasmatique indiquant une résistance à l'insuline. Le traitement prolongé d'une semaine avec le SSR240612 a permis de réduire la masse grasse de l'épididyme, de diminuer le gain de poids et de corriger les acides gras plasmatiques qui sont des marqueurs de la résistance à l'insuline dont l'acide palmitoléique, et de réduire les marqueurs inflammatoires dans les adipocytes (iNOS, IL-1 β , macrophage) (Dias et al., 2011). Ces résultats originaux montrent la contribution du B₁R dans l'obésité et ouvrent une nouvelle avenue de recherche.

7.2. Choix du modèle au glucose : avantages et limitations

L'excès de la consommation de carbohydrates raffinés représente un facteur de risque important de développement du diabète de type 2 et de la résistance à l'insuline. Nous avons voulu choisir un modèle représentatif de la diète nord-américaine riche en carbohydrates contenus dans les boissons sucrées, les sirops et les desserts sucrés. Des rats (50 à 75g) ont reçu de l'eau à volonté contenant 10% de D-glucose pendant 8-24 semaines. Notre laboratoire a été le premier à administrer le D-glucose chez des jeunes rats; ceci a permis de donner du glucose pendant plus de 8 semaines et de maintenir un poids convenable lors des expériences. Il faut souligner que la manipulation des rats qui dépassent 650 g est plus difficile et exige des quantités importantes d'agents pharmacologiques pour les études *in vivo*.

L'ingestion chronique de glucose produit un modèle nutritionnel non génétique et peu coûteux qui développe une hyperinsulinémie, une hypertension, une augmentation du stress oxydatif (anion superoxyde), une légère augmentation de la glycémie, une résistance à l'insuline (El Midaoui et de Champlain 2002; 2005) ainsi que des allodynies (Lungu et al., 2007). Les rats qui ingèrent du fructose ou du sucrose de façon chronique développent aussi ces anomalies (Hwang et al, 1987; Dai et al., 1995; Kamenov et al., 2006).

Ce modèle de résistance à l'insuline permet d'étudier les mécanismes moléculaires qui conduisent au diabète de type 2 sans que les mécanismes d'adaptation et les conséquences de la maladie n'entrent en jeu. Par contre, ce modèle présente aussi certaines limitations : l'hyperglycémie est largement supprimée par l'hyperinsulinémie compensatrice de cette phase pré-diabétique. De plus, l'inflammation vasculaire n'est qu'à son début; ainsi il n'est pas possible d'observer une inflammation exagérée (athérosclérose avec infiltration massive des macrophages) et des changements au niveau de la structure des vaisseaux. Ce modèle n'a révélé aucune hypertrophie vasculaire ou cardiaque ou de fibrose cardiaque à la suite de 4 semaines de glucose (Pilon et al., 2009). Par contre, El Midaoui et coll. en 2011 ont montré que l'administration de glucose pendant 14 semaines réduit la lumière de l'aorte sans affecter le ratio media-lumière, indice d'une atrophie vasculaire. En effet, l'administration à court terme de glucose (moins de 14 semaines) ne permet pas d'étudier ces complications cardiovasculaires. De plus, les niveaux plasmatiques de triglycérides, LDL, HDL, cholestérol restent à être déterminés dans ce modèle.

7.3. Études supplémentaires

Afin de mieux comprendre la contribution du B₁R des kinines dans le modèle du rat traité au glucose, j'ai effectué des expériences additionnelles qui ne font pas partie d'une publication. Dans ces expériences, le protocole est le suivant : des rats traités au glucose pendant 8 ou 12 semaines ont reçu au cours des 7 derniers jours, un traitement au SSR240612 (10 mg/kg/jour par gavage). Les prélèvements d'organes (aorte, foie, muscle gastrocnemius) ont été effectués au jour 7 et 3h après le dernier traitement pharmacologique en vue d'effectuer les études suivantes : a) mesure de l'expression du facteur de transcription NF-κB/IκB; b) mesure de l'expression de l'IRS-1. La contribution du B₁R chez le rat Zucker (modèle génétique de diabète de type 2) a aussi été étudiée avec la même approche pharmacologique.

7.3.1. a) La mesure de l'expression du facteur de transcription NF-κB/IκB

Sachant que le blocage du B₁R diminue la surexpression du B₁R et celle de plusieurs marqueurs inflammatoires (IL-1β, iNOS, ICAM-1, E-selectine) et des macrophages (CD68, CD11) dans l'aorte des rats traités au glucose, et que l'expression de plusieurs de ces marqueurs est régulée par le facteur de transcription NF-κB (Shoelson et al., 2006), nous avons mesuré l'expression protéique de NF-κB/IκB totale (**Figure 24**). Les rats traités au glucose pendant 8 semaines montrent une surexpression de NF-κB/IκB dans l'aorte par rapport aux rats témoins. Toutefois, le SSR240612 ne semble pas interférer avec l'expression totale de ce facteur de transcription NF-κB/IκB. La possibilité que le SSR240612 puisse prévenir sa translocation au noyau et ainsi son activation demeure une question non résolue. Il serait nécessaire de mesurer, entre autres, la phosphorylation de NF-κB/IκB. L'agoniste du B₁R (Lys-des-Arg⁹-BK) active AP-1 (activator protein-1), un facteur de transcription dans un modèle d'inflammation des voies aériennes (Christiansen et al., 2002). En plus, les gènes proinflammatoires incluant VCAM-1, iNOS, IL-1, IL-6 sont induits par le facteur de transcription AP-1 (Nicoletti et al., 1999; Karalliedde et Viberti, 2006). Il serait donc intéressant de vérifier si le blocage du B₁R inhibe ce facteur de transcription. En effet, le mécanisme transcriptionnel exact par lequel le blocage du B₁R diminue ces différents marqueurs de l'inflammation dans la vasculature demeure inconnu et nécessite de plus amples recherches.

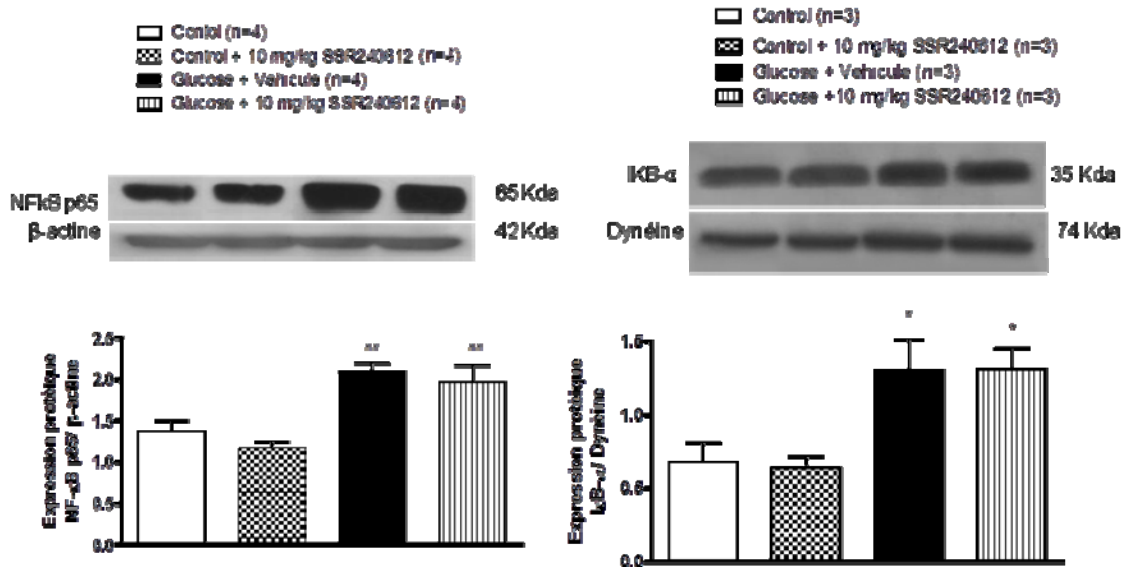


Figure 24. L'expression protéique de NF-κB et IκB-α dans l'aorte suite à l'administration du SSR240612.

Les données sont exprimées selon la moyenne ± écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) sont indiquées par *P<0.05; **P<0.01. Le protocole expérimental et la mesure de l'expression protéique par Western Blot sont basés sur notre étude soumise à Journ. Cardiovascular Pharmacol., 2011.

7.3.1. b) La mesure de l'expression de l'IRS-1

La diminution de l'expression de l'IRS-1 est un signe pouvant conduire à la résistance à l'insuline (Zick et al., 2001). Nos études montrent que les rats traités au glucose manifestent une diminution de l'expression de l'ARNm de IRS-1 dans le foie, mais aucun changement significatif de cette protéine n'a été observé dans le muscle gastrocnemius (**Figure 25**). Le traitement avec le SSR240612 a corrigé partiellement la baisse du taux d'ARNm de IRS-1 au niveau du foie sans affecter celle du muscle. Le SSR240612 n'a pas eu d'effet sur l'expression de l'IRS-1 chez les rats témoins. D'autres études seront nécessaires pour comprendre la différence entre l'expression de l'IRS-1 dans ces deux tissus et le mécanisme exact par lequel le B₁R arrive à diminuer l'IRS-1 uniquement dans le foie; le processus inflammatoire pourrait être un mécanisme possible.

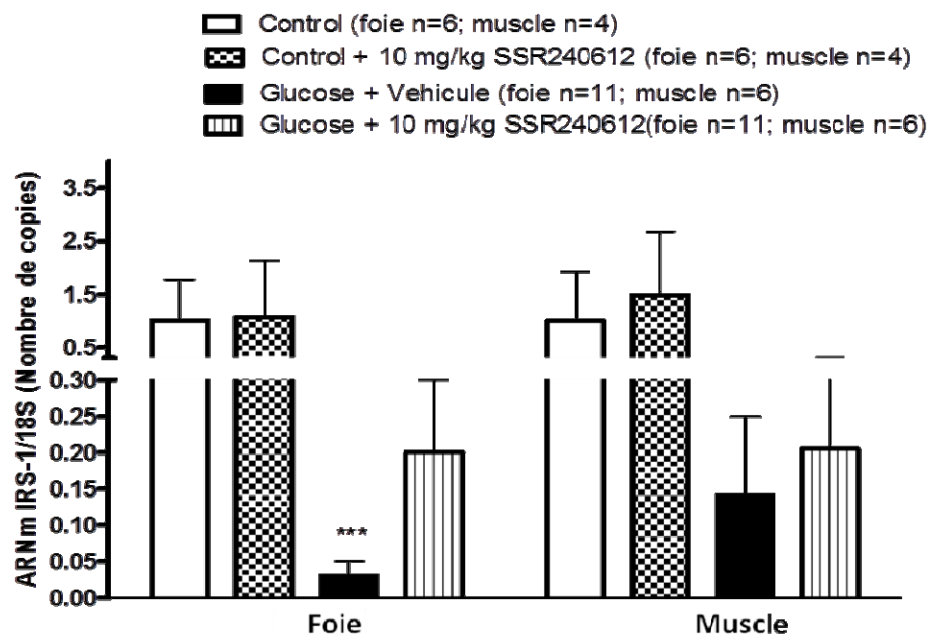


Figure 25. Effet du SSR240612 sur les taux de l'IRS-1 de l'ARN messager dans le foie et dans le muscle squelettique chez le rat traité au glucose pendant 8 semaines.

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) sont indiquées par *** $P < 0.001$. Le protocole expérimental et la mesure de l'expression de l'ARNm sont basés sur notre étude Dias et al., 2010.

7.3.2. La contribution du B₁R chez le rat Zucker

Les rats Zucker de 16 semaines manifestent une hyperglycémie, une hyperinsulinémie et ils sont obèses (Mathews et Leiter, 2005). Toutefois, le traitement avec le SSR240612 n'a pas été en mesure de réduire l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie présentes chez ces rats Zucker (observation personnelle). En effet, selon cette étude pilote, il semblerait que dans ce modèle génétique de diabète de type 2, le blocage du B₁R ne soit pas en mesure de réduire la résistance à l'insuline. En conséquence, le B₁R semble être impliqué dans la phase pré-diabétique ou la phase initiale du diabète de type 2 comme l'indique les résultats obtenus chez le rat traité au glucose. Donc, une fois que le diabète de type 2 est bien installé, il faudrait analyser la possibilité qu'un blocage plus prolongé du B₁R puisse diminuer les complications diabétiques.

7.3.3. Le poids en fonction du temps chez les rats traités au glucose

Afin de pouvoir répondre au troisième objectif de ma thèse qui porte sur l'implication du B₁R dans l'obésité dans un modèle de résistance à l'insuline, nous avons suivi les changements de poids corporel des rats traités au glucose pendant 34 semaines (**Figure 26**). On note jusqu'à 12 semaines de traitement au glucose, aucune différence de poids entre les rats traités au glucose et les témoins tel que publié antérieurement (Lungu et al., 2007; Dias et al., 2011). Cependant, à partir de 18 semaines de traitement au glucose, il y a une différence significative de poids montrant une augmentation de graisse principalement dans la région abdominale. Cette différence s'accroît avec l'âge des rats et la prise de glucose (**Figures 26, 27**). Il a été possible d'observer par le dual-energy x-ray absorptiometry dans la région abdominale, une augmentation de la masse grasse, du pourcentage de gras, de l'épaisseur sous-cutanée et du diamètre antéro-postérieur entre les rats traités au glucose et les rats témoins (**Tableau 9**). Nous avons aussi pu conclure qu'il n'y a pas de changement significatif dans le contenu et dans la densité osseuse après 34 semaines de glucose. Les rats témoins ont un contenu minéral osseux de $0,90 \pm 0,05$ kg et une densité minérale osseuse de $0,15 \pm 0,01$ g/cm² versus les rats traités au glucose qui ont respectivement $1,03 \pm 0,08$ kg et $0,17 \pm 0,01$ g/cm².

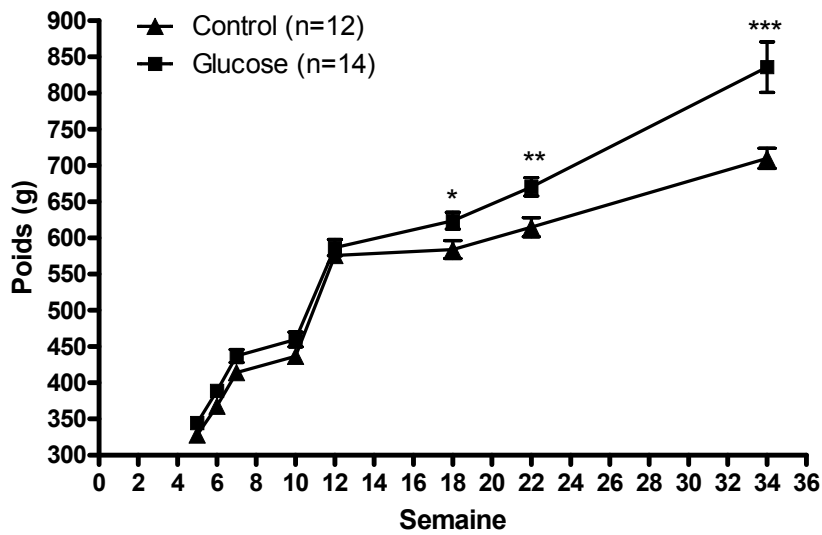


Figure 26. Courbes montrant le poids des animaux en fonction de la durée du traitement au glucose.

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) sont indiquées par * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

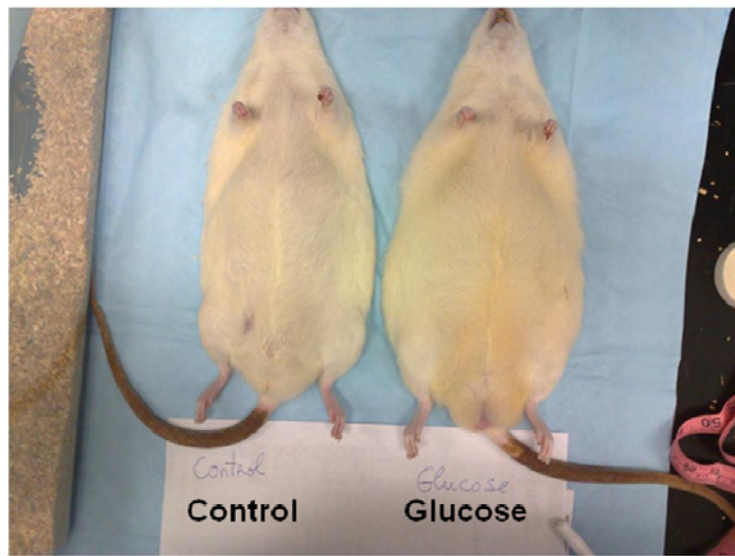


Figure 27. Photographie montrant la différence de taille de la région abdominale entre le rat témoin (control) et le rat traité au glucose pendant 24 semaines.

Tableau 9. Paramètres de la composition corporelle des rats traités au glucose pendant 34 semaines.

Unité	non abdominal			abdominal			
	Poids	Tissus	Muscle	Graisse	Gras	Épaisseur s.c	Diamètre
	(g)	(g)	(g)	(g)	(%)	(mm)	(cm)
Témoin	709,9±13,9	159,0±3,3	110,5±2,2	48,5±2,0	30,5±0,9	2,1±0,1	25,4±0,4
Glucose	835,9±34,9***	173,6±3,7*	104,7±4,3	68,8±3,8***	39,7±2,0**	4,3±0,6**	28,3±1,1*

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) sont indiquées par *P<0.05; **P<0.01; *** P<0.001, 8 rats par groupe. Le protocole expérimental de la mesure de la composition corporelle est basé sur notre étude Dias et al., 2011.

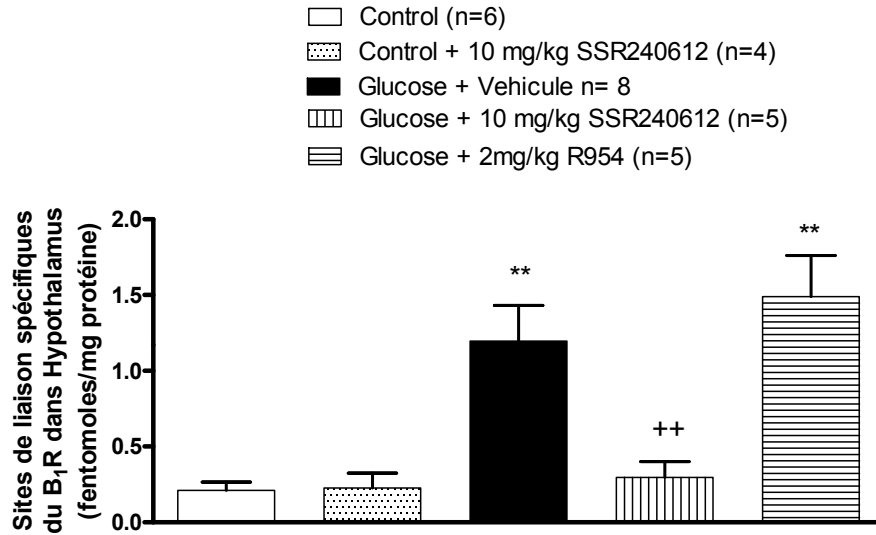
7.4. Expériences comparant le blocage du B₁R avec un antagoniste non peptidique SSR240612 et un antagoniste peptidique R-954.

Une série d'expériences a été faite chez des rats traités au glucose pendant 8 ou 12 semaines afin de comparer les effets de 2 antagonistes B₁R sur le blocage de : a) l'expression du B₁R dans le cerveau et l'aorte, b) marqueurs inflammatoires et de la production de l'anion superoxyde dans l'aorte, c) la résistance à l'insuline et des allodynies. Ces rats traités au glucose au cours de la dernière semaine ont reçu soit le SSR240612 (10 mg/kg/jour par gavage) ou le R-954 (2 mg/kg/jour par i.p.). Les prélèvements d'organes (l'hypothalamus, l'aorte, le foie) ont été effectués au jour 7 et 3h après le dernier traitement pharmacologique. Ce protocole a permis de dissocier la contribution des B₁R périphériques et centraux.

7.4.1. L'expression du B₁R dans l'hypothalamus

Premièrement, nous avons voulu savoir si le SSR240612 et le R-954 bloquent les B₁R centraux. Les rats traités au glucose pendant 13 semaines et des témoins ont reçu le SSR240612 ou le R-954 au cours de la dernière semaine. Le jour du sacrifice et 3 heures après le dernier traitement pharmacologique, l'hypothalamus a été prélevé pour analyser les sites de liaison du B₁R par autoradiographie comme décrit dans Dias et al., 2010. Les rats traités au glucose ont une augmentation significative des sites de liaison du B₁R dans l'hypothalamus par rapport aux rats témoins. Le traitement au SSR240612 chez les rats traités au glucose a déplacé les sites de liaison du ligand B₁R radioactif ($[^{125}\text{I}]\text{-HPP-desArg}^{10}\text{-Hoe 140}$) dans l'hypothalamus contrairement au traitement avec le R-954 qui n'a eu aucun effet significatif. Le traitement au SSR240612 chez les rats témoins n'a eu aucun effet sur les sites de liaison du B₁R lorsque comparé aux rats témoins sans traitement. Cette expérience nous a permis de conclure que le R-954 ne passe pas la barrière hémato-encéphalique à l'opposé du SSR240612 qui traverse (**Figure 28**).

A



B

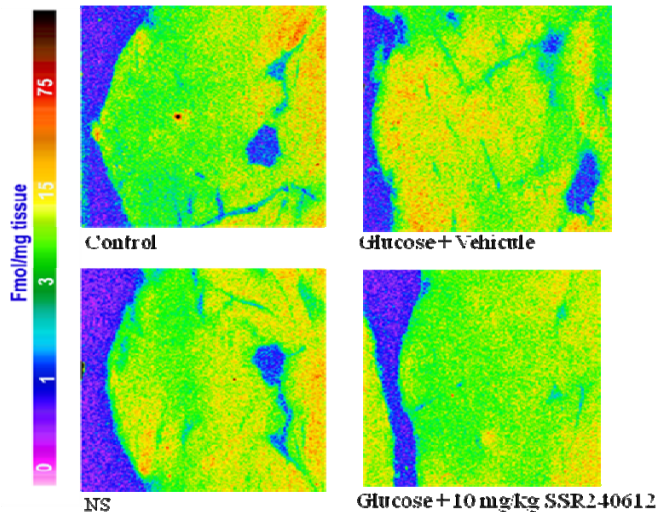


Figure 28. Densité des sites de liaison du B₁R dans l’hypothalamus de rats 1 sem après l’administration d’antagonistes (SSR240612 et R-954).

A. Quantification des sites spécifiques de liaison du B₁R avec le ligand B₁R radioactif ([¹²⁵I]-HPP-desArg¹⁰-Hoe 140) dans l’hypothalamus. **B.** Autoradiogrames de l’hypothalamus. Les données sont exprimées selon la moyenne ± écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) et avec les valeurs du rat traité au glucose (+) sont indiquées par ** ++P<0.01; le NS : non spécifique. Le protocole expérimental est basé sur notre étude Dias et al., 2010.

7.4.2. L'expression IL-1 β et B₁R dans l'aorte et iNOS dans le foie chez les rats traités au glucose

Les rats traités au glucose pendant 8 semaines ont reçu au cours de la dernière semaine soit le R-954 ou le SSR240612, puis les rats ont été sacrifiés après un jeun de 12 h. Les effets ont été mesurés sur le glucose et l'insuline plasmatique, l'expression protéique de IL- β et de B₁R dans l'aorte et sur l'expression de l'ARNm de l'iNOS dans le foie. Ces expériences nous ont permis de comprendre l'effet du B₁R périphérique dans l'augmentation de l'expression des marqueurs inflammatoires dans un tissu vasculaire et non vasculaire.

Le R-954 diminue l'hyperglycémie, l'hyperinsulinémie ainsi que l'index Homa chez les rats traités au glucose de façon similaire au SSR240612 (**Figure 29**). Également, les 2 traitements avec le R-954 et le SSR240612 réussissent à diminuer significativement la surexpression du marqueur de l'inflammation IL-1 β dans l'aorte et la surexpression de l'ARNm de l'iNOS dans le foie (**Figure 30**). Ces expériences permettent de confirmer que le blocage du B₁R chez les rats traités au glucose est en mesure de diminuer l'expression de marqueurs de l'inflammation indépendamment de l'antagoniste en périphérie. Ceci peut contribuer à diminuer la résistance à l'insuline.

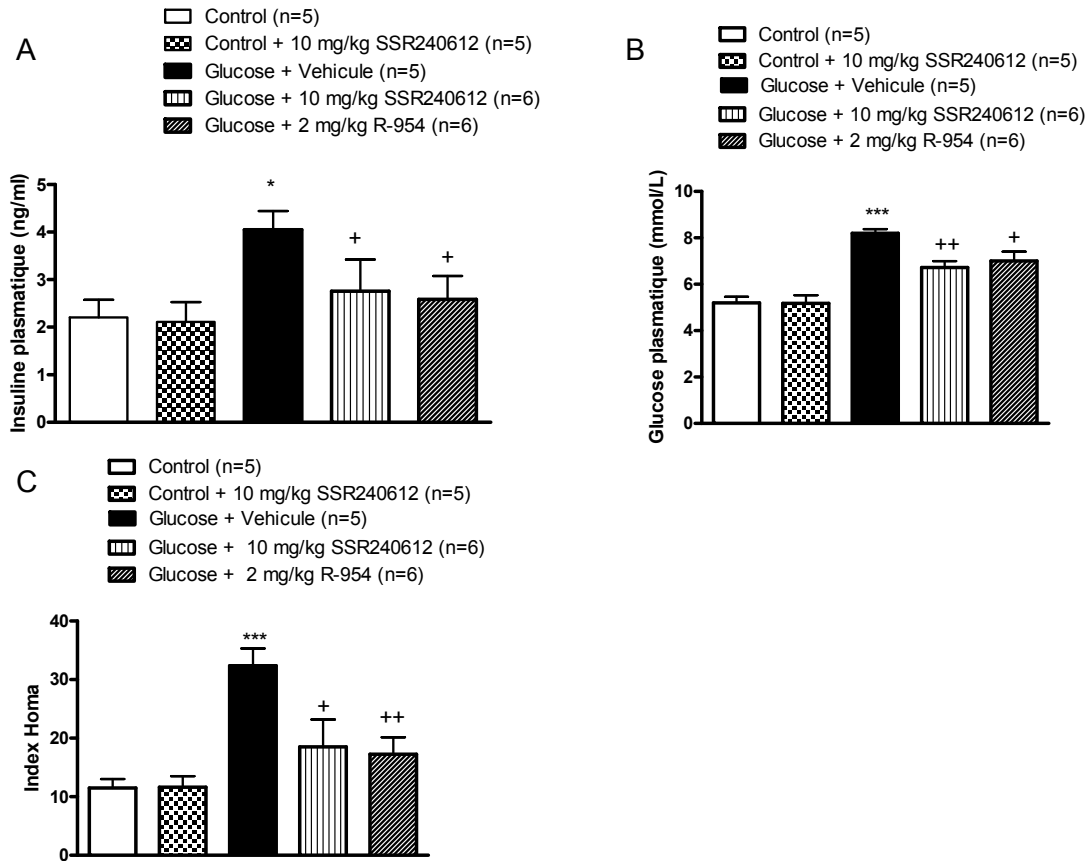


Figure 29. Effet d'un traitement d'une semaine avec le SSR240612 ou le R-954 sur (A) l'insuline plasmatique, (B) le glucose plasmatique (C) Index Homa.

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) et avec les valeurs du rat traité au glucose (+) sont indiquées par *+P<0.05; ++ P<0.01; *** P<0.001. Le protocole expérimental, la mesure du glucose et de l'insuline sont basés sur notre étude Dias et al., 2010.

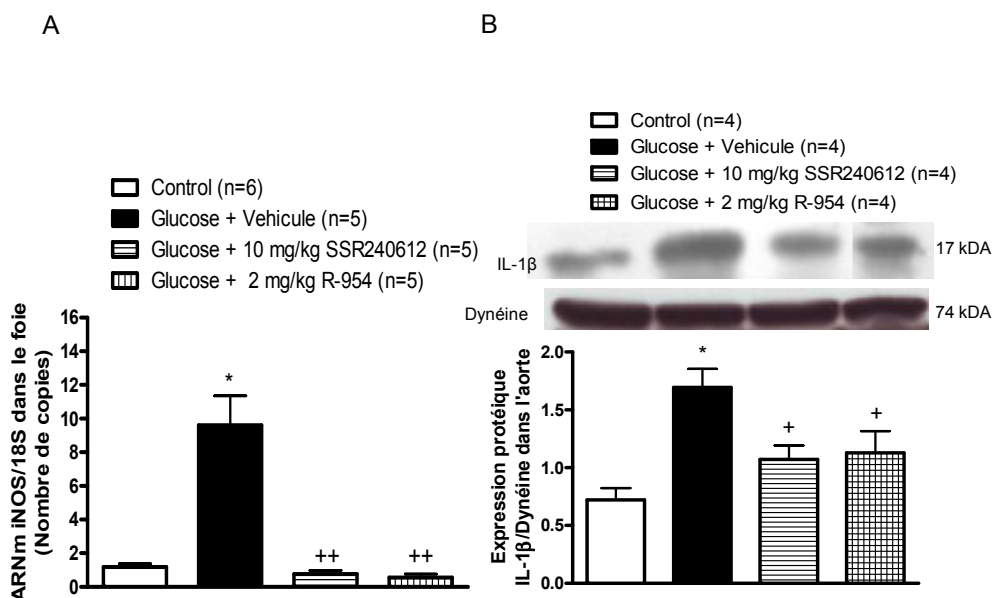


Figure 30. Effets du SSR240612 ou du R-954 sur l'expression (A) de la iNOS dans le foie et (B) de l'IL-1 β dans l'aorte.

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) et le rat traité au glucose (+) sont indiquées par *+P<0.05; ++ P<0.01. Le protocole expérimental et l'expression (ARNm et protéine) des marqueurs inflammatoires sont basés sur notre étude Dias et al., 2010 et celle soumise à Jour. Cardiovasc. Pharmacol. 2011.

7.4.3. L'expression du B₁R et le stress oxydatif dans l'aorte

Les rats traités au glucose pendant 8 semaines ont reçu le traitement d'une semaine avec le R-954 ou le SSR240612. Le jour du sacrifice, les aortes ont été prélevées afin de mesurer l'expression protéique du B₁R et la production de l'anion superoxyde. Les rats traités au glucose présentent une augmentation significative de la production de l'anion superoxyde ainsi qu'une surexpression du B₁R dans l'aorte. Ces manifestations sont diminuées significativement par le traitement au SSR240612 confirmant l'étude de Dias et collaborateurs en 2010, cependant elles ne sont pas altérées par le traitement au R-954 (**Figures 31, 32**).

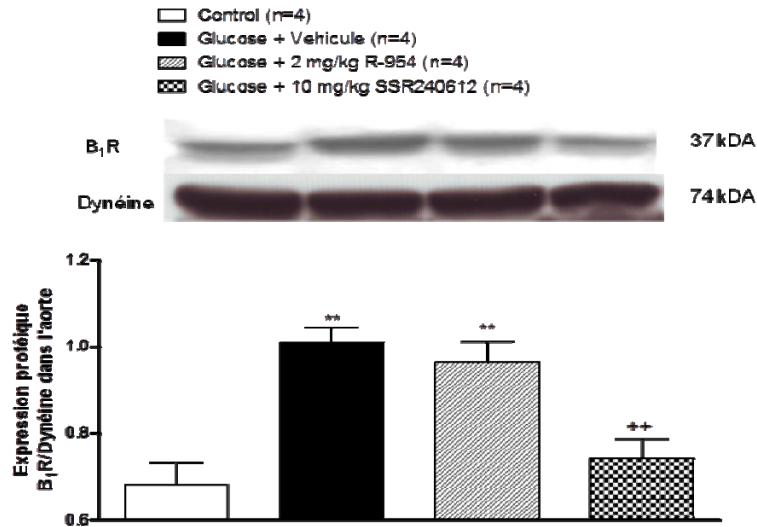


Figure 31. Effet du SSR240612 ou du R-954 sur l'expression protéique du B1R dans l'aorte. Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) et les valeurs du rat traité au glucose (+) sont indiquées par **++ P<0.01. Le protocole expérimental et l'expression protéique sont basés sur notre étude soumise à Jour. Cardiovasc. Pharmacol. 2011.

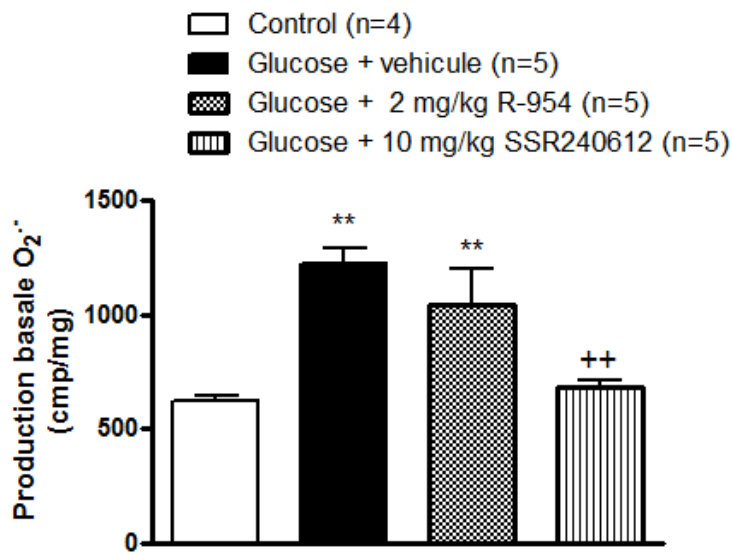


Figure 32. Effet du SSR240612 ou du R-954 sur la production de l'anion superoxyde dans l'aorte.

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) et les valeurs du rat traité au glucose (+) sont indiquées par ** ++ P<0.01. Le protocole expérimental et la mesure de la production de l'anion superoxyde sont basés sur notre étude Dias et al., 2010.

Il est possible que le blocage du B₁R par le R-954 ne soit pas soutenu dû à un problème de pharmacocinétique. La demi-vie de ces antagonistes est difficile à trouver dans la littérature. Il peut y avoir une différence significative dans la durée de vie des deux molécules dans la circulation sanguine au profit du SSR240612 qui est de nature non peptidique. De plus, une molécule non peptidique (SSR240612) pourrait plus facilement s'accumuler dans les graisses et être libérée graduellement de façon continue à l'opposé du R-954. Ces explications peuvent être soutenues par les résultats obtenus avec le R-954 sur les allodynies. Nous avons administré le SSR240612 et le R-954 aux rats traités au glucose tous les jours pendant 7 jours et nous avons mesuré l'allodynie tactile et au froid à toutes les 24h après leur administration. Le SSR240612 bloque l'allodynie tactile et au froid de façon irréversible après 2 et 3 jours si on poursuit l'administration de 10 mg/kg par gavage à chaque jour (Dias et al., 2010). Par contre, l'administration quotidienne de 2 mg/kg i.p. de R-954 chez les rats traités au glucose bloque l'allodynie tactile à 3h, 6h et non 24h et aux jours subséquents (**Figure 33A**). À la **figure 33B**, on peut observer que le traitement au R-954 bloque l'allodynie au froid chez les rats traités au glucose à 3h, 6h, 144h, 168h mais pas aux autres temps en opposition au SSR240612 qui bloque l'allodynie au froid à tous les temps (Dias et al., 2010). Ainsi, il semblerait que le B₁R ne soit pas bloqué en permanence pendant toute la journée avec le traitement au R-954. Des doses supérieures à 2 mg/kg demandent à être testées. Idéalement, le R-954 devrait être infusé en continu avec des mini pompes Alzet. Cette dose bloque l'hyperalgésie thermique en aigu chez le rat diabétique STZ (Gabra et Sirois, 2003) et les allodynies dans notre modèle. Cette étude avec le R-954 aura permis de démontrer que les allodynies dans notre modèle sont associées au récepteur B₁R périphérique et non central. Chez le rat traité au glucose, les injections i.p. d'antagonistes peptidiques (R-715 et R-954) n'ont aucun effet sur la pression artérielle (Lungu et al., 2007; observation personnelle). Dans ce modèle, des injections centrales (i.c.v de R-715) provoquent la réduction de la pression artérielle (observation personnelle). De plus, l'injection i.c.v. de R-954 ou du SSR240612 diminue de façon significative la pression artérielle chez des rats hypertendus (traités à l'angiotensine II ou SHR). Dans cette même étude, l'administration de SSR240612 par gavage (1, 5 and 10 mg/kg) renverse l'hypertension (De Brito Garipey et al., 2010). Cette étude supporte nos résultats sur la réduction de la pression artérielle par l'administration en aigu ou en chronique du SSR240612 chez le rat traité au glucose (Dias et al., 2010). Sachant que les antagonistes peptidiques (le R-954 et R-715) ne traversent pas la barrière hémato-encéphalique contrairement au SSR240612, il a été conclu que seuls les B₁R centraux contribuent à l'augmentation de la pression artérielle dans les différents modèles d'hypertension ou de résistance à l'insuline.

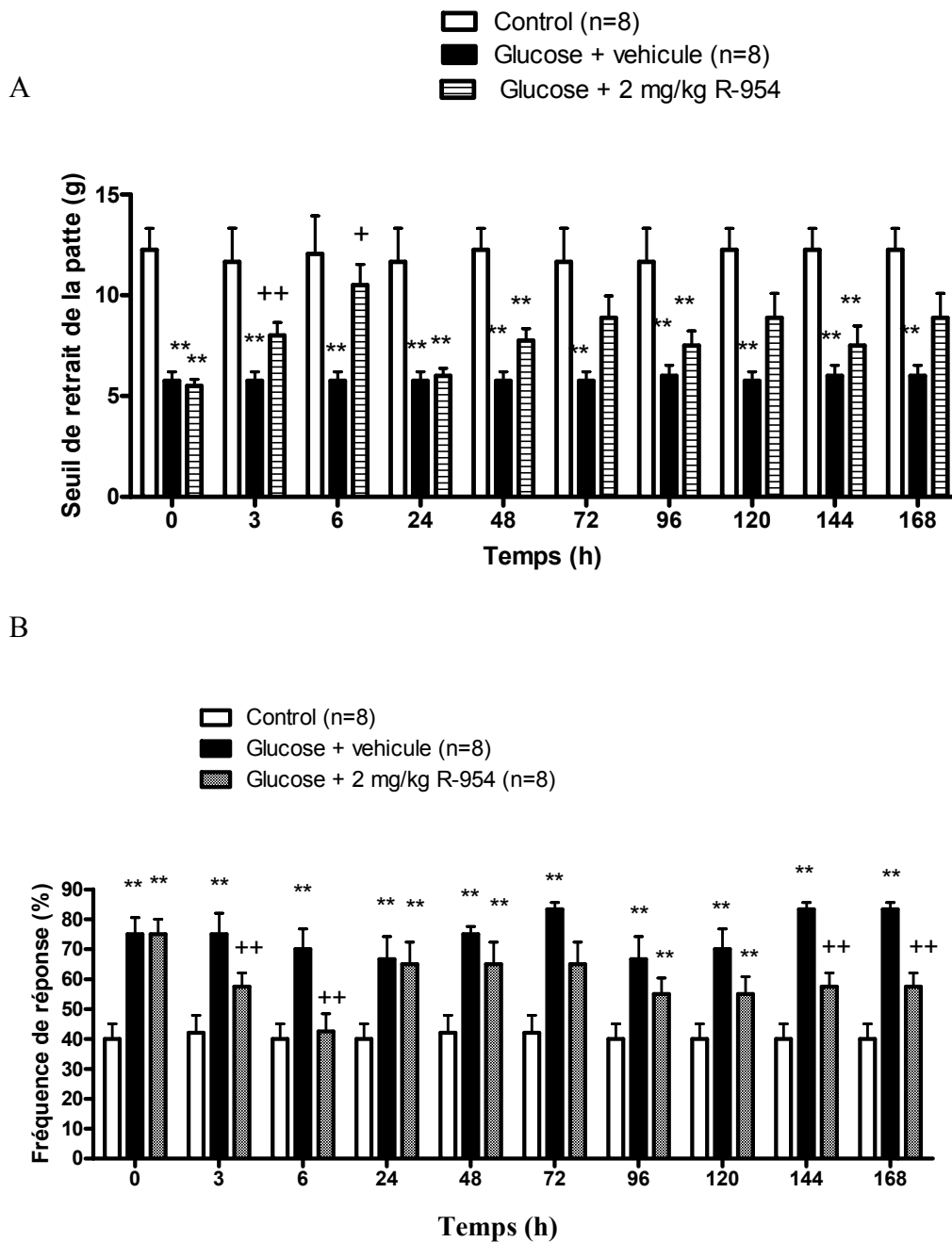


Figure 33. Effet de l'injection répétée de R-954 sur (A) l'allodynie tactile et (B) l'allodynie au froid.

Les données sont exprimées selon la moyenne \pm écart-type. Les comparaisons avec le témoin (*) et les valeurs du rat traité au glucose (+) sont indiquées par *+P<0.05; **++ P<0.01. Le protocole expérimental de la mesure de l'allodynie tactile et au froid est basé sur notre étude Dias et al., 2010.

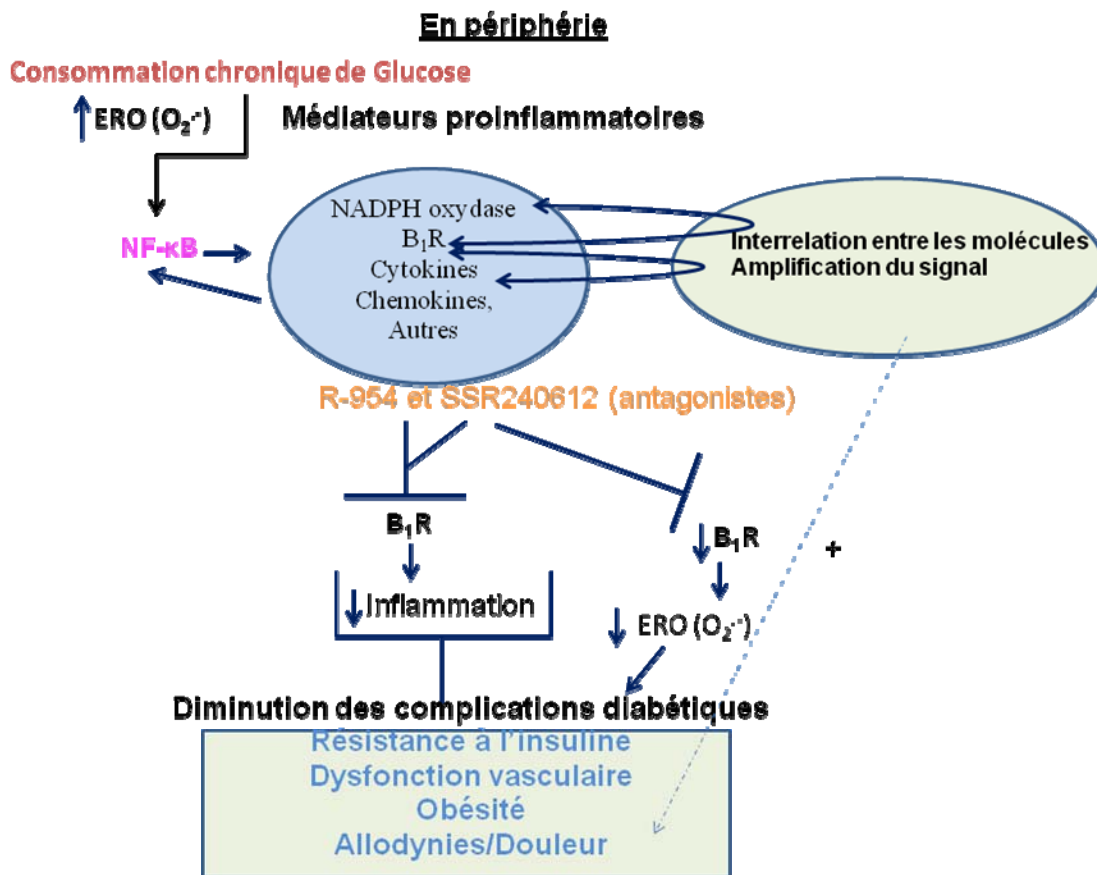


Figure 34. Synthèse de la contribution en périphérie du B₁R dans les complications diabétiques.

La consommation chronique de glucose chez le rat augmente l'expression du facteur de transcription nucléaire NF- κ B via ERO produit par la NADPH oxydase et les cytokines (IL-1 β , TNF- α). Le NF- κ B peut à son tour induire l'expression des gènes proinflammatoires dont ceux du B₁R, des chemokines et des molécules d'adhésion ICAM et VCAM-1 (Schanstra et al., 1998; Shoelson et al., 2006). Ces marqueurs inflammatoires augmentent le stress oxydatif et ce dernier active le NF- κ B (Ceriello et al., 2004). Ainsi, une boucle auto-amplificatrice de l'inflammation se crée par la production de ces médiateurs de l'inflammation et l'augmentation du stress oxydatif. Nous avons pu démontrer la diminution de l'expression de plusieurs de ces médiateurs inflammatoires, du stress oxydatif ainsi que de l'expression du B₁R par un blocage prolongé des B₁R par un antagoniste non peptidique, SSR240612. Le blocage prolongé des B₁R avec un antagoniste peptidique, R-954, ne permet pas de réduire l'expression du B₁R, ni la production d'anion superoxyde, mais permet de réduire certains marqueurs de l'inflammation. Ceci nous

permet de dire que la diminution de l'expression du B₁R est liée à la diminution de la production de l'anion superoxyde et que le blocage périphérique des B₁R est suffisant pour diminuer l'expression de marqueurs de l'inflammation indépendamment de l'inhibition du stress oxydatif. (**Figure 34**). Comme mentionné antérieurement, on pourrait expliquer la dichotomie entre le R-954 et le SSR240612 sur le stress oxydatif par la possible différence de demie-vie des antagonistes.

7.5. Perspectives futures

D'autres études peuvent être envisagées dans notre modèle de résistance à l'insuline et d'obésité. Sur le plan métabolique, le signal principal de la sécrétion de l'insuline est l'augmentation du calcium intracellulaire dans les cellules β du pancréas (Moura, 2000; Ye et al., 2007) en réponse à une hyperglycémie. Il serait intéressant de mieux comprendre la régulation de l'insuline dans le modèle du rat traité au glucose. Est-ce que le pancréas du rat traité au glucose surexprime le B₁R? L'activation ou l'inhibition du B₁R dans les cellules β augmente ou diminue la libération de l'insuline? par quel mécanisme? Est-ce que le blocage du B₁R au niveau des fibres sensorielles serait en mesure de diminuer la fonction sécrétoire du pancréas?

Est-ce que la diminution de l'expression de l'IRS-1 est corrélée avec la phosphorylation de Ser sur l'IRS-1 dans le foie du rat traité au glucose? On sait que la phosphorylation de Ser sur l'IRS-1 conduit à la dégradation de cette protéine et à la résistance à l'insuline (Zick et al., 2001). La BK peut réduire le niveau de glucose plasmatique en augmentant la capture du glucose par les transporteurs de glucose GLUT4 dans les muscles squelettiques (Miyata et al., 1998) et dans les adipocytes (Isami et al., 1996; McCarty et al., 2003). Que fait le B₁R sur la voie de signalisation de l'insuline? Agit-il de façon inverse ou similaire au B₂R sur le GLUT4? On pourrait aussi vérifier l'expression du B₂R dans différents organes chez le rat traité au glucose à la suite d'un traitement prolongé au SSR240612 afin de voir s'il y a un effet compensatoire (surexpression de B₂R dû au blocage de B₁R) tel qu'observé chez la souris invalidée pour le gène du B₁R (Klein et al., 2010).

Le récepteur B₁ serait impliqué dans l'obésité et pourrait entraîner la résistance à l'insuline et subséquemment le diabète de type 2 (Araujo et al., 2006, Mori et al., 2008; Dias et al., 2011). Son

inhibition pharmacologique ou sa délétion génétique prévient le gain de poids (Mori et al., 2008; Dias et al., 2011). Est-ce que l'administration de SSR240612 supérieure à une semaine réussirait à diminuer davantage le gain de poids corporel chez le rat obèse? De plus, il serait intéressant de vérifier si les macrophages et les neutrophiles présents dans les adipocytes expriment le B₁R. Si ces cellules inflammatoires expriment le B₁R, ceci permettrait d'expliquer que les macrophages et les neutrophiles dans les adipocytes en association avec le B₁R contribuent à la propagation de l'inflammation adipocytaire puisque nous avons démontré qu'il n'y a pas de B₁R dans les adipocytes (Dias et al., 2011).

Chez le rat traité au glucose pendant 8 semaines, l'expression de la protéine PPAR- α (peroxisome proliferator activated receptor), un groupe de récepteurs nucléaires diminue dans l'aorte lorsque comparé aux rats témoins (observation personnelle). Cependant dans le même tissu, aucun changement n'est observé dans l'expression de PPAR- α chez des rats traités au glucose pendant 4 semaines (El Midaoui et al., 2006). À la suite d'un traitement au SSR240612, l'expression de PPAR- α diminue davantage chez des rats traités au glucose pendant 8 semaines (observation personnelle). Ces nouveaux résultats inattendus soulèvent plusieurs questions. Par exemple, existe-t-il des récepteurs B₁ des kinines à la membrane nucléaire comme le suggère Savard et coll. (2008) pour le récepteur B₂ des kinines dans les noyaux des hépatocytes de rat ou démontré pour d'autres récepteurs couplés à une protéine G dont TGR5 et le récepteur pour l'acide lysophosphatidique (LPA) (Goetzl, 2007; Chen et al., 2011). Ainsi, est-ce que les ligands du B₁R des kinines produit à l'intérieur de la cellule pourraient entrer dans un domaine nucléaire et ainsi signaler des événements nucléaires distincts de ceux disponibles pour les récepteurs B₁ des kinines couplés à la protéine G à la membrane cellulaire ? Plus d'expériences sont nécessaires pour mieux comprendre l'effet unique du SSR240612 sur le stress oxydatif et sur l'expression du PPAR- α et d'autres gènes.

7.6. Conclusions

En conclusion, nous avons démontré chez le rat traité au glucose :

1. Une surexpression du récepteur B₁ des kinines, dans les tissus périphériques et centraux, qui est renversée par le blocage du B₁R par un antagoniste non peptidique (SSR240612). Le B₁R des kinines contribue à l'hypertension par un mécanisme central, à la douleur neuropathique (allodynies) ainsi qu'à la résistance à l'insuline.
2. L'activation du récepteur B₁ des kinines augmente la production du stress oxydatif dans l'aorte via la NADPH oxydase.
3. Le récepteur B₁ des kinines contribue à l'augmentation de l'inflammation vasculaire en augmentant différents marqueurs inflammatoires. Ce mécanisme pro-inflammatoire du B₁R peut entraîner la dysfonction endothéliale et la résistance à l'insuline.
4. Le récepteur B₁ des kinines contribue à l'augmentation de la masse adipeuse ainsi qu'à l'augmentation de l'inflammation dans les adipocytes et aux changements du profil lipidique plasmatique.
5. Ces résultats suggèrent que le récepteur B₁ des kinines est une cible thérapeutique pour les complications diabétiques et l'obésité.

Références

- Abbas F, Clayton JK, Marshall KM, Senior J. 1998. Characterisation of kinin receptors on the human isolated umbilical artery. *J Endocrinol* 156:389-394.
- Abe KC, Mori MA, Pesquero JB. 2007. Leptin deficiency leads to the regulation of kinin receptors expression in mice. *Regul Pept* 138:56-58.
- Abel ED, Peroni O, Kim JK, Kim YB, Boss O, Hadro E, Minnemann T, Shulman GI, Kahn BB. 2001. Adipose-selective targeting of the GLUT4 gene impairs insulin action in muscle and liver. *Nature* 409:729-733.
- Adam A, Albert A, Calay G, Closset J, Damas J, Franchimont P. 1985. Human kininogens of low and high molecular mass: quantification by radioimmunoassay and determination of reference values. *Clin Chem* 31: 423-426.
- Aguilera G. 1992. Role of angiotensin II receptor subtypes on the regulation of aldosterone secretion in the adrenal glomerulosa zone in the rat. *Mol Cell Endocrinol* 90: 53-60.
- Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. 2000. The c-Jun NH(2)-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser(307). *J Biol Chem* 275:9047-9054.
- Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. 2002. Phosphorylation of Ser307 in insulin receptor substrate-1 blocks interactions with the insulin receptor and inhibits insulin action. *J Biol Chem* 277:1531-1537.
- Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252.
- Ahmed N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. 2005. *Diabetes Res Clin Pract* 67: 3-21.
- Aktan F, Hennes S, Roufogalis BD, Ammit AJ. 2003. Gypenosides derived from *Gynostemma pentaphyllum* suppress NO synthesis in murine macrophages by inhibiting iNOS enzymatic activity and attenuating NF-kappaB-mediated iNOS protein expression. *Nitric Oxide* 8:235-242.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357:593-615.
- Alessi DR, Deak M, Casamayor A, Caudwell FB, Morrice N, Norman DG, Gaffney P, Reese CB, MacDougall CN, Harbison D, Ashworth A, Bownes M. 1997. 3-Phosphoinositide-dependent

protein kinase-1 (PKC1): structural and functional homology with the Drosophila DSTPK61 kinase. *Curr Biol* 7:776-789.

Alfie ME, Sigmon DH, Pomposiello SI, Carretero OA. 1997. Effect of high salt intake in mutant mice lacking bradykinin-B2 receptors. *Hypertension* 29:483-487.

Allogho SN, Gobeil F, Pheng LH, Nguyen-Le XK, Neugebauer W, Regoli D. 1995. Kinin B1 and B2 receptors in the mouse. *Can J Physiol Pharmacol* 73:1759-1764.

Alves M, Calegari V C, Cunha D A, Saad M J, Velloso L A, Rocha E M. 2005. Increased expression of advanced glycation end-products and their receptor, and activation of nuclear factor kappa-B in lacrimal glands of diabetic rats. *Diabetologia* 48 : 2675-2681.

Anderson E A, Balon T W, Hoffman R P, Sinkey C A, Mark A L. 1992. Insulin increases sympathetic activity but not blood pressure in borderline hypertensive humans. *Hypertension* 19: 621-627.

Anderson E A, Hoffman R P, Balon T W, Sinkey C A, Mark A L. 1991. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest* 87: 2246-2252.

Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. 2008. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. *Diabetes Metab Res Rev* 24:595-603.

Andrews P, Karadaghi PA, Memon S, Dadgar A, MacArthy P, Joseph J Knapkaand JJ, Preuss HG. 1992. No effect of high sucrose diets on the kidneys of Wister Kyoto (WKY) rats. *GERIATRIC NEPHROLOGY AND UROLOGY* 2: 1, 35-42.

Araujo RC, Mori MA, Merino VF, Bascands JL, Schanstra JP, Zollner RL, Villela CA, Nakaie CR, Paiva AC, Pesquero JL, Bader M, Pesquero JB. 2006. Role of the kinin B1 receptor in insulin homeostasis and pancreatic islet function. *Biol Chem* 387:431-436.

Aring A M, Jones D E, Falko J M. Information from your family doctor. 2005. Diabetic neuropathy. *Am Fam Physician* 71 : 2129-2130.

Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. 2005. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med* 11:191-198.

Asano M, Sawai H, Hatori C, Inamura N, Fujiwara T, Nakahara K. 1998. Effects of a nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, FR167344, on guinea-pig tracheal smooth muscle bradykinin receptors. *Can J Physiol Pharmacol* 76:1051-1055.

Atkinson MA, Maclaren NK. 1994. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331:1428-1436.

- Azcutia V, Abu-Taha M, Romacho T, Vazquez-Bella M, Matesanz N, Luscinskas FW, Rodriguez-Manas L, Sanz MJ, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C. 2010. Inflammation determines the pro-adhesive properties of high extracellular d-glucose in human endothelial cells in vitro and rat microvessels in vivo. *PLoS One* 5:e10091.
- Bachvarov DR, Houle S, Bachvarova M, Bouthillier J, Adam A, Marceau F. 2001. Bradykinin B(2) receptor endocytosis, recycling, and down-regulation assessed using green fluorescent protein conjugates. *J Pharmacol Exp Ther* 297:19-26.
- Badman MK, Flier JS. 2007. The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism. *Gastroenterology* 132:2103-2115.
- Bagnasco S M, Murphy H R, Bedford J J, Burg M B. 1988. Osmoregulation by slow changes in aldose reductase and rapid changes in sorbitol flux. *Am J Physiol* 254 : C788-C792.
- Bailey CJ. 2007. Treating insulin resistance: future prospects. *Diab Vasc Dis Res* 4:20-31.
- Baker RG, Hayden MS, Ghosh S. 2011. NF-kappaB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab* 13:11-22.
- Baldwin R L, Stolowitz M L, Hood L, Wisnieski B J. 1996. Structural changes of tumor necrosis factor alpha associated with membrane insertion and channel formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 : 1021-1026.
- Basciano H, Federico L, Adeli K. 2005. Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)* 2:5.
- Bedard K, Krause KH. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87:245-313.
- Benzing T, Fleming I, Blaukat A, Muller-Esterl W, Busse R. 1999. Angiotensin-converting enzyme inhibitor ramiprilat interferes with the sequestration of the B2 kinin receptor within the plasma membrane of native endothelial cells. *Circulation* 99:2034-2040.
- Bernobich E, de A L, Lerin C, Bellini G. 2002. The role of the angiotensin system in cardiac glucose homeostasis: therapeutic implications. *Drugs* 62 : 1295-1314.
- Berry CE, Hare JM. 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol* 555:589-606.
- Bester H, Beggs S, Woolf CJ. 2000. Changes in tactile stimuli-induced behavior and c-Fos expression in the superficial dorsal horn and in parabrachial nuclei after sciatic nerve crush. *J Comp Neurol* 428:45-61.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. 1992. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44:1-80.

- Biddinger SB, Kahn CR. 2006. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annu Rev Physiol* 68:123-158.
- Bjorkman U, Ekholm R. 1984. Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology* 115:392-398.
- Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES. 1981. Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr* 111:307-314.
- Blaukat A, Alla SA, Lohse MJ, Muller-Esterl W. 1996. Ligand-induced phosphorylation/dephosphorylation of the endogenous bradykinin B₂ receptor from human fibroblasts. *J Biol Chem* 271:32366-32374.
- Bluher M, Kahn BB, Kahn CR. 2003. Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574.
- Bluher M, Michael MD, Peroni OD, Ueki K, Carter N, Kahn BB, Kahn CR. 2002. Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3:25-38.
- Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, Hoebel BG. 2010. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels. *Pharmacol Biochem Behav* 97:101-106.
- Borisov VB, Forte E, Sarti P, Brunori M, Konstantinov AA, Giuffre A. 2006. Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the CuB-lacking cytochrome bd terminal oxidase. *FEBS Lett* 580:4823-4826.
- Boucek P. Advanced Diabetic Neuropathy: A Point of no Return? 2006. *Rev Diabet Stud* 3 : 143-150.
- Boura-Halfon S, Zick Y. 2009. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296:E581-E591.
- Boyce S, Rupniak N M, Carlson E J, Webb J, Borkowski J A, Hess J F, Strader C D, Hill R G. 1996. Nociception and inflammatory hyperalgesia in B₂ bradykinin receptor knockout mice. *Immunopharmacology* 33 : 333-335.
- Boyington JE, Carter-Edwards L, Piehl M, Hutson J, Langdon D, McManus S. 2008. Cultural attitudes toward weight, diet, and physical activity among overweight African American girls. *Prev Chronic Dis* 5:A36.
- Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. 2004. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 79:537-543.
- Bremer AA, Devaraj S, Afify A, Jialal I. 2011. Adipose tissue dysregulation in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E1782-E1788.

- Brovkovich V, Zhang Y, Brovkovich S, Minshall RD, Skidgel RA. 2011. A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med* 15:258-269.
- Brownlee M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813-820.
- Bruckdorfer R. 2005. The basics about nitric oxide. *Mol Aspects Med* 26:3-31.
- Brummer T, Schmitz-Peiffer C, Daly RJ. 2010. Docking proteins. *FEBS J* 277:4356-4369.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289:2122-2125.
- Bruning JC, Michael MD, Winnay JN, Hayashi T, Horsch D, Accili D, Goodyear LJ, Kahn CR. 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell* 2:559-569.
- Brunori M, Forte E, Arese M, Mastronicola D, Giuffre A, Sarti P. 2006. Nitric oxide and the respiratory enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1757:1144-1154.
- Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Scholmerich J, Bollheimer LC. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol* 36:485-501.
- Bujalska M, Makulska-Nowak H. 2009. Bradykinin receptors antagonists and nitric oxide synthase inhibitors in vincristine and streptozotocin induced hyperalgesia in chemotherapy and diabetic neuropathy rat model. *Neuro Endocrinol Lett* 30:144-152.
- Bulut OP, Dipp S, El-Dahr S. 2009. Ontogeny of bradykinin B1 receptors in the mouse kidney. *Pediatr Res* 66:519-523.
- Burg M B. 1988. Role of aldose reductase and sorbitol in maintaining the medullary intracellular milieu. *Kidney Int* 33 : 635-641.
- Burgess G M, Perkins M N, Rang H P, Campbell E A, Brown M C, McIntyre P, Urban L, Dziadulewicz E K, Ritchie T J, Hallett A, Snell C R, Wrigglesworth R, Lee W, Davis C, Phagoo S B, Davis A J, Phillips E, Drake G S, Hughes G A, Dunstan A, Bloomfield G C. 2000. Bradyzide, a potent non-peptide B(2) bradykinin receptor antagonist with long-lasting oral activity in animal models of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 129 : 77-86.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. 2003. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110.
- Byers M S. Headaches and back pain. 2001. *Proc (Bayl Univ Med Cent)* 14 : 447-448.

Clinical Practice Recommendations 2011. *Diabetes Care* Volume 34:S1-S98.

Caballero AE. 2006. Building cultural bridges: understanding ethnicity to improve acceptance of insulin therapy in patients with type 2 diabetes. *Ethn Dis* 16:559-568.

Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. 2005. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* 11:183-190.

Cai L, Kang YJ. 2001. Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol* 1:181-193.

Calcutt NA, Tomlinson DR, Biswas S. 1990. Coexistence of nerve conduction deficit with increased Na(+)-K(+)-ATPase activity in galactose-fed mice. Implications for polyol pathway and diabetic neuropathy. *Diabetes* 39:663-666.

Caligiuri G. 2004. [Role of the immune response in atherosclerosis and acute coronary syndromes]. *Med Sci (Paris)* 20:175-181.

Calixto J B, Cabrini D A, Ferreira J, Campos M M. 2001. Inflammatory pain: kinins and antagonists. *Curr Opin Anaesthesiol* 14 : 519-526.

Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW, Jr. 1999. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 341:1097-1105.

Cameron NE, Cotter MA, Basso M, Hohman TC. 1997. Comparison of the effects of inhibitors of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase on neurovascular function, nerve conduction and tissue polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 40:271-281.

Campbell DJ, Kladis A, Zhang Y, Jenkins AJ, Prior DL, Yii M, Kenny JF, Black MJ, Kelly DJ. 2010. Increased tissue kallikrein levels in type 2 diabetes. *Diabetologia* 53:779-785.

Campos M M, Leal P C, Yunes R A, Calixto J B. 2006. Non-peptide antagonists for kinin B1 receptors: new insights into their therapeutic potential for the management of inflammation and pain. *Trends Pharmacol Sci* 27 : 646-651.

Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AH, Rae GA, Toro JH, Calixto JB. 2001. Changes in paw oedema triggered via bradykinin B(1) and B(2) receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 416:169-177.

Campos MM, Ongali B, De Souza BH, Schanstra JP, Girolami JP, Chabot JG, Couture R. 2005. Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse* 57:29-37.

Campos MM, Souza GE, Calixto JB. 1996. Upregulation of B1 receptor mediating des-Arg9-BK-induced rat paw oedema by systemic treatment with bacterial endotoxin. *Br J Pharmacol* 117:793-798.

Canadian Community Health Survey. 2008.

Cariou B, Postic C, Boudou P, Burcelin R, Kahn CR, Girard J, Burnol AF, Mauvais-Jarvis F. 2004. Cellular and molecular mechanisms of adipose tissue plasticity in muscle insulin receptor knockout mice. *Endocrinology* 145:1926-1932.

Catanzaro OL, Dziubecki D, Obregon P, Rodriguez RR, Sirois P. 2010. Antidiabetic efficacy of bradykinin antagonist R-954 on glucose tolerance test in diabetic type 1 mice. *Neuropeptides* 44:187-189.

Cave AC, Brewer AC, Narayanananicker A, Ray R, Grieve DJ, Walker S, Shah AM. 2006. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid Redox Signal* 8:691-728.

Ceravolo GS, Fernandes L, Munhoz CD, Fernandes DC, Tostes RC, Laurindo FR, Scavone C, Fortes ZB, Carvalho MH. 2007. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension* 50:756-761.

Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, Monnier L, Moses A, Owens D, Tajima N, Tuomilehto J. 2004. Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med* 164:2090-2095.

Chamany S, Tabaei B.P. 2010. Epidemiology. In: Leonid Poretsky, editor.p 117-127.

Chang KC, Liang JT, Tseng CD, Wu ET, Hsu KL, Wu MS, Lin YT, Tseng YZ. 2007. Aminoguanidine prevents fructose-induced deterioration in left ventricular-arterial coupling in Wistar rats. *Br J Pharmacol* 151:341-346.

Chen E Y, Emerich D F, Bartus R T, Kordower J H. 2000. B2 bradykinin receptor immunoreactivity in rat brain. *J Comp Neurol* 427 : 1-18.

Chen LM, Ma J, Liang YM, Chao L, Chao J. 1996. Tissue kallikrein-binding protein reduces blood pressure in transgenic mice. *J Biol Chem* 271:27590-27594.

Chen X, Lou G, Meng Z, Huang W. 2011. TGR5: a novel target for weight maintenance and glucose metabolism. *Exp Diabetes Res* 2011:853501.

Chen X, Orfanos SE, Ryan JW, Chung AY, Hess DC, Catravas JD. 1991. Species variation in pulmonary endothelial aminopeptidase P activity. *J Pharmacol Exp Ther* 259:1301-1307.

Chung S, Park CW, Shin SJ, Lim JH, Chung HW, Youn DY, Kim HW, Kim BS, Lee JH, Kim GH, Chang YS. 2010. Tempol or candesartan prevents high-fat diet-induced hypertension and renal damage in spontaneously hypertensive rats. *Nephrol Dial Transplant* 25:389-399.

Christiansen SC, Eddleston J, Woessner KM, Chambers SS, Ye R, Pan ZK, Zuraw BL. 2002. Up-regulation of functional kinin B1 receptors in allergic airway inflammation. *J Immunol* 169:2054-2060.

- 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.
- Cloutier F, de Sousa B H, Ongali B, Couture R. 2002. Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 135 : 1641-1654.
- Cloutier F, Ongali B, Campos M M, Thibault G, Neugebauer W, Couture R. 2004. Correlation between brain bradykinin receptor binding sites and cardiovascular function in young and adult spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 142 : 285-296.
- Coelho MS, Lopes KL, Freitas RA, de Oliveira-Sales EB, Bergasmaschi CT, Campos RR, Casarini DE, Carmona AK, Araujo MS, Heimann JC, Dolnikoff MS. 2010. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept* 162:61-67.
- Cohen RA, Tong X. 2010. Vascular oxidative stress: the common link in hypertensive and diabetic vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 55:308-316.
- Cole TJ, Schreiber G. 1992. The structure and expression of the genes for T-kininogen in the rat. *Agents Actions Suppl* 38 (Pt 1):292-299.
- Collino M. 2011. High dietary fructose intake: Sweet or bitter life? *World J Diabetes* 2:77-81.
- Combs TP, Berg AH, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. 2001. Endogenous glucose production is inhibited by the adipose-derived protein Acrp30. *J Clin Invest* 108:1875-1881.
- Cooper M, Boner G. 2004. Dual blockade of the renin-angiotensin system in diabetic nephropathy. *Diabet Med* (21 Suppl 1): 15-18.
- Coppack SW, Patel JN, Lawrence VJ. 2001. Nutritional regulation of lipid metabolism in human adipose tissue. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 Suppl 2:S202-S214.
- Correa F M, Graeff F G. 1976. On the mechanism of the hypertensive action of intraseptal bradykinin in the rat. *Neuropharmacology* 15 : 713-717.
- Couto L B, Correa F M, Pela I R. 1998. Brain sites involved in the antinociceptive effect of bradykinin in rats. *Br J Pharmacol* 125 : 1578-1584.
- Couture R, Girolami JP. 2004. Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500:467-485.
- Couture R, Harrisson M, Vianna R M, Cloutier F. 2001. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429 : 161-176.

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

Couture R, Lindsey C.J. 2000. Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. Quirion, R, Bjorklund, A & Hokfelt, T. [16 Chapter VI], Peptid receptor part 1 *Handbook of Chemical neuroanatomy*.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789.

Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. 2000. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 105:311-320.

Dai S, McNeill JH. 1995. Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33:101-107.

Dai S, Todd M E, Lee S, McNeill J H. Fructose loading induces cardiovascular and metabolic changes in nondiabetic and diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; (72): 771-781.

Damas J, Bourdon V, Lefebvre PJ. 1999. Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Exp Physiol* 84:549-557.

Darley-Usmar V, White R. 1997. Disruption of vascular signalling by the reaction of nitric oxide with superoxide: implications for cardiovascular disease. *Exp Physiol* 82 : 305-316.

Davisson R L, Oliverio M I, Coffman T M, Sigmund C D. 2000. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. *J Clin Invest* 106 : 103-106.

De Brito GH, Carayon P, Ferrari B, Couture R. 2010. Contribution of the central dopaminergic system in the anti-hypertensive effect of kinin B1 receptor antagonists in two rat models of hypertension. *Neuropeptides* 44:191-198.

de Campos R O, Alves R V, Ferreira J, Kyle D J, Chakravarty S, Mavunkel B J, Calixto J B. 1999. Oral antinociception and oedema inhibition produced by NPC 18884, a non-peptidic bradykinin B2 receptor antagonist. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 360 : 278-286.

de Kort H, de Koning EJ, Rabelink TJ, Bruijn JA, Bajema IM. 2011. Islet transplantation in type 1 diabetes. *BMJ* 342:d217.

de Sousa B H, Ongali B, Thibault G, Lindsey C J, Couture R. 2002. Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can J Physiol Pharmacol* 80 : 249-257.

- de Weerd WF, Leeb-Lundberg LM. 1997. Bradykinin sequesters B2 bradykinin receptors and the receptor-coupled Galpha subunits Galphaq and Galphai in caveolae in DDT1 MF-2 smooth muscle cells. *J Biol Chem* 272:17858-17866.
- Decarie A, Adam A, Couture R. 1996. Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg9] BK in carrageenan-induced edema. *Peptides* 17:1009-1015.
- DeFronzo R A, Cooke C R, Andres R, Faloona G R, Davis P J. 1975. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. *J Clin Invest* 55 : 845-855.
- DeFronzo RA. 2004. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. *Int J Clin Pract Suppl*9-21.
- Deji N, Kume S, Araki S, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T. 2009. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 296:F118-F126.
- Delarue J, Magnan C. 2007. Free fatty acids and insulin resistance. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:142-148.
- Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G, Azay J. 2005. Involvement of oxidative stress and NADPH oxidase activation in the development of cardiovascular complications in a model of insulin resistance, the fructose-fed rat. *Atherosclerosis* 179:43-49.
- Dias JP, Couture R. 2011. Blockade of kinin B(1) receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance. *Diabetes Obes Metab*.
- Dias JP, Couture R. 2011. Suppression of vascular inflammation by kinin B₁ receptor antagonism in a rat model of insulin resistance. soumis au *J Cardiovasc Pharmacol*, en révision 7 nov 2011
- Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, Couture R. 2007. The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 152:280-287.
- Dias JP, Talbot S, Senecal J, Carayon P, Couture R. 2010. Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One* 5:e12622.
- Dibona G F. 1983. Neural mechanisms of volume regulation. *Ann Intern Med* 98 : 750-752.
- Dijkstra M, van den Berg G J, Wolters H, In't V G, Slooff M J, Heymans H S, Kuipers F, Vonk R J. 1996. Adenosine triphosphate-dependent copper transport in human liver. *J Hepatol* 25 : 37-42.
- DiMeglio DP, Mattes RD. 2000. Liquid versus solid carbohydrate: effects on food intake and body weight. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:794-800.

Dinneen S, Gerich J, Rizza R. 1992. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 327:707-713.

Dixon DA. 2004. Dysregulated post-transcriptional control of COX-2 gene expression in cancer. *Curr Pharm Des* 10:635-646.

Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K, Madden A, Devine A, Leahey W, Henry W, Johnston GD, McVeigh GE. 2005. Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypertens* 18:839-843.

Diz D I, Jacobowitz D M. 1984. Cardiovascular effects produced by injections of thyrotropin-releasing hormone in specific preoptic and hypothalamic nuclei in the rat. *Peptides* 5 : 801-808.

Diz D I. 1985. Bradykinin and related peptides in central control of the cardiovascular system. *Peptides* (6 Suppl 2): 57-64.

Dogrul A, Gardell L R, Ossipov M H, Tulunay F C, Lai J, Porreca F. 2003. Reversal of experimental neuropathic pain by T-type calcium channel blockers. *Pain* 105 : 159-168.

Dogrul A, Ossipov M H, Lai J, Malan T P, Jr., Porreca F. 2000. Peripheral and spinal antihyperalgesic activity of SIB-1757, a metabotropic glutamate receptor (mGLUR(5)) antagonist, in experimental neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 292 : 115-118.

Dong YF, Liu L, Kataoka K, Nakamura T, Fukuda M, Tokutomi Y, Nako H, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. 2010. Aliskiren prevents cardiovascular complications and pancreatic injury in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia* 53:180-191.

Dor Y, Brown J, Martinez O I, Melton D A. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429 : 41-46.

Dray A. 1997. Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol* 75:704-712.

Drexler H. 1997. Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 39:287-324.

Duchene J, Ahluwalia A. 2009. The kinin B(1) receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. *Curr Opin Pharmacol* 9:125-131.

Duchene J, Lecomte F, Ahmed S, Cayla C, Pesquero J, Bader M, Perretti M, Ahluwalia A. 2007. A novel inflammatory pathway involved in leukocyte recruitment: role for the kinin B1 receptor and the chemokine CXCL5. *J Immunol* 179:4849-4856.

Duez H, Lewis G.F. 2008. Fat Metabolism in insulin resistance and type 2. In: Feinglos M.N., Bethel M.A., editors. *Type 2 Diabetes Mellitus- an evidence-based approach to practical management*. Durham, USA: Humana Press.p 49-73.

- Duka A, Kintsurashvili E, Duka I, Ona D, Hopkins TA, Bader M, Gavras I, Gavras H. 2008. Angiotensin-converting enzyme inhibition after experimental myocardial infarct: role of the kinin B1 and B2 receptors. *Hypertension* 51:1352-1357.
- Duka I, Duka A, Kintsurashvili E, Johns C, Gavras I, Gavras H. 2003. Mechanisms mediating the vasoactive effects of the B1 receptors of bradykinin. *Hypertension* 42:1021-1025.
- Duka I, Kintsurashvili E, Gavras I, Johns C, Bresnahan M, Gavras H. 2001. Vasoactive potential of the b(1) bradykinin receptor in normotension and hypertension. *Circ Res* 88:275-281.
- 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.
- Dupuy C, Virion A, Ohayon R, Kaniewski J, Deme D, Pommier J. 1991. Mechanism of hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in thyroid plasma membrane. *J Biol Chem* 266:3739-3743.
- Dyck P J, Zimmerman B R, Vilen T H, Minnerath S R, Karnes J L, Yao J K, Poduslo J F. 1988. Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 319 : 542-548.
- Ehrenfeld P, Millan C, Matus CE, Figueroa JE, Burgos RA, Nualart F, Bhoola KD, Figueroa CD. 2006. Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. *J Leukoc Biol* 80:117-124.
- El Midaoui A, de Champlain J. 2002. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 39:303-307.
- El Midaoui A., de Champlain J. 2005. Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* 23 : 581-588.
- El Midaoui A, Lungu C, Wang H, Wu L, Robillard C, deBlois D, Couture R. 2011. Impact of alpha-lipoic acid on liver peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, vascular remodeling, and oxidative stress in insulin-resistant rats. *Can J Physiol Pharmacol* 89:743-751.
- El Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de CJ, Neugebauer W, Couture R. 2005. Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* 26:1323-1330.
- El Midaoui A, Wu L, Wang R, de Champlain J. 2006. Modulation of cardiac and aortic peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression by oxidative stress in chronically glucose-fed rats. *Am J Hypertens* 19:407-412.
- Elliott SS, Keim NL, Stern JS, Teff K, Havel PJ. 2002. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 76:911-922.

- Emanuelli C, Chao J, Regoli D, Chao L, Ni A, Madeddu P. The bradykinin B1 receptor and the central regulation of blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1999; (126): 1769-1776.
- Emanuelli C, Madeddu P. 1999. Role of the kallikrein-kinin system in the maturation of cardiovascular phenotype. *Am J Hypertens* 12:988-999.
- Enquist J, Skroder C, Whistler JL, Leeb-Lundberg LM. 2007. Kinins promote B2 receptor endocytosis and delay constitutive B1 receptor endocytosis. *Mol Pharmacol* 71:494-507.
- Enser M. 1972. Clearing-factor lipase in obese hyperglycaemic mice (ob-ob). *Biochem J* 129:447-453.
- Farese RV, Sajan MP, Standaert ML. 2005. Insulin-sensitive protein kinases (atypical protein kinase C and protein kinase B/Akt): actions and defects in obesity and type II diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)* 230:593-605.
- Farese RV. 2001. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:283-295.
- Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, Keogh JM, Lawrence E, Agwu C, Sanna V, Jebb SA, Perna F, Fontana S, Lechler RI, DePaoli AM, O'Rahilly S. 2002. Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 110:1093-1103.
- Faussner A, Proud D, Towns M, Bathon JM. 1998. Influence of the cytosolic carboxyl termini of human B1 and B2 kinin receptors on receptor sequestration, ligand internalization, and signal transduction. *J Biol Chem* 273:2617-2623.
- Feingold KR, Grunfeld C. 1992. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes* 41 Suppl 2:97-101.
- Feinstein R, Kanety H, Papa MZ, Lunenfeld B, Karasik A. 1993. Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J Biol Chem* 268:26055-26058.
- Feldman E L, Stevens M J, Greene D A. 1997. Pathogenesis of diabetic neuropathy. *Clin Neurosci* 4: 365-370.
- Feldman EL. 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest* 111:431-433.
- Feletou M, Martin CA, Molimard M, Naline E, Germain M, Thurieau C, Fauchere JL, Canet E, Advenier C. 1995. In vitro effects of HOE 140 in human bronchial and vascular tissue. *Eur J Pharmacol* 274:57-64.

Fernandes L, Ceravolo GS, Fortes ZB, Tostes R, Santos RA, Santos JA, Mori MA, Pesquero JB, de Carvalho MH. 2006. Modulation of kinin B1 receptor expression by endogenous angiotensin II in hypertensive rats. *Regul Pept* 136:92-97.

Ferreira J, Campos M M, Pesquero J B, Araujo R C, Bader M, Calixto J B. 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 41 : 1006-1012.

Fields LE, Burt VL, Cutler JA, Hughes J, Roccella EJ, Sorlie P. 2004. The burden of adult hypertension in the United States 1999 to 2000: a rising tide. *Hypertension* 44:398-404.

Fior D R, Martins D T, Lindsey C J. 1993. Localization of central pressor action of bradykinin in medulla oblongata. *Am J Physiol* 65 : H1000-H1006.

Fisslthaler B, Popp R, Kiss L, Potente M, Harder DR, Fleming I, Busse R. 1999. Cytochrome P450 2C is an EDHF synthase in coronary arteries. *Nature* 401:493-497.

Fleming I, Michaelis UR, Bredenkotter D, Fisslthaler B, Dehghani F, Brandes RP, Busse R. 2001. Endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase (Cytochrome P450 2C9) is a functionally significant source of reactive oxygen species in coronary arteries. *Circ Res* 88:44-51.

Forstermann U, Kleinert H. 1995. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 352:351-364.

Fortin JP, Bouthillier J, Marceau F. 2003. High agonist-independent clearance of rabbit kinin B1 receptors in cultured cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284:H1647-H1654.

Frey EK. Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. *Arch Klin Chir* 1926; (142): 663-669.

Friedman JM, Halaas JL. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.

Frisbee JC, Stepp DW. 2001. Impaired NO-dependent dilation of skeletal muscle arterioles in hypertensive diabetic obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281:H1304-H1311.

Fuchs S, Frenzel K, Hubert C, Lyng R, Muller L, Michaud A, Xiao HD, Adams JW, Capecchi MR, Corvol P, Shur BD, Bernstein KE. 2005. Male fertility is dependent on dipeptidase activity of testis ACE. *Nat Med* 11:1140-1142.

Fukai T, Folz RJ, Landmesser U, Harrison DG. 2002. Extracellular superoxide dismutase and cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 55:239-249.

Fukuchi S, Hamaguchi K, Seike M, Himeno K, Sakata T, Yoshimatsu H. 2004. Role of fatty acid composition in the development of metabolic disorders in sucrose-induced obese rats. *Exp Biol Med (Maywood)* 229:486-493.

- Gabra B H, Couture R, Sirois P. 2003. [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)* 19 : 1101-1110.
- Gabra B H, Merino V F, Bader M, Pesquero J B, Sirois P. 2005. Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul Pept* 127 : 245-248.
- Gabra B H, Sirois P. 2005. Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. *Eur J Pharmacol* 514 : 61-67.
- Gabra BH, Benrezzak O, Pheng LH, Duta D, Daull P, Sirois P, Nantel F, Battistini B. 2005. Inhibition of type 1 diabetic hyperalgesia in streptozotocin-induced Wistar versus spontaneous gene-prone BB/Worcester rats: efficacy of a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *J Neuropathol Exp Neurol* 64:782-789.
- Gabra BH, Couture R, Sirois P. 2003. [Functional duality of kinin receptors in pathophysiology]. *Med Sci (Paris)* 19:1101-1110.
- Gabra BH, Sirois P. 2002. Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol* 457:115-124.
- Gabra BH, Sirois P. 2003. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides* 24:1131-1139.
- Gabra BH, Sirois P. 2003. Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* 37:36-44.
- Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, Higgins J, DeFelice M, Lochner A, Faggart M, Liu-Cordero SN, Rotimi C, Adeyemo A, Cooper R, Ward R, Lander ES, Daly MJ, Altshuler D. 2002. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-2229.
- Gaetani GF, Ferraris AM, Sanna P, Kirkman HN. 2005. A novel NADPH:(bound) NADP+ reductase and NADH:(bound) NADP+ transhydrogenase function in bovine liver catalase. *Biochem J* 385:763-768.
- Gao L, Mann GE. 2009. Vascular NAD(P)H oxidase activation in diabetes: a double-edged sword in redox signalling. *Cardiovasc Res* 82:9-20.
- Geiss LS, Herman WH, Teutsch SM. 1985. Diabetes and renal mortality in the United States. *Am J Public Health* 75:1325-1326.
- Geppetti P, Del B E, Cecconi R, Tramontana M, Romani A, Theodorsson E. 1992. Capsaicin releases calcitonin gene-related peptide from the human iris and ciliary body in vitro. *Regul Pept*; (41): 83-92.

- Gerald WL, Chao J, Chao L. 1986. Immunological identification of rat tissue kallikrein cDNA and characterization of the kallikrein gene family. *Biochim Biophys Acta* 866:1-14.
- Gilcrease M Z, Hoover R L. 1990. Activated human monocytes exhibit receptor-mediated adhesion to a non-enzymatically glycosylated protein substrate. *Diabetologia* 33 : 329-333.
- Ginsberg HN, Zhang YL, Hernandez-Ono A. 2005. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch Med Res* 36:232-240.
- Gobeil F, Jr., Charland S, Filteau C, Perron SI, Neugebauer W, Regoli D. 1999. Kinin B1 receptor antagonists containing alpha-methyl-L-phenylalanine: in vitro and in vivo antagonistic activities. *Hypertension* 33:823-829.
- Gobel K, Pankratz S, Schneider-Hohendorf T, Bittner S, Schuhmann MK, Langer HF, Stoll G, Wiendl H, Kleinschnitz C, Meuth SG. 2011. Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking. *J Autoimmun* 36:106-114.
- Goetzl EJ. 2007. Diverse pathways for nuclear signaling by G protein-coupled receptors and their ligands. *FASEB J* 21:638-642.
- Goldberg RB. 2009. Cytokine and cytokine-like inflammation markers, endothelial dysfunction, and imbalanced coagulation in development of diabetes and its complications. *J Clin Endocrinol Metab* 94:3171-3182.
- Gonzalez-Chavez A, Elizondo-Argueta S, Gutierrez-Reyes G, Leon-Pedroza JI. 2011. Pathophysiological implications between chronic inflammation and the development of diabetes and obesity. *Cir Cir* 79:209-216.
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrie P, Finance O, Le FG. 2004. SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-[[[(6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl]amino]propanoyl)amino]-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new nonpeptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther* 309:661-669.
- Gracely RH, Lynch SA, Bennett GJ. 1992. Painful neuropathy: altered central processing maintained dynamically by peripheral input. *Pain* 51:175-194.
- Grant SF, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, Helgason A, Stefansson H, Emilsson V, Helgadottir A, Styrkarsdottir U, Magnusson KP, Walters GB, Palsdottir E, Jonsdottir T, Gudmundsdottir T, Gylfason A, Saemundsdottir J, Wilensky RL, Reilly MP, Rader DJ, Bagger Y, Christiansen C, Gudnason V, Sigurdsson G, Thorsteinsdottir U, Gulcher JR, Kong A, Stefansson K. 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet* 38:320-323.

- Greene DA, Arezzo JC, Brown MB. 1999. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. *Neurology* 53:580-591.
- Greene EL, Velarde V, Jaffa AA. 2000. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* 35:942-947.
- Gregg EW, Gu Q, Cheng YJ, Narayan KM, Cowie CC. 2007. Mortality trends in men and women with diabetes, 1971 to 2000. *Ann Intern Med* 147:149-155.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. 1994. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148.
- Griendling KK, Ushio-Fukai M. 2000. Reactive oxygen species as mediators of angiotensin II signaling. *Regul Pept* 91:21-27.
- Griendling KK. 2004. Novel NAD(P)H oxidases in the cardiovascular system. *Heart* 90:491-493.
- Groves JT, Wang CC. 2000. Nitric oxide synthase: models and mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* 4:687-695.
- Gu K, Cowie CC, Harris MI. 1998. Mortality in adults with and without diabetes in a national cohort of the U.S. population, 1971-1993. *Diabetes Care* 21:1138-1145.
- Guilbaud G, Besson J. *Physiologie du circuit de la douleur*. Brasseur L; Guilbaud G, 7-22. 1997. Paris, France, Maloine. Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleur aiguës, douleurs chroniques, thérapeutiques.
- Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng YH, Roberson RS, Ricordi C, O'Connell PJ, Gonzalez FJ, Kahn CR. 2005. Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122:337-349.
- Gupta A, Gupta V, Agrawal S, Natu SM, Agrawal CG, Negi MP, Tiwari S. 2010. Association between circulating leptin and insulin resistance, the lipid profile, and metabolic risk factors in North Indian adult women. *Biosci Trends* 4:325-332.
- Guyton CA, Hall EJ. *Précis de Physiologie médicale*. Saunders company. 10 th edition, 2-1034. 2000. Philadelphia, Pennsylvania. Gabra BH, Berthiaume N, Sirois P, Nantel F, Battistini B. 2006. The kinin system mediates hyperalgesia through the inducible bradykinin B1 receptor subtype: evidence in various experimental animal models of type 1 and type 2 diabetic neuropathy. *Biol Chem* 387:127-143.
- Haddad EB, Fox AJ, Rousell J, Burgess G, McIntyre P, Barnes PJ, Chung KF. 2000. Post-transcriptional regulation of bradykinin B1 and B2 receptor gene expression in human lung fibroblasts by tumor necrosis factor-alpha: modulation by dexamethasone. *Mol Pharmacol* 57:1123-1131.

Hagen TM, Vinarsky V, Wehr CM, Ames BN. 2000. (R)-alpha-lipoic acid reverses the age-associated increase in susceptibility of hepatocytes to tert-butylhydroperoxide both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal* 2:473-483.

Hagiwara M, Murakami H, Ura N, Agata J, Yoshida H, Higashiura K, Shimamoto K. 2004. Renal protective role of bradykinin B1 receptor in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 27:399-408.

Hall C E, Hall O. 1966. Salt hypertension induced by drinking saline and the effect of different concentrations of sucrose and maltose upon its development. *Tex Rep Biol Med* 24 : 445-456.

Hallfrisch J, Lazar F, Jorgensen C, Reiser S. 1979. Insulin and glucose responses in rats fed sucrose or starch. *Am J Clin Nutr* 32:787-793.

Hamdy O, Porramatikul S, Al-Ozairi E. 2006. Metabolic obesity: the paradox between visceral and subcutaneous fat. *Curr Diabetes Rev* 2: 367-373.

Hanis CL, Boerwinkle E, Chakraborty R, Ellsworth DL, Concannon P, Stirling B, Morrison VA, Wapelhorst B, Spielman RS, Gogolin-Ewens KJ, Shepard JM, Williams SR, Risch N, Hinds D, Iwasaki N, Ogata M, Omori Y, Petzold C, Rietzch H, Schroder HE, Schulze J, Cox NJ, Menzel S, Boriraj VV, Chen X, Lim LR, Lindner T, Mereu LE, Wang YQ, Xiang K, Yamagata K, Yang Y, Bell GI. 1996. A genome-wide search for human non-insulin-dependent (type 2) diabetes genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 2. *Nat Genet* 13:161-166.

Hanley AJ, Wagenknecht LE, Norris JM, Bergman R, Anderson A, Chen YI, Lorenzo C, Haffner SM. 2011. Adiponectin and the incidence of type 2 diabetes in Hispanics and African Americans: the IRAS Family Study. *Diabetes Care* 34:2231-2236.

Hariri N, Thibault L. 2010. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev* 23:270-299.

Harlan DM, Kenyon NS, Korsgren O, Roep BO. 2009. Current advances and travails in islet transplantation. *Diabetes* 58:2175-2184.

Hartge MM, Unger T, Kintscher U. 2007. The endothelium and vascular inflammation in diabetes. *Diab Vasc Dis Res* 4:84-88.

Haslbeck K M, Bierhaus A, Erwin S, Kirchner A, Nawroth P, Schlotzer U, Neundorfer B, Heuss D. 2004. Receptor for advanced glycation endproduct (RAGE)-mediated nuclear factor-kappaB activation in vasculitic neuropathy. *Muscle Nerve* 29 : 853-860.

Havel PJ. 2001. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)* 226:963-977.

Havel PJ. 2005. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 63:133-157.

- Havrankova J, Brownstein M, Roth J. 1981. Insulin and insulin receptors in rodent brain. *Diabetologia* 20 Suppl:268-273.
- Hayden MS, Ghosh S. 2008. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132:344-362.
- Henriksen EJ, Jacob S, Augustin HJ, Dietze GJ. 1996. Glucose transport activity in insulin-resistant rat muscle. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and bradykinin antagonism. *Diabetes* 45 Suppl 1:S125-S128.
- Henriksen EJ, Jacob S, Fogt DL, Dietze GJ. 1998. Effect of chronic bradykinin administration on insulin action in an animal model of insulin resistance. *Am J Physiol* 275:R40-R45.
- Henriksen EJ, Jacob S, Kinnick TR, Youngblood EB, Schmit MB, Dietze GJ. 1999. ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *Am J Physiol* 277:R332-R336.
- Henry RR. 1997. Thiazolidinediones. *Endocrinol Metab Clin North Am* 26:553-573.
- Herman RH, Zakim D, Stifel FB. 1970. Effect of diet on lipid metabolism in experimental animals and man. *Fed Proc* 29:1302-1307.
- Hess JF, Derrick AW, MacNeil T, Borkowski JA. 1996. The agonist selectivity of a mouse B1 bradykinin receptor differs from human and rabbit B1 receptors. *Immunopharmacology* 33:1-8.
- Higashi Y, Nishioka K, Umemura T, Chayama K, Yoshizumi M. 2006. Oxidative stress, endothelial function and angiogenesis induced by cell therapy and gene therapy. *Curr Pharm Biotechnol* 7 : 109-116.
- Higashiyama S, Ohkubo I, Ishiguro H, Sasaki M, Matsuda T, Nakamura R. 1987. Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion. *Biochemistry* 26 : 7450-7458.
- Hopewell JW, Robbins ME, van den Aardweg GJ, Morris GM, Ross GA, Whitehouse E, Horrobin DF, Scott CA. 1993. The modulation of radiation-induced damage to pig skin by essential fatty acids. *Br J Cancer* 68:1-7.
- Hortobagyi L, Kis B, Hrabak A, Horvath B, Huszty G, Schweer H, Benyo B, Sandor P, Busija D W, Benyo Z. 2007. Adaptation of the hypothalamic blood flow to chronic nitric oxide deficiency is independent of vasodilator prostanoids. *Brain Res* 1131 : 129-137.
- Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. 1994. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:4854-4858.
- Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. 1993. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259:87-91.

Huang W, Metlakunta A, Dedousis N, Zhang P, Sipula I, Dube JJ, Scott DK, O'Doherty RM. 2010. Depletion of liver Kupffer cells prevents the development of diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance. *Diabetes* 59:347-357.

Hwang I S, Ho H, Hoffman B B, Reaven G M. 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10 : 512-516.

Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, Sato N, Sekiguchi N, Kobayashi K, Sumimoto H, Utsumi H, Nawata H. 2003. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 14:S227-S232.

Isami S, Kishikawa H, Araki E, Uehara M, Kaneko K, Shirotani T, Todaka M, Ura S, Motoyoshi S, Matsumoto K, Miyamura N, Shichiri M. 1996. Bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase of insulin receptor tyrosine kinase in primary adipocytes: evidence that bradykinin stimulates the insulin signalling pathway. *Diabetologia* 39:412-420.

Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beausejour CM, 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.

Itani SI, Ruderman NB, Schmieder F, Boden G. 2002. Lipid-induced insulin resistance in human muscle is associated with changes in diacylglycerol, protein kinase C, and I κ B- α . *Diabetes* 51:2005-2011.

Ito M, Yoshida K, Kimura H, Ozaki N, Kurita K. 2007. Successful Treatment of Trigeminal Neuralgia With Milnacipran. *Clin Neuropharmacol* 30 : 183-185.

Iwasaki Y, Kambayashi M, Asai M, Yoshida M, Nigawara T, Hashimoto K. 2007. High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro. *J Diabetes Complications* 21 : 56-62.

Julius D, Basbaum A I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413 : 203-210.

Kakoki M, Sullivan KA, Backus C, Hayes JM, Oh SS, Hua K, Gasim AM, Tomita H, Grant R, Nossov SB, Kim HS, Jennette JC, Feldman EL, Smithies O. 2010. Lack of both bradykinin B1 and B2 receptors enhances nephropathy, neuropathy, and bone mineral loss in Akita diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:10190-10195.

Kalichman MW, Dines KC, Bobik M, Mizisin AP. 1998. Nerve conduction velocity, laser Doppler flow, and axonal caliber in galactose and streptozotocin diabetes. *Brain Res* 810:130-137.

Kamenov Z, Higashino H, Todorova M, Kajimoto N, Suzuki A. 2006. Physiological characteristics of diabetic neuropathy in sucrose-fed Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 28:13-18.

- Kammerer S, Braun A, Arnold N, Roscher AA. 1995. The human bradykinin B2 receptor gene: full length cDNA, genomic organization and identification of the regulatory region. *Biochem Biophys Res Commun* 211:226-233.
- Kaplan AP, Joseph K, Shibayama Y, Reddigari S, Ghebrehiwet B, Silverberg M. 1997. The intrinsic coagulation/kinin-forming cascade: assembly in plasma and cell surfaces in inflammation. *Adv Immunol* 66:225-272.
- Kaplan NM. 2001. Another scare about antihypertensive therapy. *Am J Cardiol* 87:759-760.
- Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, Artru AA, Azez A, Ivashkova Y, Rudich Z, Shapira Y. 2002. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *J Neurotrauma* 19:953-964.
- Karalliedde J, Viberti G. 2006. Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and diabetes. *J Hum Hypertens* 20:239-253.
- Katusic SK, Colligan RC, Barbaresi WJ, Schaid DJ, Jacobsen SJ. 2001. Incidence of reading disability in a population-based birth cohort, 1976-1982, Rochester, Minn. *Mayo Clin Proc* 76:1081-1092.
- Kawano N, Emoto M, Mori K, Yamazaki Y, Urata H, Tsuchikura S, Motoyama K, Morioka T, Fukumoto S, Shoji T, Koyama H, Okuno Y, Nishizawa Y, Inaba M. 2011. Association of Endothelial and Vascular Smooth Muscle Dysfunction with Cardiovascular Risk Factors, Vascular Complications, and Subclinical Carotid Atherosclerosis in Type 2 Diabetic Patients. *J Atheroscler Thromb*.
- Keymeulen B, Vandemeulebroucke E, Ziegler A G, Mathieu C, Kaufman L, Hale G, Gorus F, Goldman M, Walter M, Candon S, Schandene L, Crenier L, De B C, Seigneurin J M, De P P, Pierard D, Weets I, Rebello P, Bird P, Berrie E, Frewin M, Waldmann H, Bach J F, Pipeleers D, Chatenoud L. 2005. Insulin needs after CD3-antibody therapy in new-onset type 1 diabetes. *N Engl J Med* 352 : 2598-2608.
- Kim JK, Michael MD, Previs SF, Peroni OD, Mauvais-Jarvis F, Neschen S, Kahn BB, Kahn CR, Shulman GI. 2000. Redistribution of substrates to adipose tissue promotes obesity in mice with selective insulin resistance in muscle. *J Clin Invest* 105:1791-1797.
- Kim Y C, Zemel M B. 1993. Insulin increases vascular smooth muscle recovery from intracellular calcium loads. *Hypertension* 22 : 74-77.
- Kirkman HN, Rolfo M, Ferraris AM, Gaetani GF. 1999. Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. *J Biol Chem* 274:13908-13914.
- Kitamura N. 1985. [Alternative RNA processing events in kininogen gene expression]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 30 : 1709-1719.

- Klein J, Gonzalez J, Decramer S, Bandin F, Neau E, Salant DJ, Heeringa P, Pesquero JB, Schanstra JP, Bascands JL. 2010. Blockade of the kinin B1 receptor ameliorates glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 21:1157-1164.
- Kobayasi R, Akamine EH, Davel AP, Rodrigues MA, Carvalho CR, Rossoni LV. 2010. Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens* 28:2111-2119.
- Koh KK, Han SH, Quon MJ, Yeal AJ, Shin EK. 2005. Beneficial effects of fenofibrate to improve endothelial dysfunction and raise adiponectin levels in patients with primary hypertriglyceridemia. *Diabetes Care* 28:1419-1424.
- Koh KK, Han SH, Quon MJ. 2005. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. *J Am Coll Cardiol* 46:1978-1985.
- Koh KK, Son JW, Ahn JY, Lee SK, Hwang HY, Kim DS, Jin DK, Ahn TH, Shin EK. 2001. Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. *Int J Cardiol* 81:43-50.
- Kohama I, Ishikawa K, Kocsis JD. 2000. Synaptic reorganization in the substantia gelatinosa after peripheral nerve neuroma formation: aberrant innervation of lamina II neurons by Abeta afferents. *J Neurosci* 20:1538-1549.
- Kohlman O, Jr., Neves FA, Ginoza M, Tavares A, Cezaretti ML, Zanella MT, Ribeiro AB, Gavras I, Gavras H. 1995. Role of bradykinin in insulin sensitivity and blood pressure regulation during hyperinsulinemia. *Hypertension* 25:1003-1007.
- Kohno T, Moore KA, Baba H, Woolf CJ. 2003. Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol* 548:131-138.
- Konda T, Enomoto A, Matsushita J, Takahara A, Moriyama T. 2005. The N- and L-type calcium channel blocker cilnidipine suppresses renal injury in dahl rats fed a high-sucrose diet, an experimental model of metabolic syndrome. *Nephron Physiol* 101:1-13.
- Kotchen TA, Zhang HY, Covelli M, Blehschmidt N. 1991. Insulin resistance and blood pressure in Dahl rats and in one-kidney, one-clip hypertensive rats. *Am J Physiol* 261:E692-E697.
- Kudoh A, Matsuki A. 2000. Bradykinin-induced inositol 1,4,5-triphosphate in neonatal rat cardiomyocytes is activated by endotoxin. *Shock* 14 : 635-639.
- Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. 2010. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides* 44:145-154.
- Kung HC, Hoyert DL, Xu J, Murphy SL. 2008. Deaths: final data for 2005. *Natl Vital Stat Rep* 56:1-120.

Kurtz T W, Pravenec M. 2004. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 22 : 2253-2261.

Kurtz T W. 2006. New treatment strategies for patients with hypertension and insulin resistance. *Am J Med* 119 : S24-S30.

Kusunoki J, Kanatani A, Moller DE. 2006. Modulation of fatty acid metabolism as a potential approach to the treatment of obesity and the metabolic syndrome. *Endocrine* 29:91-100.

Kusunoki M, Tsutsumi K, Nakayama M, Kurokawa T, Nakamura T, Ogawa H, Fukuzawa Y, Morishita M, Koide T, Miyata T. 2007. Relationship between serum concentrations of saturated fatty acids and unsaturated fatty acids and the homeostasis model insulin resistance index in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Invest* 54:243-247.

Kwan J, Wang H, Munk S, Xia L, Goldberg HJ, Whiteside CI. 2005. In high glucose protein kinase C-zeta activation is required for mesangial cell generation of reactive oxygen species. *Kidney Int* 68:2526-2541.

Laffer CL, Elijovich F. 2010. Inflammation and therapy for hypertension. *Curr Hypertens Rep* 12:233-242

Lamontagne D, Nakhostine N, Couture R, Nadeau R. 1996. Mechanisms of kinin B1-receptor-induced hypotension in the anesthetized dog. *J Cardiovasc Pharmacol* 28:645-650.

Lacoursière S et Hébert J. 2011. L'adulte préobèse ou obèse un casse-tête pas si compliqué ! *Médecine science. Le Médecin du Québec*, volume 46, numéro 9, septembre.

Landin-Olsson M. 2002. Latent autoimmune diabetes in adults. *Ann N Y Acad Sci* 958:112-116.

Landmesser U, Harrison DG. 2001. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Coron Artery Dis* 12:455-461.

Landsberg L. 1992. Hyperinsulinemia: possible role in obesity-induced hypertension. *Hypertension* 19 : I61-I66.

Landsberg L. 1996. Insulin sensitivity in the pathogenesis of hypertension and hypertensive complications. *Clin Exp Hypertens* 18 : 337-346.

Laneuville O, Couture R. 1987. Bradykinin analogue blocks bradykinin-induced inhibition of a spinal nociceptive reflex in the rat. *Eur J Pharmacol* 137 : 281-285.

Laneuville O, Reader TA, Couture R. 1989. Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in the rat. *Eur J Pharmacol* 159:273-283.

Langenstroer P, Pieper G M. 1992. Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 263 : H257-H265.

Laund K, Shabto U. 2010. Diabetic retinopathy. In: Poretzky L, editor. *Principles of Diabetes Mellitus*. New York, USA: Springer.p 331-346.

Lassegue B, Sorescu D, Szocs K, Yin Q, Akers M, Zhang Y, Grant SL, Lambeth JD, Griendling KK. 2001. Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res* 88:888-894.

Le KA, Tappy L. 2006. Metabolic effects of fructose. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9:469-475.

Leahy J.L. 2008. Pathogenesis of Type 2 Diabetes. In: Feinglos M.N., Bethel M.A., editors. *Type 2 Diabetes Mellitus an evidence-based approach to practical management*. Durham, USA: Humana Press.p 17-33.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. 2005. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57:27-77.

Leopold JA, Loscalzo J. 2005. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1332-1340.

Leseney AM, Deme D, Legue O, Ohayon R, Chanson P, Sales JP, Carvalho DP, Dupuy C, Virion A. 1999. Biochemical characterization of a Ca²⁺/NAD(P)H-dependent H₂O₂ generator in human thyroid tissue. *Biochimie* 81:373-380.

Leu J.P, Zonszein J. 2010. Diagnostic Criteria and Classification of Diabetes. In: Leonid Poretzky, editor. *Principles of Diabetes Mellitus*. New York, USA: Springer.p 107-115.

Levy D, Zochodne D W. 2000. Increased mRNA expression of the B1 and B2 bradykinin receptors and antinociceptive effects of their antagonists in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 86 : 265-271.

Lewis GF, 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.

Lewis R E, Phillips M I. 1984. Localization of the central pressor action of bradykinin to the cerebral third ventricle. *Am J Physiol* 247 : R63-R68.

Li F, Hu W, Liu N. 1999. [Role of neuronal nitric oxide synthase in dynorphin spinal neurotoxicity and analgesia in rats]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 79 : 217-220.

- Libby P, Ridker PM, Hansson GK. 2009. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol* 54 : 2129-2138.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105:1135-1143.
- Lillioja S, Mott DM, Spraul M, Ferraro R, Foley JE, Ravussin E, Knowler WC, Bennett PH, Bogardus C. 1993. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction as precursors of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Prospective studies of Pima Indians. *N Engl J Med* 329:1988-1992.
- Lindqvist A, Baelemans A, Erlanson-Albertsson C. 2008. Effects of sucrose, glucose and fructose on peripheral and central appetite signals. *Regul Pept* 150:26-32.
- Lindsey C J, Buck H S, Fior-Chadi D R, Lapa R C. 1997. Pressor effect mediated by bradykinin in the paratrigeminal nucleus of the rat. *J Physiol* (502 (Pt 1)): 119-129.
- Lindsey C J, Fujita K, Martins T O. 1988. The central pressor effect of bradykinin in normotensive and hypertensive rats. *Hypertension* 11 : I126-I129.
- Lindsey CJ, Nakaie CR, Martins DT. 1989. Central nervous system kinin receptors and the hypertensive response mediated by bradykinin. *Br J Pharmacol* 97:763-768.
- Lombardo YB, Drago S, Chicco A, Fainstein-Day P, Gutman R, Gagliardino JJ, Gomez Dumm CL. 1996. Long-term administration of a sucrose-rich diet to normal rats: relationship between metabolic and hormonal profiles and morphological changes in the endocrine pancreas. *Metabolism* 45:1527-1532.
- Lopes P, Couture R. 1992. Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. *Eur J Pharmacol* 210:137-147.
- Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, Couture R. 2007. Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41:375-387.
- Luttrell LM, Daaka Y, Lefkowitz RJ. 1999. Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Cell Biol* 11:177-183.
- Madeddu P, Glorioso N, Soro A, Tonolo G, Manunta P, Troffa C, Demontis MP, Varoni MV, Anania V. 1990. Brain kinins are responsible for the pressor effect of intracerebroventricular captopril in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 15:407-412.
- Madeddu P, Varoni MV, Palomba D, Emanuelli C, Demontis MP, Glorioso N, Dessi-Fulgheri P, Sarzani R, Anania V. 1997. Cardiovascular phenotype of a mouse strain with disruption of bradykinin B2-receptor gene. *Circulation* 96:3570-3578.

- Maislos M, Medvedovskv V, Sztarkier I, Yaari A, Sikuler E. 2006. *Psammomys obesus* (sand rat), a new animal model of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Res Clin Pract* 72:1-5.
- Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Despres JP, Hu FB. 2010. Sugar-sweetened beverages, obesity, type 2 diabetes mellitus, and cardiovascular disease risk. *Circulation* 121:1356-1364.
- Mamalakis G, Kafatos A, Tornaritis M, Alevizos B. 1998. Anxiety and adipose essential fatty acid precursors for prostaglandin E1 and E2. *J Am Coll Nutr* 17:239-243.
- Mandrup-Poulsen T, Pickersgill L, Donath MY. 2010. Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6:158-166.
- Mangravite LM, Dawson K, Davis RR, Gregg JP, Krauss RM. 2007. Fatty acid desaturase regulation in adipose tissue by dietary composition is independent of weight loss and is correlated with the plasma triacylglycerol response. *Am J Clin Nutr* 86:759-767.
- Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP, Koniaris A. 2011. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E567-E584.
- Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. 1998. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50:357-386.
- Marcic B, Deddish PA, Jackman HL, Erdos EG. 1999. Enhancement of bradykinin and resensitization of its B2 receptor. *Hypertension* 33:835-843.
- Marshall C, Hitman GA, Partridge CJ, Clark A, Ma H, Shearer TR, Turner MD. 2005. Evidence that an isoform of calpain-10 is a regulator of exocytosis in pancreatic beta-cells. *Mol Endocrinol* 19:213-224.
- Martyn KD, Frederick LM, von LK, Dinauer MC, Knaus UG. 2006. Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18:69-82.
- Masilamani S, Kim G H, Mitchell C, Wade J B, Knepper M A. 1999. Aldosterone-mediated regulation of ENaC alpha, beta, and gamma subunit proteins in rat kidney. *J Clin Invest* 104 : R19-R23.
- Massaro M, Scoditti E, Carluccio MA, Campana MC, De CR. 2010. Omega-3 fatty acids, inflammation and angiogenesis: basic mechanisms behind the cardioprotective effects of fish and fish oils. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 56:59-82.
- Matesanz N, Lafuente N, Azcutia V, Martin D, Cuadrado A, Nevado J, Rodriguez-Manas L, Sanchez-Ferrer CF, Peiro C. 2007. Xanthine oxidase-derived extracellular superoxide anions stimulate activator protein 1 activity and hypertrophy in human vascular smooth muscle via c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Hypertens* 25:609-618.

- Mathews C.E., Leiter E.H. 2005. Rodent Models of the study of Diabetes. In: Kahn C.R, Weir G.C., King G.L., Jacobson A.M., M, s, e, editors. Joslin's Diabetes Mellitus. Boston: Lippincott Williams and Wilkins.p 291-327.
- Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. 1996. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* 50:128-139.
- Mattes RD. 1996. Dietary compensation by humans for supplemental energy provided as ethanol or carbohydrate in fluids. *Physiol Behav* 59:179-187.
- McGarry JD. 2002. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 51:7-18.
- McLean PG, Perretti M, Ahluwalia A. 2000. Kinin B(1) receptors and the cardiovascular system: regulation of expression and function. *Cardiovasc Res* 48:194-210.
- McTernan CL, McTernan PG, Harte AL, Levick PL, Barnett AH, Kumar S. 2002. Resistin, central obesity, and type 2 diabetes. *Lancet* 359:46-47.
- Meigs JB, D'Agostino RB, Sr., Wilson PW, Cupples LA, Nathan DM, Singer DE. 1997. Risk variable clustering in the insulin resistance syndrome. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 46:1594-1600.
- Meijer RI, Serne EH, Smulders YM, van Hinsbergh VW, Yudkin JS, Eringa EC. 2011. Perivascular adipose tissue and its role in type 2 diabetes and cardiovascular disease. *Curr Diab Rep* 11:211-217.
- Meini S, Quartara L, Rizzi A, Patacchini R, Cucchi P, Giolitti A, Calo G, Regoli D, Criscuoli M, Maggi CA. 1999. MEN 11270, A novel selective constrained peptide antagonist with high affinity at the human B2 kinin receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1250-1256.
- Mendez JI, Nicholson WJ, Taylor WR. 2005. SOD isoforms and signaling in blood vessels: evidence for the importance of ROS compartmentalization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:887-888.
- Meneton P, Bloch-Faure M, Hagege AA, Ruetten H, Huang W, Bergaya S, Ceiler D, Gehring D, Martins I, Salmon G, Boulanger CM, Nussberger J, Crozatier B, Gasc JM, Heudes D, Bruneval P, Doetschman T, Menard J, Alhenc-Gelas F. 2001. Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:2634-2639.
- Menetrey D, Gannon A, Levine JD, Basbaum AI. 1989. Expression of c-fos protein in interneurons and projection neurons of the rat spinal cord in response to noxious somatic, articular, and visceral stimulation. *J. Comp Neurol.* 285 : 177-195.
- Messlinger K. [What is nociceptor]. 1997. *Schmerz* 11 : 353-366.

Metsarinne K, Saijonmaa O, Yki-Jarvinen H, Fyhrquist F. 1994. Insulin increases the release of endothelin in endothelial cell cultures in vitro but not in vivo. *Metabolism* 43 : 878-882.

Millar WJ, Young TK. 2003. Tracking diabetes: Prevalence, incidence and risk factors. *Health Reports (Statistics Canada, Catalogue 82-003)* 14:35-47.

Minami M, Ishiyama A, Takagi M, Omata M, Atarashi K. 2005. Effects of allopurinol, a xanthine oxidase inhibitor, on renal injury in hypercholesterolemia-induced hypertensive rats. *Blood Press* 14:120-125.

Miyata T, Taguchi T, Uehara M, Isami S, Kishikawa H, Kaneko K, Araki E, Shichiri M. 1998. Bradykinin potentiates insulin-stimulated glucose uptake and enhances insulin signal through the bradykinin B2 receptor in dog skeletal muscle and rat L6 myoblasts. *Eur J Endocrinol* 138:344-352.

Miyazaki M, Kim YC, Ntambi JM. 2001. A lipogenic diet in mice with a disruption of the stearoyl-CoA desaturase 1 gene reveals a stringent requirement of endogenous monounsaturated fatty acids for triglyceride synthesis. *J Lipid Res* 42:1018-1024.

Mizuno Y, Jacob RF, Mason RP. 2010. Advances in pharmacologic modulation of nitric oxide in hypertension. *Curr Cardiol Rep* 12:472-480.

Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS. 1994. NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266:H2568-H2572.

Moller DE. 2000. Potential role of TNF-alpha in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 11:212-217.

Molnar J, Yu S, Mzhavia N, Pau C, Chereshev I, Dansky HM. 2005. Diabetes induces endothelial dysfunction but does not increase neointimal formation in high-fat diet fed C57BL/6J mice. *Circ Res* 96:1178-1184.

Moran TH, Bi S. 2006. Hyperphagia and obesity of OLETF rats lacking CCK1 receptors: developmental aspects. *Dev Psychobiol* 48:360-367.

Morand-Contant M, Anand-Srivastava MB, Couture R. 2010. Kinin B1 receptor upregulation by angiotensin II and endothelin-1 in rat vascular smooth muscle cells: receptors and mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299:H1625-H1632.

Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. 2005. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J Pharmacol Sci* 99:6-38.

Mori MA, Araujo RC, Reis FC, Sgai DG, Fonseca RG, Barros CC, Merino VF, Passadore M, Barbosa AM, Ferrari B, Carayon P, Castro CH, Shimuta SI, Luz J, Bascands JL, Schanstra JP, Even PC, Oliveira SM, Bader M, Pesquero JB. 2008. Kinin B1 receptor deficiency leads to leptin hypersensitivity and resistance to obesity. *Diabetes* 57:1491-1500.

- Morris M J, Wilson W L, Starbuck E M, Fitts D A. 2002. Forebrain circumventricular organs mediate salt appetite induced by intravenous angiotensin II in rats. *Brain Res* 949 : 42-50.
- Morton GJ. 2007. Hypothalamic leptin regulation of energy homeostasis and glucose metabolism. *J Physiol* 583:437-443.
- Moura AS. 2000. Bradykinin enhances membrane electrical activity of pancreatic beta cells in the presence of low glucose concentrations. *Braz J Med Biol Res* 33:1089-1092.
- Muniyappa R, Srinivas P R, Ram J L, Walsh M F, Sowers J R. 1998. Calcium and protein kinase C mediate high-glucose-induced inhibition of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 31 : 289-295.
- Murase T, Mizuno T, Omachi T, Onizawa K, Komine Y, Kondo H, Hase T, Tokimitsu I. 2001. Dietary diacylglycerol suppresses high fat and high sucrose diet-induced body fat accumulation in C57BL/6J mice. *J Lipid Res* 42:372-378.
- Muratani H, Fukiyama K, Kamiyama T, Kimura Y, Abe K, Ishii M, Fujii J, Kuwajima I, Shiomi T, Kawano Y, Mikami H, Ibayashi S, Omae T. 1996. Current status of antihypertensive therapy for elderly patients in Japan. *Hypertens Res* 19 : 281-290.
- Muse ED, Obici S, Bhanot S, Monia BP, McKay RA, Rajala MW, Scherer PE, Rossetti L. 2004. Role of resistin in diet-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* 114:232-239.
- Nakamura J, Koh N, Sakakibara F, Hamada Y, Wakao T, Sasaki H, Mori K, Nakashima E, Naruse K, Hotta N. 1997. Diabetic neuropathy in sucrose-fed Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats: effect of an aldose reductase inhibitor, TAT. *Life Sci* 60:1847-1857.
- Nakamura Y, Makino R, Tanaka T, Ishimura Y, Ohtaki S. 1991. Mechanism of H₂O₂ production in porcine thyroid cells: evidence for intermediary formation of superoxide anion by NADPH-dependent H₂O₂-generating machinery. *Biochemistry* 30:4880-4886.
- Nakanishi S. 1987. Substance P precursor and kininogen: their structures, gene organizations, and regulation. *Physiol Rev* 67:1117-1142.
- Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspá MA, Roncal C, Perez-Pozo SE, Johnson RJ, Nakagawa T. 2010. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 298:F712-F720.
- Nandish S, Wyatt J, Bailon O, Smith M, Oliveros R, Chilton R. 2011. Implementing cardiovascular risk reduction in patients with cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 108:42B-51B.
- Neugebauer W, Blais PA, Halle S, Filteau C, Regoli D, Gobeil F, Jr. 2002. Kinin B1 receptor antagonists with multi-enzymatic resistance properties. *Can J Physiol Pharmacol* 80:287-292.

Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ. 1996. Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384:360-364.

Neve B, Fernandez-Zapico ME, Ashkenazi-Katalan V, Dina C, Hamid YH, Joly E, Vaillant E, Benmezroua Y, Durand E, Bakaher N, Delannoy V, Vaxillaire M, Cook T, Dallinga-Thie GM, Jansen H, Charles MA, Clement K, Galan P, Herberg S, Helbecque N, Charpentier G, Prentki M, Hansen T, Pedersen O, Urrutia R, Melloul D, Froguel P. 2005. Role of transcription factor KLF11 and its diabetes-associated gene variants in pancreatic beta cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:4807-4812.

Ni A, Chao L, Chao J. 1998. Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 273:2784-2791.

Nicoletti A, Michel JB. 1999. Cardiac fibrosis and inflammation: interaction with hemodynamic and hormonal factors. *Cardiovasc Res* 41:532-543.

Nitti M, Furfaro A L, Traverso N, Odetti P, Storace D, Cottalasso D, Pronzato M A, Marinari U M, Domenicotti C. 2007. PKC delta and NADPH oxidase in AGE-induced neuronal death. *Neurosci Lett* 416 : 261-265.

Noda K, Melhorn MI, Zandi S, Frimmel S, Tayyari F, Hisatomi T, Almulki L, Pronczuk A, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. 2010. An animal model of spontaneous metabolic syndrome: Nile grass rat. *FASEB J* 24:2443-2453.

Obrosova I G. 2005. Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal* 7 : 1543-1552.

Ohshiro Y, Ma RC, Yasuda Y, Hiraoka-Yamamoto J, Clermont AC, Isshiki K, Yagi K, Arikawa E, Kern TS, King GL. 2006. Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase Cbeta-null mice. *Diabetes* 55:3112-3120.

Ohtomo S, Izuhara Y, Nangaku M, Dan T, Ito S, van Ypersele de SC, Miyata T. 2010. Body weight control by a high-carbohydrate/low-fat diet slows the progression of diabetic kidney damage in an obese, hypertensive, type 2 diabetic rat model. *J Obes*.

Okamoto H, Greenbaum LM. 1983. Pharmacological properties of T-kinin (isoleucyl-seryl-bradykinin) from rat plasma. *Biochem Pharmacol* 32:2637-2638.

Okamoto M, Baba H, Goldstein PA, Higashi H, Shimoji K, Yoshimura M. 2001. Functional reorganization of sensory pathways in the rat spinal dorsal horn following peripheral nerve injury. *J Physiol* 532:241-250.

- Ondrak KS, Hackney AC. 2010. Body composition differences in normal weight, obese-overweight and anorexic adolescents: role of adipocytokines. *Med Sport Sci* 55:32-42.
- Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, Thibault G, Couture R. 2004. Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* 15:2463-2466.
- Oshida Y, Yamanouchi K, Hayamizu S, Sato Y. 1989. Long-term mild jogging increases insulin action despite no influence on body mass index or VO₂ max. *J Appl Physiol* 66:2206-2210.
- Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. 1999. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100:2473-2476.
- Pacher P, Beckman J S, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007; (87): 315-424.
- Pakiz B, Flatt SW, Bardwell WA, Rock CL, Mills PJ. 2011. Effects of a weight loss intervention on body mass, fitness, and inflammatory biomarkers in overweight or obese breast cancer survivors. *Int J Behav Med* 18:333-341.
- Palecek J, Willis WD. 2003. The dorsal column pathway facilitates visceromotor responses to colorectal distention after colon inflammation in rats. *Pain* 104 : 501-507.
- Panchal SK, Brown L. 2011. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011:351982.
- Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, Kauter K, Sernia C, Campbell F, Ward L, Gobe G, Fenning A, Brown L. 2011. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 57:51-64.
- Papapetropoulos A, Rudic RD, Sessa WC. 1999. Molecular control of nitric oxide synthases in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 43:509-520.
- Parekh PI, Petro AE, Tiller JM, Feinglos MN, Surwit RS. 1998. Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. *Metabolism* 47:1089-1096.
- Park HK, Qatanani M, Briggs ER, Ahima RS, Lazar MA. 2011. Inflammatory induction of human resistin causes insulin resistance in endotoxemic mice. *Diabetes* 60:775-783.
- Patel J, Iyer A, Brown L. 2009. Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Biophys* 46:66-72.
- Patel SD, Rajala MW, Rossetti L, Scherer PE, Shapiro L. 2004. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. *Science* 304:1154-1158.

Patriarca P, Cramer R, Marussi M, Rossi F, Romeo D. 1971. Mode of activation of granule-bound NADPH oxidase in leucocytes during phagocytosis. *Biochim Biophys Acta* 237:335-338.

Patro B, Szajewska H. 2010. Meal patterns and childhood obesity. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:300-304.

Peppia M, Brem H, Cai W, Zhang JG, Basgen J, Li Z, Vlassara H, Uribarri J. 2006. Prevention and reversal of diabetic nephropathy in db/db mice treated with alagebrium (ALT-711). *Am J Nephrol* 26:430-436.

Pereira RL, Buscariollo BN, Correa-Costa M, Semedo P, Oliveira CD, Reis VO, Maquigussa E, Araujo RC, Braga TT, Soares MF, Moura IC, Malheiros DM, Filho AP, Keller AC, Camara NO. 2011. Bradykinin receptor 1 activation exacerbates experimental focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int* 79:1217-1227.

Perseghin G, Petersen K, Shulman GI. 2003. Cellular mechanism of insulin resistance: potential links with inflammation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27 Suppl 3:S6-11.

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.

Pesquero JB, Bader M. 2006. Genetically altered animal models in the kallikrein-kinin system. *Biol Chem* 387:119-126.

Petcu M, Ongali B, El MA, de Champlain J, Couture R. 2005. Effects of alpha-lipoic acid on kinin B1 and B2 receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides* 26:1331-1338.

Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. 2004. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 350:664-671.

Peyroux J, Sternberg M. 2006. Advanced glycation endproducts (AGEs): Pharmacological inhibition in diabetes. *Pathol Biol (Paris)* 54 : 405-419.

Pieper G M, Mei D A, Langenstroer P, O'Rourke S T. 1992. Bioassay of endothelium-derived relaxing factor in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 263 : H676-H680.

Pilon M, Wu R, Huot-Marchand JE, deBlois D, Champlain J, Couture R. 2009. Effect of chronic inhibition of nitric oxide on hypertension, insulin resistance, and cardiovascular remodeling in glucose-fed rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 53:405-413.

Pi-Sunyer X. 2005. Treatment of Obesity. In: Kahn C.R, Weir G.C., King G.L., Moses A.C., Smith R.J., editors. *Joslin's Diabetes Mellitus*. Boston, USA: Lippincott Williams and Wilkins.p 547-562.

- Pober JS, Gimbrone MA, Jr., Lapierre LA, Mendrick DL, Fiers W, Rothlein R, Springer TA. 1986. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137:1893-1896.
- Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. 2006. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 22:257-273.
- Porreca F, Vanderah TW, Guo W, Barth M, Dodey P, Peyrou V, Luccarini JM, Junien JL, 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.
- Portha B, Lacraz G, Chavey A, Figeac F, Fradet M, Turrel-Cuzin C, Homo-Delarche F, Giroix MH, Bailbe D, Gangnerau MN, Movassat J. 2010. Islet structure and function in the GK rat. *Adv Exp Med Biol* 654:479-500.
- Porzio O, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Accili D, Lauro R, Borboni P, Sesti G. 1999. The Gly972-->Arg amino acid polymorphism in IRS-1 impairs insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Clin Invest* 104:357-364.
- Pouliot M, Hetu S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. 2011. Modulation of retinal blood flow by kinin B receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 92:482-489.
- Powell SJ, Slynn G, Thomas C, Hopkins B, Briggs I, Graham A. 1993. Human bradykinin B2 receptor: nucleotide sequence analysis and assignment to chromosome 14. *Genomics* 15:435-438.
- Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P. 2002. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol* 193:275-286.
- Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP, Maezono K, Defronzo RA, Mandarino LJ. 2001. Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes* 50:2572-2578.
- Privitera P J, Beckstead R M, Yates P, Walgren R. 2003. Autoradiographic localization of [125I-Tyr⁰]bradykinin binding sites in brains of Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Cell Mol Neurobiol* 23 : 805-815.
- Pruneau D, Paquet JL, Luccarini JM, Defrene E, Fouchet C, Franck RM, Loillier B, Robert C, Belichard P, Duclos H, Cremers B, Dodey P. 1999. Pharmacological profile of LF 16-0687, a new potent non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist. *Immunopharmacology* 43:187-194.
- Puntarulo S, Cederbaum AI. 1998. Production of reactive oxygen species by microsomes enriched in specific human cytochrome P450 enzymes. *Free Radic Biol Med* 24:1324-1330.

Raben A, Vasilaras TH, Moller AC, Astrup A. 2002. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr* 76:721-729.

Raidoo DM, Bhoola KD. 1998. Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue. *Pharmacol Ther* 79:105-127.

Rea S, James DE. 1997. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46:1667-1677.

Reaven G M, Hollenbeck C, Jeng C Y, Wu M S, Chen Y D. 1988. Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate, and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37 : 1020-1024.

Reaven G M. 1991. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and hypertriglyceridemia in the etiology and clinical course of hypertension. *Am J Med* 90 : 7S-12S.

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

Regoli D, Rhaleb NE, Tousignant C, Rouissi N, Nantel F, Jukic D, Drapeau G. 1991. New highly potent bradykinin B2 receptor antagonists. *Agents Actions* 34:138-141.

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadian SF, Ward R, Lander ES. 2001. Linkage disequilibrium in the human genome. *Nature* 411:199-204.

Rizzi A, Gobeil F, Bogoni G, Calo G, Campobasso C, Inamura N, Regoli D. 1997. Antagonistic effects of FR 173657 on human, pig, rabbit, and guinea pig kinin receptors: an in vitro study. *Can J Physiol Pharmacol* 75:601-608.

Robertson R P, Harmon J, Tran P O, Tanaka Y, Takahashi H. 2003. Glucose toxicity in beta-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes* 52 : 581-587.

Rocchini A P. 1991. Insulin resistance and blood pressure regulation in obese and nonobese subjects. Special lecture. *Hypertension* 17 : 837-842.

Rodi D, Couture R, Ongali B, Simonato M. 2005. Targeting kinin receptors for the treatment of neurological diseases. *Curr Pharm Des* 11:1313-1326.

Rodriguez A I, Pereira-Flores K, Hernandez-Salinas R, Boric M P, Velarde V. 2006. High glucose increases B1-kinin receptor expression and signaling in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345 : 652-659.

Rodriguez JA, De la Cerda P, Collyer E, Decap V, Vio CP, Velarde V. 2006. Cyclooxygenase-2 induction by bradykinin in aortic vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290:H30-H36.

Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. 2001. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 17:189-212.

Rowe J W, Young J B, Minaker K L, Stevens A L, Pallotta J, Landsberg L. 1981. Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 30 : 219-225.

Ruiz-Ramirez A, Chavez-Salgado M, Peneda-Flores JA, Zapata E, Masso F, El-Hafidi M. 2011. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301:E1198-E1207.

Ryan E A, Paty B W, Senior P A, Lakey J R, Bigam D, Shapiro A M. 2005. Beta-score: an assessment of beta-cell function after islet transplantation. *Diabetes Care* 28 : 343-347.

Ryan EA, Bigam D, Shapiro AM. 2006. Current indications for pancreas or islet transplant. *Diabetes Obes Metab* 8:1-7.

Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji M, Nakamaru K, Hirashima Y, Kawashima J, Shirotani T, Ichinose K, Brownlee M, Araki E. 2003. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 300:216-222.

Salas-Salvado J, Martinez-Gonzalez MA, Bullo M, Ros E. 2011. The role of diet in the prevention of type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 21 Suppl 2:B32-B48.

Salsali A, Nathan M. 2006. A review of types 1 and 2 diabetes mellitus and their treatment with insulin. *Am J Ther* 13:349-361.

Sandkuhler J. 2009. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev* 89:707-758.

Santos EL, de Picoli SK, Guimaraes PB, Reis FC, Silva SM, Costa-Neto CM, Luz J, Pesquero JB. 2008. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor enalapril on body weight and composition in young rats. *Int Immunopharmacol* 8:247-253.

Sardi SP, Perez H, Antunez P, Rothlin RP. 1997. Bradykinin B1 receptors in human umbilical vein. *Eur J Pharmacol* 321:33-38.

- Sato A, Kawano H, Notsu T, Ohta M, Nakakuki M, Mizuguchi K, Itoh M, Suganami T, Ogawa Y. 2010. Antiobesity effect of eicosapentaenoic acid in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity: importance of hepatic lipogenesis. *Diabetes* 59:2495-2504.
- Satoh H, Nguyen MT, Miles PD, Imamura T, Usui I, Olefsky JM. 2004. Adenovirus-mediated chronic "hyper-resistinemia" leads to in vivo insulin resistance in normal rats. *J Clin Invest* 114:224-231.
- Scacchi R, Pinto A, Gambina G, Rosano A, Corbo RM. 2007. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with higher risk for Alzheimer's disease in octogenarians. *Brain Res* 1139:1-5.
- Scarda A, Franzin C, Milan G, Sanna M, Dal PC, Pagano C, Boldrin L, Piccoli M, Trevellin E, Granzotto M, Gamba P, Federspil G, De CP, Vettor R. 2010. Increased adipogenic conversion of muscle satellite cells in obese Zucker rats. *Int J Obes (Lond)* 34:1319-1327.
- Schafer FQ, Buettner GR. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30:1191-1212.
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL. 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.
- Schiffrin EL, Touyz RM. 2003. Multiple actions of angiotensin II in hypertension: benefits of AT1 receptor blockade. *J Am Coll Cardiol* 42:911-913.
- Schmidt A M, Yan S D, Yan S F, Stern D M. 2001. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 108 : 949-955.
- Schubert M, Gautam D, Surjo D, Ueki K, Baudler S, Schubert D, Kondo T, Alber J, Galldiks N, Kustermann E, Arndt S, Jacobs AH, Krone W, Kahn CR, Bruning JC. 2004. Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3100-3105.
- Schulz E, Gori T, Munzel T. 2011. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. *Hypertens Res* 34:665-673.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., Seeley RJ, Baskin DG. 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404:661-671.
- Seagle HM, Bessesen DH, Hill JO. 1998. Effects of sibutramine on resting metabolic rate and weight loss in overweight women. *Obes Res* 6:115-121.
- Seguin T, Buleon M, Destrube M, Ranera MT, Couture R, Girolami JP, 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.

- Sesti G, Federici M, Hribal ML, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R. 2001. Defects of the insulin receptor substrate (IRS) system in human metabolic disorders. *FASEB J* 15:2099-2111.
- Shahkhalili Y, Mace K, Moulin J, Zbinden I, Acheson KJ. 2011. The fat:carbohydrate energy ratio of the weaning diet programs later susceptibility to obesity in male sprague dawley rats. *J Nutr* 141:81-86.
- Shakher J, Stevens MJ. 2011. Update on the management of diabetic polyneuropathies. *Diabetes Metab Syndr Obes* 4:289-305.
- Shapiro A, Mu W, Roncal C, Cheng KY, Johnson RJ, Scarpace PJ. 2008. Fructose-induced leptin resistance exacerbates weight gain in response to subsequent high-fat feeding. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295:R1370-R1375.
- Sharma JN, Kesavarao U. 2011. The effects of captopril on cardiac regression, blood pressure and bradykinin components in diabetic Wistar Kyoto rats. *Int J Immunopathol Pharmacol* 24:337-343.
- Sharma N, Okere IC, Barrows BR, Lei B, Duda MK, Yuan CL, Previs SF, Sharov VG, Azimzadeh AM, Ernsberger P, Hoit BD, Sabbah H, Stanley WC. 2008. High-sugar diets increase cardiac dysfunction and mortality in hypertension compared to low-carbohydrate or high-starch diets. *J Hypertens* 26:1402-1410.
- Shiuchi T, Cui T X, Wu L, Nakagami H, Takeda-Matsubara Y, Iwai M, Horiuchi M. 2002. ACE inhibitor improves insulin resistance in diabetic mouse via bradykinin and NO. *Hypertension* 40 : 329-334.
- Shmookler Reis RJ, Xu L, Lee H, Chae M, Thaden JJ, Bharill P, Tazearslan C, Siegel E, Alla R, Zimniak P, Ayyadevara S. 2011. Modulation of lipid biosynthesis contributes to stress resistance and longevity of *C. elegans* mutants. *Aging (Albany NY)* 3:125-147.
- Shoelson S E, Lee J, Yuan M. 2003. Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord*; (27 Suppl 3): S49-S52.
- Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. 2006. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest* 116:1793-1801.
- Sima A A, Bril V, Nathaniel V, McEwen T A, Brown M B, Lattimer S A, Greene D A. 1988. Regeneration and repair of myelinated fibers in sural-nerve biopsy specimens from patients with diabetic neuropathy treated with sorbinil. *N Engl J Med* 319 : 548-555.
- Simard B, Gabra BH, Sirois P. 2002. Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 80:1203-1207.

- Simmons RK, Alberti KG, Gale EA, Colagiuri S, Tuomilehto J, Qiao Q, Ramachandran A, Tajima N, Brajkovich M, I, Ben-Nakhi A, Reaven G, Hama SB, Mendis S, Roglic G. 2010. The metabolic syndrome: useful concept or clinical tool? Report of a WHO Expert Consultation. *Diabetologia* 53:600-605.
- Smith JA, Webb C, Holford J, Burgess GM. 1995. Signal transduction pathways for B1 and B2 bradykinin receptors in bovine pulmonary artery endothelial cells. *Mol Pharmacol* 47:525-534.
- Sowers J R, Ferdinand K C, Bakris G L, Douglas J G. Hypertension-related disease in African Americans. Factors underlying disparities in illness and its outcome. *Postgrad Med* 2002 112 : 24-30, 33.
- Spranger J, Kroke A, Mohlig M, Hoffmann K, Bergmann MM, Ristow M, Boeing H, Pfeiffer AF. 2003. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* 52:812-817.
- Standley P R, Ram J L, Sowers J R. 1993. Insulin attenuation of vasopressin-induced calcium responses in arterial smooth muscle from Zucker rats. *Endocrinology* 133 : 1693-1699.
- Stanhope KL, Griffen SC, Bair BR, Swarbrick MM, Keim NL, Havel PJ. 2008. Twenty-four-hour endocrine and metabolic profiles following consumption of high-fructose corn syrup-, sucrose-, fructose-, and glucose-sweetened beverages with meals. *Am J Clin Nutr* 87:1194-1203.
- Stanhope KL, Schwarz JM, Keim NL, Griffen SC, Bremer AA, Graham JL, Hatcher B, Cox CL, Dyachenko A, Zhang W, McGahan JP, Seibert A, Krauss RM, Chiu S, Schaefer EJ, Ai M, Otokozawa S, Nakajima K, Nakano T, Beysen C, Hellerstein MK, Berglund L, Havel PJ. 2009. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 119:1322-1334.
- Stentz FB, Umpierrez GE, Cuervo R, Kitabchi AE. 2004. Proinflammatory cytokines, markers of cardiovascular risks, oxidative stress, and lipid peroxidation in patients with hyperglycemic crises. *Diabetes* 53:2079-2086.
- Stephens JM, Pekala PH. 1991. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem* 266:21839-21845.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312.
- Stuehr DJ. 1996. Purification and properties of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol* 268:324-333.
- Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 365:1333-1346.

Su DS, Markowitz MK, DiPardo RM, Murphy KL, Harrell CM, O'Malley SS, Ransom RW, Chang RS, Ha S, Hess FJ, Pettibone DJ, Mason GS, Boyce S, Freidinger RM, Bock MG. 2003. Discovery of a potent, non-peptide bradykinin B1 receptor antagonist. *J Am Chem Soc* 125:7516-7517.

Su JB, Houel R, Heloïre F, Barbe F, Beverelli F, Sambin L, Castaigne A, Berdeaux A, Crozatier B, Hittinger L. 2000. Stimulation of bradykinin B(1) receptors induces vasodilation in conductance and resistance coronary vessels in conscious dogs: comparison with B(2) receptor stimulation. *Circulation* 101:1848-1853.

Sutherland AP, Van BT, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ, von HM. 2009. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 58:1144-1155.

Suzuki H, DeLano FA, Parks DA, Jamshidi N, Granger DN, Ishii H, Suematsu M, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. 1998. Xanthine oxidase activity associated with arterial blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4754-4759.

Takagi M, Tanaka Y, Yamasaki Y, Yamamoto M, Hori M, Nakaniwa T, Niwa M, Uchino H, Tamura Y, Nomiya T, Watada H, Kawamori R. 2003. Responsiveness of insulin-induced cardiac sympathetic nerve activation associates with blood pressure regulation in diabetics. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284 : E1022-E1026.

Takenaka A, Oki N, Takahashi SI, Noguchi T. 2000. Dietary restriction of single essential amino acids reduces plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) but does not affect plasma IGF-binding protein-1 in rats. *J Nutr* 130:2910-2914.

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

Talbot S, Theberge-Turmel P, Liazoghli D, Senecal J, Gaudreau P, Couture R. 2009. Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin. *J Neuroinflammation* 6:11.

Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. 2006. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:85-96.

Tappy L, Le KA. 2010. Metabolic effects of fructose and the worldwide increase in obesity. *Physiol Rev* 90:23-46.

Tarzi RM, Cook HT, Jackson I, Pusey CD, Lord GM. 2004. Leptin-deficient mice are protected from accelerated nephrotoxic nephritis. *Am J Pathol* 164:385-390.

Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, Asare-Anane H, Persaud SJ, Jones PM, Petrie L, Hanson MA, Poston L. 2005. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R134-R139.

Teff KL, Grudziak J, Townsend RR, Dunn TN, Grant RW, Adams SH, Keim NL, Cummings BP, Stanhope KL, Havel PJ. 2009. Endocrine and metabolic effects of consuming fructose- and glucose-sweetened beverages with meals in obese men and women: influence of insulin resistance on plasma triglyceride responses. *J Clin Endocrinol Metab* 94:1562-1569.

Thallas-Bonke V, Thorpe SR, Coughlan MT, Fukami K, Yap FY, Sourris KC, Penfold SA, Bach LA, Cooper ME, Forbes JM. 2008. Inhibition of NADPH oxidase prevents advanced glycation end product-mediated damage in diabetic nephropathy through a protein kinase C-alpha-dependent pathway. *Diabetes* 57:460-469.

Thomas SR, Witting PK, Drummond GR. 2008. Redox control of endothelial function and dysfunction: molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 10:1713-1765.

Thornalley PJ. 1998. Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)* 44:1013-1023.

Timmermans P B, Wong P C, Chiu A T, Herblin W F, Smith R D. 1993. New perspectives in angiotensin system control. *J Hum Hypertens* 7 Suppl 2 : S19-S31.

Tirupattur P R, Ram J L, Standley P R, Sowers J R. 1993. Regulation of Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase gene expression by insulin in vascular smooth muscle cells. *Am J Hypertens* 6 : 626-629.

Tran LT, Yuen VG, McNeill JH. 2009. The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem* 332:145-159.

Trayhurn P, Beattie JH. 2001. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc Nutr Soc* 60:329-339.

Trovati M, Anfossi G. 2002. Influence of insulin and of insulin resistance on platelet and vascular smooth muscle cell function. *J Diabetes Complications* 16 : 35-40.

Tschope C, Walther T, Koniger J, Spillmann F, Westermann D, Escher F, Pauschinger M, Pesquero JB, Bader M, Schultheiss HP, Noutsias M. 2004. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene. *FASEB J* 18:828-835.

Turer AT, Khera A, Ayers CR, Turer CB, Grundy SM, Vega GL, Scherer PE. 2011. Adipose tissue mass and location affect circulating adiponectin levels. *Diabetologia* 54:2515-2524.

Ueki K, Kondo T, Kahn CR. 2004. Suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) and SOCS-3 cause insulin resistance through inhibition of tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate proteins by discrete mechanisms. *Mol Cell Biol* 24:5434-5446.

Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389:610-614.

Vague P, Moulin JP. 1982. The defective glucose sensitivity of the B cell in non insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia. *Metabolism* 31:139-142.

Valverde AM, Lorenzo M, Navarro P, Mur C, Benito M. 2000. Okadaic acid inhibits insulin-induced glucose transport in fetal brown adipocytes in an Akt-independent and protein kinase C zeta-dependent manner. *FEBS Lett* 472:153-158.

van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. 2011. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 91:79-118.

Varma S, Lal BK, Zheng R, Breslin JW, Saito S, Pappas PJ, Hobson RW, Duran WN. 2005. Hyperglycemia alters PI3k and Akt signaling and leads to endothelial cell proliferative dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1744-H1751.

Velarde V, Ullian ME, Morinelli TA, Mayfield RK, Jaffa AA. 1999. Mechanisms of MAPK activation by bradykinin in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 277:C253-C261.

Vendrell J, Broch M, Vilarrasa N, Molina A, Gomez JM, Gutierrez C, Simon I, Soler J, Richart C. 2004. Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 12:962-971.

Venkatachalam K, Mummidi S, Cortez DM, Prabhu SD, Valente AJ, Chandrasekar B. 2008. Resveratrol inhibits high glucose-induced PI3K/Akt/ERK-dependent interleukin-17 expression in primary mouse cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H2078-H2087.

Vessby B, Tengblad S, Lithell H. 1994. Insulin sensitivity is related to the fatty acid composition of serum lipids and skeletal muscle phospholipids in 70-year-old men. *Diabetologia* 37:1044-1050.

Vessby B. 2000. Dietary fat and insulin action in humans. *Br J Nutr* 83 Suppl 1:S91-S96.

Vianna RM, Calixto JB. 1998. Characterization of the receptor and the mechanisms underlying the inflammatory response induced by des-Arg9-BK in mouse pleurisy. *Br J Pharmacol* 123:281-291.

Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R. 2003. Up-regulation of kinin B1 receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br J Pharmacol* 138:13-22.

Vincent MA, Montagnani M, Quon MJ. 2003. Molecular and physiologic actions of insulin related to production of nitric oxide in vascular endothelium. *Curr Diab Rep* 3:279-288.

- Vinik A I, Mehrabyan A. 2004. Diabetic neuropathies. *Med Clin North Am* 88 : 947-99, xi.
- Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. 1984. Accumulation of diabetic rat peripheral nerve myelin by macrophages increases with the presence of advanced glycosylation endproducts. *J Exp Med*; 160 : 197-207.
- Wallis MG, Wheatley CM, Rattigan S, Barrett EJ, Clark AD, Clark MG. 2002. Insulin-mediated hemodynamic changes are impaired in muscle of Zucker obese rats. *Diabetes* 51:3492-3498.
- Wang PH, Cenedeze MA, Campanholle G, Malheiros DM, Torres HA, Pesquero JB, Pacheco-Silva A, Camara NO. 2009. Deletion of bradykinin B1 receptor reduces renal fibrosis. *Int Immunopharmacol* 9:653-657.
- Wang Y, Nishina PM, Naggert JK. 2009. Degradation of IRS1 leads to impaired glucose uptake in adipose tissue of the type 2 diabetes mouse model TALLYHO/Jng. *J Endocrinol* 203:65-74.
- Weir GC. 1982. Non-insulin-dependent diabetes mellitus: interplay between B-cell inadequacy and insulin resistance. *Am J Med* 73:461-464.
- Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K, Charo I, Leibel RL, Ferrante AW, Jr. 2006. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 116:115-124.
- Weisel JW, Nagaswami C, Woodhead JL, DeLa Cadena RA, Page JD, Colman RW. 1994. The shape of high molecular weight kininogen. Organization into structural domains, changes with activation, and interactions with prekallikrein, as determined by electron microscopy. *J Biol Chem* 269:10100-10106.
- Westermann D, Walther T, Savvatis K, Escher F, Sobirey M, Riad A, Bader M, Schultheiss HP, Tschope C. 2009. Gene deletion of the kinin receptor B1 attenuates cardiac inflammation and fibrosis during the development of experimental diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* 58:1373-1381.
- Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. 2004. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27:1047-1053.
- Wilkins MR, Wharton J, Grimminger F, Ghofrani HA. 2008. Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 32:198-209.
- Willars GB, Calcutt NA, Tomlinson DR. 1991. Nerve conduction velocity and axonal transport of 6-phosphofructokinase activity in galactose-fed rats. *J Neurol Sci* 104:46-51.
- Williams TA, Hooper NM, Barnes K, Kenny AJ, Turner AJ. 1992. Immunological studies on the endothelial and testicular forms of angiotensin converting enzyme. *Biochem Soc Trans* 20:281S.
- Wines D R, Brady J M, Pritchett D B, Roberts J L, MacDonald R J. 1989. Organization and expression of the rat kallikrein gene family. *J Biol Chem* 264 : 7653-7662.

- Wines D R, Brady J M, Southard E M, MacDonald R J. 1991. Evolution of the rat kallikrein gene family: gene conversion leads to functional diversity. *J Mol Evol* 32 : 476-492.
- Wolfrum S, Dendorfer A, Dominiak P. 1999. Identification of kallidin degrading enzymes in the isolated perfused rat heart. *Jpn J Pharmacol* 79 : 117-120.
- Woods SC, D'Alessio DA. 2008. Central control of body weight and appetite. *J Clin Endocrinol Metab* 93:S37-S50.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. 2003. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 133:1081-1087.
- Wolf C J. 1996. Phenotypic modification of primary sensory neurons: the role of nerve growth factor in the production of persistent pain. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 351 : 441-448.
- Wu RF, Ma Z, Liu Z, Terada LS. 2010. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Mol Cell Biol* 30:3553-3568.
- Xu J, Carretero OA, Shesely EG, Rhaleb NE, Yang JJ, Bader M, Yang XP. 2009. The kinin B1 receptor contributes to the cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers in mice. *Exp Physiol* 94:322-329.
- Xu X, Sarikas A, Dias-Santagata DC, Dolios G, Lafontant PJ, Tsai SC, Zhu W, Nakajima H, Nakajima HO, Field LJ, Wang R, Pan ZQ. 2008. The CUL7 E3 ubiquitin ligase targets insulin receptor substrate 1 for ubiquitin-dependent degradation. *Mol Cell* 30:403-414.
- Yamasaki S, Sawada S, Komatsu S, Kawahara T, Tsuda Y, Sato T, Toratani A, Kono Y, Higaki T, Imamura H, Tada Y, Akamatsu N, Tamagaki T, Tsuji H, Nakagawa M. 2000. Effects of bradykinin on prostaglandin I(2) synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension* 36:201-207.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, Yamashita S, Noda M, Kita S, Ueki K, Eto K, Akanuma Y, Froguel P, Foufelle F, Ferre P, Carling D, Kimura S, Nagai R, Kahn BB, Kadowaki T. 2002. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288-1295.
- Ye J. 2007. Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 7 : 65-74.
- 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.
- Yoon KH, Ko SH, Cho JH, Lee JM, Ahn YB, Song KH, Yoo SJ, Kang MI, Cha BY, Lee KW, Son HY, Kang SK, Kim HS, Lee IK, Bonner-Weir S. 2003. Selective beta-cell loss and alpha-cell

expansion in patients with type 2 diabetes mellitus in Korea. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2300-2308.

Young J B, Landsberg L. 1981. Effect of oral sucrose on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Metabolism* 30 : 421-424.

Yudkin JS, Stehouwer CD, Emeis JJ, Coppack SW. 1999. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19:972-978.

Yurko-Mauro K. 2010. Cognitive and cardiovascular benefits of docosahexaenoic acid in aging and cognitive decline. *Curr Alzheimer Res* 7:190-196.

Zaman MQ, Leray V, Le BJ, Thorin C, Ouguerram K, Nguyen P. 2011. Lipid profile and insulin sensitivity in rats fed with high-fat or high-fructose diets. *Br J Nutr* 106 Suppl 1:S206-S210.

Zeman M, Vecka M, Stopka P, Zahin M, Tvrzicka E, Stankova B, Vareka T, Janikova L, Zak A. 2006. [Oxidation stress, insulin resistance and endothelial dysfunction during the treatment of hyperlipidaemia]. *Cas Lek Cesk* 145:923-928.

Zemel M B, Johnson B A, Ambrozy S A. Insulin-stimulated vascular relaxation. Role of Ca(2+)-ATPase. *Am J Hypertens* 1992; (5): 637-641.

Zemel M B, Reddy S, Sowers J R. 1991. Insulin attenuation of vasoconstrictor responses to phenylephrine in Zucker lean and obese rats. *Am J Hypertens* 4 : 537-539.

Zhang B, Berger J, Hu E, Szalkowski D, White-Carrington S, Spiegelman BM, Moller DE. 1996. Negative regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene expression contributes to the antiadipogenic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Mol Endocrinol* 10:1457-1466.

Zhang H, Go YM, Jones DP. 2007. Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 465:119-126.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432.

Zhao C, Wang P, Xiao X, Chao J, Chao L, Wang DW, Zeldin DC. 2003. Gene therapy with human tissue kallikrein reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-induced hypertensive rats. *Hypertension* 42:1026-1033.

Zhou YE, Egeland GM, Meltzer SJ, Kubow S. 2009. The association of desaturase 9 and plasma fatty acid composition with insulin resistance-associated factors in female adolescents. *Metabolism* 58:158-166.

Zick Y. 2001. Insulin resistance: a phosphorylation-based uncoupling of insulin signaling. Trends Cell Biol 11:437-441.

Ziegler D, Mayer P, Gries F A. 1988. Evaluation of thermal, pain, and vibration sensation thresholds in newly diagnosed type 1 diabetic patients. J Neurol Neurosurg Psychiatry 51 : 1420-1424.

Zimmet PZ, Elliott RB, Mackay IR, Tuomi T, Rowley MJ, Pilcher CC, Knowles WJ. 1994. Autoantibodies to glutamic acid decarboxylase and insulin in islet cell antibody positive presymptomatic type 1 diabetes mellitus: frequency and segregation by age and gender. Diabet Med 11:866-871.

Zweckberger K, Plesnila N. 2009. Anatibant, a selective non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, reduces intracranial hypertension and histopathological damage after experimental traumatic brain injury. Neurosci Lett 454:115-117.

Pages web :

<http://lesconseilsdupharmacien.info/diabete.htm>, visité en oct 2011.

http://www.diabetes.ca/documents/get-involved/WEB_FR_CDA_Report.pdf., visité en oct 2011

<http://www.hon.ch/Dossier/Ageing/French/Radicaux.gif>, visité sept 2011

Annexe

LISTE DE PUBLICATIONS

1-SÉBASTIEN TALBOT, JENNY PENA DIAS RÉJEAN COUTURE, *Co-author with first author. Activation of TRPV1 by capsaicin induces functional Kinin B₁ receptor in the rat spinal cord microglia, Journal of Neuroinflammation, J Neuroinflammation.(2012) Jan 20;9:16

2-JENNY PENA DIAS and RÉJEAN COUTURE, Suppression of vascular inflammation by kinin B₁R antagonist in a rat model of insulin resistance (sous presse Mars 2012, Journal of Cardiovascular Pharmacology, JCVP-11-473).

3-JENNY PENA DIAS and RÉJEAN COUTURE, Blockade of kinin B₁ receptor reverses plasma fatty acids composition changes and body and tissue fat gain in a rat model of insulin resistance, Diabetes, Obesity and Metabolism (2012) Mar;14(3):244-53

4-JENNY PENA DIAS, SÉBASTIEN TALBOT, JACQUES SÉNÉCAL, PIERRE CARAYON, RÉJEAN COUTURE. Kinin B₁ receptor enhanced the oxidative stress in rat model of insulin resistance: Outcome on hypertension, allodynia and metabolic complications, PloS One. (2010) Sep 7;5(9):e 12622.

5- SEBASTIEN TALBOT, EMNA CHAHMI, JENNY PENA DIAS, RÉJEAN COUTURE Key role for spinal dorsal horn microglial kinin B₁ receptor in early diabetic pain neuropathy Journal of Neuroinflammation (2010) Jun 29;7(1):36

6-JENNY PENA DIAS, MAHMOUD ALI ISMAEL, MAGALIE PILON, JACQUES DE CHAMPLAIN, BERNARD FERRARI, PIERRE CARAYON, RÉJEAN COUTURE. The kinin B₁ receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. British Journal of Pharmacology (2007) 152 : 280-87.

7-CALIN LUNGU, JENNY PENA DIAS, CAMILLA ESTEVAO DE FRANCA, BRICE ONGALI, DOMENICO REGOLI, FLORINA MOLDOVAN, RÉJEAN COUTURE. Involvement of kinin B₁ receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. Neuropeptides (2007) 41(6): 375-87.

8- MIHAI PETCU, JENNY PENA DIAS, BRICE ONGALI, GAÉTAN THIBAUT, WITOLD NEUGEBAUER, RÉJEAN COUTURE. Role of kinin B₁ and B₂ receptors in a rat model of neuropathic pain. International Immunopharmacology (2008) 8 (2): 188-96.

9-JENNY PENA DIAS, HELAINE DE BRITO PERREIRA, RÉJEAN COUTURE. Function and expression of kinin B₁ receptor in the brain of insulin-resistant rats (en rédaction).

10-JENNY PENA DIAS, CALIN LUNGU, RÉJEAN COUTURE. Blockade of kinin B₂ receptor with anantibant mesylate reverses pain neuropathy in an experimental rat model of type 2 diabetes (en rédaction).