

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.



Université de Montréal

**Étude du rôle du monoxyde d'azote dans le développement du
diabète de type 2**

Par
Magalie Pilon

Département de Physiologie
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise ès Sciences (M.Sc.) en Physiologie

Janvier 2008
© Magalie Pilon



Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :
**Étude du rôle du monoxyde d'azote dans le développement du diabète de
type 2**

Présenté par :
Magalie Pilon

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Éric Thorin.....président-rapporteur

Réjean Couture.....directeur de recherche

Jacques de Champlain.....codirecteur

Alzbeta Chorvatova.....membre du jury

RÉSUMÉ

Un modèle de résistance à l'insuline et d'hypertension artérielle a été développé dans nos laboratoires en soumettant des rats à un traitement chronique au glucose. Cette étude a été effectuée afin de tester l'hypothèse qu'une inhibition chronique de l'enzyme de synthèse du monoxyde d'azote (NOS) avec le N^G-nitro-L-Arginine méthyle ester (L-NAME) accélère l'apparition de la résistance à l'insuline, le développement de l'hypertension et des lésions cardiovasculaires chez les rats traités au glucose. Pour ce faire, des rats Sprague-Dawley (250g) ont été traités (dans l'eau de boisson) pendant 4 semaines: 1- Aucun supplément (Témoin); 2- Glucose (G, 10%); 3- L-NAME (LN, 50 mg/kg/jr); 4-Glucose + L-NAME (G-LN). Une élévation progressive de la pression artérielle systolique a été observée chez tous les rats traités (C < G < LN < G-LN). L'insulinémie, la résistance à l'insuline (HOMA) et la concentration d'adrénaline plasmatique étaient augmentées chez G, et davantage chez G-LN. Une augmentation de la production d'anion superoxyde a été mesurée dans les aortes de tous les rats traités, ainsi que dans le cœur des rats LN. Aucune variation significative de l'activité de la NAD(P)H oxydase n'a été observée. Bien qu'aucune fibrose cardiaque n'ait été observée, les rats LN et G-LN présentaient une hypertrophie de l'aorte, sans hyperplasie. Ces résultats montrent que l'inhibition de la NOS augmente la production cardiovasculaire de l'anion superoxyde et amplifie, chez le rat traité au glucose, l'hypertension artérielle, la résistance à l'insuline et l'activité sympatho-surrénalienne. Le NO exercerait donc un rôle protecteur dans notre modèle de résistance à l'insuline.

MOTS CLÉS :

Diabète de type 2, monoxyde d'azote, hypertension, résistance à l'insuline, remodelage vasculaire, stress oxydatif, catécholamines.

SUMMARY

A model of insulin resistance and hypertension induced by glucose feeding was developed in our laboratory. This study was performed to test the hypothesis that chronic inhibition of nitric oxide synthesis with N^G-nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME) may accelerate the development of insulin resistance, hypertension and cardiovascular lesions in glucose-fed rats. To this end, Sprague-Dawleys rats (250g) were treated (in the drinking water) for 4 weeks as follows: 1- No treatment (Control); 2- Glucose (G, 10%); 3- L-NAME (LN, 50mg/kg/day); 4- Glucose + L-NAME (G-LN). The systolic blood pressure increased progressively in all treated groups (C < G < LN < G-LN). Insulinemia, insulin resistance (HOMA index) and plasma adrenaline level were elevated in G, and furthermore in G-LN. Superoxide anion production was higher in the aorta of all treated groups and in the heart of LN. However, no significant change in NAD(P)H oxidase activity was observed. Whereas no cardiac fibrosis was detected in any group, LN and G-LN showed aortic hypertrophy without smooth muscle hyperplasia. No cardiac fibrosis was detected in any group. The findings show that inhibition of nitric oxide synthesis in glucose-fed rats increases cardiac and vascular superoxide anion production and exacerbates, in glucose-fed rats, hypertension, insulin resistance and sympatho-adrenal activity, thereby demonstrating a protective role of nitric oxide pathway on the cardiovascular system in our model of insulin resistance.

KEY WORDS:

Type 2 diabetes, nitric oxide, hypertension, insulin resistance, vascular remodelling, oxidative stress, catecholamines.

RÉSUMÉ VULGARISÉ

Le diabète est la septième cause de décès au Canada, principalement en raison des complications cardiovasculaires (CCV) qui lui sont associées. Le diabète de type 2 (DT2), qui touche 90% des diabétiques, est caractérisé par une élévation anormale du taux de sucre (glucose) dans le sang en raison d'une mauvaise utilisation de l'insuline (hormone sécrétée par le pancréas) par les cellules de notre corps. Notre travail consiste à développer un modèle animal de DT2, c'est-à-dire un animal qui va manifester les principaux symptômes de la maladie, pour que nous puissions tester le potentiel thérapeutique des médicaments antidiabétiques. Il existe déjà différents modèles animaux du DT2, mais aucun n'est véritablement représentatif de ce que nous observons chez les patients, soit parce que le diabète y est induit par une manipulation génétique, ignorant ainsi l'importance du mode de vie du patient sur le développement de la maladie, soit parce que l'animal ne présente pas tous les symptômes de la maladie. Dans notre laboratoire, nous avons développé un modèle de DT2 en donnant de l'eau sucrée avec du glucose aux rats pendant 4 à 8 semaines. Bien qu'ils présentent plusieurs des caractéristiques du DT2, ces rats semblent dépourvus des atteintes cardiovasculaires qui apparaissent plus tardivement dans le développement de la maladie. L'objectif de cette étude était de développer un modèle non-génétique accéléré du DT2 sur lequel nous pourrions observer plus rapidement l'apparition des complications cardiovasculaires. Comme plateforme pour nos travaux, nous avons utilisé le rat traité au glucose. Dans leur eau, nous avons ajouté un autre produit; le L-NAME. Ce produit empêche l'activité d'une enzyme (la synthase de l'oxyde nitrique, NOS) impliquée entre autres dans la régulation du tonus vasomoteur (degré de contraction des vaisseaux sanguins). D'ailleurs, l'administration de L-NAME chez l'humain ou chez l'animal induit une élévation de la pression artérielle. Nos résultats démontrent que l'inhibition de la NOS

accélère le développement de l'hypertension et de la résistance à l'insuline (diminution de l'entrée du glucose dans les cellules cibles à la suite d'une sécrétion d'insuline par le pancréas) chez le rat traité au glucose. Ces constatations permettent donc de déduire que la NOS joue un rôle protecteur sur le système cardiovasculaire dans notre modèle du rat traité au glucose.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	III
SUMMARY	IV
RÉSUMÉ VULGARISÉ.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
DÉDICACE	XIII
REMERCIEMENTS	XIV
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION.....	I
1.1 LE DIABÈTE.....	2
1.1.1 <i>Les types de diabète</i>	3
1.1.1.1 <i>Diabète de type 1</i>	3
1.1.1.2 <i>Diabète de type 2</i>	5
1.1.1.3 <i>Diabète gestationnel</i>	7
1.1.1.4 <i>Autres types particuliers</i>	8
1.1.2 <i>Diagnostic</i>	8
1.1.3 <i>Complications diabétiques</i>	10
1.1.4 <i>Traitements</i>	12
1.1.5 <i>Prévalence et incidence</i>	14
1.2 LA VOIE DE L'INSULINE	15
1.2.1 <i>L'insuline</i>	15
1.2.2 <i>Les transporteurs du glucose</i>	16
1.2.3 <i>Sécrétion de l'insuline</i>	17
1.2.4 <i>Le récepteur de l'insuline et ses substrats</i>	20
1.2.5 <i>Voie de signalisation intracellulaire de l'insuline</i>	21
1.2.6 <i>Pathologies de la voie de signalisation de l'insuline impliquées dans le DT2</i>	22
1.3 L'HYPERTENSION ET LE DIABÈTE	23
1.4 LE STRESS OXYDATIF ET LE DIABÈTE	24
1.4.1 <i>Stress oxydatif</i>	24
1.4.2 <i>Stress oxydatif et résistance à l'insuline</i>	26
1.5 LE SYSTÈME NERVEUX SYMPATHIQUE (SNS) ET LE DIABÈTE.....	28
1.6 LE REMODELAGE CARDIOVASCULAIRE ET LE DIABÈTE.....	30
1.6.1 <i>Remodelage vasculaire</i>	30
1.6.2 <i>Cardiomyopathies diabétiques</i>	31
1.7 LA VOIE DU MONOXYDE D'AZOTE	33
1.7.1 <i>Synthèse du NO</i>	34
1.7.2 <i>Inhibition de la NOS</i>	36
1.7.3 <i>Cibles du NO</i>	37
1.7.4 <i>Physiologie du NO</i>	38
1.7.4.1 <i>Physiologie cardiovasculaire du NO</i>	38
1.7.4.2 <i>Implication du NO dans le métabolisme du glucose</i>	41
1.7.5 <i>Implication du NO dans l'hypertension et le diabète</i>	42
1.7.6 <i>Inhibition/Inactivation de la NOS</i>	44

1.7.6.1	<i>Inhibition pharmacologique avec des analogues du L-Arginine</i>	45
1.7.6.2	<i>Inactivation génétique</i>	45
1.8	LE MODÈLE DU RAT TRAITÉ AU GLUCOSE	46
1.9	LA PROBLÉMATIQUE DE L'ÉTUDE	47
1.9.1	<i>Problématique et objectifs</i>	47
1.9.2	<i>Hypothèses</i>	48
CHAPITRE 2 – ARTICLE SCIENTIFIQUE		50
	EXACERBATION OF HYPERTENSION AND INSULIN RESISTANCE, BUT NOT CARDIOVASCULAR REMODELING, FOLLOWING CHRONIC INHIBITION OF NITRIC OXIDE IN GLUCOSE-FED RATS	51
	INTRODUCTION	53
	METHODS	56
	<i>Animals and experimental protocols</i>	56
	<i>Measurement of plasma glucose and insulin and insulin resistance</i>	57
	<i>Aortic hypertrophy assessment and determination of aortic smooth muscle cell number</i>	57
	<i>Fibrosis evaluation</i>	58
	<i>Superoxide anion measurement</i>	58
	<i>Plasma catecholamine measurement</i>	59
	<i>Statistical analysis and Correlations studies</i>	60
	RESULTS	61
	<i>Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on various parameters</i>	61
	<i>Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on plasma levels of glucose and insulin, and insulin resistance</i>	61
	<i>Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on systolic blood pressure</i>	62
	<i>Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on plasma catecholamines</i>	62
	<i>Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on aortic hypertrophy and smooth muscle cell number</i>	62
	<i>Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on superoxide anion production</i>	63
	<i>Correlation between systolic blood pressure and cross-sectional area of the aorta, superoxide anion production and plasma adrenaline levels</i>	63
	DISCUSSION	64
	<i>Total energy balance and body weight</i>	64
	<i>Glycemia, insulinemia, insulin resistance and blood pressure</i>	64
	<i>Sympathetic nervous system activity</i>	66
	<i>Heart remodeling</i>	67
	<i>Vascular remodeling</i>	68
	<i>Oxidative stress</i>	69
	<i>Conclusion</i>	70
	REFERENCES	72
	<i>Figure legends</i>	86
	TABLE 1. DETERMINATION OF VARIOUS PARAMETERS IN RATS TREATED FOR 4 WEEKS WITH GLUCOSE AND/OR L-NAME	88
	FIGURE 1	89
	FIGURE 2	90
	FIGURE 3	91
	FIGURE 4	92
	FIGURE 5	93
	FIGURE 6	94

CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION	95
3.1 LES MODÈLES EXPÉRIMENTAUX DU DT2	96
3.1.1 Les modèles génétiques ou spontanés	101
3.1.2 Les modèles nutritionnels	105
3.1.3 Le modèle du rat traité au glucose + L-NAME (G-LN)	108
3.2 PERSPECTIVES	110
3.3 CONCLUSION	111
BIBLIOGRAPHIE	112
ANNEXE I - RÉFÉRENCES CITÉES DANS LE TABLEAU VI	XIV
ANNEXE II – ACCORD DES COAUTEURS	XX
ANNEXE III – DEMANDE D’AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLE XXI	
ANNEXE IV – CURRICULUM VITAE	XXII
ANNEXE V – PERMISSION DE REPRODUIRE DES FIGURES	XXV
FIGURE 5	XXV
FIGURE 7	XXVI
FIGURE 10	XXVIII
FIGURE 11	XXIX
FIGURE 12	XXX

LISTE DES TABLEAUX

CHAPITRE 1

TABLEAU I. COMPARAISON DES CARACTÉRISTIQUES PRINCIPALES QUI DISTINGUENT LE DIABÈTE DE TYPE 1 (DT1) DU DIABÈTE DE TYPE 2 (DT2).	3
TABLEAU II. DESCRIPTION DES MODES D' ACTIONS DES PRINCIPAUX MÉDICAMENTS ANTIDIABÉTIQUES ORAUX.	13
TABLEAU III. CARACTÉRISTIQUES DE LA PREMIÈRE SOUS-FAMILLE DES TRANSPORTEURS GLUT..	17
TABLEAU IV. CRITÈRES DE DIAGNOSTIQUE DU SYNDROME MÉTABOLIQUE SELON LE TROISIÈME RAPPORT (ATPIII) DU « NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM » [EXPERT PANEL ON DETECTION 2001].	24
TABLEAU V. COMPARAISON DES PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DES ISOFORMES DE LA NOS. ...	36
TABLEAU VII. CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPAUX MODÈLES GÉNÉTIQUES ET NUTRITIONNELS DE DT2 CHEZ LES RONGEURS.	99

CHAPITRE 2

TABLEAU VI. DETERMINATION OF VARIOUS PARAMETERS IN RATS TREATED FOR 4 WEEKS WITH GLUCOSE AND/OR L-NAME.	88
--	----

CHAPITRE 3

TABLEAU VIII. VARIATIONS (%) INDUITES PAR LE TRAITEMENT AVEC G-LN INITIÉ CHEZ DES RATS JEUNES OU ADULTES.	109
--	-----

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1

FIGURE 1. VALEURS SEUILS DE GLYCÉMIE SERVANT AU DIAGNOSTIQUE DU DIABÈTE.....	10
FIGURE 2. REPRÉSENTATION DES ORGANES ATTEINTS PAR LES PRINCIPALES COMPLICATIONS DIABÉTIQUES.	12
FIGURE 3. ESTIMATION DE LA PRÉVALENCE DU DIABÈTE DANS LE MONDE EN 2007.....	14
FIGURE 4. PRÉVALENCE DU DIABÈTE AU CANADA, EN 1999-2000, SELON L'ÂGE ET LE SEXE.	15
FIGURE 5. LES DIFFÉRENTES VOIES DE RÉGULATION DU MÉTABOLISME PAR L'INSULINE DANS LES CELLULES HÉPATIQUES, MUSCULAIRES ET ADIPEUSES.....	16
FIGURE 6. SCHÉMA REPRÉSENTANT LES MÉCANISMES ENTRAÎNANT LA SÉCRÉTION DE L'INSULINE ET L'ENTREPOSAGE DU GLUCOSE DANS LES CELLULES MUSCULAIRES SQUELETTIQUES.	19
FIGURE 7. SCHÉMA REPRÉSENTANT LA STRUCTURE DU RÉCEPTEUR DE L'INSULINE ET SON MODE D'ACTIVATION.	20
FIGURE 8. SCHÉMA REPRÉSENTANT LA FORMATION ET L'ÉLIMINATION DES DIFFÉRENTES ESPÈCES RÉACTIVES OXYGÉNÉES.....	26
FIGURE 9. REPRÉSENTATION DU RÔLE DE L'ACTIVATION DES SÉRINES KINASES DANS L'INDUCTION DE LA RÉSISTANCE À L'INSULINE PAR LES STRESS OXYDATIF.	27
FIGURE 10. LES TYPES DE REMODELAGE ARTÉRIEL OBSERVÉS EN PATHOLOGIE.....	31
FIGURE 11. ÉVOLUTION DE L'HYPERTROPHIE VENTRICULAIRE PATHOLOGIQUE.....	32
FIGURE 12. FORMATION DU MONOXYDE D'AZOTE PAR LA NO SYNTHASE.....	35

CHAPITRE 2

FIGURE 1. EFFECTS OF 4-WEEK TREATMENT WITH GLUCOSE, L-NAME AND GLUCOSE COMBINED WITH L-NAME ON FASTING PLASMA GLUCOSE LEVELS, FASTING PLASMA INSULIN LEVELS AND THE HOMA INDEX OF INSULIN RESISTANCE	89
FIGURE 2. EFFECTS OF 4-WEEK TREATMENT WITH GLUCOSE, L-NAME AND GLUCOSE COMBINED WITH L-NAME ON SYSTOLIC BLOOD PRESSURE..	90
FIGURE 3. PLASMA NORADRENALINE LEVELS AND ADRENALINE LEVELS MEASURED AFTER 4-WEEK TREATMENT WITH GLUCOSE, L-NAME AND GLUCOSE COMBINED WITH L-NAME..	91
FIGURE 4. EFFECTS OF 4-WEEK TREATMENT WITH GLUCOSE, L-NAME AND GLUCOSE PLUS L- NAME ON THE MEDIAL MASS OF THE AORTA AND ON SMOOTH MUSCLE CELL NUMBER PER CROSS-SECTION	92
FIGURE 5. BASAL SUPEROXIDE ANION PRODUCTION AND NADPH OXIDASE ACTIVITY IN THE AORTA AND IN THE HEART OF RATS TREATED FOR 4 WEEKS WITH GLUCOSE, L-NAME, OR GLUCOSE SUPPLEMENTED WITH L-NAME	93
FIGURE 6. CORRELATION BETWEEN SYSTOLIC BLOOD PRESSURE AND THE MEDIAL MASS OF THE AORTA, SUPEROXIDE ANION PRODUCTION, AND ADRENALINE LEVELS.....	94

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

<u>Sigle ou abréviation</u>	<u>Signification</u>
ADMA	DiMéthyle-Arginine Asymétrique
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
DDAH	Diméthylarginine Diméthylaminohydrolase
DG	Diabète gestationnel
DT1	Diabète de type 1
DT2	Diabète de type 2
eNOS	NOS endothéliale
G	Glucose
GCs	Guanylyl cyclase soluble
G-LN	Glucose + L-NAME
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
HFD	Diète riche en gras (<i>High fat diet</i>)
HTA	Hypertension artérielle
iNOS	NOS inductible
L-NAME ou LN	L-N ^G -nitro-Arginine-Méthyle-Ester
L-NMMA	L-N ^G -MonoMéthyle-Arginine
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit
nNOS	NOS neuronale
NO	Monoxyde d'azote (<i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Synthase du monoxyde d'azote
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PPAR-γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptor- gamma</i>
RI	Résistance à l'insuline
RNS	Espèces réactives azotées (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espèces réactives oxygénées (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNS	Système nerveux sympathique
TK	Tyrosine kinase

DÉDICACE

Dave, ce mémoire t'est dédié,

*Par ton regard rempli d'amour, de confiance, et de fierté,
tu m'as transmis l'énergie qui m'a permis de me surpasser...*

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier sincèrement Dr Réjean Couture, d'abord pour sa disponibilité et son soutien, mais aussi pour m'avoir transmis son goût du travail bien fait. Je tiens également à remercier Dr Jacques de Champlain pour m'avoir fait bénéficier de son côté profondément humain, puis pour m'avoir fait confiance et encouragée à sortir de ma zone de confort.

J'aimerais témoigner ma reconnaissance à Diane Papin, qui m'a beaucoup aidée tout au long de ces travaux sans jamais se départir de sa patience, sa douceur et sa bonne humeur. Je veux remercier Dr Denis deBlois et Julié-Émilie Huot-Marchand pour la contribution substantielle qu'ils m'ont apportée pour l'évaluation du remodelage cardiovasculaire. J'ai aussi grandement apprécié l'expertise de recherche que Rong Wu m'a partagée, et le support technique que Jo-Ann Le Guerrier et Jacques Sénécal m'ont procuré. Je souhaite remercier Marc-André Laplante pour son accueil chaleureux et pour m'avoir facilité l'intégration au département. Je remercie également Helaine De Brito Pereira, Sébastien Talbot, Patrick Théberge-Thurmel, Jenny Pena Dias, Nejla Tidjane, pour leur contribution et leur présence.

Je suis extrêmement reconnaissante au Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM) et à la Société Québécoise d'Hypertension Artérielle (SQHA) pour leurs supports financiers versés sous la forme de bourses d'études et de bourses de voyage.

J'aimerais remercier mon père, Lorraine, et Kristyn, pour leurs encouragements et leur amour réconfortant. Enfin, je tiens à témoigner ma profonde gratitude à ma mère et à George, pour m'avoir supportée et encouragée inconditionnellement dans la réalisation de ces études. Je me sens comme si vous aviez couru avec moi jusqu'au fil d'arrivée...

CHAPITRE 1 – INTRODUCTION

1.1 Le diabète

Le diabète mellitus, qualifié d'épidémie du XXI^e siècle, est une maladie métabolique incurable qui se développe chez un individu lorsque son pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline ou lorsque qu'il y a une diminution de la réponse des tissus à l'insuline. Puisque globalement l'effet de l'insuline est de favoriser l'entrée du glucose sanguin dans les tissus cibles (foie, muscle squelettique et adipeux) afin qu'il y soit entreposé ou converti en énergie, un individu dépourvu partiellement ou entièrement des effets de l'insuline verra son taux de glucose sanguin augmenter. Une hyperglycémie prolongée peut provoquer des lésions majeures à plusieurs systèmes, principalement au système nerveux et cardiovasculaire, et ces lésions peuvent être mortelles. La classification des types de diabète tel que suggéré par le « National Diabetes Data Group » en 1979 et reconnue par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a longtemps prévalu dans le monde médical [National Diabetes Data Group 1979; World Health Organisation 1985]. Selon cette classification, il y avait deux formes majeures de diabète qui se distinguaient par la dépendance ou non aux injections d'insuline pour la survie des patients. L'ancienne classification a été révisée par un groupe d'experts [The Expert Committee on the Diagnosis Classification of Diabetes Mellitus 1997; The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003] en tenant compte de l'étiologie de la maladie plutôt que du traitement pharmacologique utilisé pour gérer l'état de santé du patient. Les sections qui suivent décriront brièvement les principaux types de diabète, en accord avec cette nouvelle classification.

1.1.1 Les types de diabète

Le tableau I résume les caractéristiques principales des deux principaux types de diabète, le type 1 (DT1) et le type 2 (DT2).

Tableau I. Comparaison des caractéristiques principales qui distinguent le diabète de type 1 (DT1) du diabète de type 2 (DT2).

	DT1	DT2
PROPORTION DES CAS DE DIABÈTE (%)	5-10	90
PATHOPHYSIOLOGIE	Destruction auto-immune (1A) ou idiopathique (1B) des cellules β	Résistance à l'insuline et sécrétion inadéquate d'insuline
APPARITION	Rapide et aiguë	Lente et progressive
ÂGE	Surtout chez les jeunes	Surtout chez les personnes plus âgées (>50 ans)
FACTEURS DE RISQUES	Antécédents familiaux, facteurs environnementaux suspectés	Antécédents familiaux, obésité, sédentarité, tabagisme, dyslipidémie, hypertension.
DIMINUTION DE L'ESPÉRANCE DE VIE	Jusqu'à 15 ans	5 à 10 ans

1.1.1.1 Diabète de type 1

Le DT1, qui constitue 5 à 10% des cas de diabète dans le monde, est caractérisé par la destruction spécifique des cellules beta (β) du pancréas menant à une suppression généralement complète de la sécrétion d'insuline [World Health Organisation Diabetes Unit]. C'est pourquoi la plupart des patients qui en souffrent sont complètement dépendants des injections d'insuline pour survivre [Atkinson *et al.*, 1994]. Cette maladie fait habituellement son apparition pendant l'enfance ou l'adolescence, mais elle peut survenir à tout âge, même chez les personnes âgées. Bien que la destruction des cellules β soit progressive, l'apparition subite des symptômes explique que dans bien des cas le

diagnostique du DT1 soit fait à l'hôpital, alors que le patient est traité d'urgence pour une acidocétose diabétique ou une hyperglycémie sévère [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003]. La carence en insuline et la déficience énergétique qui en résulte sont compensées par une augmentation de la lipolyse et une inhibition de la lipogenèse qui se traduit par une élévation des niveaux d'acides gras circulants. Ces acides gras sont pris en charge par le foie et oxydés en corps cétoniques (β -hydroxybutyrate et acétoacétate). Les corps cétoniques sont des acides puissants qui se dissocient au pH physiologique, produisant une grande quantité d'ions hydrogènes. L'acidose métabolique, qui peut mener au coma diabétique ou même à la mort, survient alors que les réserves alcalines de l'organisme sont épuisées dans leur tentative pour tamponner ce surplus d'ions hydrogènes [Eledrisi *et al.*, 2006].

Le sous-type 1A du DT1 s'applique lorsque l'attaque des cellules sécrétrices d'insuline est d'origine auto-immune, c'est-à-dire lorsque le système immunitaire de l'individu produit des anticorps dirigés contre ses propres cellules. La présence de ces auto-anticorps dans le sang permet de distinguer le DT1 des autres formes de diabète. Les meilleurs marqueurs actuels [Eisenbarth 2007] de ce type de diabète sont les auto-anticorps réagissant avec l'acide glutamique décarboxylase (un enzyme impliqué dans la synthèse de l'acide gamma-aminobutyrique présente dans les cellules β du pancréas [Villalba 2008]), la protéine-2 associée à l'antigène insulinoma qui joue un rôle dans la sécrétion d'insuline [Kim 2007] ou avec l'insuline. Au moins un de ces marqueurs est présent chez plus de 90% des patients qui reçoivent un diagnostic de diabète de type 1A. Une prédisposition génétique favorise le développement de la maladie. Toutefois la croissance du nombre de cas dans les pays industrialisés suggère fortement l'implication de facteurs environnementaux, bien que ceux-ci ne soient pas encore bien définis [Eisenbarth 2007]. Une hypothèse intéressante

suggère qu'une diminution de l'exposition aux infections infantiles, qui résulte d'une amélioration de l'hygiène et de l'administration accrue de vaccins et d'antibiotiques, serait partiellement responsable de l'accroissement de l'incidence des allergies et des maladies auto-immunes, dont le DT1A [Bach 2002]. La destruction des cellules β peut ne pas être d'origine auto-immunitaire; il s'agit alors du diabète idiopathique de type 1B qui affecte une minorité de patients et qui est fortement associé à un héritage génétique [Imagawa *et al.*, 2000].

1.1.1.2 Diabète de type 2

Selon l'OMS, le diabète de type 2 (DT2) représente plus de 90% des cas de diabète dans le monde [World Health Organisation Diabetes Unit]. Cette maladie, qui a longtemps été considérée comme affectant uniquement la population adulte vieillissante, est désormais diagnostiquée chez un nombre grandissant d'enfants obèses [Rosenbloom *et al.*, 1999]. Il s'agit d'une maladie sournoise puisque l'hyperglycémie peut progresser graduellement pendant plusieurs années, parallèlement avec une augmentation des risques de développer des complications vasculaires sévères, avant que le diagnostic ne soit posé et que le patient ne soit pris en charge [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003]. Cette maladie est caractérisée par la résistance à l'insuline (RI); une condition qui consiste en une réponse inadéquate à l'insuline qui se traduit par une diminution de l'absorption et de l'entreposage du glucose par les cellules cibles et par une augmentation de la libération de glucose par le foie [Fery 1994; Katz *et al.*, 1994]. Lorsque la RI s'installe, les cellules β du pancréas augmentent leur sécrétion d'insuline afin de contenir la glycémie à l'intérieur de valeurs normales [Kahn *et al.*, 2006]. La RI évolue vers le DT2 lorsque l'hypersécrétion pancréatique ne réussit plus à compenser pour la baisse de

la sensibilité à l'insuline [Kahn 2001]. C'est alors que les niveaux de glucose sanguin augmentent et contribuent à la progression de la défaillance des cellules β , ce qui permet à l'hyperglycémie de s'installer définitivement [Robertson 2004; Prentki *et al.*, 2006]. Ainsi, l'étude « National Health and Nutrition Examination Survey » (NHANES) a révélé que l'insuline, seule ou combinée avec des médicaments antidiabétiques oraux, est utilisée pour traiter 27% des patients qui souffrent de cette maladie qui a pourtant longtemps été qualifiée de diabète insulino-indépendant [Koro *et al.*, 2004].

Bien qu'une composante héréditaire dans le DT2 soit indéniable, l'hétérogénéité génétique qui la caractérise rend l'étude complexe [Freeman *et al.*, 2006]. De plus, le développement du DT2 est grandement associé à l'implication de facteurs environnementaux tels que l'obésité, la mauvaise alimentation et le manque d'activité physique. En fait, il existe même un concept intéressant selon lequel le génotype du DT2 causerait seulement une prédisposition pour l'intolérance au glucose, alors que le développement du phénotype dépendrait plutôt de facteurs environnementaux [Leahy 2005]. Quelques faits viennent appuyer cette idée : plusieurs études ont démontré une amélioration de la sensibilité à l'insuline, et un ralentissement du développement du DT2, chez les individus ayant suivi une diète faible en hydrates de carbone et faisant de l'exercice [Bjorntorp *et al.*, 1972; Pan *et al.*, 1997; Knowler *et al.*, 2002]; des corrélations positives ont été démontrées entre l'obésité, une absence d'activité physique et le risque de développer le DT2 [Hu *et al.*, 2001]; l'explosion de la prévalence du DT2 dans le monde est beaucoup plus marquée dans les pays en voie de développement qui ont adopté un mode de vie occidental impliquant une diminution de l'activité physique et une surconsommation de nourriture à forte densité énergétique [Hossain *et al.*, 2007].

1.1.1.3 Diabète gestationnel

Le diagnostic du diabète gestationnel (DG), qui complique environ 4% des grossesses aux États-Unis, est établi lorsqu'une hyperglycémie est détectée pour la première fois chez une patiente enceinte. Ce type de diabète ressemble beaucoup au DT2 puisqu'il implique une résistance à l'insuline associée à une sécrétion inadéquate d'insuline [Buchanan *et al.*, 2005]. D'ailleurs jusqu'à 40% des femmes qui ont le DG pendant leur grossesse développeront le DT2 en vieillissant [Geiss *et al.*, 1993]. Une base génétique pour le développement du DG n'a pas encore été établie clairement [Watanabe *et al.*, 2007].

Il est important de bien contrôler la glycémie chez ces patientes pour éviter les complications qui peuvent se développer chez la mère, mais aussi chez le fœtus puisque le surplus de glucose peut traverser le placenta et stimuler la sécrétion d'insuline par le pancréas fœtal [Crowther *et al.*, 2005]. Cette hyperinsulinémie fœtale augmente les risques de macrosomie fœtale (croissance exagérée du fœtus), d'hypoglycémie chez le nouveau-né et de développement du DT2 en vieillissant. De plus, la macrosomie fœtale peut compliquer ou précipiter l'accouchement, entraînant ainsi des complications associées aux naissances prématurées tel que la détresse respiratoire et la jaunisse qui résultent d'une formation incomplète des poumons et du foie [Jovanovic *et al.*, 2001]. Le traitement du DG commence par une modification des habitudes de vie (diète et activité physique) et l'administration d'agents antidiabétiques oraux peut s'ajouter au traitement. De plus, il est possible, et même souhaitable, de traiter la femme enceinte avec des injections d'insuline puisque, à l'inverse du glucose, l'insuline ne traverse pas le placenta [Cheng *et al.*, 2007].

1.1.1.4 Autres types particuliers

Certaines maladies, comme la pancréatite chronique et la fibrose kystique, favorisent indirectement le développement du diabète en causant des dommages au pancréas. Des mutations génétiques causant une défaillance des cellules β ou une anomalie de l'action de l'insuline peuvent aussi être responsables du développement de d'autres formes rares de diabète. De plus le diabète peut se développer conséquemment à un désordre hormonal comme l'acromégalie (hypersécrétion de l'hormone de croissance causée par une tumeur bénigne logée dans le lobe antérieur de l'hypophyse) ou le syndrome de Cushing (hypersécrétion de corticostéroïdes par les glandes surrénales). Enfin, l'administration de certains médicaments, dont les agonistes β -adrénergiques et les glucocorticoïdes, peuvent favoriser le développement d'une hyperglycémie [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003].

1.1.2 Diagnostique

Selon les nouveaux critères de l'OMS [World Health Organisation 1999], le diagnostique du diabète ne devrait jamais être établi en se basant sur une seule analyse sanguine. L'évaluation de la glycémie à jeun et l'examen oral de tolérance au glucose, qui consiste à mesurer la glycémie 2 heures après l'ingestion de 75g de glucose, sont deux épreuves dont l'utilisation est suggérée par l'OMS pour le diagnostique du diabète. Alors que le premier examen est avantagé par une plus grande reproductibilité et par sa simplicité, le second semblerait bénéficier d'une meilleure sensibilité.

La méthode de l'hémoglobine glycosylée permet aussi d'évaluer la glycémie; comme la durée de vie des érythrocytes est de 120 jours, et que le degré de glycosylation (liaison du glucose à certains acides aminés) des molécules d'hémoglobine est proportionnel à la concentration sanguine en glucose, la quantification de l'hémoglobine glycosylée permet d'évaluer la glycémie moyenne des 2-3 derniers mois [Rohlfing 2002]. Par contre, l'utilisation de cette méthode pour des fins de diagnostic n'est pas encore conseillée parce qu'il reste du travail à faire afin de la normaliser mondialement [The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2003b].

Une épreuve de glycémie plasmatique à jeun permet de révéler une anomalie de la glycémie à jeun lorsque la concentration sanguine en glucose se situe entre 5,6 et 7,0 mmol/L (Figure 1). Parallèlement, un diagnostic d'intolérance au glucose s'applique lorsque des valeurs de glycémie se situant entre 7,8 et 11,1 mmol/L sont obtenues 2 heures après l'ingestion de 75 grammes de glucose. Un diagnostic de diabète doit être posé lorsque la glycémie à jeun est supérieure à 7,0 mmol/L. De plus, une mesure de la glycémie supérieure à 11,0 mmol/L, que ce soit 2 heures après l'ingestion de 75 grammes de glucose ou à n'importe quel autre moment de la journée, entraîne aussi un diagnostic de diabète. Ainsi, une glycémie à jeun inférieure à 5,6 mmol/L ou une mesure de glycémie 2 heures après une ingestion de 75 grammes de glucose inférieure à 7,8 correspondent à des valeurs normales (Figure 1).

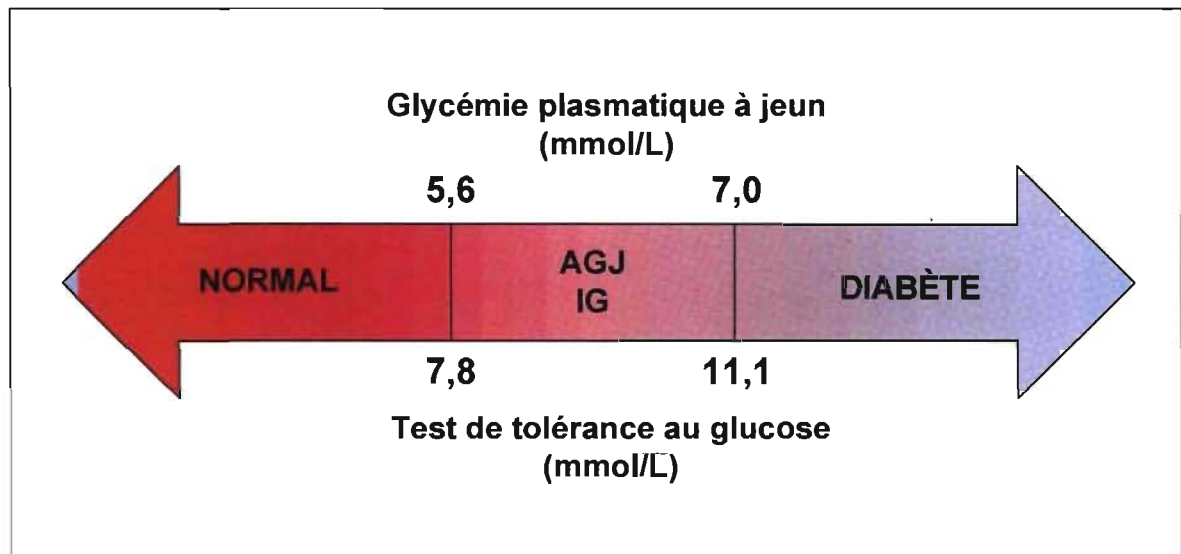


Figure 1. Valeurs seuils de glycémie servant au diagnostic du diabète.
AGJ, anomalie de la glycémie à jeun; IG, Intolérance au glucose.

1.1.3 Complications diabétiques

Une étude clinique faite au Japon a révélé que l'espérance de vie est diminuée en moyenne de 15 ans dans le DT1 et de 5 à 10 ans dans le DT2 (Tableau I) [Sasaki 1981]. Les complications diabétiques sont les aspects les plus redoutés de la maladie car elles sont grandement responsables de la mortalité et de la morbidité. L'association entre l'hyperglycémie et le développement de complications diabétiques a été clairement établie [The Diabetes Control and Complications Trial Research Group 1993; UK Prospective Diabetes Study Group 1998] et les mécanismes suivant seraient impliqués;

- La voie polyol
- La glycation avancée
- L'activation de la protéine kinase C
- Un flux accru par la voie de la biosynthèse de l'hexoamine
- Le stress oxydatif

La description spécifique et détaillée de chacune de ces voies ne fait pas partie de l'objectif du présent ouvrage, et le lecteur est invité à consulter l'excellent article de revue du Dr Brownlee pour plus d'information [Brownlee 2005].

Dans le diabète, alors que toutes les cellules baignent dans un environnement riche en glucose, seules les cellules qui sont incapables de réguler à la baisse l'entrée de glucose sont endommagées. Les cellules endothéliales figurent parmi celles-ci, ce qui explique que les complications diabétiques qui se développent sont essentiellement microvasculaires et/ou macrovasculaires. Ainsi l'athérosclérose s'installe dans les artères qui approvisionnent le cerveau, le cœur et les membres inférieurs, ce qui résulte pour les diabétiques en une augmentation des risques de subir un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral ou une amputation (Figure 2). D'ailleurs les principales causes de mortalité et de morbidité du diabète sont les maladies cardiovasculaires [Garcia *et al.*, 1974]. De plus, les dommages aux vaisseaux sanguins périphériques contribuent au développement de la rétinopathie, de la néphropathie et des polyneuropathies diabétique (Figure 2). Ainsi, au Canada la rétinopathie diabétique est le principal facteur responsable des nouveaux cas de cécité et la néphropathie diabétique est la principale cause de transplantation rénale [Santé Canada 2002].

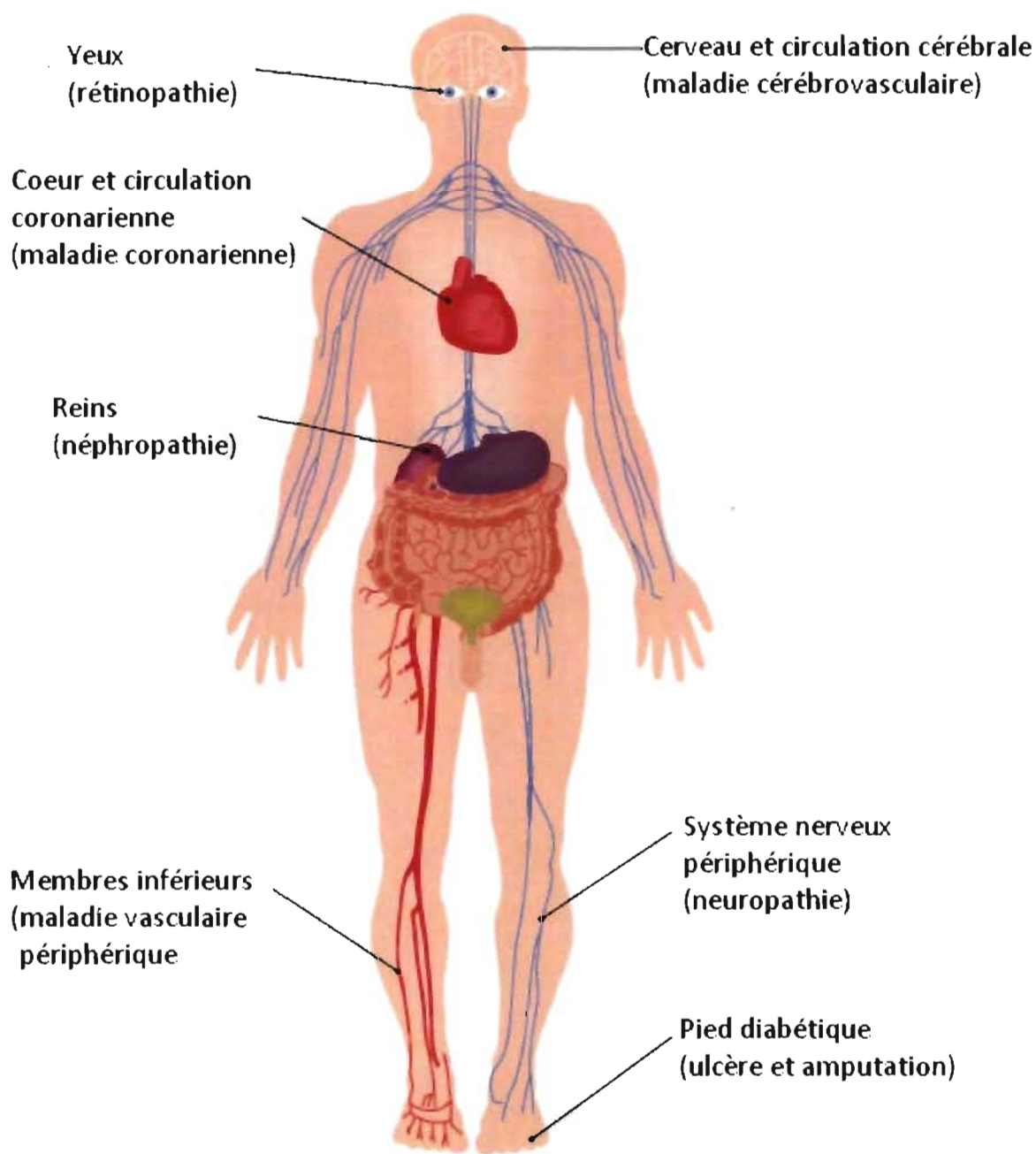


Figure 2. Représentation des organes atteints par les principales complications diabétiques.

Source : *Diabetes Atlas, deuxième édition, Fédération internationale du diabète, 2003.*

1.1.4 Traitements

Les différents traitements ont pour objectif de retarder ou d'éviter le développement des complications diabétiques qui apparaissent chez 20-30% de la population diabétique malgré

un contrôle efficace de la glycémie. La meilleure approche clinique pour retarder le développement des complications consiste à contrôler la glycémie le plus efficacement possible. La première étape de la prise en charge du patient comprend la mise en place d'un programme d'exercice ainsi qu'une diète faible en gras saturés et en sucres simples [Knowler *et al.*, 2002]. Si l'administration de médicaments devient nécessaire, le programme d'exercice et de diète doit être poursuivi avec le même sérieux afin de potentialiser les effets des médicaments. Alors que le DT1 se traite principalement par des injections d'insuline pour pallier au déficit pancréatique, le DT2 est d'abord traité avec des médicaments oraux et les injections d'insuline peuvent être ajoutées si une insuffisance des cellules β l'exige. Les antidiabétiques oraux agissent à différents niveaux. Par exemple certains stimulent la sécrétion d'insuline dans le pancréas ou le métabolisme du glucose dans le muscle alors que d'autres suppriment la production hépatique de glucose ou ralentissent l'absorption des hydrates de carbones au niveau intestinal (Tableau II).

Tableau II. Description des modes d'actions des principaux médicaments antidiabétiques oraux.

MÉDICAMENT	CIBLE	ACTION
Acarbose, Miglitol	Intestin grêle	Inhibe α -glucosidase (enzyme de dégradation des disaccharides)
Metformine, Thiazolidinédiones	Foie	Supprime la production de glucose
	Muscle squelettique	Stimule le métabolisme du glucose
Sulfonylurées, Meglitinides	Pancréas	Stimule la sécrétion d'insuline

1.1.5 Prévalence et incidence

Le diabète est qualifié d'épidémie mondiale du XXI^e siècle par les experts. Les dernières estimations de la Fédération internationale du diabète indiquent que la maladie touche 246 millions de personnes dans le monde actuellement, et que ce nombre devrait atteindre 380 millions d'ici vingt ans si la tendance se maintient. Les pays en voie de développement sont particulièrement affectés par cette augmentation de la prévalence (Figure 3).



Figure 3. Estimation de la prévalence du diabète dans le monde en 2007.

Source : Diabetes Atlas Third edition, International Diabetes Federation, 2006.

Au cours de l'année 1999-2000, des études de santé Canada ont révélé que 5,1% des canadiens vivaient avec un diabète diagnostiqué. Cette étude a confirmé qu'au Canada, comme dans le reste du monde, le diabète est plus répandu chez les hommes que chez les femmes (Figure 4). De plus, la prévalence augmente avec l'âge tant chez l'homme que chez la femme (Figure 4).

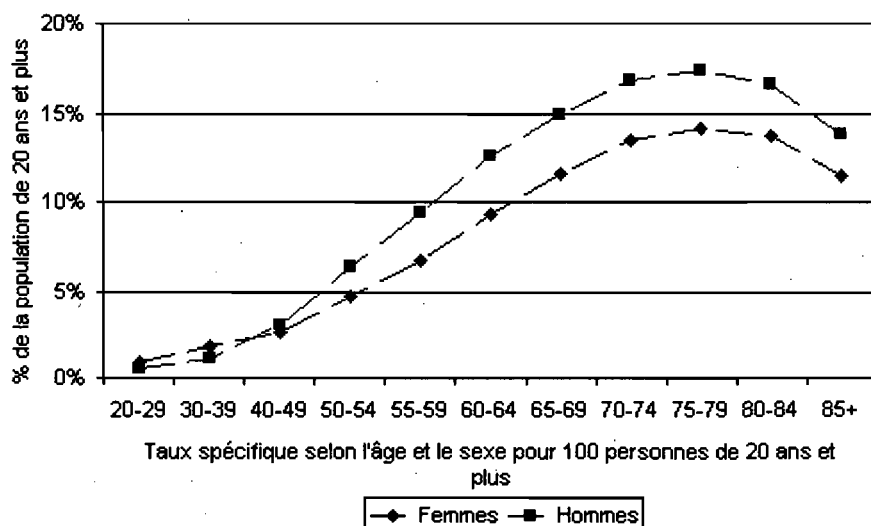


Figure 4. Prévalence du diabète au Canada, en 1999-2000, selon l'âge et le sexe.

Source : Agence de la santé publique du Canada, données brutes fournies par le système national de surveillance du diabète.

1.2 La voie de l'insuline

1.2.1 L'insuline

L'insuline est une hormone anabolique, exclusivement produite et sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans pancréatiques, qui intervient dans plusieurs processus physiologiques. Au niveau métabolique, l'insuline stimule l'entrée du glucose dans les cellules musculaires, hépatiques et adipeuses. Elle favorise aussi l'entrée des acides aminés dans les cellules musculaires. Les acides gras circulant vont aussi pénétrer à l'intérieur des cellules adipeuses lors d'une stimulation par l'insuline. En plus de favoriser l'entrée des molécules simples circulantes (glucose, acides aminés et acides gras) à l'intérieur des cellules, l'insuline accélère la conversion des molécules simples en molécules d'entreposage tel que le glycogène dans le muscle et le foie, les protéines dans le muscle et

les triglycérides dans le tissu adipeux (Figure 5). Parallèlement, dans ces mêmes tissus, l'insuline inhibe les enzymes qui sont responsables de la dégradation des molécules d'entreposage. D'autre part, l'insuline stimule la croissance et la différenciation cellulaire.

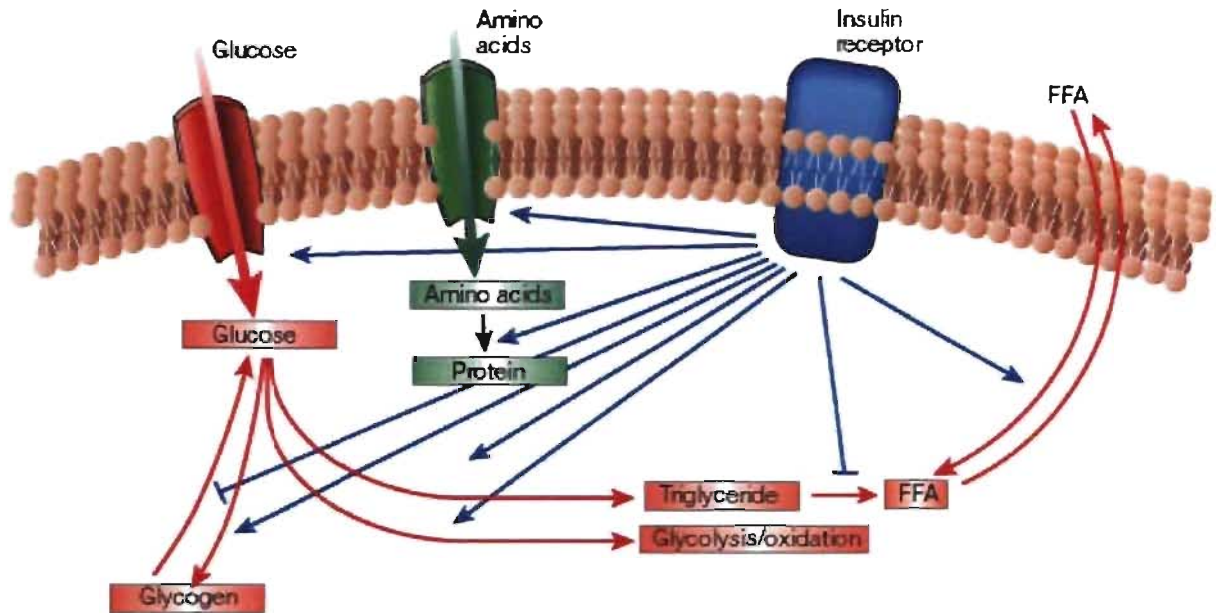


Figure 5. Les différentes voies de régulation du métabolisme par l'insuline dans les cellules hépatiques, musculaires et adipeuses.

L'insuline stimule l'entrée du glucose, des acides aminés et des acides gras (FFA) dans les cellules. Le glucose pénètre dans les cellules hépatiques et musculaires, les acides aminés dans les cellules musculaires et les acides gras dans les cellules adipeuses. Elle induit aussi une augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes qui catalysent la synthèse du glycogène, des lipides et des protéines tout en inhibant l'expression des enzymes qui catalysent la dégradation de ces molécules d'entreposage. Source : [Saltiel *et al.*, 2001].

1.2.2 Les transporteurs du glucose

Les transporteurs de glucose sont des protéines membranaires qui transportent les molécules de glucose hydrophiles à travers la double couche lipidique de la membrane plasmique. Il y en a deux types; les transporteurs de glucose dépendant du sodium (SGLT) et les transporteurs de glucose facilitant (GLUT). La famille GLUT peut être divisée en trois sous-familles selon les similarités de leurs séquences génétiques. La première sous-

famille est constituée de cinq transporteurs qui se différencient par leurs spécificités tissulaires et leurs fonctions (Tableau III). L'article de revue de Scheepers *et al.* [Scheepers *et al.*, 2004] revoit dans le détail les autres sous-familles de GLUT ainsi que la famille des SGLT.

Tableau III. Caractéristiques de la première sous-famille des transporteurs GLUT.

TRANSPORTEURS	DISTRIBUTION	NOTE
GLUT-1	Ubiquitaire Niveau élevé d'expression; - Érythrocytes - Cellules endothéliales du cerveau	Responsable de l'apport basal en glucose dans toutes les cellules
GLUT -2	Cellules β du pancréas Foie Reins Intestin grêle	Transporteur de faible affinité (pour que le glucose entre dans les cellules par GLUT-2, sa concentration extracellulaire doit être élevée)
GLUT -3	Neurones du cerveau Testicule	Transporteur de haute affinité (le glucose doit entrer dans ces tissus même s'il y a peu de glucose en circulation)
GLUT -4	Cœur Muscle squelettique Tissu adipeux	Permet au glucose d'entrer dans ces cellules lorsque sa translocation à la membrane est stimulée par l'insuline
GLUT -14	Testicule	Peu définie

1.2.3 Sécrétion de l'insuline

Les cellules β du pancréas détectent des élévations du glucose sanguin et sécrètent l'insuline afin de rétablir la glycémie à la normale (Figure 6). Les transporteurs de glucose GLUT-2 situés sur la membrane des cellules β ont une faible affinité pour le glucose (Tableau III); ainsi sa concentration extracellulaire doit être élevée pour qu'il puisse entrer dans la cellule. À l'intérieur des cellules β , l'oxydation du glucose libère l'ATP qui se lie et

inactive les canaux potassiques, causant ainsi une dépolarisation de la membrane et l'activation subséquente des canaux calciques voltage-dépendants. L'entrée de calcium par ces canaux est responsable de la sécrétion d'insuline par les cellules β dans la circulation sanguine.

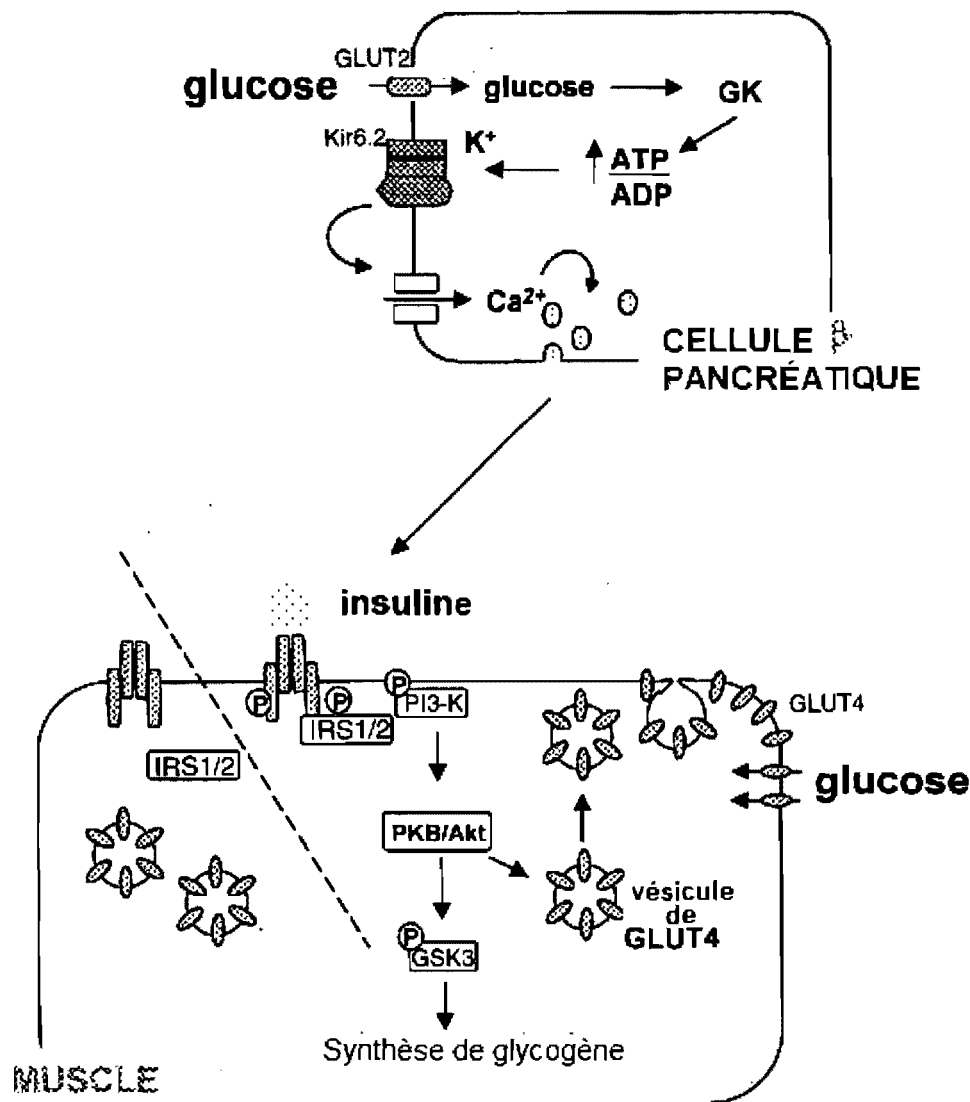


Figure 6. Schéma représentant les mécanismes entraînant la sécrétion de l'insuline et l'entreposage du glucose dans les cellules musculaires squelettiques.

Lorsque la concentration extracellulaire en glucose augmente, il y a plus de glucose qui entre dans les cellules β via les transporteurs GLUT-2. La glucokinase (GK) phosphoryle le glucose, et la consommation du glucose phosphorylé mène à une augmentation du ratio ATP : ADP. L'inactivation des canaux potassiques par l'ATP favorise l'entrée de calcium qui déclenche la sécrétion d'insuline. Le récepteur à l'insuline activé phosphoryle ses substrats (IRS1/2) et recrute la phosphoinositide 3-kinase (PI-3k). La PI-3k enclenche une cascade enzymatique menant à une augmentation de la translocation de GLUT-4 à la membrane d'une part, et à une augmentation de la glycogénèse, d'autre part. Adapté de [Scheepers *et al.*, 2004].

1.2.4 Le récepteur de l'insuline et ses substrats

L'action de l'insuline est initiée par l'interaction de celle-ci avec son récepteur à la surface de la membrane cellulaire. Le récepteur de l'insuline est une protéine tétramérique (Figure 7) constituée de deux sous-unités α extracellulaires reliées par des ponts disulfures et de deux sous-unités β transmembranaires à activité tyrosine kinase (TK) [Saltiel *et al.*, 2001].

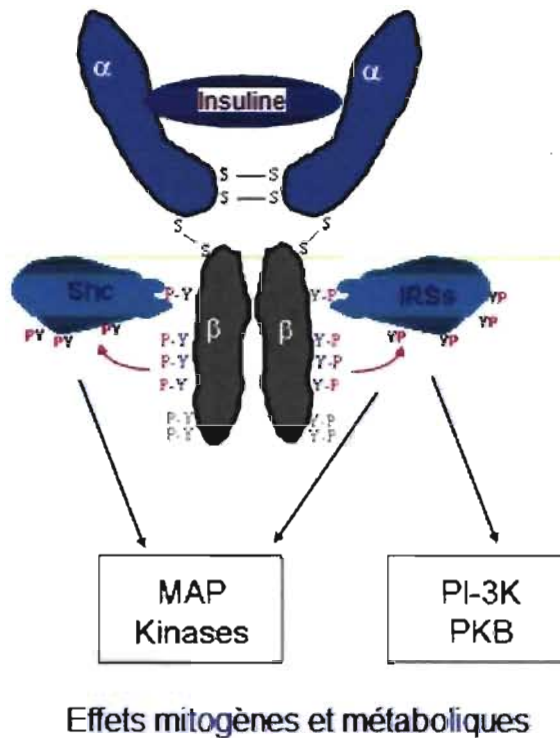


Figure 7. Schéma représentant la structure du récepteur de l'insuline et son mode d'activation.

Le récepteur est constitué de deux sous-unités α extracellulaires qui lient l'insuline, et de deux sous-unités β transmembranaires à activité tyrosine kinase, interconnectés par des ponts disulfures (S—S). Séquence des événements : 1- Liaison de l'insuline au récepteur, 2- Autophosphorylation de la sous-unité β et changement conformationnel, 3- Phosphorylation des résidus tyrosines (pY) sur les substrats du récepteur à l'insuline (*Insulin-receptor substrates (IRSs), Shc...*), 4- Effets sur la mitogenèse ou le métabolisme via l'activation des MAP kinases ou de la Phosphoinositide 3-kinase (PI-3k) et des phosphokinases B (PKB). Adapté à partir du site internet de l'Institut Cochin de recherche biomédicale en France, l'équipe de Dr Tarik Issad [Institut Cochin de biologie médicale 2007].

La liaison de l'insuline à la sous-unité α entraîne l'autophosphorylation de la sous-unité β du récepteur sur un certain nombre de tyrosines. Cette autophosphorylation, et le changement de conformation qu'elle induit, stimule l'activité TK du récepteur envers ses substrats cellulaires tels que les *insulin-receptor substrates 1 à 4* (IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4) et les isoformes des Shc [Saltiel *et al.*, 2001]. Le rôle de ces substrats est de transmettre le signal de l'insuline à l'intérieur de la cellule (Figure 7).

1.2.5 Voie de signalisation intracellulaire de l'insuline

Lorsque les substrats du récepteur de l'insuline sont phosphorylés sur des résidus tyrosines, ils deviennent un point d'ancrage pour les domaines *Src-homology-2* (SH2) des protéines intracellulaires qui vont transmettre le signal de l'insuline à l'intérieur de la cellule. La signalisation de l'insuline est dispersée dans diverses directions selon la nature des molécules de signal qui se lient sur les substrats du récepteur. Parmi celles-ci, il y a la phosphatidylinositol-3(PI-3)-kinase qui déclenche la voie d'activation des protéines PI-3 et Akt [Saltiel *et al.*, 2001]. C'est par cette voie de transmission du signal que l'insuline augmente la vitesse de translocation du transporteur GLUT-4 à la membrane cellulaire pour qu'il puisse accélérer, par un facteur de 10 à 20 fois, la diffusion facilitée du glucose contre son gradient de concentration (Figure 6) [Scheepers *et al.*, 2004]. L'ajout de molécules de glucose aux chaînes de glycogène est aussi favorisé par cette voie de signalisation de l'insuline. Par ailleurs, la contraction musculaire et l'hypoxie peuvent induire la translocation de GLUT-4 à la membrane. Les effets non métaboliques de l'insuline sur la prolifération cellulaire sont plutôt transmis par la voie d'activation des protéines Ras via le substrat du récepteur Shc (Figure 7).

1.2.6 Pathologies de la voie de signalisation de l'insuline impliquées dans le DT2

La RI est caractérisée par des altérations à plusieurs niveaux [Pessin *et al.*, 2000];

- Concentration des récepteurs à l'insuline et de leurs activités
- Concentration et phosphorylation des substrats du récepteur (IRS-1 et IRS-2)
- Activité de la PI-3k
- Translocation de GLUT-4
- Activité des enzymes intracellulaires

L'efficacité de l'insuline sur ses tissus cibles dépendra de l'activité TK de son récepteur. Cette activité TK est étroitement contrôlée par un certain nombre de protéines intracellulaires dont les protéines tyrosine-phosphatases (PTP) qui peuvent dé-phosphoryler les récepteurs et ainsi diminuer leur activité TK. Deux PTP (PTP1B et LAR) ont été impliquées dans la régulation négative des récepteurs à l'insuline, et une élévation de l'expression de chacune de ces phosphatases a été rapportée chez des patients insulino-résistants [Goldstein *et al.*, 1998].

Alors que la phosphorylation des résidus tyrosines a pour effet d'augmenter l'activité des protéines IRS, la phosphorylation des résidus sérines ou thréonines entraîne une inactivation de la protéine. En effet, la phosphorylation des résidus sérines et/ou thréonines induit un changement de conformation qui empêche les domaines TK de la protéine d'atteindre les résidus tyrosines pour les phosphoryler. De plus, le changement de conformation peut aussi réduire l'habilité de ces substrats à attirer et activer la PI-3k. Ces phosphorylations neutralisantes peuvent être effectuées par différentes protéines kinases intracellulaires reconnues pour leurs implications dans l'hyperinsulinémie, l'hyperlipidémie, l'obésité, l'hyperglycémie et l'inflammation [Draznin 2006]. Parmi

celles-ci il y a la protéine *Tumor necrosis factor* α (TNF α) dont l'expression est augmentée dans les tissus adipeux des animaux et des humains obèses et insulino-résistants. La neutralisation de cette protéine ou la suppression de son gène protège contre le développement de la RI, suggérant ainsi que cette cytokine joue un rôle important dans cette pathologie [Qi *et al.*, 2000]. En déclenchant une cascade d'événements menant à la phosphorylation de résidus sérines/thréonines sur le récepteur à l'insuline ou son substrat, le stress oxydatif peut aussi contribuer au développement de la RI (Section 1.4.2). Enfin, l'atténuation de la signalisation de l'insuline induite par l'obésité pourrait résulter de l'activation séquentielle de la protéine kinase C et de l'inhibiteur de la kinase du facteur nucléaire κ B (IK κ B) [Yuan *et al.*, 2001].

1.3 L'hypertension et le diabète

L'hypertension artérielle (HTA) et le diabète vont souvent de pairs et cette association augmente grandement le risque de morbidité et de mortalité. Une étude internationale réalisée en 1998 [Adler *et al.*, 2000] a démontré qu'une diminution de la pression artérielle de 10/5 mmHg (systolique/diastolique) chez un patient diabétique hypertendu est associée à une diminution du risque de mortalité, de complications macro- et microvasculaires dans des proportions de 32%, 34% et 37%, respectivement. Au Québec, la prévalence de l'HTA est de 80% chez les personnes diabétiques de type 2, et inversement, le risque de devenir diabétique est 2,4 fois plus élevé chez les personnes hypertendues [La société québécoise d'hypertension artérielle 2007]. L'HTA et l'intolérance au glucose, en plus de l'obésité abdominale, une concentration élevée en triglycérides et basse en cholestérol HDL, font partie d'un ensemble de facteurs de risques de maladies cardiovasculaires regroupés sous le

terme de « syndrome métabolique » (Tableau IV). Un individu doit présenter au moins trois des facteurs de risques pour qu'un diagnostic de syndrome métabolique soit établi. La présence du syndrome aggrave davantage les lésions des organes cibles que la présence isolée de chacun des facteurs [La société québécoise d'hypertension artérielle 2007].

Tableau IV. Critères de diagnostic du syndrome métabolique selon le troisième rapport (ATPIII) du « National Cholesterol Education Program » [Expert Panel on Detection 2001].

FACTEURS DE RISQUES	SEUIL
OBÉSITÉ ABDOMINALE (TOUR DE TAILLE)	
HOMME	> 102 cm
FEMME	> 88 cm
TRIGLYCÉRIDES	≥ 1,7 mmol/L
CHOLESTÉROL-HDL	
HOMME	< 1,0 mmol/L
FEMME	< 1,3 mmol/L
PRESSION ARTÉRIELLE	≥ 130/ ≥ 85 mm Hg
GLYCÉMIE À JEUN	≥ 6,1 mmol/L

1.4 Le stress oxydatif et le diabète

1.4.1 Stress oxydatif

En condition normale, les espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species en anglais) et azotées (RNS, Reactive Nitrogen Species en anglais) sont continuellement produites par les mitochondries lors de la respiration aérobie et par certaines enzymes comme les xanthines oxydases, les nicotinamides adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases et les cytochromes P450. Elles jouent un rôle essentiel dans la

communication intercellulaire, dans l'activation de voies métaboliques impliquées dans la réponse au stress ainsi que dans le système immunitaire où elles aident à la destruction du contenu des phagocytes. Comme il s'agit de radicaux libres (molécules instables possédant un ou plusieurs électrons non appariés sur la couche externe de leur orbitale) ou de molécules ayant le potentiel d'en devenir, elles peuvent aussi causer des dommages non spécifiques indésirables aux cellules en oxydant l'ADN [Dizdaroglu 1992], les lipides [Heinecke 1997] ou les protéines [Aruoma *et al.*, 1989]. Normalement ces dommages sont rapidement réparés [Davies 2000] ou encore les radicaux libres sont neutralisés par les défenses antioxydantes avant même de causer des dégâts [Halliwell *et al.*, 1992; Rosen *et al.*, 2001]. Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre persistant entre cette production de ROS/RNS et les réparations effectuées par les systèmes de défense, et ces conditions sont observées chez les patients diabétiques [Maxwell *et al.*, 1997; Rosen *et al.*, 2001].

L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) est un précurseur important dans la plupart des voies métaboliques impliquant les ROS (Figure 8). Bien que plusieurs réactions d'oxydoréductions enzymatiques puissent générer l' $O_2^{\cdot-}$, il semble que sa source principale dans le système cardiovasculaire résulte de l'activation de la NADPH oxydase qui transfère un électron à partir du NADPH vers l'oxygène (Figure 8).

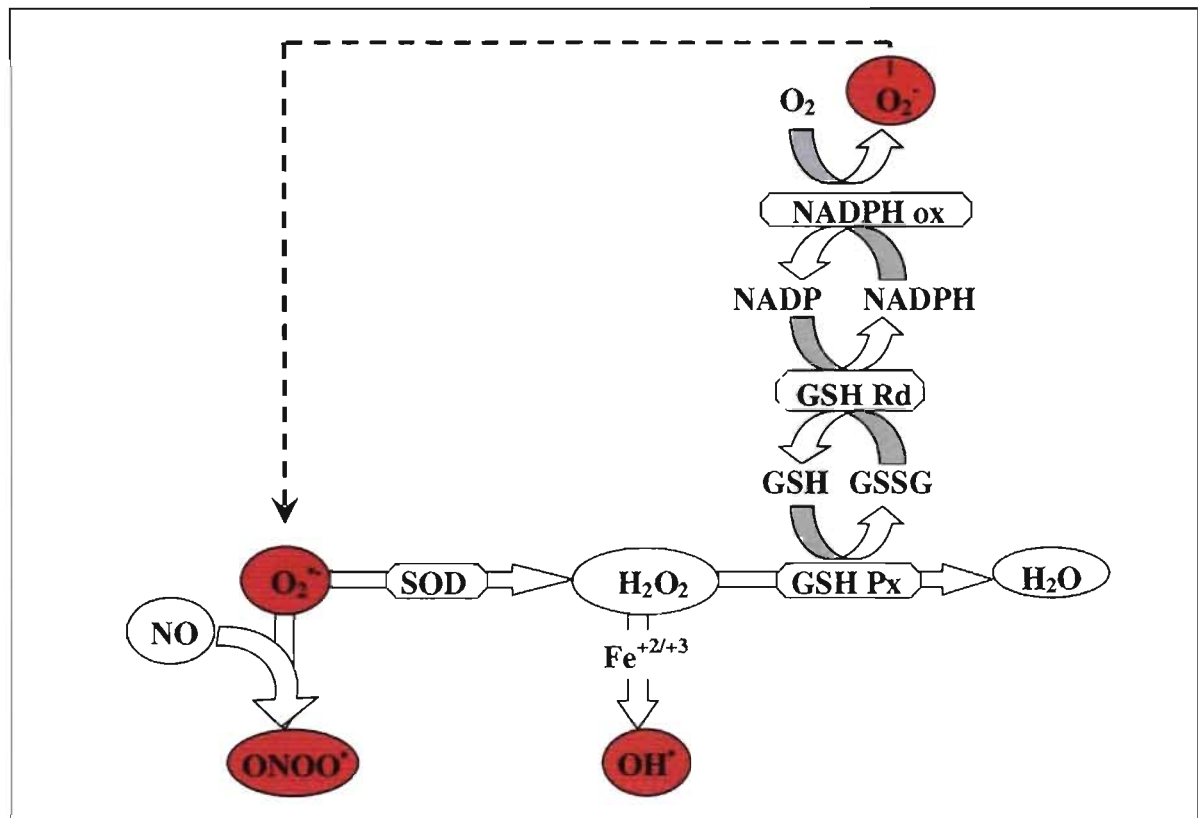


Figure 8. Schéma représentant la formation et l'élimination des différentes espèces réactives oxygénées.

Les molécules en rouge représentent des radicaux libres. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) est réduit par le superoxyde dismutase (SOD) pour former le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ensuite le peroxyde d'hydrogène peut être reconverti en eau par l'action catalytique de la glutathion peroxydase (GSH-Px) ou par la catalase, ou bien il peut être oxydé par le Fer et devenir ainsi un radical hydroxyle. Au cours de la réaction catalytique de la GSH-Px, le glutathion réduit (GSH) est oxydé (GSSG) par la GSH-Px. Le GSH peut être régénéré par la glutathion réductase (GSH-Rd), qui utilise le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADP+) comme co-substrat, produisant ainsi du NADP+ réduit (NADPH). L'anion superoxyde est formé par la NADPH oxydase (NADPH ox) qui transfère un électron du NADPH vers un atome d'oxygène. Enfin, l'anion superoxyde peut réagir avec le monoxyde d'azote (NO) pour former un autre radical, le peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$).

1.4.2 Stress oxydatif et résistance à l'insuline

À long terme, le stress oxydatif contribue au développement de la résistance à l'insuline et à la défaillance des cellules β [Rosen *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003]. Une variété de stimuli, tels que l'hyperglycémie ou une concentration élevée en acides gras libres, causent

une augmentation de la production de ROS et de RNS qui à leur tour activent plusieurs cascades de sérines/thréonines kinases sensibles au stress (Figure 9). Une fois activées, ces kinases peuvent phosphoryler des résidus sérines ou thréonines du récepteur de l'insuline ou de son substrat. Ainsi, la tyrosine kinase préalablement activée par l'insuline n'arrive plus à phosphoryler, et ainsi activer, le récepteur à l'insuline et son substrat [Rosen *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2003].

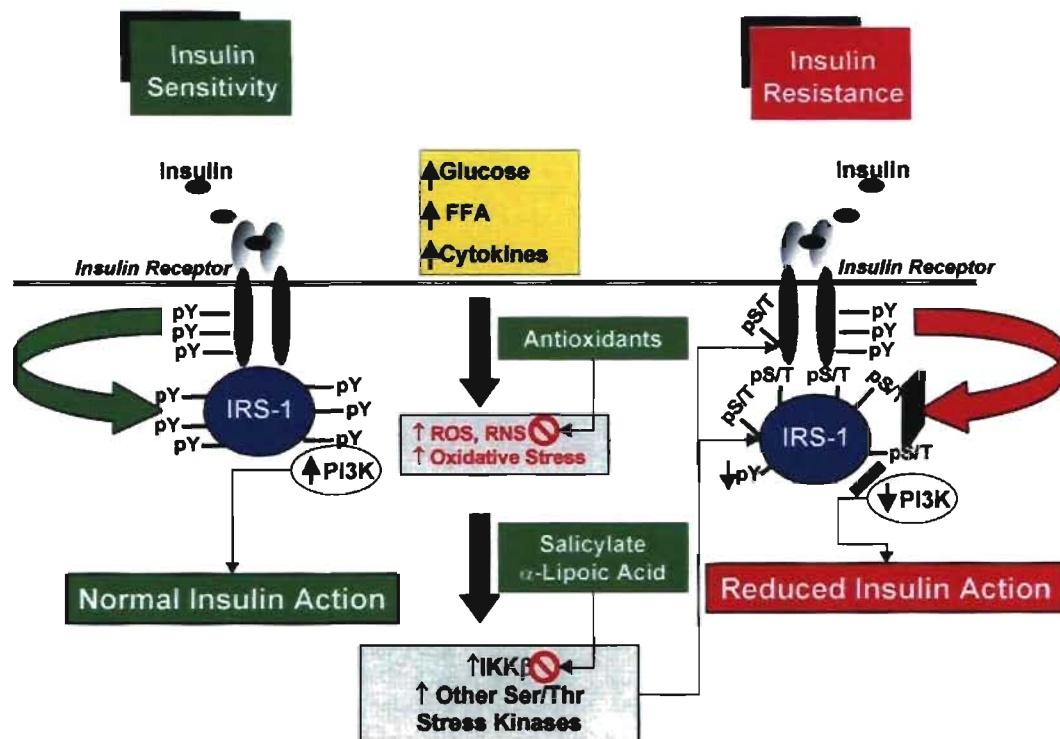


Figure 9. Représentation du rôle de l'activation des sérines kinases dans l'induction de la résistance à l'insuline par les stress oxydatif.

Une variété de stimuli (hyperglycémie, niveaux élevés d'acides gras libre (FFA), cytokines et autres) augmente la production de ROS et de RNS. Cela résulte en l'activation de plusieurs cascades de sérines/thréonines (Ser/Thr) kinases sensibles au stress tel que $IKK\beta$ (section 1.2.6). Une fois activées, ces kinases peuvent phosphoryler des résidus sérines ou thréonines (pS/T) du récepteur de l'insuline ou de son substrat (IRS-1), diminuant ainsi l'activité tyrosine kinase. Conséquemment, la voie de signalisation de l'insuline est entravée (résistance à l'insuline). L'effet protecteur des antioxydants (α -lipoic Acid) sur l'induction de la résistance à l'insuline par le stress oxydatif pourrait s'expliquer par une préservation de l'équilibre redox intracellulaire. Le salicylate joue un rôle protecteur en bloquant l'activité des kinases sensibles au stress responsable de la phosphorylation des sérines sur le récepteur à l'insuline. pY, tyrosine phosphorylation; PI3K, phosphatidylinositol 3-kinase. Source : [Evans *et al.*, 2003].

Une exposition prolongée au stress oxydatif est particulièrement périlleuse pour les cellules des îlots pancréatiques puisque celles-ci possèdent moins de défenses antioxydantes [Robertson 2004]. Une augmentation chronique de la production de ROS et de RNS résulte en une diminution de l'expression du gène de l'insuline et de sa sécrétion, ainsi qu'à l'apoptose des cellules β [Robertson 2004]. Le stress oxydatif, via la formation d'anion superoxyde, est un facteur primaire important dans le développement et l'évolution de l'hypertension et de la résistance à l'insuline [de Champlain *et al.*, 2004], et des complications diabétiques [Brownlee 2005; Haidara *et al.*, 2006]. Ceci explique les effets bénéfiques de l'antioxydant acide α -lipoïque sur le développement de l'hypertension, de la résistance à l'insuline et des neuropathies diabétiques dans des modèles animaux [Maddux *et al.*, 2001; El Midaoui *et al.*, 2002a; Lungu *et al.*, 2007] et le patient diabétique [Jacob *et al.*, 1995; Kamenova 2006; Foster 2007]. L'acide α -lipoïque a d'ailleurs été approuvé pour le traitement des neuropathies diabétiques dans plusieurs pays [Reljanovic *et al.*, 1999; Rosen *et al.*, 2001].

1.5 Le système nerveux sympathique (SNS) et le diabète

Des études montrent que l'hyperactivité sympathique serait le lien entre le développement de l'hypertension et la résistance à l'insuline [Perin *et al.*, 2001]. Les manifestations étant une élévation des catécholamines circulantes [Fournier *et al.*, 1986; Kaufman *et al.*, 1991; K-Laflamme *et al.*, 1998] et de la fréquence cardiaque [Chan *et al.*, 1995; Facchini *et al.*, 1996] et une hyperactivité sympathique au repos [Huggett *et al.*, 2003]. Chez les patients hypertendus, les bloqueurs α -adrénergiques (prazosine, doxazosine) améliorent la sensibilité à l'insuline [Pollare *et al.*, 1988; Lehtonen 1991], alors que les médicaments

utilisés pour améliorer la sensibilité à l'insuline (rosiglitazone, troglitazone) chez les diabétiques atténuent l'activité du SNS [Watanabe *et al.*, 2004; Yosefy *et al.*, 2004]. Une sympathectomie chimique empêche le développement de l'hypertension et l'hyperinsulinémie chez le rat soumis à une diète riche en fructose [Verma *et al.*, 1999]. Enfin, des études de linkage génétique ont révélé que la mutation du gène codant pour le récepteur β_2 -adrénergique est étroitement associée à la résistance à l'insuline et à une élévation de la pression artérielle [Masuo *et al.*, 2005]. Toutes ces études démontrent que le SNS joue un rôle majeur dans le développement de l'hypertension et de la résistance à l'insuline.

Malgré l'étroite relation entre l'hyperactivité sympathique et la résistance à l'insuline, il est difficile de déterminer lequel s'installe en premier dans le développement du diabète. L'activation accrue du SNS par l'hyperinsulinémie a été démontrée [Rowe *et al.*, 1981; Berne *et al.*, 1992] et elle impliquerait entre autres une action directe de l'insuline sur le système nerveux central et/ou une action indirecte sur le baroréflexe en réponse à la vasodilatation induite par l'insuline [Perin *et al.*, 2001]. D'autre part, l'administration d'adrénaline ou la stimulation du SNS altère grandement la sensibilité à l'insuline dans le muscle [Deibert *et al.*, 1980] et le tissu adipeux [Klein *et al.*, 1999]. L'hyperactivité du SNS peut causer ou amplifier la résistance à l'insuline par son effet vasoconstricteur qui diminue le flux sanguin dans le muscle et/ou en augmentant le nombre de fibres musculaires IIB résistantes à l'insuline) [Zeman *et al.*, 1988].

1.6 Le remodelage cardiovasculaire et le diabète

1.6.1 Remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire est une transformation active caractérisée par des altérations structurales impliquant un dérèglement des mécanismes cellulaires suivant;

- Croissance cellulaire
- Mort cellulaire
- Migration cellulaire
- Production ou dégradation de la matrice extracellulaire

À long terme, l'hypertension artérielle cause des changements hémodynamiques qui favorisent un remodelage vasculaire. Celui-ci consiste initialement en une adaptation bénéfique, mais il peut éventuellement contribuer à la pathophysiologie des maladies vasculaires et circulatoires. Une augmentation de la masse et un durcissement de l'aorte contribuent à l'élévation de la pression artérielle systolique et représentent un facteur de risque indépendant pour l'hypertrophie ventriculaire [Safar *et al.*, 1993]. En plus de la composante hémodynamique, le remodelage vasculaire repose sur l'interaction entre des facteurs de croissances générés localement et des médiateurs vasoactifs [Gibbons *et al.*, 1994].

Le remodelage vasculaire implique une variation de l'épaisseur du vaisseau et/ou du diamètre de la lumière. Ce qui est fréquemment observé dans l'hypertension artérielle, c'est un remodelage hypertrophique qui consiste en un épaissement de la paroi de l'artère et une diminution du diamètre de la lumière (Figure 10A). Le remodelage peut aussi être eutrophique lorsque, tout en conservant la même quantité, le tissu musculaire se réorganise

autour de la lumière du vaisseau pour en réduire le diamètre (Figure 10B). Le remodelage hypotrophique se produit à la suite d'une diminution chronique du débit sanguin et il est caractérisé par une diminution de la masse musculaire et du volume de la lumière (Figure 10C). L'inverse se produit lorsque le flux sanguin augmente pendant une longue période (Figure 10D).

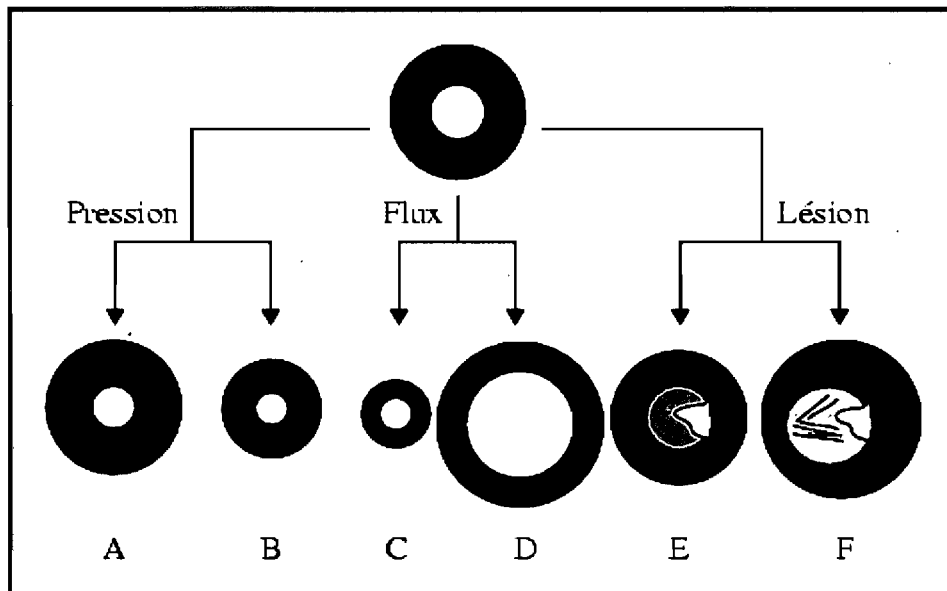


Figure 10. Les types de remodelage artériel observés en pathologie.

Le vaisseau A représente le remodelage hypertrophique, tel qu'il peut être observé dans l'hypertension artérielle. Le vaisseau B représente le remodelage eutrophique (impliquant une réduction structurale de la lumière artérielle). Les vaisseaux C (hypotrophique) et D (hypertrophique excentrique) représentent l'adaptation à une diminution ou à une augmentation du flux artériel chronique. Les vaisseaux E et F représentent les remodelages de l'athérosclérose. D'après [Gibbons *et al.*, 1994].

1.6.2 Cardiomyopathies diabétiques

Les cardiomyopathies diabétiques, caractérisées par une hypertrophie et une fibrose du myocarde, contribuent significativement à la morbidité et à la mortalité cardiovasculaire chez les patients diabétiques, particulièrement chez ceux qui sont hypertendus.

L'hypertrophie ventriculaire peut être physiologique, et inoffensive, lorsqu'elle est associée à la croissance normale du cœur après la naissance ou à une adaptation chez un individu qui fait beaucoup d'exercice. Cette hypertrophie est qualifiée d'eutrophique et elle est caractérisée par une croissance proportionnelle de la paroi ventriculaire et de l'espace intra-ventriculaire [Heineke *et al.*, 2006]. L'hypertrophie pathologique est caractérisée par une augmentation de la masse musculaire du ventricule gauche et elle est initialement compensatoire. Éventuellement, une décompensation des fonctions du cœur hypertrophié cause une dilatation du ventricule gauche, une augmentation de la fibrose interstitielle et une insuffisance cardiaque (Figure 11) [Heineke *et al.*, 2006].

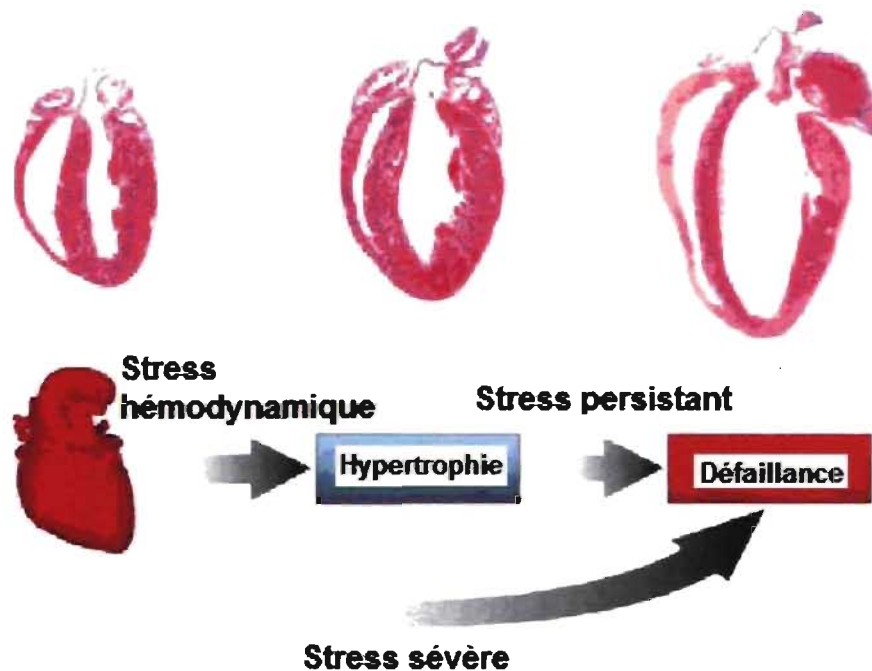


Figure 11. Évolution de l'hypertrophie ventriculaire pathologique.

Tiré du site internet de l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire en France, le groupe de physiopathologie moléculaire de Dr Éric Honoré [Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire 2007, www.ipmc.cnrs.fr].

La surcharge de travail causée par l'hypertension artérielle est grandement responsable du développement de l'hypertrophie ventriculaire chez les patients hypertendus, qu'ils soient

diabétiques ou pas. Par contre, une incidence élevée d'hypertrophie ventriculaire gauche est aussi observée chez les patients diabétiques qui ne sont pas hypertendus [Struthers *et al.*, 2002]. Cela démontre que cette pathologie peut s'expliquer autrement que par des causes mécaniques. En fait, il semble que le développement de la cardiomyopathie puisse être initié par l'hyperglycémie et le stress oxydatif [Sharma *et al.*, 2006]. D'ailleurs, des études épidémiologiques récentes suggèrent que l'intolérance au glucose pourrait contribuer au développement de l'hypertrophie ventriculaire gauche [Fujita *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007].

La fibrose cardiaque résulte d'une prolifération inadéquate des fibroblastes et d'une accumulation, dans la matrice extracellulaire, du collagène qu'ils sécrètent. Le tissu cicatriciel ainsi produit remplace progressivement le tissu musculaire contractile, ce qui contribue à l'installation d'une insuffisance cardiaque qui peut entraîner la mort. Les systèmes rénine-angiotensine et endothéline sont impliqués dans le développement de la fibrose cardiaque chez le rat diabétique [Gross *et al.*, 2004].

1.7 La voie du monoxyde d'azote

Un facteur de relaxation des cellules musculaires lisses d'origine endothéliale a été découvert en 1980 par Furchgott et Zawadzki en montrant que la réponse vasodilatatrice induite par l'acétylcholine *in vitro* nécessitait un endothélium intact [Furchgott *et al.*, 1980]. Ce facteur a par la suite été identifié comme étant le monoxyde d'azote (NO) et la clarification de son rôle dans le système cardiovasculaire a valu à Robert Furchgott, Louis Ignarro et Ferid Murad, le prix Nobel de médecine en 1998 [Ignarro *et al.*, 1987]. Auparavant sous-estimé pendant de nombreuses années et associé qu'à la formation des

pluies acides et à l'amincissement de la couche d'ozone, le NO est alors devenu un médiateur biologique important.

1.7.1 Synthèse du NO

La *nitric oxide synthase* (NOS) est l'enzyme qui catalyse la biosynthèse du NO au cours d'une réaction d'oxydation, dépendante de l'oxygène et du NADPH, dans laquelle le L-Arginine est converti en L-Citrulline (Figure 12). L'étape de dimérisation a pour effet d'activer l'enzyme. Cette activation génère des sites de liaison qui ont une grande affinité pour l'arginine et le cofacteur essentiel, le tétrahydrobioptérine (BH₄), permettant ainsi un transfert d'électrons à partir du domaine flavine-réductase vers le domaine hème-oxygénase [Andrew *et al.*, 1999; Vallance *et al.*, 2002].

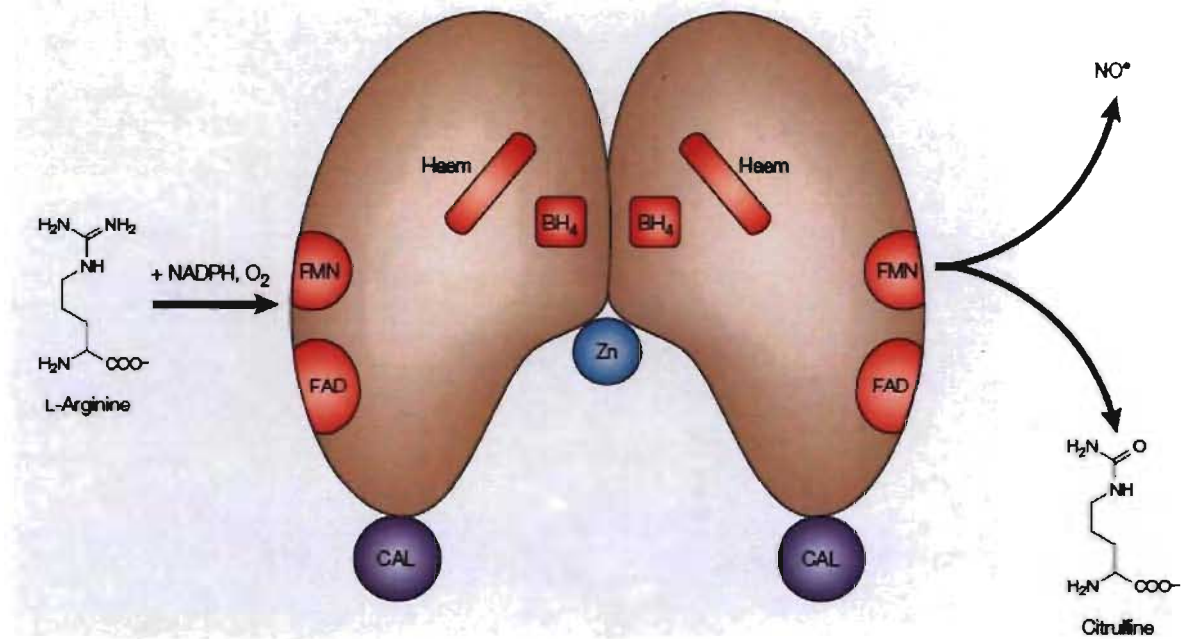


Figure 12. Formation du monoxyde d'azote par la NO synthase.

Pour être active, la NOS doit d'abord dimériser et lier ses cofacteurs (tétrahydrobioptérine (BH₄), hème (Haem), flavine mononucléotide (FMN) et flavine adénine dinucléotide (FAD)). En liant la calmoduline (CAL), l'enzyme active catalyse l'oxydation du L-Arginine en L-Citrulline et en NO. Cette étape requiert des co-substrats (oxygène et Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate réduit (NADPH) et le zinc (Zn)). Tiré de [Vallance *et al.*, 2002].

La famille des NOS comprend trois isoformes structurellement et fonctionnellement différentes (Tableau V). Les NOS endothéliales et neuronales (eNOS, nNOS) sont généralement exprimées de façon constitutive, principalement dans les cellules endothéliales et neuronales, respectivement. L'activation des e/nNOS nécessite la liaison de la calmoduline (Figure 12), et cette liaison dépend de la biodisponibilité du calcium. Ainsi, la quantité de NO produit par ces NOS est limitée en fonction de la biodisponibilité du calcium. La NOS inducible (iNOS) peut être activée dans plusieurs type cellulaires par certaines cytokines ou par des médiateurs de l'inflammation (interféron- γ , interleukine-1, facteur α de nécrose tumorale). De faibles niveaux d'expression constitutive de cette enzyme ont été mesurés dans les reins, les cellules musculaires lisses et le système nerveux

central [Zatz *et al.*, 1998]. L'isoforme iNOS ne dépend toutefois pas de la biodisponibilité du calcium pour son activation puisque la calmoduline demeure liée en permanence, ce qui en fait une enzyme beaucoup plus productive que les autres NOS. En effet, une fois exprimée, la iNOS produit 100 à 1000 fois plus de NO que les e/nNOS. [Andrew *et al.*, 1999; Vallance *et al.*, 2002].

Tableau V. Comparaison des principales caractéristiques des isoformes de la NOS.

ISOFORMES	EXPRESSION	DÉPENDANCE À LA CALMODULINE?	LOCALISATION (NON EXHAUSTIVE)
eNOS	Constitutive	OUI	Cellules endothéliales Myocytes cardiaques Neurones cardiaques
nNOS	Constitutive	OUI	Neurones périphériques et centraux Cellules musculaires lisses
iNOS	Inductible	NON	Cellules endothéliales Macrophage Cellules musculaires lisses

1.7.2 Inhibition de la NOS

Parmi les molécules inhibant la synthèse du NO, il y a celles qui bloquent les cofacteurs ou la dimérisation de la NOS ainsi que les analogues des substrats de la NOS [Vallance *et al.*, 2002]. La méthylation des résidus Arginine, par une enzyme méthyle transférase d'Arginine, se fait de façon naturelle chez le mammifère. Les méthylations qui se font de façon asymétrique donne lieu à des analogues du L-Arginine qui entrent en compétition avec celui-ci pour son site de liaison sur la NOS [Vallance *et al.*, 2002]. Ainsi, le L-N^G-MonoMéthyle-Arginine (L-NMMA) et le DiMéthyle-Arginine Asymétrique (ADMA) sont des inhibiteurs endogènes produits de cette façon [Vallance *et al.*, 1992]. Le L-N^G-Nitro-Arginine-Méthyle-Ester (L-NAME) est un autre analogue du L-Arginine couramment utilisé en laboratoire mais celui-ci n'est pas produit naturellement. Ces trois analogues du

L-Arginine inhibent non-sélectivement les trois isoformes de la NOS [Rees *et al.*, 1990; Andrew *et al.*, 1999; Vallance *et al.*, 2002].

1.7.3 Cibles du NO

À ce jour, trois principales cibles du NO ont été identifiées;

➤ Métaux (Fer)

La guanylyl cyclase soluble (GCs) a été la première cible physiologique du NO à être décrite. La GCs possède un groupement hème qui expose un atome de fer auquel le NO se lie pour activer l'enzyme. L'activation enzymatique cause la production de Guanosine monophosphate cyclique (GMPc) et initie une cascade de signalisation qui est à la base de plusieurs des effets physiologiques du NO [Ignarro *et al.*, 1999; Vallance *et al.*, 2002]. Le NO contribue aussi à la régulation de l'activité du cytochrome oxydase c qui fait partie de la chaîne respiratoire des mitochondries [Brown 2001].

➤ Thiols réduit

Un thiol est un groupe fonctionnel composé d'un atome de soufre et d'un atome d'hydrogène (-SH). Les cystéines sont des acides aminés composés d'un thiol qui peut être converti en -NO lors d'un processus nommé S-nitrosation. La nitrosation des cystéines de certaines protéines (canaux ioniques, enzymes, protéines G, facteurs de transcription) peut affecter leur fonctionnement, ce qui fait du thiol une cible du NO

ayant une grande importance physiologique [Stamler *et al.*, 2001; Vallance *et al.*, 2002].

➤ Oxygène moléculaire et ROS

Puisqu'il possède un électron non apparié, le NO fait partie de la famille des radicaux libres. L'azote peut exister sous une variété d'état d'oxydation pour générer différents ions azotés (nitrite, nitrate, nitroxyle, nitrosonium). Lorsque l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) est présent en concentration suffisante, c'est avec celui-ci que le NO va réagir le plus rapidement pour former du peroxynitrite, un puissant oxydant qui peut endommager plusieurs molécules dans la cellule [Stamler *et al.*, 2001; Vallance *et al.*, 2002]. C'est ainsi qu'une augmentation de la formation d'anion superoxyde, comme c'est le cas dans le diabète, peut résulter en une diminution de la biodisponibilité du NO et contribuer au développement des complications diabétiques.

La signalisation par le NO est intimement liée à l'état redox de la cellule ainsi qu'à la biodisponibilité en composés thiols.

1.7.4 Physiologie du NO

1.7.4.1 Physiologie cardiovasculaire du NO

Dans le système cardiovasculaire, la génération de NO est importante pour maintenir les vaisseaux sanguins dans un état de relaxation, protéger l'endothélium de l'adhésion des plaquettes et des globules blancs, et prévenir la prolifération des cellules musculaires lisses [Alheid *et al.*, 1987; Garg *et al.*, 1989; Kubes *et al.*, 1991]. Cette section présente

brièvement les principaux mécanismes impliqués dans la maintenance de l'homéostasie vasculaire induite par le NO.

➤ **Vasorelaxation**

Au départ, c'est la propriété vasodilatatrice du NO qui a permis d'attirer l'attention des scientifiques sur cette molécule et qui a motivé le travail de recherche colossal fait sur le sujet afin de mieux caractériser ses effets physiologiques. La liaison du NO au groupement hème de la GCs active cette enzyme productrice de GMPc. L'activation subséquente de la protéine kinase G inhibe la formation de l'inositol trisphosphate responsable de la mobilisation du calcium intracellulaire. Le calcium ne peut donc plus activer la kinase responsable de la phosphorylation de la chaîne légère de myosine et la contraction est ainsi empêchée [Tang *et al.*, 2003]. La voie du NO s'oppose donc au développement de l'hypertension en contribuant au maintien d'un réseau vasculaire détendu.

➤ **Prolifération cellulaire**

Le NO inhibe la prolifération cellulaire des cellules musculaires lisses par des mécanismes qui sont dépendants ou indépendants de la GMPc. L'expression des gènes p53 et p21, impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, est régulée par l'activation de la GMPc [Rubio *et al.*, 2004]. En fait, une augmentation de l'expression ou de l'activation de ces gènes favorise un arrêt en phase G1 du cycle cellulaire, ce qui empêche la prolifération cellulaire. Le NO peut aussi nuire à la croissance cellulaire de façon GMPc-indépendante en inhibant les enzymes arginase et décarboxylase ornithine impliquées dans la voie arginine-polyamine [Rubio *et al.*, 2004]. La voie polyamine

gouverne la prolifération cellulaire, la survie et l'apoptose. Par sa propriété anti-proliférative, le NO contribue à protéger le cœur et les vaisseaux contre le développement de l'hypertrophie cardiovasculaire pathologique typiquement observée dans le diabète et l'hypertension.

➤ **Apoptose**

Le NO peut avoir un effet opposé sur l'apoptose. Il peut la promouvoir ou l'inhiber dépendant de la source du NO et du type cellulaire concerné. Le NO abolit complètement l'effet apoptotique de l'angiotensine II en interférant (via une S-nitrosation) avec l'activation de la cascade des caspases [Dimmeler *et al.*, 1997]. En empêchant ainsi l'apoptose des cellules endothéliales, le NO contribue à prévenir le développement de l'athérosclérose [Rubio *et al.*, 2004]. D'autre part, il semble que la promotion de l'apoptose soit principalement imputable à une activation de la iNOS lors d'un processus inflammatoire [Dimmeler *et al.*, 1997]. Le NO intervient donc en régulant l'apoptose pour prévenir le remodelage vasculaire pathologique.

➤ **Agrégation plaquettaire**

L'activation de la GC par le NO entraîne une réduction de l'expression de la P-sélectine (une molécule d'adhésion cellulaire) et de la forme active de la glycoprotéine plaquettaire IIb/IIIa qui est nécessaire pour la liaison au fibrinogène (protéine impliquée dans la coagulation). Conséquemment, le NO inhibe l'activation, l'adhésion, et l'agrégation des plaquettes sanguines [Michelson *et al.*, 1996]. Une voie fonctionnelle du NO contribue donc à prévenir l'obstruction des vaisseaux sanguins du cœur

(infarctus), du cerveau (accident vasculaire cérébral) et des pieds (gangrène) dont l'incidence est accrue chez les diabétiques.

➤ **Inflammation**

La synthèse du NO inhibe l'induction, par des facteurs (interleukine (IL) -1 α , IL-6, IL-8, NF- κ B), de l'expression de molécules d'adhésion qui facilitent la migration des monocytes et des neutrophiles à l'intérieur de la paroi du vaisseau, agissant ainsi en tant que molécule anti-inflammatoire [De Caterina *et al.*, 1995]. L'inflammation est un processus clé dans le développement de l'athérosclérose chez les patients diabétiques souffrant de maladies cardiovasculaires. Ainsi, en protégeant les vaisseaux contre le développement de l'inflammation, le NO prévient le développement de maladies cardiovasculaires chez les diabétiques.

1.7.4.2 Implication du NO dans le métabolisme du glucose

La diffusion facilitée, qui permet l'entrée du glucose dans la cellule cible contre son gradient de concentration, est induite alors que l'insuline stimule la translocation des transporteurs du glucose (le principal étant GLUT4) à la membrane cellulaire (Section 1.2.2). L'insuline cause aussi une vasodilatation dans les tissus cibles, ce qui a pour effet de faciliter la livraison de l'insuline et du glucose vers ces tissus. Des études effectuées avec des inhibiteurs de la NOS et des donneurs de NO ont démontré que ces effets de l'insuline sont partiellement dépendants de la voie du NO. Le NO faciliterait la liaison de l'insuline à son récepteur cellulaire et il contribuerait à la vasodilatation induite par l'insuline [Scherrer *et al.*, 1994; Ragoobirsingh *et al.*, 2004].

1.7.5 Implication du NO dans l'hypertension et le diabète

Une déficience de la capacité du NO à induire une vasodilatation a été observée chez les patients souffrants d'hypertension artérielle et de DT2, avec ou sans hypertension [Panza *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1996]. Lorsque des chercheurs ont tenté de déterminer si cette déficience était attribuable à une diminution de la biodisponibilité du substrat, ils ont été confrontés au paradoxe du L-Arginine. Bien que les concentrations intracellulaires de L-Arginine soient bien au-delà de la valeur de la constante d'équilibre (K_m) pour la synthèse du NO (de l'ordre du milli- versus micro-molaires), une altération du transport du L-Arginine vers l'intérieur de la cellule limite la synthèse du NO dans certaines conditions pathologiques. Un autre paradoxe concernant le L-Arginine est que son administration, chez des patients hypertendus et dans des modèles animaux d'hypertension (DOCA-sel, fructose) [Tay *et al.*, 2002; Gokce 2004], entraîne une diminution de la pression artérielle et une amélioration des dysfonctions endothéliales, alors que les concentrations plasmatiques de L-Arginine endogène sont augmentées chez ces sujets [Perticone *et al.*, 2005]. Il semblerait en fait qu'une altération des mécanismes de transport du L-Arginine vers le milieu intracellulaire, plutôt qu'une diminution de sa disponibilité extracellulaire, explique cette défaillance de la voie du NO à induire une vasodilatation chez les sujets hypertendus [Moss *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2006]. Cela expliquerait aussi pourquoi un apport exogène supplémentaire en L-Arginine n'a démontré aucune propriété thérapeutique dans certaines formes d'hypertension, notamment chez les patients présentant une hypertension sévère ou installée de longue date [Gokce 2004], ainsi que chez le rat spontanément hypertendu [Kristek 1998] ou rendu hypertendu avec le L-NAME [Simko *et al.*, 2005].

Les concentrations plasmatiques élevées d'ADMA (section 1.7.2) observées dans la dysfonction endothéliale, l'hypertension et le diabète pourraient contribuer à la déficience de la voie du NO observée dans ces pathologies [Goonasekera *et al.*, 1997; Boger *et al.*, 1998; Abbasi *et al.*, 2001]. En fait, un déséquilibre du ratio L-Arginine : ADMA a aussi été suggéré comme étant une explication potentielle du paradoxe du L-Arginine [Bode-Boger *et al.*, 2007]. Normalement, les inhibiteurs endogènes de la NOS sont présents en faible concentration dans le plasma parce qu'ils sont rapidement hydrolysés par des diméthylarginines diméthylaminohydrolases (DDAH). Une diminution de l'activité enzymatique des DDAH a été observée dans plusieurs pathologies cardiovasculaires pouvant expliquer les niveaux élevés d'ADMA [Tran *et al.*, 2003]. Les dysfonctions endothéliales, associées à une élévation des niveaux d'ADMA circulants, apparaissent tôt dans le développement de la résistance à l'insuline. De plus, les individus insulino-résistants présentent une altération de la vasodilatation à l'insuline dans le muscle squelettique et une diminution de la prise de glucose par l'insuline. Puisque le NO est impliqué dans ces deux processus (Section 1.7.4.2), une inhibition accrue de la NOS par ADMA pourrait ainsi contribuer au développement de la résistance à l'insuline, en plus d'accélérer le développement des dysfonctions endothéliales et de l'hypertension [Sydow *et al.*, 2005].

Tel que discuté aux sections 1.4.2 et 1.7.3, une augmentation du stress oxydatif est observée dans le diabète et l'hypertension, et cette condition peut favoriser une inactivation accrue du NO par l' $O_2^{\bullet-}$. De plus, une augmentation de la production de ROS résulte en une oxydation accrue de BH_4 , un co-facteur essentiel de la NOS (section 1.7.1). La diminution de la biodisponibilité du BH_4 favorise la dissociation des dimères de la NOS, résultant ainsi en une nette diminution de la production de NO. En fait, une fois dissociée,

les sous-unités de la NOS ont plutôt tendance à produire davantage de ROS [Chalupsky *et al.*, 2005]. Donc en plus de contribuer directement au développement de la résistance à l'insuline (section 1.4.2), le stress oxydatif peut entraver le rôle protecteur du NO au niveau cardiovasculaire (section 1.7.4.1) et ainsi accélérer le développement des complications diabétiques tel que le remodelage cardiovasculaire, l'athérosclérose et l'obstruction vasculaire. Ceci explique qu'un traitement avec des antioxydants atténue le développement de l'hypertension, la résistance à l'insuline et les neuropathies diabétiques dans des modèles animaux [Maddux *et al.*, 2001; El Midaoui *et al.*, 2002a; Lungu *et al.*, 2007] et le patient diabétique [Jacob *et al.*, 1995; Kamenova 2006; Foster 2007].

Une hyperactivité sympathique est observée chez les patients atteints d'hypertension ou de diabète, et la combinaison des deux pathologies est associée à une plus grande hyperactivité [Huggett *et al.*, 2003]. Puisque le NO est connu pour son effet supprimeur sur l'activité sympathique, la déficience de la voie du NO observée dans l'hypertension et le diabète pourrait contribuer à cette hyperactivité. L'activation des récepteurs α -adrénergiques diminue la sensibilité à l'insuline et l'hyperinsulinémie augmente l'activité sympathique.

1.7.6 Inhibition/Inactivation de la NOS

La compréhension de la physiologie et de la pathologie de la voie du monoxyde d'azote a été basée largement sur des données obtenues en limitant la biosynthèse du NO par des approches pharmacologique et génétique.

1.7.6.1 *Inhibition pharmacologique avec des analogues du L-Arginine*

L'administration d'un inhibiteur non sélectif de la NOS synthase (L-NMMA, ADMA, L-NAME) induit une élévation de la pression artérielle dans les minutes suivant l'injection, tant chez l'humain que chez l'animal [Haynes *et al.*, 1993; Zatz *et al.*, 1998], suggérant ainsi que le NO joue un rôle important dans les fonctions circulatoires en maintenant un tonus vasodilatateur. De plus, l'administration chronique d'un analogue du L-Arginine cause une hypertension artérielle permanente chez les animaux, démontrant par le fait même le rôle essentiel que joue le NO dans la régulation à long terme de la pression artérielle [Zatz *et al.*, 1998]. L'inhibition de la NOS favorise ainsi l'action des systèmes vasoconstricteurs dont celui de l'endothéline-1, de l'angiotensine II et du système nerveux sympathique [Zatz *et al.*, 1998].

L'administration chronique du L-NMMA est aussi associée au développement de la résistance à l'insuline chez le rat [Baron *et al.*, 1995]. Ensuite, il a été démontré que l'administration de L-NAME chez l'humain abolit complètement l'effet de l'insuline sur la prise de glucose et la vasodilatation dans le muscle squelettique [Vincent *et al.*, 2003], suggérant ainsi fortement une implication de la voie du NO dans les effets hypoglycémisants de l'insuline.

1.7.6.2 *Inactivation génétique*

L'inactivation du gène codant pour la protéine eNOS cause le développement de l'hypertension systémique et pulmonaire chez la souris, alors que la manipulation des gènes codant pour nNOS et iNOS n'induit aucun changement au niveau circulatoire, suggérant ainsi que c'est la production du NO par eNOS qui est responsable pour les fonctions

circulatoires du NO. Des études de linkage génétique ont permis de confirmer l'association entre le polymorphisme de ce gène et l'hypertension essentielle [Shoji *et al.*, 2000]. De plus, au sein d'une sous-population de patients hypertendus, un haplotype (786C894G) a été identifié comme étant un facteur de risque pour le syndrome métabolique chez les patients hypertendus [Fernandez *et al.*, 2004]. Cette association suggère une implication du gène eNOS dans la pathologie du syndrome métabolique. Enfin, l'inactivation du gène eNOS ou nNOS prédispose la souris à développer la résistance à l'insuline [Shankar *et al.*, 2000].

1.8 Le modèle du rat traité au glucose

Un modèle de résistance à l'insuline et d'hypertension artérielle a été développé dans nos laboratoires en soumettant des rats à un traitement chronique au glucose pendant 4 à 12 semaines. Plusieurs des caractéristiques du diabète de type 2 ont été observées chez ces rats [El Midaoui *et al.*, 2002a; El Midaoui *et al.*, 2003; Dias *et al.*, 2007];

- Hyperglycémie
- Hyperinsulinémie
- Résistance à l'insuline
- Hypertension artérielle
- Augmentation du stress oxydatif dans le système cardiovasculaire
- Allodynie tactile et au froid (indice de neuropathies sensorielles)

Par contre, les lésions cardiovasculaires telles que l'hypertrophie et la fibrose, qui sont généralement associées à l'hypertension et l'athérosclérose dans des stades plus avancés de la maladie, n'ont pas été observées dans ce modèle [Pilon *et al.*, 2007].

Dans le modèle du rat traité au glucose, comme dans tout modèle expérimental de DT2, les mécanismes impliqués dans le développement des pathologies sont très complexes. Plusieurs systèmes interagissent pour contribuer au développement de la résistance à l'insuline et des complications associées.

Il a été démontré que le stress oxydatif était impliqué dans le développement de l'hypertension et la résistance à l'insuline dans ce modèle. En effet, l'administration d'acide α -lipoïque ou d'aspirine prévient ou atténue le développement de la résistance à l'insuline et de l'hypertension artérielle chez le rat traité au glucose. Dans ce modèle, l'ajout de l'une ou l'autre molécule dans la diète a pour effet de prévenir l'augmentation de la production d'anion superoxyde dans l'aorte [El Midaoui *et al.*, 2002a; El Midaoui *et al.*, 2002b].

1.9 La problématique de l'étude

1.9.1 Problématique et objectifs

À chaque 10 secondes, deux personnes développent le diabète et une personne meurt des suites des complications diabétiques dans le monde. En plus de réduire l'espérance de vie, le diabète affecte grandement la qualité de vie des personnes qui en souffrent, principalement en raison des multiples complications diabétiques qui se développent souvent malgré un contrôle adéquat de la glycémie. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement du diabète et de ses complications pourrait nous aider à développer des médicaments plus appropriés. C'est pourquoi il est impératif que la recherche dans ce domaine se poursuive afin d'atteindre l'objectif ultime qui est

celui de trouver un moyen pour guérir la maladie. Comme des considérations d'ordre éthique évidentes nous limitent dans l'expérimentation effectuée sur les sujets humains, l'utilisation de modèles animaux se révèle quasi indispensable. Il existe bel et bien quelques modèles expérimentaux du DT2, mais aucun ne représente tous les aspects de la maladie. Bien que le DT2 ait une forte composante héréditaire, celle-ci est beaucoup trop complexe et variable entre les individus pour que nous puissions développer un modèle génétique expérimental qui représente l'ensemble de la population diabétique humaine. Par contre, l'influence de l'environnement a aussi une très grande importance dans le développement de cette maladie. Ainsi le modèle du rat traité au glucose développé dans nos laboratoires reflète bien les conditions observées dans la population humaine, où le diabète se développe chez des individus prédisposés à la suite d'une surconsommation alimentaire en hydrates de carbone. Puisque les complications cardiovasculaires sont la cause principale de mortalité et de morbidité associée au diabète, l'un de nos principaux intérêts consiste à développer un modèle de DT2 qui présente ces complications. Or, le modèle du rat traité au glucose ne présente ni remodelage, ni fibrose cardiaque ou vasculaire. De plus, il faut attendre parfois jusqu'à 12 semaines pour voir apparaître clairement les caractéristiques du diabète chez le rat glucosé. Un modèle expérimental où le DT2 se développerait plus rapidement permettrait d'accélérer les travaux et de diminuer les coûts. Donc l'objectif de cette étude était de développer un modèle non génétique et accéléré de DT2 qui présente des lésions cardiovasculaires diabétiques (hypertrophie, fibrose).

1.9.2 Hypothèses

Il est suggéré que le NO protège contre le développement de l'hypertrophie pathologique en prévenant la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires; il s'oppose à

l'évolution de l'hypertension par vasodilatation et inhibition du système nerveux sympathique; il protège contre l'obstruction des vaisseaux en empêchant l'adhésion des leucocytes et des plaquettes sanguines; il prévient l'installation de l'athérosclérose grâce à ses propriétés anti-inflammatoires; il favorise la liaison de l'insuline à son récepteur et il contribue à l'effet vasodilatateur induit par l'insuline dans les tissus cibles; il réduit le stress oxydatif en piégeant les radicaux libres. Ainsi, notre hypothèse de travail était qu'une inhibition chronique de l'enzyme de synthèse (synthase) du monoxyde d'azote avec le L-NAME peut accélérer l'apparition de la résistance à l'insuline et le développement de l'hypertension chez le rat traité au glucose, permettant ainsi l'apparition de lésions cardiovasculaires associées au diabète.

CHAPITRE 2 – ARTICLE SCIENTIFIQUE

Soumis en avril 2008 à l'American Journal of Physiology

Exacerbation of hypertension and insulin resistance, but not cardiovascular remodeling, following chronic inhibition of nitric oxide in glucose-fed rats

Magalie Pilon^a, Rong Wu^a, Julie-Émilie Huot-Marchand^b, Denis deBlois^b, Jacques de Champlain^a, Réjean Couture^a.

Departments of ^aPhysiology and ^bPharmacology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3C 3J7

Running head:

Nitric oxide in a model of insulin resistance

Contact information:

Dr Réjean Couture, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7.

Telephone: 514-343-7060. Fax: 514-343-2111, E-mail : XXXXXXXXXX

ABSTRACT

The aim of this study was to determine whether the inhibition of nitric oxide synthase (NOS) with L-NAME could exacerbate hypertension, insulin resistance and the development of cardiovascular remodeling in glucose-fed rats. Sprague-Dawley rats had free access to tap water supplemented, or not (control), with 10 % D-glucose (G) and/or 50 mg/kg/day L-NAME (G-LN or LN) for 4 weeks. The following end points were measured: systolic blood pressure (SBP), insulin resistance (HOMA index), plasma catecholamines, cardiovascular remodelling and oxidative stress (superoxide anion production and NAD(P)H oxidase activity). SBP was elevated by 12%, 26% and 39% with G, LN or G-LN treatments, respectively. Hyperinsulinemia and insulin resistance occurred in G treated rats ($p < 0.05$), and were further increased in G-LN rats ($p < 0.01$). Plasma noradrenaline was increased in the G treated group only, yet adrenaline concentrations were markedly increased in all treated groups, especially in G-LN ($p < 0.01$). Whereas no cardiac hypertrophy or fibrosis was detected, aortic hypertrophy occurred in LN and G-LN rats ($p < 0.001$) without smooth muscle hyperplasia. Superoxide anion formation but not NAD(P)H oxidase activity was increased in the aorta of all treated groups ($p < 0.01$) and in the heart of LN ($p < 0.05$). Results highlight an exacerbation of hypertension and insulin resistance under chronic pharmacological blockade of NOS in glucose-fed rats. This was associated with vascular but not cardiac hypertrophy. The loss of the wide range protective effects of NO, the increased vascular oxidative stress and the sympatho-adrenal hyperactivity are among the contributing factors of these cardiovascular and metabolic complications.

Key Words: adrenaline, diabetes mellitus, nitric oxide synthase, oxidative stress

INTRODUCTION

The nitric oxide (NO) pathway plays an important role in a wide variety of regulatory mechanisms and pathological conditions. NO derives from the oxidization of L-arginine into L-citrulline under the enzymatic action of NO synthase (NOS) which occurs on three isoforms (endothelial, neuronal and inducible). This gas is physiologically important for cardiovascular homeostasis. It maintains the vasculature dilated (42, 51) and prevents smooth muscle cell proliferation (33), angiotensin-induced endothelial cell apoptosis (18), platelet aggregation (2) and leucocytes adhesion (49). Hence, impairment of the NO pathway leads to the development of hypertension, endothelial dysfunction, vascular hypertrophy, atherosclerosis, thrombosis and ischaemia (6, 51, 63, 88). NO bioavailability is affected by the expression of functional NOS, the rate of NO synthesis (influenced by endogenous inhibitors and substrates/cofactors availabilities), and by the scavenging of NO with superoxide anion (70).

In addition to its vast implication in cardiovascular physiology, NO plays an important role in modulating insulin sensitivity by increasing glucose uptake and supply in skeletal muscle and by facilitating the binding of insulin to its receptor and its subsequent vasodilatory effect (26, 66, 76). Recently, a case-control study made an associations between hyperinsulinemia and eNOS polymorphism in subjects with in-stent stenosis (31). Accordingly, blocking NO synthesis by genetic knock out of the e/nNOS gene or with chemical inhibitors leads to the development of insulin resistance in the rat (4, 77, 85). Unimpaired generation of NO is crucial for maintenance of vascular tone particularly under condition of vascular insults exemplified by insulin resistance, obesity and dyslipidemia as

detected in cp/cp (56), fructose-fed (78), obese Zucker rats (46) and high-fat diet-fed mice (8).

Asymmetric dimethylarginine (ADMA), an analogue of L-arginine produced endogenously, acts as a competitive inhibitor of all isoforms of NO synthase (83). Elevated plasma concentrations of ADMA are observed in patients and various animal models with endothelial dysfunction, hypertension and diabetes mellitus that is believed to contribute to the NO pathway impairment in those conditions (1, 5, 8, 37). Therefore, L-arginine supplementation or treatment with NO donors in type 2 diabetic patients or animal models restored impaired insulin-mediated vasodilatation and glucose uptake, and hypertension (36, 39, 54, 82, 87).

The North American diet enriched with carbohydrates and lipids leads to increased oxidative stress, hyperinsulinemia and insulin resistance. The latter represents an important risk factor for the development of type 2 diabetes and cardiovascular diseases (12). Thus nutritional rat models of diabetes may be representative of this situation. A rat model of insulin resistance and hypertension was developed in our laboratory by adding 10% glucose in the drinking water for 4 to 12 weeks (19-24). The induction and overexpression of the pro-inflammatory kinin B1 receptor in various peripheral and central tissues also evidenced an inflammatory process in glucose-fed rats (17, 53). Whereas cardiovascular complications are the leading cause of mortality and morbidity associated with diabetes (32), heart hypertrophy/fibrosis and vascular remodeling were not detected in this animal model (65). This study was undertaken to determine whether the inhibition of NO synthase with NG-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) could exacerbate hypertension and

insulin resistance, leading to the development of cardiomyopathy and vascular remodelling, in glucose-fed rats.

METHODS

Animals and experimental protocols

This study was approved by the Deontological Committee on Animal Experimentation of our university and performed according to guidelines of the Canadian Council for Animal Care. Male Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories, St-Constant, Qc, Canada) weighing 250–300 g were housed two per cage under controlled conditions of temperature (23°C) and humidity (50%), on a 12 h light–dark cycle during four weeks. The animals were allowed free access to normal chow diet (Charles River Rodent no. 5075) and drinking water supplemented, or not (control rats), with 10% D-glucose and/or 50 mg/kg L-NAME per day (both glucose and L-NAME were purchased from Sigma-Aldrich Canada, Oakville, Ont, Canada). Rats were randomly divided into four groups of 8 rats: group 1 (control), group 2 (glucose), group 3 (L-NAME), group 4 (glucose + L-NAME). Body weight, food/water intake and systolic blood pressure (SBP) were measured weekly. SBP was measured in conscious rats by tail-cuff photoplethysmography (Harvard Apparatus Ltd, South Natick, Ma, USA) and it was registered on a MacLab/8 system (AD Instruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Six or seven blood pressure readings were obtained for each rat and averaged. The energy intake was calculated based on daily food and fluid intake and the caloric values of normal chow diet (4.1 Kcal/g) and glucose (4 Kcal/g). The day before sacrifice, rats were anesthetized with isoflurane (CDMV, St-Hyacinthe, Qc, Canada) and a catheter containing heparin (100 IU/ml) was implanted into the abdominal aorta through the left femoral artery, to allow blood

sampling (for plasma catecholamine assessment) from unrestrained and awaked rats (44, 45). Rats recovered from the surgery for at least 24 h in individual plastic cages. At the end of the 4-week protocol, rats were decapitated under light anesthesia with CO₂ after overnight fasting. Blood was collected and plasma kept frozen at - 80°C for the subsequent measurement of glucose and insulin. The thoracic aorta and the heart were rapidly excised, placed in oxygenated Krebs solution for cleaning and removal of connective tissue. A segment of aorta, taken between the 3rd and the 4th intercostal arteries, and a 4 mm equatorial section of the left ventricle were fixed in 4% phosphate-buffered paraformaldehyde for histological studies. The rest of the tissues was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use for superoxide anion measurement.

Measurement of plasma glucose and insulin and insulin resistance

Fasting plasma glucose level, which is recommended by the World Health Organization for the screening and diagnosis of diabetes (27, 34), was determined with a glucometer (Elite; Bayer Inc.). Fasting insulin concentrations were measured by radioimmunoassay (Rat insulin RIA kit; Linco Research, St Charles, Missouri, USA). The Homeostasis Model Assessment was calculated (insulin (μU/ml) × glucose (mM)/22.5) to estimate the degree of insulin resistance (55, 86).

Aortic hypertrophy assessment and determination of aortic smooth muscle cell number

Fixed aortas were embedded in paraffin blocks. Aortic cross sectional area and smooth muscle cell number were evaluated in 3μm thick sections of aorta, stained

with haematoxylin and eosin. The tri-dimensional disector method was used to evaluate number of smooth muscle cells (SMC) per unit vessel length, using the adapted method of Mulvany et al (57) as described previously by us (15). Briefly, three consecutive slices of aorta of 3 μ m thick were taken and photograph at 400X magnification and analyzed as described previously. Digital image analysis was performed using National Institute of Health Image 1.32 (public domain software available at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>).

Fibrosis evaluation

Fibrosis in the left ventricle was evaluated by an histomorphometry method on 5 μ m thick sections stained with Gomori One Step Trichrome (Sigma). In total, 9 pictures at 10X magnification were taken per heart and the fibrosis was evaluated by Quantitative analysis of the pictures using the Adobe PhotoShop 5.5 software, which allows counting of the pixels stained specifically (blue for collagen fibers, red for cardiac muscle cells and black for nucleus).

Superoxide anion measurement

The reduction of lucigenin in the presence of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) results in the production of dioxetane, which is unstable and decomposes spontaneously into acridone with concomitant light emission (28). Thus it is possible to estimate quantitatively $O_2^{\bullet-}$ production by measuring this light emission. In this study, $O_2^{\bullet-}$ production was measured in isolated thoracic aortic rings and pieces of heart tissue using the lucigenin-enhanced chemiluminescence method as described previously (58, 62), but adapted with low concentration of lucigenin (91) to prevent the

generation of $O_2^{\bullet-}$ by reduced lucigenin (81). Briefly, after 3 minutes equilibration in Krebs-HEPES buffer (saturated with 95% O_2 and 5% CO_2) at room temperature, small aortic rings or pieces of heart tissue (2–5 mg wet weight) were transferred into a glass scintillation vial containing 5 μ M lucigenin (Sigma-Aldrich Canada) and the luminescence produced by the lucigenin- $O_2^{\bullet-}$ interaction was measured with a Liquid Scintillation Counter (Wallac 1409; Perkin Elmer Life Science, St-Laurent, Qc, Canada). The average luminescence value was estimated, the background value (from vessel-free incubation media) was subtracted and the result was divided by the weight of each sample.

One clearly established source of $O_2^{\bullet-}$ is the family of NAD(P)H oxidases which catalyze the reduction of oxygen by transferring a single electron from either NADH or NADPH. Whereas NADH or NADPH can both act as NAD(P)H oxidase substrates, unspecific light emission (without the participation of $O_2^{\bullet-}$) is less likely to occur with NADPH than with NADH at the concentration of lucigenin used (43). Therefore in the present study, the estimation of NAD(P)H oxidase activity in the samples was assessed by adding NADPH 10–4 M (Sigma-Aldrich Canada) in the vials before counting for another 6 minutes. Basal superoxide induced luminescence was then subtracted from the luminescence value induced by NADPH.

Plasma catecholamine measurement

Aortic blood samples (0.4 ml) were collected from the aortic catheter in unrestrained and awaked rats and conserved on ice-chilled tubes containing a preservative solution (0.25 M EGTA and 0.2 M reduced glutathione, pH 7). The

samples were rapidly centrifuged at 14 000 x g for 5 min at 4°C. The plasma was frozen at -80°C until the assay. Plasma noradrenaline and adrenaline concentrations were measured by radio-enzymatic assay as described previously (44, 45, 64).

Statistical analysis and Correlations studies

Data are expressed as means \pm standard error of the mean of (n) values in each group. Multiple comparisons were analyzed using Pearson correlation and analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni or the Dunnett post-test using the program GraphPad Prism (version 4.00, GraphPad Software Inc.). A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on various parameters

Table 1 shows the data obtained on various parameters in rats treated for a period of 4 weeks with glucose and/or L-NAME. Rats treated with 10 % glucose (G) with or without L-NAME (LN) doubled their daily water intake in comparison with control rats. Food intake was reduced in these two groups by 39% and 30%, respectively. Consequently, the total energy intake remained unaffected by either treatment. Glucose intake accounted for 44% and 37% of total caloric intake in G and G-LN, respectively, while simple sugars accounted for 5,5% of the normal chow diet.

No significant variations were observed in the body weight, heart weight or the heart weight to body weight ratio in the four groups (Table 1). Treatment with L-NAME alone had no significant effect on any measured parameters when compared with control. Also, there was no evidence of cardiac fibrosis in the different groups.

Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on plasma levels of glucose and insulin, and insulin resistance

Effects of 4-week treatment with glucose and L-NAME, alone or combined, on fasting plasma glucose and insulin levels, are shown in Figure 1. Glycemia was significantly increased only in glucose-fed rats receiving L-NAME when compared with control. Plasma insulin levels were significantly elevated in glucose-treated rats and further increased in rats receiving both glucose and L-NAME. Consequently, insulin resistance (HOMA index) was increased by 234% in glucose-treated rats and by 511% in glucose-fed rats receiving L-

NAME. Treatment with L-NAME alone had no significant effect on plasma insulin levels or insulin resistance.

Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on systolic blood pressure

A 4-week treatment with glucose resulted in a progressive and significant elevation in systolic blood pressure (Fig. 2). L-NAME treated rats showed a similar increase of blood pressure within the first 3 weeks, but a greater increase was measured on the fourth week. The combination of the two treatments had an additive effect on the intensity of the blood pressure increase during the entire 4-week treatment. Only the group treated with glucose and L-NAME was hypertensive after one week of treatment.

Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on plasma catecholamines

Plasma catecholamine levels are presented in Figure 3. Glucose treatment increased by 105% plasma noradrenaline levels, yet the other treatments had no significant effect. In contrast, significant increases in plasma adrenaline levels occurred in all treated groups, especially in the group treated with glucose and L-NAME.

Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on aortic hypertrophy and smooth muscle cell number

As shown in Figure 4, medial cross-sectional area of the aorta was increased significantly by 16% in both L-NAME and glucose plus L-NAME groups, indicating aortic hypertrophy in these groups. This vascular alteration in L-NAME treated animals was not associated with aortic SMC hyperplasia (Fig. 4).

Effects of orally administered glucose and/or L-NAME on superoxide anion production

The effects of 4-week treatment with glucose and L-NAME, alone or combined, on basal and NADPH stimulated $O_2^{\bullet-}$ production in the aorta are shown in Figure 5. Glucose feeding, with or without L-NAME supplementation, resulted in an increase of 31% and 35% of basal $O_2^{\bullet-}$ production in the aorta. When administered alone, L-NAME caused a greater increase (57%) of $O_2^{\bullet-}$ production in the aorta. The activation of NAD(P)H oxidase, as assessed by the production of $O_2^{\bullet-}$ induced by NADPH after subtracting basal $O_2^{\bullet-}$ production, revealed no significant changes among the four groups (Fig. 5a). In the heart, basal $O_2^{\bullet-}$ production was significantly augmented in the L-NAME group, but no changes were measured in NAD(P)H oxidase activity in any groups (Fig. 5b).

Correlation between systolic blood pressure and cross-sectional area of the aorta, superoxide anion production and plasma adrenaline levels

Figure 6 shows highly significant correlation between systolic blood pressure and medial cross-sectional area of the aorta ($r = 0.64$, $P < 0.0002$), basal superoxide anion production ($r = 0.60$, $P < 0.0004$), and adrenaline levels ($r = 0.69$, $P < 0.0001$) when all groups were taken into account.

DISCUSSION

The present findings strongly suggest that NO plays a protective role in the progression of glucose-induced hypertension and insulin resistance. In glucose-fed rats, the inhibition of NO synthase with L-NAME significantly enhanced the degree of insulin resistance and accelerated the development of hypertension. Increased vascular superoxide anion production and sympatho-adrenal activity might have contributed to L-NAME additive effect on glucose-induced hypertension. Vascular remodelling, but not cardiac hypertrophy and fibrosis, was detected in L-NAME treated rats.

Total energy balance and body weight

As previously described (19), glucose supplementation in the drinking water induced polydipsia, a common symptom in diabetes. Glucose feeding was compensated by a reduction of food intake that maintained stable total caloric intake and body weight. Inhibition of NOS did not interfere with the caloric intake and body weight. The lack of significant changes of body weight in rats exposed to high carbohydrate diet or L-NAME treatment was previously reported (19, 29, 44). Furthermore, it was previously observed that food intake decreased and water intake increased when fructose was given in the drinking water (74).

Glycemia, insulinemia, insulin resistance and blood pressure

NO accounts for insulin-induced vasodilatation and muscle glucose uptake (76). Thus, inhibition of NOS impairs insulin-mediated increases in blood flow and partially blunts glucose uptake in response to insulin in the rat (85). Most importantly, eNOS and nNOS

knock out mice exhibit insulin resistance, thereby confirming that NO plays an important role in modulating insulin sensitivity (77). However, neither hyperinsulinemia nor insulin resistance was observed in L-NAME rats. This might be due to the dosage and duration of the treatment with L-NAME as other reports showed either increases (4, 25) or no change (73, 80). The development of hyperinsulinemia and insulin resistance following high carbohydrate feeding (glucose, fructose, and sucrose) has been extensively studied by us and others (20, 41, 90). Contrary to previous studies which reported slight increases of plasma glucose in glucose-fed rats (20, 24), the rise did not reach significance in the present study. One possible explanation is that high plasma insulin levels prevented hyperglycemia to occur in these rats, and this situation is translated by an increased HOMA index. This suggests that glucose-fed rats are representative of the pre-diabetes state which is mainly characterized by insulin resistance and not by hyperglycemia, the index used to diagnose type 2 diabetes. However, the addition of L-NAME to glucose feeding increased fasting plasma glucose level to 7.6 mM, which is higher than the standard value of 7 mM used to diagnose diabetes in humans (34, 89). Because the inhibition of NOS in glucose-fed rats led to a higher insulin resistance that prevents the normalization of hyperglycemia in face of high insulin levels, this condition may represent a suitable model for studying type 2 diabetes.

In healthy human and other species, chronic or acute NO synthase inhibition causes significant increases in blood pressure, indicating the need of having a functional NO pathway to prevent hypertension from developing (38, 69). In fact, endothelial NO plays a primary role in dilatation of vascular smooth muscle cells and its inhibition has direct impact on the vascular tone (51). In previous studies, we reported that hypertension was induced in rats treated either with glucose or L-NAME (20, 24, 44). Exacerbation of

hypertension induced by the inhibition of NOS in glucose-fed rats is in agreement with earlier studies in rats receiving an intravenous infusion of combined glucose and L-NAME for a period of 20 days (10, 11). Since β -adrenergic receptor blockade partially prevented L-NAME-induced exacerbation of hypertension, the authors concluded that NO opposes glucose-induced hypertension by suppressing sympathetic activity. This hypothesis is supported by the observation of enhanced adrenaline levels under treatment with L-NAME.

Sympathetic nervous system activity

Previous studies have suggested that dietary supplementation with fructose, sucrose or fat stimulates sympathetic nervous system activity (47, 94). Moreover, sympathetic activity is needed for the development of hyperinsulinemia and hypertension in rats submitted to high fructose diet (84). Although increased noradrenaline excretion in the urine was previously reported in rats fed a high glucose diet (29, 47), the present study highlights an elevation of both adrenaline and noradrenaline levels in the plasma of rats receiving high glucose intake. Therefore an association between sympathetic hyperactivity and glucose-induced hypertension can be supported by the present study. It was previously shown that the inhibition of sympathetic peripheral fibers with guanethidine (75) and ganglionic nicotinic receptors with trimethaphan (13) greatly attenuated L-NAME-induced hypertension, indicating that the sympathetic nervous system plays a primary role in this model of hypertension. The contribution of the adrenal gland to L-NAME-induced hypertension was also demonstrated by increased circulating levels of adrenaline, but not noradrenaline (44). This adrenal-medullary hyperactivity was confirmed in the present study since L-NAME treated rats, with and without glucose supplementation, showed higher plasma adrenaline levels than controls rats ($C < G < LN < G-LN$). Whereas the study of Navarro et al.

reported an elevation of noradrenaline levels in L-NAME rats (60), our data are in agreement with those of K-Laflamme et al. (44) which showed no change in plasma noradrenaline. Major differences in protocols could explain the discrepancy between results: 1- In Navarro et al. experiment, increasing concentration of L-NAME, from 5 to 30 mg/100ml of drinking water, were given to rats during 5 weeks while a fixed concentration of 50 mg/kg/day of L-NAME was given during 4 weeks in our study and that of K-Laflamme et al (44). 2- We collected blood from unrestrained and awaked rats with a catheter to avoid stress-induced modulation of the sympathetic nervous activity. The method used to collect blood was not described in the study of Navarro et al. (60).

Our observation that plasma adrenaline levels were significantly higher in G-LN compared with G, supports the hypothesis that NO attenuates the over activation of the sympathetic nervous system by glucose. It may thus be postulated that the greater increase of blood pressure under chronic inhibition of the NO synthase with L-NAME involves a contribution of a sympatho-adrenal activity. This is supported by the observation of a highly positive correlation between systolic blood pressure and plasma adrenaline. Our results are in agreement with the clinical observation whereby a sympathetic hyperactivity was observed in a subpopulation of patients with essential hypertension or diabetes, and this phenomenon was even greatest when hypertension and diabetes were combined in the same patient (40).

Heart remodeling

Diabetic cardiomyopathy, characterized by myocardial hypertrophy and fibrosis, contributes significantly to cardiovascular morbidity and mortality in diabetic patients, particularly in those with coexistent hypertension (79). Recent epidemiological studies have

suggested impaired glucose tolerance as a possible contributor to the development of left ventricular hypertrophy (30, 52). While the hypertensive model induced by L-NAME is generally devoid of cardiac hypertrophy (3, 50), left ventricular hypertrophy has been demonstrated in the fructose model of hypertension (48). Furthermore, glucose-fed rats treated with L-NAME presented left ventricular hypertrophy when measured by echocardiography in our laboratory (93). However, with the heart weight to body weight ratio used in this study as an index of cardiac hypertrophy, no changes were observed in any groups. One explanation could be that the technique used here might not be sensitive enough to detect small early increase in left ventricular size. In fact, when animal were treated with glucose plus L-NAME for a period of six weeks, an increase in left ventricular to body weight ratio has been observed (Pilon et al., unpublished observations). One limitation of our 4-week experimental model of diabetes and hypertension is the absence of cardiac fibrosis.

Vascular remodeling

Structural and functional alterations of the large arteries occurs in hypertensive subjects and are responsible, eventually, for an additional increase in systolic blood pressure (71). The hypertrophic remodeling typically observed in hypertensive vessels is characterized by a thickened media and a reduced lumen (35). The administration of L-NAME in WKY has been shown to increase aortic hypertrophy (16) as documented in the present study in both L-NAME treated groups. As additional information, we showed here that this phenomenon is unlikely associated with hyperplasia as aortic SMC number remained unchanged after L-NAME treatment. A positive correlation between high blood pressure and aortic hypertrophy was shown. Since vascular remodeling was not detected in hypertensive

glucose-fed rats, it is postulated that NO deficiency is a greater contributor than elevated arterial pressure to the development of aortic hypertrophy in L-NAME treated rats. This hypothesis is supported by the finding that L-NAME-induced microvascular remodeling is not counteracted by the normalization of blood pressure with hydralazine (61)..

Oxidative stress

Through their antioxidative properties, α -lipoic acid and acetylsalicylic prevented or attenuated hypertension, insulin resistance, sensory polyneuropathy, hyperglycemia, hyperinsulinemia and cardiovascular oxidative stress (20, 53)(91). The hypothesis that oxidative stress, mostly through $O_2^{\bullet-}$ production, is a key pathogenic factor in the development and evolution of hypertension and insulin resistance in human and experimental models was previously postulated (9, 14, 68). By reacting with $O_2^{\bullet-}$, NO bioavailability decreases while peroxynitrite production increases, both contributing directly to high blood pressure by altering vascular function and integrity. Indeed, the positive correlation already reported between vascular oxidative stress and systolic blood pressure in glucose-fed rats (20) was confirmed in the present study under inhibition of NO production. Intriguingly, L-NAME treatment alone caused a higher elevation in aortic $O_2^{\bullet-}$ production when compared to glucose alone or combined with L-NAME. Also, in cardiac tissue, only L-NAME displayed a significant increased in oxidative stress. One explanation for these unexpected findings is that the improvement of the antioxidant defence under glucose treatment, as documented by increases of superoxide dismutase (24), may buffer the effect of L-NAME on oxidative stress.

NAD(P)H oxidase is considered as the major source of superoxide anion in cardiovascular tissue and its activity was shown to be up-regulated, concomitantly to enhanced superoxide

anion production, in several hypertensive animal models such as DOCA-salt, SHR, and angiotensin-induced hypertension (67, 92). However, in glucose-induced hypertension associated with insulin resistance, superoxide anion overproduction appeared to be mediated by mitochondrial activity rather than NAD(P)H oxidase (21). This may afford a reasonable explanation for the lack of aortic or cardiac alterations of NAD(P)H oxidase activity in our study. Alternatively, increased aldose reductase activity, as observed in hyperglycemic environment, could explain the increased oxidative stress without an implication of NAD(P)H oxidase. Aldose reductase catalyses the reduction of glucose into sorbitol by NADPH, thereby decreasing the availability of NADPH to collaborate with glutathione reductase to regenerate reduced glutathione, an important intracellular antioxidant (7). Indeed, decreased glutathione reductase activity was previously reported in fructose-fed rats (59) and diabetic patients (72). Moreover, enhanced level of advanced glycation end-products, previously observed in glucose-fed rat (21) could also have contributed to the oxidative stress in the present study.

Conclusion

In glucose-fed rats, the inhibition of NOS with L-NAME significantly enhanced glycemia, the degree of insulin resistance and accelerated the development of hypertension, providing a suitable experimental model for studying type 2 diabetes. NO was found to oppose glucose-induced hypertension by suppressing sympatho-adrenal activity. Conversely, glucose feeding blunted the potentiating effect of L-NAME on cardiovascular superoxide anion production. Although a positive correlation was evidenced between systolic blood pressure and hypertrophy, it appears that NO is a greater contributor than high blood pressure to promote vascular hypertrophy through a mechanism which is likely independent

on smooth muscle cells proliferation. This was nevertheless insufficient to cause cardiac hypertrophy and fibrosis at this early stage of the disease.

ACKNOWLEDGMENT AND GRANTS

This work was supported by Grants and Studentships from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Canadian Diabetes Association, the “Société Québécoise d’Hypertension Artérielle” (SQHA) and the “Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament” (GRUM) of Université de Montréal. The expert technical assistance of Mrs Diane Papin and Johanne Le Guerrier are gratefully acknowledged.

REFERENCES

1. **Abbasi F, Asagmi T, Cooke J, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven G, Stühlinger M, and Tsao P.** Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in type 2 diabetes mellitus. *Am J cardiol* 88: 1201-1203, 2001.
2. **Alheid U, Frolich JC, and Forstermann U.** Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 47: 561-571, 1987.
3. **Arnal JF, el Amrani AI, Chatellier G, Menard J, and Michel JB.** Cardiac weight in hypertension induced by nitric oxide synthase blockade. *Hypertension* 22: 380-387, 1993.
4. **Baron AD, Zhu JS, Marshall S, Irsula O, Brechtel G, and Keech C.** Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol* 269: E709-715, 1995.
5. **Boger R, Bode-Boger S, Szuba A, Tsao P, Chan J, Tangphao O, Blaschke T, and Cooke J.** Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 1842-1847, 1998.
6. **Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Junker W, Alexander K, and Frolich JC.** Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 95: 2068-2074, 1997.
7. **Brownlee M.** The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625, 2005.

8. **Cabou C, Cani PD, Campistron G, Knauf C, Mathieu C, Sartori C, Amar J, Scherrer U, and Burcelin R.** Central insulin regulates heart rate and arterial blood flow: an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism altered during diabetes. *Diabetes* 56: 2872-2877, 2007.
9. **Ceriello A.** Possible role of oxidative stress in the pathogenesis of hypertension. *Diabetes Care* 31 Suppl 2: S181-184, 2008.
10. **Claxton CR, and Brands MW.** Nitric oxide opposes glucose-induced hypertension by suppressing sympathetic activity. *Hypertension* 41: 274-278, 2003.
11. **Claxton CR, Brands MW, Fitzgerald SM, and Cameron JA.** Inhibition of nitric oxide synthesis potentiates hypertension during chronic glucose infusion in rats. *Hypertension* 35: 451-456, 2000.
12. **Coutinho M, Gerstein HC, Wang Y, and Yusuf S.** The relationship between glucose and incident cardiovascular events. A metaregression analysis of published data from 20 studies of 95,783 individuals followed for 12.4 years. *Diabetes Care* 22: 233-240, 1999.
13. **Cunha RS, Cabral AM, and Vasquez EC.** Evidence that the autonomic nervous system plays a major role in the L-NAME-induced hypertension in conscious rats. *Am J Hypertens* 6: 806-809, 1993.
14. **de Champlain J, Wu R, Girouard H, Karas M, A ELM, Laplante MA, and Wu L.** Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 26: 593-601, 2004.

15. **deBlois D, Tea BS, Than VD, Tremblay J, and Hamet P.** Smooth muscle apoptosis during vascular regression in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 29: 340-349, 1997.
16. **Devlin AM, Brosnan MJ, Graham D, Morton JJ, McPhaden AR, McIntyre M, Hamilton CA, Reid JL, and Dominiczak AF.** Vascular smooth muscle cell polyploidy and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo. *Am J Physiol* 274: H52-59, 1998.
17. **Dias JP, Ismael MA, Pilon M, de Champlain J, Ferrari B, Carayon P, and Couture R.** 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, 2007.
18. **Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, and Zeiher AM.** Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81: 970-976, 1997.
19. **El Midaoui A, and 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* 23: 581-588, 2005.
20. **El Midaoui A, and de Champlain J.** Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 39: 303-307, 2002.
21. **El Midaoui A, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, and de Champlain J.** Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 16: 173-179, 2003.

22. **El Midaoui A, Ongali B, Petcu M, Rodi D, de Champlain J, Neugebauer W, and Couture R.** Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* 26: 1323-1330, 2005.
23. **El Midaoui A, Wu L, Wang R, and de Champlain J.** 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, 2006.
24. **El Midaoui A, Wu R, and de Champlain J.** Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens* 20: 1407-1412, 2002.
25. **Erlich Y, and Rosenthal T.** Chronic hypertension leads to hyperinsulinemia in Sprague-Dawley rats treated with nitric oxide synthase inhibitor. *Am J Hypertens* 11 (9) 1129-1133, 1998.
26. **Etgen GJ, Jr., Fryburg DA, and Gibbs EM.** Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes* 46: 1915-1919, 1997.
27. **Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1: S5-20, 2003.
28. **Faulkner K, and Fridovich I.** Luminol and lucigenin as detectors for O₂. Free radical biology & medicine 15: 447-451, 1993.

29. **Fournier RD, Chiueh CC, Kopin IJ, Knapka JJ, DiPette D, and Preuss HG.** Refined carbohydrate increases blood pressure and catecholamine excretion in SHR and WKY. *Am J Physiol* 250: E381-385, 1986.
30. **Fujita M, Asanuma H, Kim J, Liao Y, Hirata A, Tsukamoto O, Minamino T, Hori M, Goto M, Node K, and Kitakaze M.** Impaired glucose tolerance: a possible contributor to left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction. *Int J Cardiol* 118: 76-80, 2007.
31. **Galluccio E, Piatti P, Citterio L, Lucotti P, Setola E, Cassina L, Oldani M, Zavaroni I, Bosi E, Colombo A, Alfieri O, Casari G, Reaven GM, and Monti LD.** Hyperinsulinemia and Impaired Leptin:Adiponectin Ratio Associate with Endothelial Nitric Oxide Synthase Polymorphisms in Patients with in-Stent Restenosis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008.
32. **Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, and Kannel WB.** Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23: 105-111, 1974.
33. **Garg UC, and Hassid A.** Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83: 1774-1777, 1989.
34. **Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, Defronzo R, Kahn R, Kitzmiller J, Knowler WC, Lebovitz H, Lernmark A, Nathan D, Palmer J, Rizza R, Saudek C, Shaw J, Steffes M, Stern M, Tuomilehto J, and Zimmet P.** Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26: 3160-3167, 2003.

35. **Gibbons GH, and Dzau VJ.** The emerging concept of vascular remodeling. *The New England journal of medicine* 330: 1431-1438, 1994.
36. **Gokce N.** L-arginine and hypertension. *The Journal of nutrition* 134: 2807S-2811S; discussion 2818S-2819S, 2004.
37. **Goonasekera C, Rees D, Woolard P, Friend A, Shah V, and Dillon M.** Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens* 15: 901-909, 1997.
38. **Haynes WG, Noon JP, Walker BR, and Webb DJ.** Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens* 11: 1375-1380, 1993.
39. **Henstridge DC, Kingwell BA, Formosa MF, Drew BG, McConell GK, and Duffy SJ.** Effects of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside, on resting leg glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 48: 2602-2608, 2005.
40. **Huggett RJ, Scott EM, Gilbey SG, Stoker JB, Mackintosh AF, and Mary DA.** Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanisms in hypertension. *Circulation* 108: 3097-3101, 2003.
41. **Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, and Reaven GM.** Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512-516, 1987.
42. **Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, and Chaudhuri G.** Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269, 1987.

43. **Janiszewski M, Souza HP, Liu X, Pedro MA, Zweier JL, and Laurindo FR.** Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts. *Free radical biology & medicine* 32: 446-453, 2002.
44. **K.-Laflamme A, Foucart S, Moreau P, Lambert C, Cardinal R, and de Champlain J.** Sympathetic functions in NG-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 16: 63-76, 1998.
45. **K.-Laflamme A, Oster L, Cardinal R, and de Champlain J.** Effects of renin-angiotensin blockade on sympathetic reactivity and beta-adrenergic pathway in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 30: 278-287, 1997.
46. **Karagiannis J, Reid JJ, Darby I, Roche P, Rand MJ, and Li CG.** Impaired nitric oxide function in the basilar artery of the obese Zucker rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 42: 497-505, 2003.
47. **Kaufman LN, Peterson MM, and Smith SM.** Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am J Physiol* 260: E95-100, 1991.
48. **Kobayashi R, Nagano M, Nakamura F, Higaki J, Fujioka Y, Ikegami H, Mikami H, Kawaguchi N, Onishi S, and Ogihara T.** Role of angiotensin II in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Hypertension* 21: 1051-1055, 1993.
49. **Kubes P, Suzuki M, and Granger DN.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651-4655, 1991.

50. **Lantelme P, Lo M, and Sassard J.** Decreased cardiac baroreflex sensitivity is not due to cardiac hypertrophy in NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *J Hypertens* 12: 791-795, 1994.
51. **Lesniewski LA, Donato AJ, Behnke BJ, Woodman CR, Laughlin MH, Ray CA, and Delp MD.** Decreased NO signaling leads to enhanced vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle arterioles of the ZDF rat prior to overt diabetes and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H1840-1850, 2008.
52. **Lin TH, Chiu HC, Su HM, Voon WC, Liu HW, Lai WT, and Sheu SH.** Association between fasting plasma glucose and left ventricular mass and left ventricular hypertrophy over 4 years in a healthy population aged 60 and older. *J Am Geriatr Soc* 55: 717-724, 2007.
53. **Lungu C, Dias JP, Franca CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, and Couture R.** Involvement of kinin B(1) receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41: 375-387, 2007.
54. **Martina V, Masha A, Gigliardi VR, Brocato L, Manzato E, Berchio A, Massarenti P, Settanni F, Della Casa L, Bergamini S, and Iannone A.** Long Term N-Acetylcysteine and L-Arginine Administration Reduces Endothelial Activation and Systolic Blood Pressure in Hypertensive Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2008.

55. **Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, and Turner RC.** Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 28: 412-419, 1985.
56. **McKendrick JD, Salas E, Dube GP, Murat J, Russell JC, and Radomski MW.** Inhibition of nitric oxide generation unmasks vascular dysfunction in insulin-resistant, obese JCR:LA-cp rats. *Br J Pharmacol* 124: 361-369, 1998.
57. **Mulvany MJ, Baandrup U, and Gundersen HJ.** Evidence for hyperplasia in mesenteric resistance vessels of spontaneously hypertensive rats using a three-dimensional disector. *Circ Res* 57: 794-800, 1985.
58. **Munzel T, Sayegh H, Freeman BA, Tarpey MM, and Harrison DG.** Evidence for enhanced vascular superoxide anion production in nitrate tolerance. A novel mechanism underlying tolerance and cross-tolerance. *J Clin Invest* 95: 187-194, 1995.
59. **Nandhini AT, Thirunavukkarasu V, Ravichandran MK, and Anuradha CV.** Effect of taurine on biomarkers of oxidative stress in tissues of fructose-fed insulin-resistant rats. *Singapore medical journal* 46: 82-87, 2005.
60. **Navarro J, Sanchez A, Saiz J, Ruilope LM, Garcia-Estan J, Romero JC, Moncada S, and Lahera V.** Hormonal, renal, and metabolic alterations during hypertension induced by chronic inhibition of NO in rats. *Am J Physiol* 267: R1516-1521, 1994.
61. **Numaguchi K, Egashira K, Takemoto M, Kadokami T, Shimokawa H, Sueishi K, and Takeshita A.** Chronic inhibition of nitric oxide synthesis causes coronary microvascular remodeling in rats. *Hypertension* 26: 957-962, 1995.

62. **Ohara Y, Peterson TE, and Harrison DG.** Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: 2546-2551, 1993.
63. **Panza JA, Casino PR, Kilcoyne CM, and Quyyumi AA.** Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87: 1468-1474, 1993.
64. **Peuler JD, and Johnson GA.** Simultaneous single isotope radioenzymatic assay of plasma norepinephrine, epinephrine and dopamine. *Life Sci* 21: 625-636, 1977.
65. **Pilon M, Wu R, Huot-Marchand J-É, deBlois D, de Champlain J, and Couture R.** Acceleration of glucose-induced type II diabetes by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in the rat (Abstract). *Journal of hypertension* 25 (suppl 2): S280, 2007.
66. **Ragoobirsingh D, McGrowder D, Dasgupta T, and Brown P.** The effect of nitric oxide on glucose metabolism. *Molecular and cellular biochemistry* 263: 29-34, 2004.
67. **Rajagopalan S, Kurz S, Munzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, and Harrison DG.** 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, 1996.
68. **Ramakrishna V, and Jaiikhani R.** Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients. *Acta diabetologica* 45: 41-46, 2008.
69. **Ribeiro M, Antunes E, de Nucc iG, Lovisolo S, and Zatz R.** Chronic inhibition of nitric oxide synthesis. A new model of arterial hypertension. *Hypertension* 20 (3): 298-303, 1992.

70. **Rubio AR, and Morales-Segura MA.** Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Archives of medical research* 35: 1-11, 2004.
71. **Safar ME, and Laurent S.** Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 15: 1033-1045, 1993.
72. **Sailaja YR, Baskar R, and Saralakumari D.** The antioxidant status during maturation of reticulocytes to erythrocytes in type 2 diabetics. *Free radical biology & medicine* 35: 133-139, 2003.
73. **Sakuma I, Togashi H, Yoshioka M, Saito H, Yanagida M, Tamura M, Kobayashi T, Yasuda H, Gross SS, and Levi R.** NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetic nerve activity in vivo. A role for nitric oxide in the central regulation of sympathetic tone? *Circ Res* 70: 607-611, 1992.
74. **Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, and Franco M.** Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F423-429, 2007.
75. **Sander M, Hansen PG, and Victor RG.** Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension* 26: 691-695, 1995.
76. **Scherrer U, Randin D, Vollenweider P, Vollenweider L, and Nicod P.** Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 94 (6): 2511-2515, 1994.

77. **Shankar RR, Wu Y, Shen HQ, Zhu JS, and Baron AD.** Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 49: 684-687, 2000.
78. **Shinozaki K, Kashiwagi A, Nishio Y, Okamura T, Yoshida Y, Masada M, Toda N, and Kikkawa R.** Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O₂- imbalance in insulin-resistant rat aorta. *Diabetes* 48: 2437-2445, 1999.
79. **Sowers JR, Epstein M, and Frohlich ED.** Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension* 37: 1053-1059, 2001.
80. **Swislocki A, Eason T, and Kaysen GA.** Oral administration of the nitric oxide biosynthesis inhibitor, N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), causes hypertension, but not glucose intolerance or insulin resistance, in rats. *Am J Hypertens* 8: 1009-1014, 1995.
81. **Tarpey MM, White CR, Suarez E, Richardson G, Radi R, and Freeman BA.** Chemiluminescent detection of oxidants in vascular tissue. Lucigenin but not coelenterazine enhances superoxide formation. *Circ Res* 84: 1203-1211, 1999.
82. **Tay A, Ozcelikay AT, and Altan VM.** Effects of L-arginine on blood pressure and metabolic changes in fructose-hypertensive rats. *Am J Hypertens* 15: 72-77, 2002.
83. **Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, and Moncada S.** Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339: 572-575, 1992.

84. **Verma S, Bhanot S, and McNeill JH.** Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. *Eur J Pharmacol* 373: R1-4, 1999.
85. **Vincent MA, Barrett EJ, Lindner JR, Clark MG, and Rattigan S.** Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285: E123-129, 2003.
86. **Wallace TM, Levy JC, and Matthews DR.** Use and abuse of HOMA modeling. *Diabetes Care* 27: 1487-1495, 2004.
87. **Wascher TC, Graier WF, Dittrich P, Hussain MA, Bahadori B, Wallner S, and Toplak H.** Effects of low-dose L-arginine on insulin-mediated vasodilatation and insulin sensitivity. *Eur J Clin Invest* 27: 690-695, 1997.
88. **Williams SB, Cusco JA, Roddy MA, Johnstone MT, and Creager MA.** Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 27: 567-574, 1996.
89. **World Health Organisation.** Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Geneva: WHO, Department of Noncommunicable Disease Surveillance 1-59, 1999.
90. **Wright DW, Hansen RI, Mondon CE, and Reaven GM.** Sucrose-induced insulin resistance in the rat: modulation by exercise and diet. *Am J Clin Nutr* 38: 879-883, 1983.
91. **Wu R, Lamontagne D, and de Champlain J.** Antioxidative properties of acetylsalicylic Acid on vascular tissues from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 105: 387-392, 2002.

92. **Wu R, Millette E, Wu L, and de Champlain J.** Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 741-748, 2001.

93. **Wu R, Monassier L, Pilon M, Laplante MA, Couture R, and de Champlain J.** Effects of cyclooxygenase inhibitors on oxidative stress, insulin resistance and cardiovascular parameters in a model of type 2 diabetes in rat [Abstract]. *Journal of hypertension* 25 (supp2): S127, 2007.

94. **Young J, and Landsberg L.** Stimulation of the sympathetic nervous system during sucrose feeding *Nature Long* 269: 615-617, 1977.

Figure legends

Fig. 1: Effects of 4-week treatment with glucose (G), L-NAME (LN) and glucose combined with L-NAME (G-LN) on (a) fasting plasma glucose levels (mmol/L), (b) fasting plasma insulin levels (ng/mL) and (c) the HOMA index of insulin resistance (plasma glucose (mmol/mL) x plasma insulin (mU/L) / 22.5). Values represent the mean \pm s.e.mean (n = 7-8). *P<0.05, **P<0.01 versus control (C).

Fig. 2: Effects of 4-week treatment with glucose (G), L-NAME (LN) and glucose combined with L-NAME (G-LN) on systolic blood pressure. Values represent the mean \pm s.e.mean (n = 8). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 versus control; †P<0.05, ††P<0.01, †††P<0.001 versus G; †P<0.05 versus LN group.

Fig. 3: Plasma noradrenaline levels (left panel) and adrenaline levels (right panel) measured after 4-week treatment with glucose (G), L-NAME (LN) and glucose combined with L-NAME (G-LN). Values represent the mean \pm s.e.mean (n= 5-8). *P<0.05, **P<0.01 versus control; †P<0.05, versus G group.

Fig. 4: Effects of 4-week treatment with glucose (G), L-NAME (LN) and glucose plus L-NAME (G-LN) on the medial mass of the aorta (left panel) as assessed by cross-sectional area measurements and on smooth muscle cell number (SMC) per cross-section (right panel). Values represent the mean \pm s.e.mean (n= 7-8). ***P<0.001, versus control.

Fig. 5: Basal superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) production (left panel) and NADPH oxidase activity (right panel) in the aorta (a) and in the heart (b) of rats treated for 4 weeks with glucose (G), L-NAME (LN), or glucose supplemented with L-NAME (G-LN). Values represent the mean \pm s.e.mean (n= 6-8). **P<0.01, ***P<0.001 versus control; †P<0.05, versus G group.

Fig. 6: Correlation between systolic blood pressure and (a) the medial mass of the aorta, (b) superoxide anion production, and (c) adrenaline levels. Values were those measured in control (C), glucose (G), L-NAME (LN) and glucose + L-NAME (G-LN) (n = 5-8 in each group).

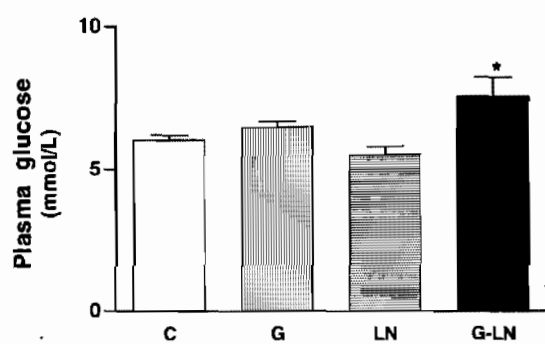
Table 1. Determination of various parameters in rats treated for 4 weeks with glucose and/or L-NAME.

Group	Body weight (g)	Water intake (ml)	Food intake (g)	Total energy intake (kJ)	Heart weight (g)	HW ($\times 10^3$) / BW	Heart fibrosis (%)
C	384 \pm 11	49 \pm 3	23.0 \pm 0.6	247 \pm 54	1.00 \pm 0.04	2.60 \pm 0.06	3.8 \pm 1.4
G	385 \pm 10	98 \pm 12***	14.3 \pm 0.4***	368 \pm 14	1.00 \pm 0.03	2.59 \pm 0.05	3.9 \pm 0.7
LN	393 \pm 7	46 \pm 1	23.7 \pm 1.4	338 \pm 20	0.97 \pm 0.01	2.48 \pm 0.04	3.6 \pm 0.7
G-LN	389 \pm 12	94 \pm 10***	15.7 \pm 1.9**	380 \pm 27	0.99 \pm 0.04	2.53 \pm 0.09	3.8 \pm 0.9

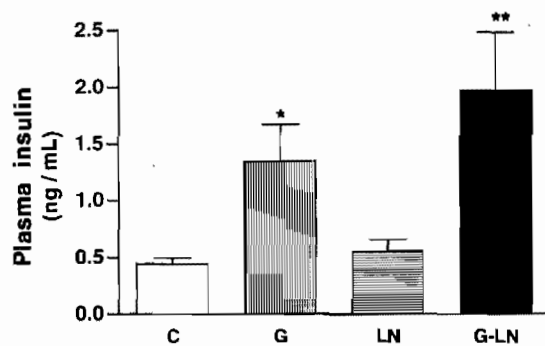
Data represent the mean \pm s.e.mean. C, Control; G, Glucose; LN, L-NAME; G-LN, Glucose + L-NAME; HW, heart weight; BW, body weight. **P<0.01, ***P<0.001 versus control.

Figure 1

(a)



(b)



(c)

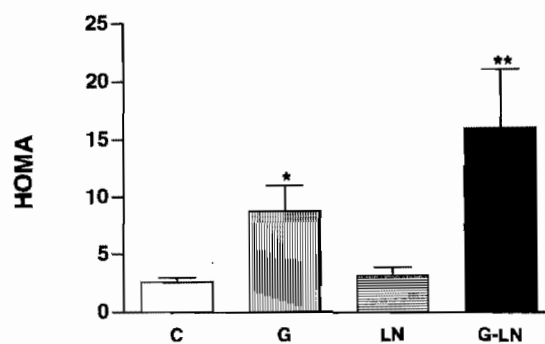
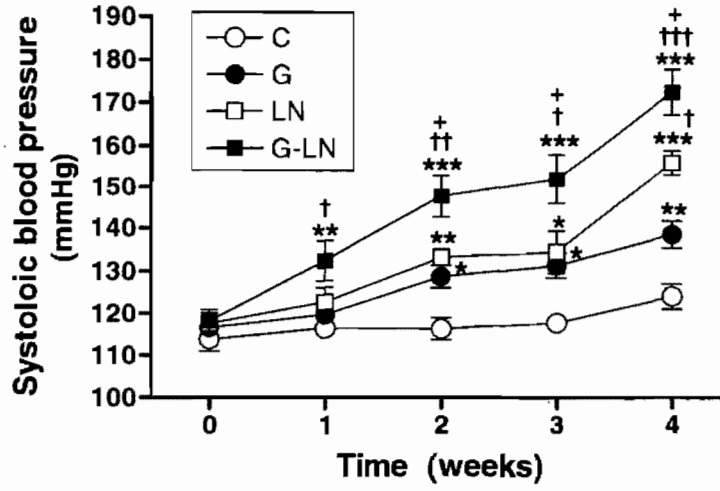
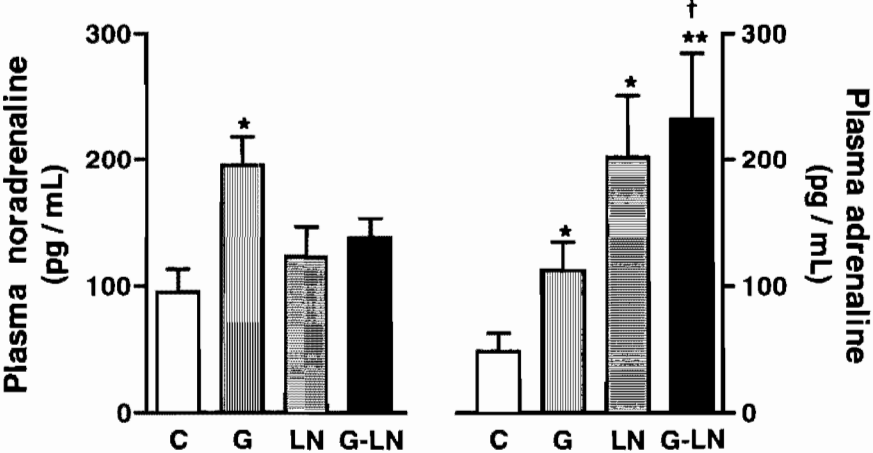


Figure 2



Pilon et al. 2008

Figure 3



Pilon et al. 2008

Figure 4

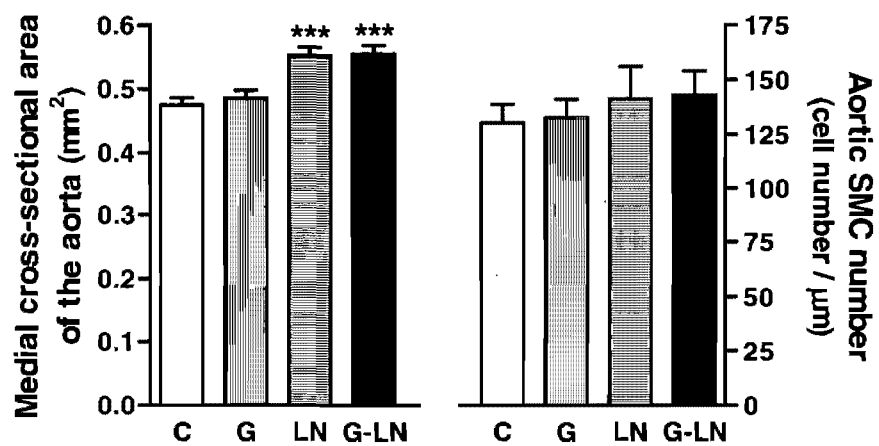
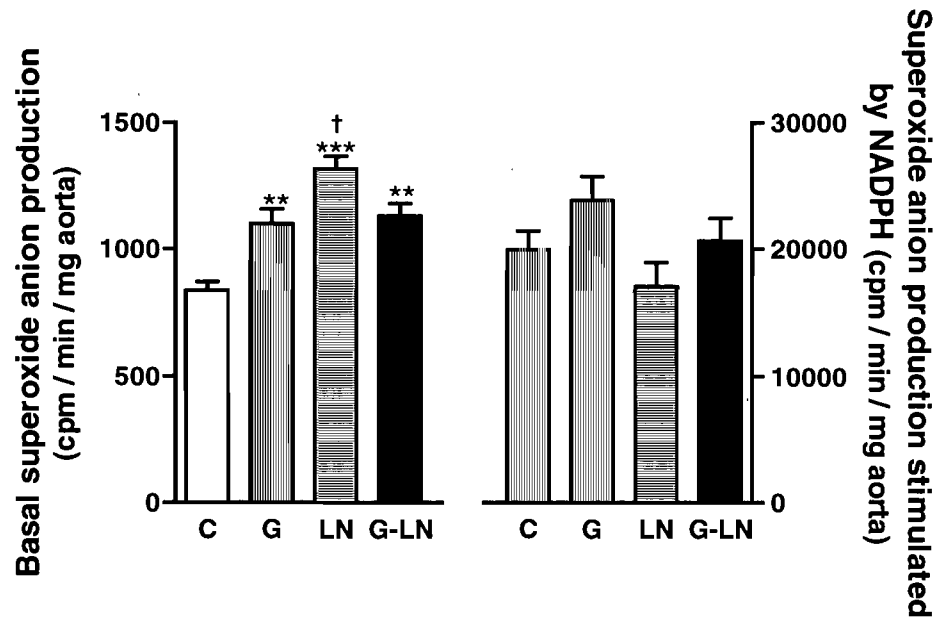
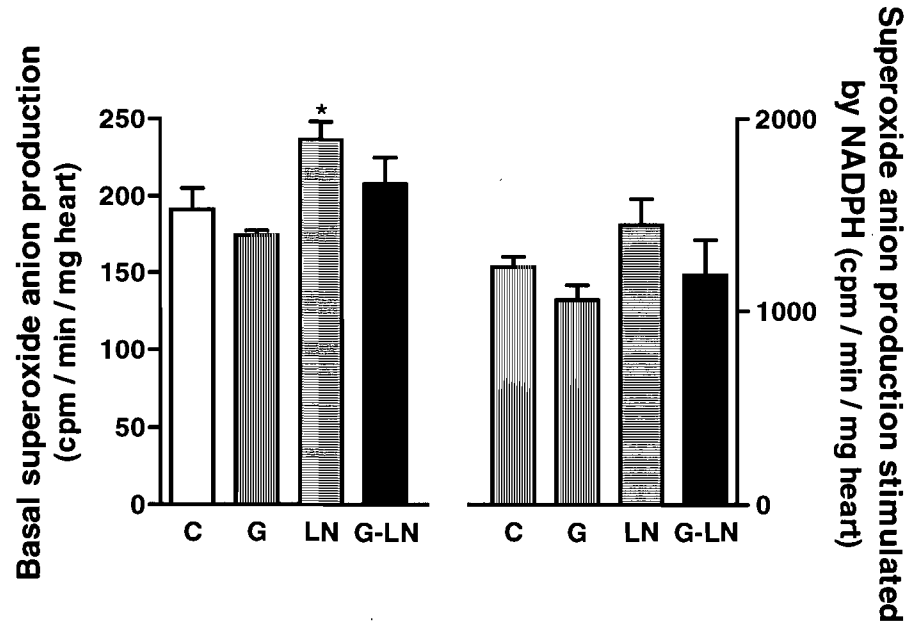


Figure 5

(a)



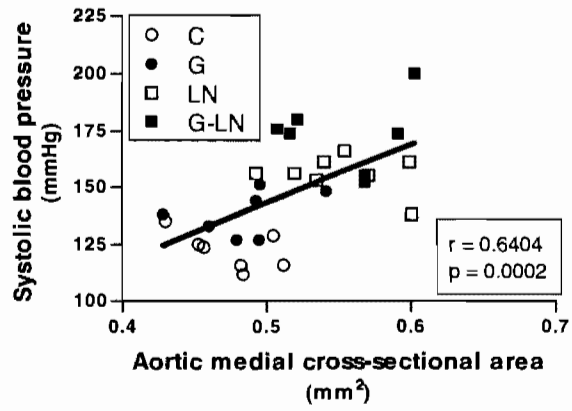
(b)



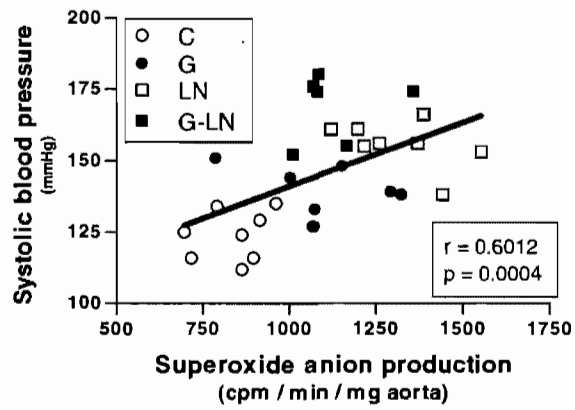
Pilon et al. 2008

Figure 6

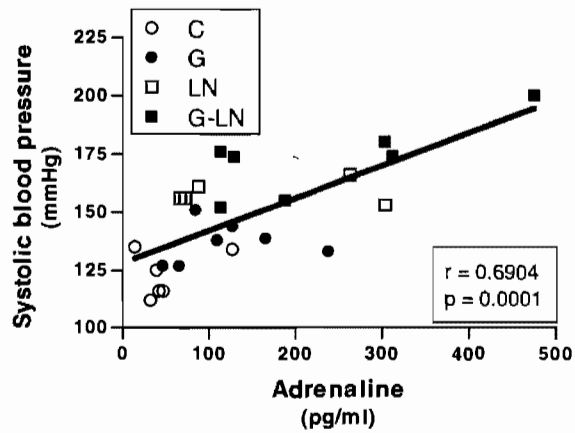
(a)



(b)



(c)



CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION

La pathologie du DT2 est complexe. Elle implique le développement progressif de la résistance à l'insuline qui évolue vers l'hyperglycémie lorsque l'hypersécrétion d'insuline devient insuffisante pour compenser la diminution de la sensibilité à l'insuline. En dépit d'une forte prédisposition génétique, les risques de développer le DT2 chez l'humain augmentent avec l'âge, l'obésité, les maladies cardiovasculaires, le manque d'activité physique et la mauvaise alimentation. Les avenues thérapeutiques actuelles sont limitées. Elles comprennent, outre les injections d'insuline au besoin, quatre classes d'antidiabétiques oraux qui 1- stimulent la sécrétion d'insuline par le pancréas, 2- réduisent la production hépatique de glucose, 3- retardent la digestion et l'absorption intestinale des hydrates de carbones, et 4- améliorent la sensibilité à l'insuline sur les tissus cibles (Section 1.1.4). L'analyse génétique du DT2 est grandement compliquée par la multitude et la complexité des interactions entre les gènes de susceptibilité, mais aussi entre ces gènes et l'environnement. L'expérimentation sur des sujets humains étant largement limitée par des considérations d'ordre éthiques, l'utilisation de modèles animaux devient alors nécessaire pour la recherche et pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

3.1 Les modèles expérimentaux du DT2

Il est difficile de développer un modèle animal qui représente fidèlement le DT2 puisque l'étiologie et la pathophysiologie de cette maladie comportent une grande variabilité au sein même de la population diabétique. Chaque modèle animal de DT2 a été développé pour adresser une question portant sur un aspect particulier de la maladie. Malgré le très grand nombre de modèles disponibles, aucun ne représente fidèlement le DT2 dans son ensemble. L'innombrable littérature sur le sujet est confinée dans quelques articles de revue [Bell *et*

al., 1983; Rees *et al.*, 1990; Shafir 1992; Cefalu 2006; Srinivasan *et al.*, 2007], mais les articles récents sont peu nombreux et tous comportent d'importantes lacunes. D'abord, la plupart des articles ont été rédigés par les auteurs de ces modèles de DT2. Dans ces situations, il arrive parfois que les propos manquent d'objectivité. Conséquemment, nous avons l'impression que la revue des modèles existants n'est en fait qu'un prétexte pour mieux présenter un nouveau modèle, en insistant sur ses forces... et sur les faiblesses des autres... De plus, ces articles évitent souvent de présenter les modèles où le diabète est induit via une diète particulière, ou alors ils abordent le sujet mais en présentant principalement le rat du désert (*Psammomys obesus*) et la souris spiny (*Acomys calirinus*). Ainsi, bien que les modèles animaux où le DT2 est induit par le biais d'une diète riche en sucres (fructose, sucrose, glucose) ou en lipides soient largement couverts par la littérature actuelle, ils sont à peine effleurés dans les articles de revue portant sur le sujet. Dans cet ouvrage, une revue de littérature a été effectuée afin de mieux situer notre modèle de DT2 dans le contexte des connaissances actuelles. Les résultats de cette synthèse sont présentés dans le tableau VII qui représente les principales caractéristiques du DT2 observées chez chacun de ces modèles. Les sections 1.1 à 1.6 de cet ouvrage présentent le portrait clinique de la maladie tel qu'observé chez le patient ainsi que les principales caractéristiques qui la définissent. Brièvement, le diagnostic de la maladie s'appuie sur la présence de l'hyperglycémie. Ensuite la description de l'étiologie du DT2 est caractérisée d'abord par une hyperinsulinémie compensatoire au début de la maladie, laquelle peut évoluer vers une hypo-insulinémie à la suite de la destruction des cellules β pancréatiques. La principale différence entre le DT1 et le DT2 est la résistance à l'insuline qui est manifeste uniquement dans le DT2. Il est aussi mentionné que la prévalence de l'hypertension dans la population diabétique de type 2 est de 80%. De plus, il a été démontré que des conditions d'hyperactivité du système nerveux sympathique et du système rénine-angiotensine sont

étroitement associées au DT2, tout comme une augmentation du stress oxydatif. Le tableau VII énumère plusieurs autres caractéristiques observées chez certains patients diabétiques et détaillées dans l'introduction de cet ouvrage.

Seuls les modèles de rongeurs sont abordés, et une attention particulière est apportée aux modèles présentant un DT2 d'origine génétique ou nutritionnelle. L'utilisation des rongeurs pour l'expérimentation animale comporte des avantages considérables : petite taille, courte période de gestation, grande disponibilité, faible coût économique, génome entièrement séquencé. Pour plus d'information concernant les autres espèces, le lecteur peut consulter le numéro spécial de la revue ILAR portant sur les modèles expérimentaux du DT2 et l'obésité [National Research Council of the Academies 2006]. Outre les méthodes nutritionnelles et génétiques pour induire le diabète, il y a les méthodes chimiques et chirurgicales discutées dans l'article de revue de Srinivasan *et al* [Srinivasan *et al.*, 2007].

Légende du tableau VI: Les modèles de DT2 spontanés ou génétiques comprennent : les souris ob/ob et db/db qui portent une mutation sur le gène codant pour la leptine ou pour son récepteur, les rats Zucker obèses et diabétiques (ZFR et ZDR) qui portent une mutation sur le chromosome 5 touchant aussi la voie de signalisation de la leptine, les souris Goto Kakizaki (GK) qui ont été sélectionnées pendant plusieurs générations pour le phénotype d'hyperglycémie d'origine polygénique, les rats spontanément hypertendus (SHR) qui ont été sélectionnés pendant plusieurs générations pour leur propension à développer l'obésité (N/-cp, pour *corpulent*), les souris IRS2-KO qui présentent une rupture du gène codant pour les *insulin receptor substrate-2* (IRS2-KO) et les souris/rats qui sont transgéniques pour le polypeptide des îlots amyloïdes humain (HIP). Les modèles nutritionnels de DT2 comprennent : les souris/rats soumises à une diète riche en fructose, en gras (HFD) ou en glucose, et les rats du désert (*Psammomys obesus*) soumis à une diète normale plutôt qu'à une diète végétarienne pauvre en calories à laquelle ils sont habitués. Les modèles combinés comprennent : les rats recevant une diète riche en gras et une injection de streptozotocine (STZ) pour détruire les cellules β du pancréas, les rats traités au glucose et au L-NAME (Glucose + LN), les rats SHR soumis à une diète riche en gras et sélectionnés pour leur forte propension à un accident vasculaire cérébral (SHR-SP, pour *stroke prone*). Une revue de la littérature a été effectuée afin de créer ce tableau présentant les principales caractéristiques du DT2 observées chez chacun des modèles. Ainsi le signe + (ou - s'il y a lieu) indique que la caractéristique correspondante a été observée, le signe \neq indique que l'absence de cette caractéristique a été confirmée, le signe +/- indique que des résultats opposés ont été observés, et une case laissée vide indique que ce paramètre n'a pas été évalué dans le modèle correspondant. *Les références numérotées 1 à 77 sont présentées à l'annexe 1. ** Le rat traité au glucose ne présente pas de surcharge pondérale nette, mais des études sont en cours dans le laboratoire de Dr Couture pour déterminer s'il y a une accumulation de tissu adipeux au niveau abdominal. (SNS, système nerveux sympathique, RAS, système rénine angiotensine)

3.1.1 Les modèles génétiques ou spontanés

Les animaux développant le DT2 de façon spontanée peuvent être obtenus à partir d'individus, présentant une ou plusieurs mutations génétiques, croisés ensemble pendant plusieurs générations successives. Le génome des **souris obèse (ob/ob)**, et de leurs cousines **diabétiques (db/db)**, comporte une mutation autosomale récessive sur le gène codant pour la leptine et son récepteur, respectivement [Ingalls *et al.*, 1950; Hummel *et al.*, 1966; Zhang *et al.*, 1994]. C'est en grande partie grâce à ces souris obèses et insulino-résistantes que le rôle de la leptine dans le contrôle de l'appétit et du métabolisme a pu être mieux caractérisé. D'autre part, la leptine induit une augmentation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et des fonctions rénales, vraisemblablement via une activation du SNS [Lindstrom 2007]. Étant déficiente en leptine, les souris ob/ob présentent une hypo-activation du SNS généralement associée à une pression artérielle plus basse que les souris témoins, quoique des souris obèses hypertensives aient aussi été observées [Snitker *et al.*, 1997; Mark *et al.*, 1999; Swoap 2001]. Chez la souris obèse, la glycémie est élevée pendant la période de croissance, mais elle a tendance à décliner pour se stabiliser à des valeurs presque normales en vieillissant, ce qui est peu représentatif du portrait clinique du DT2. De plus, les déficiences en leptine sont rarement observées au sein de la population humaine obèse et/ou diabétique [Lindstrom 2007]. En fait, la souris ob/ob est principalement utilisée dans les études portant sur l'obésité, alors que la souris db/db, qui est beaucoup plus représentative du DT2 humain (Tableau VII), est particulièrement utile dans l'étude des néphropathies diabétiques [Sharma *et al.*, 2003]. L'hypotension et l'hypoactivité sympathique observées chez ces souris sont des traits généralement opposés à ceux retrouvés dans la population humaine diabétique.

Comme la souris db/db, le rat **Zucker obèse (ZFR)** et son cousin **diabétique (ZDR)** deviennent obèse et diabétique en raison d'une mutation récessive sur le gène du récepteur de la leptine [Bray 1977]. Il s'agit d'un modèle plutôt complet (Tableau VII) qui présente les caractéristiques associées au syndrome métabolique (hypertension modérée, obésité, dyslipidémie, hyperglycémie, résistance à l'insuline) et aux complications cardiovasculaires diabétiques (remodelage cardiovasculaire et dysfonctions endothéliales) [Kurtz *et al.*, 1989; Fredersdorf *et al.*, 2004; Sista *et al.*, 2005; Bouvet *et al.*, 2007]. Ce modèle génétique est toutefois très coûteux et demeure encore controversé quant à sa capacité à développer l'hypertension artérielle.

Les **rats spontanément hypertendus (SHR)** ont été sélectionnés pendant plusieurs générations pour leur propension à devenir **obèse (SHR/N-cp)** ou à subir un **accident vasculaires cérébral (SHR-SP)**. Tout comme la souris db/db et le rat Zucker diabétique, la corpulence du rat SHR/N-cp résulte d'une mutation du gène codant pour le récepteur de la leptine [Ishizuka *et al.*, 1998]. Les rats SHR/N-cp et SHR-SP présentent des caractéristiques diabétiques semblables aux autres animaux affectés par une déficience de la voie de la leptine (Tableau VI). Ces rats présentent une élévation du stress oxydatif qui semble être étroitement associée au développement de néphropathies diabétiques. D'ailleurs, l'effet néphroprotecteur de la prévention de l'élévation du stress oxydatif par l'acide corosolique ou par une diète hypocalorique a été démontré [Nangaku *et al.*, 2005; Yamaguchi *et al.*, 2006]. L'acide corosolique est l'un des principaux constituants des feuilles du lilas des Indes, *Lagerstroemia speciosa*, qui sont utilisées en médecine traditionnelle dans l'Asie du Sud pour traiter le diabète. L'hyperactivité du système rénine-angiotensine (RAS) est en partie responsable de l'augmentation de la pression artérielle et de l'incidence des accidents vasculaires chez les rats SHR-SP [Okamoto *et al.*, 1986].

Le rat **Goto kakizaki (GK)** est un modèle polygénique spontané de DT2 qui a largement contribué à la compréhension de la relation entre la diminution de la masse des cellules β et le développement du diabète et de ses complications, principalement les néphropathies diabétiques. Contrairement à la plupart des modèles de DT2, le rat GK ne présente pas spontanément les caractéristiques du syndrome métabolique tel que l'hypertension, la dyslipidémie et l'obésité, ce qui en fait un bon modèle pour étudier le DT2 isolé des influences des autres pathologies associées [Sato *et al.*, 2003]. De plus, une diète riche en sel induit le développement de l'hypertension chez les rats GK. L'augmentation du stress oxydatif dans ce modèle, et la subséquente diminution de la biodisponibilité du NO, seraient partiellement responsables du développement des dysfonctions endothéliales puisque l'administration d'acide α -lipoïque atténue conjointement ces paramètres [Bitar *et al.*, 2005; Sena *et al.*, 2007]. La lacune principale de ce modèle réside dans le fait qu'il présente une déficience des cellules β à la naissance, ce qui n'est pas le cas chez le patient diabétique où l'on observe plutôt une déficience progressive dans le temps.

Les techniques de biologie moléculaire actuelles permettent de modifier le bagage génétique d'un zygote avant de le réimplanter dans l'oviducte de la souris pour qu'il poursuive son développement. Le ciblage génétique permet d'inactiver un gène précis dans une cellule souche embryonnaire, et ce gène modifié est ensuite transmis tout au long de la lignée cellulaire. Cette approche produit des animaux invalidés pour ce gène (*knockout*). La transgénèse réfère plutôt à la technique permettant d'introduire un gène modifié, en une ou plusieurs copies, dans le bagage génétique d'un animal. Théoriquement, ces techniques permettent la perturbation sélective d'un seul élément au sein d'un système complexe. Mais en pratique, la modification de l'expression d'un gène altère l'expression de plusieurs autres gènes par des mécanismes de compensation. Par exemple, l'inactivation complète du

gène codant pour la protéine IRS-1 entraîne étonnamment peu de perturbations (résistance à l'insuline modérée, normoglycémie, retard de croissance) [Tamemoto *et al.*, 1994] si l'on considère le rôle central de signalisation qu'elle occupe (Section 0). La redondance au niveau de la cascade de signalisation dans laquelle est impliquée l'IRS-1 permettrait d'outrepasser cette manipulation génétique. Toutefois, l'**inactivation de IRS-2** ne semble pas être compensée pas d'autres mécanismes puisque ces souris développent le diabète, associé à une résistance à l'insuline et à une réduction de la masse des cellules β , avant l'âge de 10 jours [Withers *et al.*, 1998; Kubota *et al.*, 2000]. Aussi, l'implication du transporteur GLUT-4 dans la voie de l'insuline a été confirmée par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline chez les souris transgéniques sur-exprimant le gène de ce transporteur [Liu *et al.*, 1993].

L'un des mécanismes potentiels, qui expliquerait la sécrétion déficiente d'insuline chez les patients souffrants de DT2 serait une augmentation de l'apoptose des cellules β attribuable à une action cytotoxique des oligomères produits par les îlots amyloïde (*islet amyloid polypeptide*, **IAPP**) [Janson *et al.*, 1999]. La propension de cette protéine à produire des oligomères toxiques est étroitement associée à sa capacité à développer des fibrilles d'amyloïde [Kayed *et al.*, 2003]. Les IAPP des souris et des rats ne produisent pas de telles fibrilles et ne sont pas toxiques. L'introduction du gène IAPP humain chez la souris ou chez le rat (HIP) produit le phénotype de DT2 [Janson *et al.*, 1996; Butler *et al.*, 2004], supportant ainsi la théorie selon laquelle la destruction des cellules β serait, du moins en partie, attribuable à cette protéine. Ce modèle ne représente toutefois pas fidèlement l'étiologie du DT2 observé chez l'humain puisque la phase de déficience à l'insuline chez ces animaux n'est pas précédée de la phase d'hyperinsulinémie typiquement observée chez le patient.

3.1.2 Les modèles nutritionnels

Au cours des 30 dernières années, l'industrie a progressivement remplacé le sucre par du fructose dans la préparation de ses aliments en raison de la mise au point d'un procédé peu coûteux permettant d'extraire le fructose du maïs. De 1970 à 2003, la consommation journalière en fructose chez l'américain moyen est passée de 0,5g à 53,9g [Wylie-Rosett *et al.*, 2004]. Plusieurs études ont été effectuées afin de vérifier si cette surconsommation en fructose contribuait au développement de l'obésité et des anomalies associées à la résistance à l'insuline. Il a ainsi été démontré qu'une diète riche en fructose (de 35 à 66% de l'énergie quotidienne ingérée) chez le rat et le chien, pour une durée variant entre 2 et 13 semaines selon l'étude, entraînait une diminution de la sensibilité à l'insuline associée à l'élévation de la pression artérielle [Hwang *et al.*, 1987; Martinez *et al.*, 1994; Sanchez-Lozada *et al.*, 2007]. Bien qu'il ne soit ni obèse, ni franchement hyperglycémique, le rat recevant une diète riche en fructose est fréquemment utilisé pour des études portant sur le syndrome métabolique puisqu'il rencontre les autres critères de diagnostic (Tableau IV et Tableau VII).

Chez l'humain, la consommation d'un breuvage à forte teneur en fructose entraîne une élévation rapide et prolongée de la concentration plasmatique en triglycérides, alors que ces niveaux demeurent inchangés lorsque le breuvage comporte plutôt une forte concentration en glucose [Teff *et al.*, 2004]. Donc, le fructose favorise la lipogenèse hépatique et il semble que les dommages associés à une diète riche en fructose soient principalement imputables à la dyslipidémie qui en résulte [Elliott *et al.*, 2002]. L'administration d'un agent hypolipidémiant (benfluorex) renverse le développement de la résistance à l'insuline induite par une diète riche en fructose chez le rat, démontrant ainsi une implication de

l'hypertriglycéridémie dans la pathophysiologie de ce modèle [Storlien *et al.*, 1993]. D'ailleurs le rat nourri avec une diète riche en fructose développe sensiblement les mêmes complications que celui qui est nourri avec une diète riche en gras (HFD), un autre modèle de résistance à l'insuline (Tableau VII).

Il y a des différences majeures entre les voies métaboliques des deux monosaccharides qui constituent le sucrose, à savoir le glucose et le fructose. À l'inverse du glucose, le fructose favorise la lipogenèse hépatique. De plus, l'ingestion d'un breuvage à forte teneur en fructose ne stimule pas, à court terme, la sécrétion d'insuline par le pancréas [Teff *et al.*, 2004]. Comme la leptine est produite en réponse à cette sécrétion d'insuline, la consommation en fructose (versus glucose) est aussi associée à une concentration en leptine circulante moins élevée, ce qui peut favoriser l'implantation de l'obésité. Une autre différence réside dans l'utilisation de ces sucres simples par le cerveau; alors que le glucose constitue la principale source énergétique du cerveau, le fructose ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique pour se rendre au cerveau [Thurston *et al.*, 1972].

Le modèle du rat traité au glucose a été développé dans nos laboratoires pour étudier l'effet d'une consommation élevée en glucose sur le développement de la résistance à l'insuline et de l'hypertension. Ce modèle présente l'hyperglycémie qui faisait défaut chez le rat traité au fructose (Tableau VII). Une explication possible pour cette divergence pourrait se situer au niveau de la rétroaction négative de la voie glycolytique. L'ATP produit à partir de la lyse du glucose agit rétroactivement pour inhiber une enzyme clé dans la voie de la glycolyse, la phosphofructokinase. L'inhibition de l'utilisation et de la transformation du glucose par ce procédé pourrait expliquer l'élévation de la glycémie. En revanche, le fructose peut emprunter une voie ne passant pas par le point de contrôle de la

phosphofructokinase pour produire des lipides. Ainsi, il se pourrait que la pathophysiologie du modèle du fructose soit principalement caractérisée par l'hypertriglycéridémie, alors que l'hyperglycémie caractériserait plutôt le modèle du glucose.

Dans son habitat naturel, lorsqu'il se nourrit essentiellement de végétaux, le rat du désert *Psammomys obesus* se porte bien. Toutefois son état se détériore (Tableau VI) lorsque la nourriture dont il dispose est hautement calorique, tel que celle que nous fournissons à nos animaux de laboratoire. En réponse à ce régime riche, *P. obesus* devient obèse, résistant à l'insuline et hyperglycémique, et il présente une hyperinsulinémie qui évolue vers une déficience en insuline lorsque la détérioration et la nécrose des cellules β s'installent [Shafir 2001]. Si une forte teneur en cholestérol est ajoutée à sa diète, le rat du désert devient hyperlipidémique et développe des lésions athérosclérotiques [Marquie *et al.*, 1991].

Il existe donc une multitude de modèles expérimentaux de DT2 dont chacun comporte des avantages et des inconvénients. Les modèles génétiques ou spontanés, en plus d'être coûteux et parfois difficilement accessibles, ne représentent pas l'hétérogénéité génétique du DT2 observée chez le patient. Les méthodes chimiques (alloxan ou streptozotocine) ou chirurgicales (pancréatectomie) utilisées pour détruire ou retirer une partie des cellules β ne reproduisent pas le phénomène de résistance à l'insuline qui caractérise le DT2. Ces méthodes sont plutôt associées à une hyperglycémie qui se développe en raison d'une insuffisance en insuline sécrétée (DT1). L'induction du diabète par des méthodes nutritionnelles comporte aussi des désavantages, les principaux étant que ces méthodes requièrent souvent de longues périodes de traitement pour aboutir à une hyperglycémie qui n'est pas très élevée et variable selon les groupes traités.

3.1.3 Le modèle du rat traité au glucose + L-NAME (G-LN)

L'objectif de cette étude était de développer un modèle non génétique et accéléré de DT2 qui présente des lésions cardiovasculaires diabétiques. Nous avons observé qu'une inhibition chronique de la NO synthase avait pour effet d'accélérer le développement de l'hypertension et l'apparition de la résistance à l'insuline (Figures 13 et 14) chez les rats traités au glucose, suggérant ainsi un rôle protecteur de la voie du NO dans ce modèle. Nous pouvons désormais affirmer que notre modèle représente le DT2, et non un état pré-diabétique comme celui du rat traité au glucose, puisque l'hyperglycémie des rats à jeun est au-delà de la limite de 7 mmol/L suggérée par l'OMS (Section 1.1.2). De plus, la possibilité que nous soyons en présence d'un modèle de DT1 est exclue puisque nous avons observé une hyperinsulinémie dans notre modèle, ce qui indique que les rats ne présentent pas la défaillance des cellules β qui caractérise cette maladie. En conséquence, la première partie de notre objectif est atteinte puisque nous avons développé un modèle non génétique et accéléré de DT2. Nous avons aussi réalisé la deuxième partie de l'objectif concernant la présence de lésions cardiovasculaires puisque les rats traités au L-NAME, avec ou sans glucose, montrent un remodelage hypertrophique de l'aorte non associé à une hyperplasie (Figure 15). Malgré que nos études histologiques n'aient pas révélé de fibrose cardiaque dans ce modèle (Tableau VI), des échocardiographies effectuées sur les rats traités au G-LN pendant 4 semaines ont permis de constater que ceux-ci présentent une hypertrophie ventriculaire gauche [Wu *et al.*, 2007]. Nous avons tenté de poursuivre le traitement pendant 2 semaines additionnelles mais le traitement a dû être interrompu à cause d'un nombre très élevé de mortalité associé à des accidents vasculaires cérébraux et à des infarctus du myocarde (données non présentées).

D'autres expériences effectuées avec les rats traités au G-LN ont contribué à démontrer que l'âge auquel le traitement était initié avait un impact sur les résultats obtenus [Pilon *et al.*, 2008]. Nous avons comparé les effets d'un traitement de 4 semaines chez le rat adulte (250-300g) avec les effets d'un traitement de 6 semaines chez le jeune rat (50-75g) (Tableau VIII). Les jeunes rats montraient une hyperglycémie relativement plus élevée que les rats adultes, bien que les rats adultes présentaient une plus grande élévation de la résistance à l'insuline et de la production vasculaire d'anion superoxyde. Comme autre constatation, mentionnons que 7 semaines de traitement chez les jeunes rats représentent le seuil de mortalité, contrairement à 5 semaines chez les rats adultes (données non présentées). Ainsi, il semble que le fait d'initier le traitement au G-LN chez des rats plus âgés soit associé à une gravité accrue du développement de la maladie, principalement au niveau de la résistance à l'insuline.

Tableau VII. Variations (%) induites par le traitement avec G-LN initié chez des rats jeunes ou adultes.

	RATS ADULTES TRAITÉS PENDANT 4 SEMAINES	JEUNES RATS TRAITÉS PENDANT 6 SEMAINES
	G-LN	G-LN
GLYCÉMIE À JEUN	+ 25 *	+ 39 ***
INSULINÉMIE À JEUN	+ 346 **	+ 202 ***
HOMA	+ 511 **	+ 311 ***
PRESSION ARTÉRIELLE SYSTOLIQUE	+ 39 **	+ 39 ***
ANION SUPEROXYDE - AORTE	+ 35 ***	+ 19 *

(* ; ** et *** $P < 0,05$; 0,01 et 0,001 versus témoin)

Nous avons observé une chose assez surprenante au niveau rénal chez les rats traités avec G-LN. Alors que les patients diabétiques et la plupart des modèles expérimentaux de diabète présentent une hypertrophie rénale, nous avons plutôt mesuré une diminution significative de 20% ($P < 0,01$) du ratio du poids des reins sur le poids corporel, révélant

ainsi une atrophie rénale dans notre modèle (Pilon *et al.*, 2007). Cette atrophie a été confirmée à chacune de nos expériences effectuées sur des rats jeunes ou adultes, traités pendant des périodes variant de 4 à 8 semaines. Après histologie rénale (données non présentées), nous avons constaté qu'il n'y a aucune variation significative du nombre de glomérules. Ceci semble suggérer que l'atrophie rénale ne s'explique pas par une diminution du nombre de glomérules. Au contraire, une augmentation du ratio paroi/lumière a été mesurée, suggérant à nouveau la présence d'un remodelage vasculaire sur les glomérules rénaux.

3.2 Perspectives

L'étape que nous venons d'accomplir, à savoir de développer un modèle expérimental de DT2 qui soit accéléré et qui reproduit certaines lésions cardiovasculaires observées chez le patient, s'intègre dans une perspective globale dont l'objectif ultime est d'en comprendre les mécanismes afin de proposer les traitements les plus appropriés. Nous devons ainsi poursuivre en étudiant la voie du NO (niveau d'expression des différentes isoformes de NO synthase dans les tissus cardiovasculaires) et les concentrations plasmatiques d'ADMA, l'inhibiteur endogène de cette voie. Le potentiel thérapeutique d'un supplément en L-Arginine mérite d'être évalué. La découverte inattendue d'une atrophie rénale qui peut contribuer à l'hypertension chez les rats traités au G-LN nécessite de nouvelles études (dosage de la microalbuminurie, études histologiques incluant les tubules rénaux, activité de la rénine plasmatique). Il nous semble aussi nécessaire de mettre au point des techniques pour doser d'autres marqueurs du stress oxydatif et pour évaluer l'état des défenses antioxydantes. Cela pourrait entre autres nous aider à comprendre pourquoi les rats LN

présentent une production aortique d'anion superoxyde supérieure à celle des rats recevant le traitement combinés (G-LN). Enfin, lorsque notre modèle sera bien caractérisé, nous serons en mesure de l'utiliser pour évaluer le potentiel thérapeutique de nouveaux médicaments antidiabétiques en développement par le groupe de recherche universitaire sur le médicament (GRUM).

3.3 Conclusion

À la lumière de nos résultats, nous sommes maintenant en mesure de confirmer notre hypothèse de recherche selon laquelle une inhibition de la NO synthase peut accélérer l'apparition de la résistance à l'insuline et le développement de l'hypertension chez le rat traité au glucose, permettant ainsi l'observation des lésions cardiovasculaires diabétiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi, F., T. Asagmi, J. Cooke, C. Lamendola, T. McLaughlin, G. Reaven, M. Stühlinger and P. Tsao (2001). Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in type 2 diabetes mellitus. *Am J cardiol* 88: 1201-1203.
- Adler, A. I., I. M. Stratton, H. A. Neil, J. S. Yudkin, D. R. Matthews, C. A. Cull, A. D. Wright, R. C. Turner and R. R. Holman (2000). Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study. *Bmj* 321(7258): 412-9.
- Alheid, U., J. C. Frolich and U. Forstermann (1987). Endothelium-derived relaxing factor from cultured human endothelial cells inhibits aggregation of human platelets. *Thromb Res* 47(5): 561-71.
- Andrew, P. J. and B. Mayer (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43(3): 521-31.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, J. Butler and B. M. Hoey (1989). Apparent inactivation of alpha 1-antiproteinase by sulphur-containing radicals derived from penicillamine. *Biochem Pharmacol* 38(24): 4353-7.
- Atkinson, M. A. and N. K. Maclaren (1994). The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 331(21): 1428-36.
- Bach, J. F. (2002). The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 347(12): 911-20.
- Baron, A. D., J. S. Zhu, S. Marshall, O. Irsula, G. Brechtel and C. Keech (1995). Insulin resistance after hypertension induced by the nitric oxide synthesis inhibitor L-NMMA in rats. *Am J Physiol* 269(4 Pt 1): E709-15.
- Bell, R. H., Jr. and R. J. Hye (1983). Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res* 35(5): 433-60.
- Berne, C., J. Fagius, T. Pollare and P. Hjendahl (1992). The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* 35(9): 873-9.
- Bitar, M. S., S. Wahid, S. Mustafa, E. Al-Saleh, G. S. Dhaunsi and F. Al-Mulla (2005). Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type II model of genetic diabetes. *Eur J Pharmacol* 511(1): 53-64.
- Bjorntorp, P., M. Fahlen, G. Grimby, A. Gustafson, J. Holm, P. Renstrom and T. Schersten (1972). Carbohydrate and lipid metabolism in middle-aged, physically well-trained men. *Metabolism* 21(11): 1037-44.
- Bode-Boger, S. M., F. Scalera and L. J. Ignarro (2007). The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol Ther* 114(3): 295-306.
- Boger, R., S. Bode-Boger, A. Szuba, P. Tsao, J. Chan, O. Tangphao, T. Blaschke and J. Cooke (1998). Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for

- endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98: 1842-1847.
- Bouvet, C., E. B. de Chantemele, A. L. Guihot, E. Vessieres, A. Bocquet, O. Dumont, A. Jardel, L. Loufrani, P. Moreau and D. Henrion (2007). Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* 50(1): 248-54.
- Bray, G. A. (1977). The Zucker-fatty rat: a review. *Fed Proc* 36(2): 148-53.
- Brown, G. C. (2001). Regulation of mitochondrial respiration by nitric oxide inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 1504(1): 46-57.
- Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 54(6): 1615-25.
- Buchanan, T. A. and A. H. Xiang (2005). Gestational diabetes mellitus. *J Clin Invest* 115(3): 485-91.
- Butler, A. E., J. Jang, T. Gurlo, M. D. Carty, W. C. Soeller and P. C. Butler (2004). Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (HIP Rat): a new model for type 2 diabetes. *Diabetes* 53(6): 1509-16.
- Cefalu, W. T. (2006). Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *Ilar J* 47(3): 186-98.
- Chalupsky, K. and Cai, H. (2005) Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase. *PNAS* 21;102(25): 9056-61.
- Chan, P., C. W. Wang, T. S. Lin, C. W. Tsai and W. H. Pan (1995). Increased sympathetic nervous system activity in Chinese hypertensive patients with type II diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 50(1): 69-74.
- Cheng, Y. W. and A. B. Caughey (2007). Gestational diabetes mellitus: what is the optimal treatment modality? *J Perinatol* 27(5): 257-8.
- Crowther, C. A., J. E. Hiller, J. R. Moss, A. J. McPhee, W. S. Jeffries and J. S. Robinson (2005). Effect of treatment of gestational diabetes mellitus on pregnancy outcomes. *N Engl J Med* 352(24): 2477-86.
- Davies, K. J. (2000). Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life* 50(4-5): 279-89.
- De Caterina, R., P. Libby, H. B. Peng, V. J. Thannickal, T. B. Rajavashisth, M. A. Gimbrone, Jr., W. S. Shin and J. K. Liao (1995). Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 96(1): 60-8.
- de Champlain, J., R. Wu, H. Girouard, M. Karas, E. L. M. A, M. A. Laplante and L. Wu (2004). Oxidative stress in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 26(7-8): 593-601.
- Deibert, D. C. and R. A. DeFronzo (1980). Epinephrine-induced insulin resistance in man. *J Clin Invest* 65(3): 717-21.

- Dias, J. P., M. A. Ismael, M. Pilon, J. de Champlain, B. Ferrari, P. Carayon and R. Couture (2007). The kinin B1 receptor antagonist SSR240612 reverses tactile and cold allodynia in an experimental rat model of insulin resistance. *Br J Pharmacol* 152(2): 280-7.
- Dimmeler, S., V. Rippmann, U. Weiland, J. Haendeler and A. M. Zeiher (1997). Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res* 81(6): 970-6.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (1997). Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1(4): 275-81.
- Dizdaroglu, M. (1992). Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 275(3-6): 331-42.
- Draznin, B. (2006). Molecular mechanisms of insulin resistance: serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and increased expression of p85alpha: the two sides of a coin. *Diabetes* 55(8): 2392-7.
- Eisenbarth, G. S. (2007). Update in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 92(7): 2403-7.
- El Midaoui, A. and J. de Champlain (2002a). Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 39(2): 303-7.
- El Midaoui, A., R. Wu and J. de Champlain (2002b). Prevention of hypertension, hyperglycemia and vascular oxidative stress by aspirin treatment in chronically glucose-fed rats. *J Hypertens* 20(7): 1407-12.
- El Midaoui, A., A. Elimadi, L. Wu, P. S. Haddad and J. de Champlain (2003). Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 16(3): 173-9.
- Eledrisi, M. S., M. S. Alshanti, M. F. Shah, B. Brolosy and N. Jaha (2006). Overview of the diagnosis and management of diabetic ketoacidosis. *Am J Med Sci* 331(5): 243-51.
- Elliott, S. S., N. L. Keim, J. S. Stern, K. Teff and P. J. Havel (2002). Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *Am J Clin Nutr* 76(5): 911-22.
- Evans, J. L., I. D. Goldfine, B. A. Maddux and G. M. Grodsky (2003). Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 52(1): 1-8.
- Expert Panel on Detection, E., and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, (2001). Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285(19): 2486-97.
- Facchini, F. S., R. A. Stoohs and G. M. Reaven (1996). Enhanced sympathetic nervous system activity. The linchpin between insulin resistance, hyperinsulinemia, and heart rate. *Am J Hypertens* 9(10 Pt 1): 1013-7.
- Fernandez, M. L., R. Ruiz, M. A. Gonzalez, R. Ramirez-Lorca, C. Couto, A. Ramos, R. Gutierrez-Tous, J. M. Rivera, A. Ruiz, L. M. Real and A. Grilo (2004). Association of NOS3 gene with metabolic syndrome in hypertensive patients. *Thromb Haemost* 92(2): 413-8.

- Fery, F. (1994). Role of hepatic glucose production and glucose uptake in the pathogenesis of fasting hyperglycemia in type 2 diabetes: normalization of glucose kinetics by short-term fasting. *J Clin Endocrinol Metab* 78(3): 536-42.
- Foster, T. S. (2007). Efficacy and safety of alpha-lipoic acid supplementation in the treatment of symptomatic diabetic neuropathy. *Diabetes Educ* 33(1): 111-7.
- Fournier, R. D., C. C. Chiueh, I. J. Kopin, J. J. Knapka, D. DiPette and H. G. Preuss (1986). Refined carbohydrate increases blood pressure and catecholamine excretion in SHR and WKY. *Am J Physiol* 250(4 Pt 1): E381-5.
- Fredersdorf, S., C. Thumann, C. Ulucan, D. P. Griese, A. Luchner, G. A. Riegger, E. P. Kromer and J. Weil (2004). Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol* 13(1): 11-9.
- Freeman, H. and R. D. Cox (2006). Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2: R202-9.
- Fujita, M., H. Asanuma, J. Kim, Y. Liao, A. Hirata, O. Tsukamoto, T. Minamino, M. Hori, M. Goto, K. Node and M. Kitakaze (2007). Impaired glucose tolerance: a possible contributor to left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction. *Int J Cardiol* 118(1): 76-80.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288(5789): 373-6.
- Garcia, M. J., P. M. McNamara, T. Gordon and W. B. Kannel (1974). Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23(2): 105-11.
- Garg, U. C. and A. Hassid (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 83(5): 1774-7.
- Geiss, L. S., W. H. Herman, M. G. Goldschmid, F. DeStefano, M. S. Eberhardt, E. S. Ford, R. R. German, J. M. Newman, D. R. Olson, S. J. Sepe and et al. (1993). Surveillance for diabetes mellitus--United States, 1980-1989. *MMWR CDC Surveill Summ* 42(2): 1-20.
- Gibbons, G. H. and V. J. Dzau (1994). The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330(20): 1431-8.
- Gokce, N. (2004). L-arginine and hypertension. *J Nutr* 134(10 Suppl): 2807S-2811S; discussion 2818S-2819S.
- Goldstein, B. J., F. Ahmad, W. Ding, P. M. Li and W. R. Zhang (1998). Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem* 182(1-2): 91-9.
- Goonasekera, C., D. Rees, P. Woolard, A. Friend, V. Shah and M. Dillon (1997). Nitric oxide synthase inhibitors and hypertension in children and adolescents. *J Hypertens* 15: 901-909.
- Gross, M. L., N. Heiss, M. Weckbach, A. Hansen, A. El-Shakmak, A. Szabo, K. Munter, E. Ritz and K. Amann (2004). ACE-inhibition is superior to endothelin A receptor blockade in preventing abnormal capillary supply and fibrosis of the heart in experimental diabetes. *Diabetologia* 47(2): 316-24.

- Haidara, M. A., H. Z. Yassin, M. Rateb, H. Ammar and M. A. Zorkani (2006). Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol* 4(3): 215-27.
- Halliwell, B., J. M. Gutteridge and C. E. Cross (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119(6): 598-620.
- Haynes, W. G., J. P. Noon, B. R. Walker and D. J. Webb (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J Hypertens* 11(12): 1375-80.
- Heinecke, J. W. (1997). Mechanisms of oxidative damage of low density lipoprotein in human atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 8(5): 268-74.
- Heinecke, J. and J. D. Molkenin (2006). Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7(8): 589-600.
- Hossain, P., B. Kavar and M. El Nahas (2007). Obesity and diabetes in the developing world--a growing challenge. *N Engl J Med* 356(3): 213-5.
- Hu, F. B., J. E. Manson, M. J. Stampfer, G. Colditz, S. Liu, C. G. Solomon and W. C. Willett (2001). Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med* 345(11): 790-7.
- Huggett, R. J., E. M. Scott, S. G. Gilbey, J. B. Stoker, A. F. Mackintosh and D. A. Mary (2003). Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanisms in hypertension. *Circulation* 108(25): 3097-101.
- Hummel, K. P., M. M. Dickie and D. L. Coleman (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science* 153(740): 1127-8.
- Hwang, I. S., H. Ho, B. B. Hoffman and G. M. Reaven (1987). Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10(5): 512-6.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(24): 9265-9.
- Ignarro, L. J., G. Cirino, A. Casini and C. Napoli (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* 34(6): 879-86.
- Imagawa, A., T. Hanafusa, J. Miyagawa and Y. Matsuzawa (2000). A novel subtype of type 1 diabetes mellitus characterized by a rapid onset and an absence of diabetes-related antibodies. Osaka IDDM Study Group. *N Engl J Med* 342(5): 301-7.
- Ingalls, A. M., M. M. Dickie and G. D. Snell (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *J Hered* 41(12): 317-8.
- Institut Cochin de biologie médicale. (2007). Équipe du Dr Tarik Issad. from <http://institut.cochin.inserm.fr>.
- Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire. (2007, 2007). Équipe du Dr Eric Honore. from <http://www.ipmc.cnrs.fr>.
- Ishizuka, T., P. Ernsberger, S. Liu, D. Bedol, T. M. Lehman, R. J. Koletsky and J. E. Friedman (1998). Phenotypic consequences of a nonsense mutation in the leptin receptor gene (fak) in obese spontaneously hypertensive Koletsky rats (SHROB). *J Nutr* 128(12): 2299-306.

- Jacob, S., E. J. Henriksen, A. L. Schieman, I. Simon, D. E. Clancy, H. J. Tritschler, W. I. Jung, H. J. Augustin and G. J. Dietze (1995). Enhancement of glucose disposal in patients with type 2 diabetes by alpha-lipoic acid. *Arzneimittelforschung* 45(8): 872-4.
- Janson, J., W. C. Soeller, P. C. Roche, R. T. Nelson, A. J. Torchia, D. K. Kreutter and P. C. Butler (1996). Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(14): 7283-8.
- Janson, J., R. H. Ashley, D. Harrison, S. McIntyre and P. C. Butler (1999). The mechanism of islet amyloid polypeptide toxicity is membrane disruption by intermediate-sized toxic amyloid particles. *Diabetes* 48(3): 491-8.
- Jovanovic, L. and D. J. Pettitt (2001). Gestational diabetes mellitus. *Jama* 286(20): 2516-8.
- K.-Laflamme, A., S. Foucart, P. Moreau, C. Lambert, R. Cardinal and J. de Champlain (1998). Sympathetic functions in NG-nitro-L-arginine-methyl-ester-induced hypertension: modulation by the renin-angiotensin system. *J Hypertens* 16(1): 63-76.
- Kahn, S. E. (2001). Clinical review 135: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): 4047-58.
- Kahn, S. E., R. L. Hull and K. M. Utzschneider (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444(7121): 840-6.
- Kamenova, P. (2006). Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of alpha-lipoic acid. *Hormones (Athens)* 5(4): 251-8.
- Katz, H., M. Homan, M. Jensen, A. Caumo, C. Cobelli and R. Rizza (1994). Assessment of insulin action in NIDDM in the presence of dynamic changes in insulin and glucose concentration. *Diabetes* 43(2): 289-96.
- Kaufman, L. N., M. M. Peterson and S. M. Smith (1991). Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am J Physiol* 260(1 Pt 1): E95-100.
- Kayed, R., E. Head, J. L. Thompson, T. M. McIntire, S. C. Milton, C. W. Cotman and C. G. Glabe (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science* 300(5618): 486-9.
- Kim, S.J., Jeong, D.G., Jeong, S.K., Yoon, T.S. and SE Ryu (2007). Crystal structure of the major diabetes autoantigen insulinoma-associated protein 2 reveals distinctive immune epitopes. *Diabetes* 56(1):41-8.
- Klein, J., M. Fasshauer, M. Ito, B. B. Lowell, M. Benito and C. R. Kahn (1999). beta(3)-adrenergic stimulation differentially inhibits insulin signaling and decreases insulin-induced glucose uptake in brown adipocytes. *J Biol Chem* 274(49): 34795-802.
- Knowler, W. C., E. Barrett-Connor, S. E. Fowler, R. F. Hamman, J. M. Lachin, E. A. Walker and D. M. Nathan (2002). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 346(6): 393-403.

- Koro, C. E., S. J. Bowlin, N. Bourgeois and D. O. Fedder (2004). Glycemic control from 1988 to 2000 among U.S. adults diagnosed with type 2 diabetes: a preliminary report. *Diabetes Care* 27(1): 17-20.
- Kristek, F. (1998). Long-term administration of L-arginine did not influence blood pressure, heart rate, cardiac hypertrophy or arterial wall thickness of spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol* 83(5): 595-603.
- Kubes, P., M. Suzuki and D. N. Granger (1991). Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4651-5.
- Kubota, N., K. Tobe, Y. Terauchi, K. Eto, T. Yamauchi, R. Suzuki, Y. Tsubamoto, K. Komeda, R. Nakano, H. Miki, S. Satoh, H. Sekihara, S. Sciacchitano, M. Lesniak, S. Aizawa, R. Nagai, S. Kimura, Y. Akanuma, S. I. Taylor and T. Kadowaki (2000). Disruption of insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 49(11): 1880-9.
- Kurtz, T. W., R. C. Morris and H. A. Pershadsingh (1989). The Zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 13(6 Pt 2): 896-901.
- La société québécoise d'hypertension artérielle (2007). Hypertension, Guide thérapeutique, troisième édition. 151-174.
- Leahy, J. L. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res* 36(3): 197-209.
- Lehtonen, A. (1991). Doxazosin effects on insulin and glucose in hypertensive patients. The Finnish Multicenter Study Group. *Am Heart J* 121(4 Pt 2): 1307-11.
- Lin, T. H., H. C. Chiu, H. M. Su, W. C. Voon, H. W. Liu, W. T. Lai and S. H. Sheu (2007). Association between fasting plasma glucose and left ventricular mass and left ventricular hypertrophy over 4 years in a healthy population aged 60 and older. *J Am Geriatr Soc* 55(5): 717-24.
- Lindstrom, P. (2007). The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *ScientificWorldJournal* 7: 666-85.
- Liu, M. L., E. M. Gibbs, S. C. McCoid, A. J. Milici, H. A. Stukenbrok, R. K. McPherson, J. L. Treadway and J. E. Pessin (1993). Transgenic mice expressing the human GLUT4/muscle-fat facilitative glucose transporter protein exhibit efficient glycemic control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23): 11346-50.
- Lungu, C., J. P. Dias, C. E. Franca, B. Ongali, D. Regoli, F. Moldovan and R. Couture (2007). Involvement of kinin B(1) receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides* 41(6): 375-87.
- Maddux, B. A., W. See, J. C. Lawrence, Jr., A. L. Goldfine, I. D. Goldfine and J. L. Evans (2001). Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid. *Diabetes* 50(2): 404-10.
- Mark, A. L., R. A. Shaffer, M. L. Correia, D. A. Morgan, C. D. Sigmund and W. G. Haynes (1999). Contrasting blood pressure effects of obesity in leptin-deficient ob/ob mice and agouti yellow obese mice. *J Hypertens* 17(12 Pt 2): 1949-53.

- Marquie, G., P. Hadjiisky, O. Arnaud and J. Duhault (1991). Development of macroangiopathy in sand rats (*Psammomys obesus*), an animal model of non-insulin-dependent diabetes mellitus: effect of gliclazide. *Am J Med* 90(6A): 55S-61S.
- Martinez, F. J., R. A. Rizza and J. C. Romero (1994). High-fructose feeding elicits insulin resistance, hyperinsulinism, and hypertension in normal mongrel dogs. *Hypertension* 23(4): 456-63.
- Masuo, K., T. Katsuya, Y. Fu, H. Rakugi, T. Ogihara and M. L. Tuck (2005). Beta2-adrenoceptor polymorphisms relate to insulin resistance and sympathetic overactivity as early markers of metabolic disease in nonobese, normotensive individuals. *Am J Hypertens* 18(7): 1009-14.
- Maxwell, S. R., H. Thomason, D. Sandler, C. Leguen, M. A. Baxter, G. H. Thorpe, A. F. Jones and A. H. Barnett (1997). Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest* 27(6): 484-90.
- Michelson, A. D., S. E. Benoit, M. I. Furman, W. L. Breckwoldt, M. J. Rohrer, M. R. Barnard and J. Loscalzo (1996). Effects of nitric oxide/EDRF on platelet surface glycoproteins. *Am J Physiol* 270(5 Pt 2): H1640-8.
- Moss, M. B., T. M. Brunini, R. Soares De Moura, L. E. Novaes Malagris, N. B. Roberts, J. C. Ellory, G. E. Mann and A. C. Mendes Ribeiro (2004). Diminished L-arginine bioavailability in hypertension. *Clin Sci (Lond)* 107(4): 391-7.
- Nangaku, M., Y. Izuhara, N. Usuda, R. Inagi, T. Shibata, S. Sugiyama, K. Kurokawa, C. van Ypersele de Strihou and T. Miyata (2005). In a type 2 diabetic nephropathy rat model, the improvement of obesity by a low calorie diet reduces oxidative/carbonyl stress and prevents diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 20(12): 2661-9.
- National Diabetes Data Group (1979). Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. National Diabetes Data Group. *Diabetes* 28(12): 1039-57.
- National Research Council of the Academies (2006). Type 2 diabetes and obesity *ILAR journal* 47(3): 1-108.
- Okamoto, K., K. Yamamoto, N. Morita, Y. Ohta, T. Chikugo, T. Higashizawa and T. Suzuki (1986). Establishment and use of the M strain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens Suppl* 4(3): S21-4.
- Pan, X. R., G. W. Li, Y. H. Hu, J. X. Wang, W. Y. Yang, Z. X. An, Z. X. Hu, J. Lin, J. Z. Xiao, H. B. Cao, P. A. Liu, X. G. Jiang, Y. Y. Jiang, J. P. Wang, H. Zheng, H. Zhang, P. H. Bennett and B. V. Howard (1997). Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 20(4): 537-44.
- Panza, J. A., P. R. Casino, C. M. Kilcoyne and A. A. Quyyumi (1993). Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87(5): 1468-74.
- Perin, P. C., S. Maule and R. Quadri (2001). Sympathetic nervous system, diabetes, and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 23(1-2): 45-55.

- Perticone, F., A. Sciacqua, R. Maio, M. Perticone, R. Maas, R. H. Boger, G. Tripepi, G. Sesti and C. Zoccali (2005). Asymmetric dimethylarginine, L-arginine, and endothelial dysfunction in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 46(3): 518-23.
- Pessin, J. E. and A. R. Saltiel (2000). Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106(2): 165-9.
- Pilon, M., R. Wu, J.-É. Huot-Marchand, D. deBlois, J. de Champlain and R. Couture (2007). Acceleration of glucose-induced type II diabetes by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in the rat. *Journal of hypertension* 25 (suppl 2): S280.
- Pilon, M., R. Wu, J.-É. Huot-Marchand, D. deBlois, J. de Champlain and R. Couture (2008). Effet de l'âge sur le développement de la résistance à l'insuline chez le rat traité au glucose et au L-NAME. *Médecine Sciences* 24 (Supp 1): 20.
- Pollare, T., H. Lithell, I. Selinus and C. Berne (1988). Application of prazosin is associated with an increase of insulin sensitivity in obese patients with hypertension. *Diabetologia* 31(7): 415-20.
- Prentki, M. and C. J. Nolan (2006). Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116(7): 1802-12.
- Qi, C. and P. H. Pekala (2000). Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in adipocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 223(2): 128-35.
- Ragoobirsingh, D., D. McGrowder, T. Dasgupta and P. Brown (2004). The effect of nitric oxide on glucose metabolism. *Mol Cell Biochem* 263(1-2): 29-34.
- Rees, D. D., R. M. Palmer, R. Schulz, H. F. Hodson and S. Moncada (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101(3): 746-52.
- Reljanovic, M., G. Reichel, K. Rett, M. Lobisch, K. Schuette, W. Moller, H. J. Tritschler and H. Mehnert (1999). Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid): a two year multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial (ALADIN II). Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. *Free Radic Res* 31(3): 171-9.
- Robertson, R. P. (2004). Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 279(41): 42351-4.
- Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H.M., Little, R.R., England, J.D., Tennill, A. and DE Goldstein (2002). Defining the relationship between plasma glucose and HbA(1c): analysis of glucose profiles and HbA(1c) in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 25(2): 275-8
- Rosen, P., P. P. Nawroth, G. King, W. Moller, H. J. Tritschler and L. Packer (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(3): 189-212.
- Rosenbloom, A. L., J. R. Joe, R. S. Young and W. E. Winter (1999). Emerging epidemic of type 2 diabetes in youth. *Diabetes Care* 22(2): 345-54.

- Rowe, J. W., J. B. Young, K. L. Minaker, A. L. Stevens, J. Pallotta and L. Landsberg (1981). Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* 30(3): 219-25.
- Rubio, A. R. and M. A. Morales-Segura (2004). Nitric oxide, an iceberg in cardiovascular physiology: far beyond vessel tone control. *Arch Med Res* 35(1): 1-11.
- Safar, M. E. and S. Laurent (1993). Behaviour of conduit arteries in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 15(6): 1033-45.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414(6865): 799-806.
- Sanchez-Lozada, L. G., E. Tapia, A. Jimenez, P. Bautista, M. Cristobal, T. Nepomuceno, V. Soto, C. Avila-Casado, T. Nakagawa, R. J. Johnson, J. Herrera-Acosta and M. Franco (2007). Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 292(1): F423-9.
- Santé Canada (2002). Le diabète au Canada, deuxième édition. Santé Canada, Direction générale de la santé de la population et de la santé publique. *Centre de prévention et de contrôle des maladies chroniques*: 1-82.
- Sasaki, A. (1981). Assessment of the new criteria for diabetes mellitus according to 10-year relative survival rates. *Diabetologia* 20(3): 195-8.
- Sato, N., K. Komatsu and H. Kurumatani (2003). Late onset of diabetic nephropathy in spontaneously diabetic GK rats. *Am J Nephrol* 23(5): 334-42.
- Scheepers, A., H. G. Joost and A. Schurmann (2004). The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 28(5): 364-71.
- Scherrer, U., D. Randin, P. Vollenweider, L. Vollenweider and P. Nicod (1994). Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 94 (6): 2511-2515.
- Sena, C. M., E. Nunes, T. Louro, T. Proenca and R. M. Seica (2007). Endothelial dysfunction in type 2 diabetes: effect of antioxidants. *Rev Port Cardiol* 26(6): 609-19.
- Shafir, E. (1992). Animal models of non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes Metab Rev* 8(3): 179-208.
- Shafir, E. (2001). Albert Renold memorial lecture: molecular background of nutritionally induced insulin resistance leading to type 2 diabetes--from animal models to humans. *Int J Exp Diabetes Res* 2(4): 299-319.
- Shankar, R. R., Y. Wu, H. Q. Shen, J. S. Zhu and A. D. Baron (2000). Mice with gene disruption of both endothelial and neuronal nitric oxide synthase exhibit insulin resistance. *Diabetes* 49(5): 684-7.
- Sharma, K., P. McCue and S. R. Dunn (2003). Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 284(6): F1138-44.
- Sharma, V. and J. H. McNeill (2006). Diabetic cardiomyopathy: where are we 40 years later? *Can J Cardiol* 22(4): 305-8.

- Shoji, M., S. Tsutaya, R. Saito, H. Takamatu and M. Yasujima (2000). Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan. *Life Sci* 66(26): 2557-62.
- Simko, F., I. Luptak, J. Matuskova, K. Krajcirovicova, Z. Sumbalova, J. Kucharska, A. Gvozdjakova, J. Simko, P. Babal, O. Pechanova and I. Bernatova (2005). L-arginine fails to protect against myocardial remodelling in L-NAME-induced hypertension. *Eur J Clin Invest* 35(6): 362-8.
- Sista, A. K., M. K. O'Connell, T. Hinohara, S. S. Oommen, B. E. Fenster, A. J. Glassford, E. A. Schwartz, C. A. Taylor, G. M. Reaven and P. S. Tsao (2005). Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker *fa/fa* rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(2): H845-51.
- Snitker, S., R. E. Pratley, M. Nicolson, P. A. Tataranni and E. Ravussin (1997). Relationship between muscle sympathetic nerve activity and plasma leptin concentration. *Obes Res* 5(4): 338-40.
- Srinivasan, K. and P. Ramarao (2007). Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 125(3): 451-72.
- Stamler, J. S., S. Lamas and F. C. Fang (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106(6): 675-83.
- Storlien, L. H., N. D. Oakes, D. A. Pan, M. Kusunoki and A. B. Jenkins (1993). Syndromes of insulin resistance in the rat. Inducement by diet and amelioration with benfluorex. *Diabetes* 42(3): 457-62.
- Struthers, A. D. and A. D. Morris (2002). Screening for and treating left-ventricular abnormalities in diabetes mellitus: a new way of reducing cardiac deaths. *Lancet* 359(9315): 1430-2.
- Swoap, S. J. (2001). Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(6): H2473-9.
- Sydow, K., C. E. Mondon and J. P. Cooke (2005). Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc Med* 10 Suppl 1: S35-43.
- Tamemoto, H., T. Kadowaki, K. Tobe, T. Yagi, H. Sakura, T. Hayakawa, Y. Terauchi, K. Ueki, Y. Kaburagi, S. Satoh and et al. (1994). Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 372(6502): 182-6.
- Tang, K. M., G. R. Wang, P. Lu, R. H. Karas, M. Aronovitz, S. P. Heximer, K. M. Kaltenbronn, K. J. Blumer, D. P. Siderovski, Y. Zhu and M. E. Mendelsohn (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med* 9(12): 1506-12.
- Tay, A., A. T. Ozcelikay and V. M. Altan (2002). Effects of L-arginine on blood pressure and metabolic changes in fructose-hypertensive rats. *Am J Hypertens* 15(1 Pt 1): 72-7.
- Teff, K. L., S. S. Elliott, M. Tschop, T. J. Kieffer, D. Rader, M. Heiman, R. R. Townsend, N. L. Keim, D. D'Alessio and P. J. Havel (2004). Dietary fructose reduces circulating insulin and leptin, attenuates postprandial suppression of ghrelin, and increases triglycerides in women. *J Clin Endocrinol Metab* 89(6): 2963-72.

- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329(14): 977-86.
- The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (2003). Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 26 Suppl 1: S5-20.
- The Expert Committee on the Diagnosis Classification of Diabetes Mellitus (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 20(7): 1183-97.
- Thurston, J. H., C. A. Levy, S. K. Warren and E. M. Jones (1972). Permeability of the blood-brain barrier to fructose and the anaerobic use of fructose in the brains of young mice. *J Neurochem* 19(7): 1685-96.
- Tran, C. T., J. M. Leiper and P. Vallance (2003). The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler Suppl* 4(4): 33-40.
- UK Prospective Diabetes Study Group (1998). Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352(9131): 837-53.
- Vallance, P., A. Leone, A. Calver, J. Collier and S. Moncada (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339(8793): 572-5.
- Vallance, P. and J. Leiper (2002). Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nat Rev Drug Discov* 1(12): 939-50.
- Verma, S., S. Bhanot and J. H. McNeill (1999). Sympathectomy prevents fructose-induced hyperinsulinemia and hypertension. *Eur J Pharmacol* 373(2-3): R1-4.
- Villalba, A., Iacono, R.F., Valdez, S.N. and E. Poskus (2008). Detection and immunochemical characterization of glutamic acid decarboxylase autoantibodies in patients with autoimmune diabetes mellitus. *Autoimmunity* 41(2):143-53.
- Vincent, M. A., E. J. Barrett, J. R. Lindner, M. G. Clark and S. Rattigan (2003). Inhibiting NOS blocks microvascular recruitment and blunts muscle glucose uptake in response to insulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E123-9.
- Watanabe, K., J. Komatsu, M. Kurata, S. Inaba, S. Ikeda, S. Sueda, J. Suzuki, K. Kohara and M. Hamada (2004). Improvement of insulin resistance by troglitazone ameliorates cardiac sympathetic nervous dysfunction in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 22(9): 1761-8.
- Watanabe, R. M., M. H. Black, A. H. Xiang, H. Allayee, J. M. Lawrence and T. A. Buchanan (2007). Genetics of gestational diabetes mellitus and type 2 diabetes. *Diabetes Care* 30 Suppl 2: S134-40.
- Williams, S. B., J. A. Cusco, M. A. Roddy, M. T. Johnstone and M. A. Creager (1996). Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 27(3): 567-74.

- Withers, D. J., J. S. Gutierrez, H. Towery, D. J. Burks, J. M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G. I. Shulman, S. Bonner-Weir and M. F. White (1998). Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391(6670): 900-4.
- World Health Organisation (1985). Diabetes mellitus. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 727: 1-113.
- World Health Organisation (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Part : Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Geneva: WHO, Department of Noncommunicable Disease Surveillance*: 1-59.
- World Health Organisation Diabetes Unit. from www.who.int/diabetes.
- Wu, R., L. Monassier, M. Pilon, M. A. Laplante, R. Couture and J. de Champlain (2007). Effects of cyclooxygenase inhibitors on oxidative stress, insulin resistance and cardiovascular parameters in a model of type 2 diabetes in rat [Abstract]. *Journal of hypertension* 25 (supp2): S127.
- Wylie-Rosett, J., C. J. Segal-Isaacson and A. Segal-Isaacson (2004). Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference? *Obes Res* 12 Suppl 2: 124S-9S.
- Yamaguchi, Y., K. Yamada, N. Yoshikawa, K. Nakamura, J. Haginaka and M. Kunitomo (2006). Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/NDmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci* 79(26): 2474-9.
- Yang, Z. and D. M. Kaye (2006). Endothelial dysfunction and impaired L-arginine transport in hypertension and genetically predisposed normotensive subjects. *Trends Cardiovasc Med* 16(4): 118-24.
- Yosefy, C., E. Magen, A. Kiselevich, R. Priluk, D. London, L. Volchek and R. J. Viskoper, Jr. (2004). Rosiglitazone improves, while Glibenclamide worsens blood pressure control in treated hypertensive diabetic and dyslipidemic subjects via modulation of insulin resistance and sympathetic activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 44(2): 215-22.
- Yuan, M., N. Konstantopoulos, J. Lee, L. Hansen, Z. W. Li, M. Karin and S. E. Shoelson (2001). Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* 293(5535): 1673-7.
- Zatz, R. and C. Baylis (1998). Chronic nitric oxide inhibition model six years on. *Hypertension* 32(6): 958-64.
- Zeman, R. J., R. Ludemann, T. G. Easton and J. D. Etlinger (1988). Slow to fast alterations in skeletal muscle fibers caused by clenbuterol, a beta 2-receptor agonist. *Am J Physiol* 254(6 Pt 1): E726-32.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372(6505): 425-32.

ANNEXE I - RÉFÉRENCES CITÉES DANS LE TABLEAU VI

- 1 Ingalls AM, Dickie MM, Snell GD. Obese, a new mutation in the house mouse. *The Journal of heredity* 1950; 41:317-318.
- 2 Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science (New York, NY)* 1966; 153:1127-1128.
- 3 Bianchi R, Marelli C, Marini P, Fabris M, Triban C, Fiori MG. Diabetic neuropathy in db/db mice develops independently of changes in atpase and aldose reductase. A biochemical and immunohistochemical study. *Diabetologia* 1990; 33:131-136.
- 4 Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432.
- 5 Snitker S, Pratley RE, Nicolson M, Tataranni PA, Ravussin E. Relationship between muscle sympathetic nerve activity and plasma leptin concentration. *Obesity research* 1997; 5:338-340.
- 6 Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: Molecular characterization and effects of western diet feeding. *Metabolism: clinical and experimental* 2000; 49:22-31.
- 7 Swoap SJ. Altered leptin signaling is sufficient, but not required, for hypotension associated with caloric restriction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H2473-2479.
- 8 Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284:F1138-1144.
- 9 Shao JQ, Iwashita N, Du H, Wang YT, Wang YY, Zhao M, Wang J, Watada H, Kawamori R. Angiotensin ii receptor blocker provides pancreatic beta-cell protection independent of blood pressure lowering in diabetic db/db mice. *Acta Pharmacol Sin* 2007; 28:246-257.
- 10 Yue P, Arai T, Terashima M, Sheikh AY, Cao F, Charo D, Hoyt G, Robbins RC, Ashley EA, Wu J, Yang PC, Tsao PS. Magnetic resonance imaging of progressive cardiomyopathic changes in the db/db mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; 292:H2106-2118.
- 11 Lindstrom P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *TheScientificWorldJournal* 2007; 7:666-685.
- 12 Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *The Tohoku journal of experimental medicine* 1976; 119:85-90.
- 13 Morgan DA, Anderson EA, Mark AL. Renal sympathetic nerve activity is increased in obese zucker rats. *Hypertension* 1995; 25:834-838.
- 14 Cheng ZJ, Vaskonen T, Tikkanen I, Nurminen K, Ruskoaho H, Vapaatalo H, Muller D, Park JK, Luft FC, Mervaala EM. Endothelial dysfunction and salt-sensitive hypertension in spontaneously diabetic goto-kakizaki rats. *Hypertension* 2001; 37:433-439.

- 15 Murakawa Y, Zhang W, Pierson CR, Brismar T, Ostenson CG, Efendic S, Sima AA. Impaired glucose tolerance and insulinopenia in the gk-rat causes peripheral neuropathy. *Diabetes/metabolism research and reviews* 2002; 18:473-483.
- 16 Sato N, Komatsu K, Kurumatani H. Late onset of diabetic nephropathy in spontaneously diabetic gk rats. *American journal of nephrology* 2003; 23:334-342.
- 17 Desrois M, Sidell RJ, Gauguier D, Davey CL, Radda GK, Clarke K. Gender differences in hypertrophy, insulin resistance and ischemic injury in the aging type 2 diabetic rat heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* 2004; 37:547-555.
- 18 Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, Al-Saleh E, Dhaunsi GS, Al-Mulla F. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type ii model of genetic diabetes. *European journal of pharmacology* 2005; 511:53-64.
- 19 Sena CM, Nunes E, Louro T, Proenca T, Seica RM. Endothelial dysfunction in type 2 diabetes: Effect of antioxidants. *Rev Port Cardiol* 2007; 26:609-619.
- 20 Sachidanandam K, Portik-Dobos V, Harris AK, Hutchinson JR, Muller E, Johnson MH, Ergul A. Evidence for vasculoprotective effects of etb receptors in resistance artery remodeling in diabetes. *Diabetes* 2007; 56:2753-2758.
- 21 Bray GA. The zucker-fatty rat: A review. *Federation proceedings* 1977; 36:148-153.
- 22 Kurtz TW, Morris RC, Pershadsingh HA. The zucker fatty rat as a genetic model of obesity and hypertension. *Hypertension* 1989; 13:896-901.
- 23 Morley JE, Mattammal MB. Nitric oxide synthase levels in obese zucker rats. *Neuroscience letters* 1996; 209:137-139.
- 24 Finegood DT, McArthur MD, Kojwang D, Thomas MJ, Topp BG, Leonard T, Buckingham RE. Beta-cell mass dynamics in zucker diabetic fatty rats. Rosiglitazone prevents the rise in net cell death. *Diabetes* 2001; 50:1021-1029.
- 25 Hoshi S, Shu Y, Yoshida F, Inagaki T, Sonoda J, Watanabe T, Nomoto K, Nagata M. Podocyte injury promotes progressive nephropathy in zucker diabetic fatty rats. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2002; 82:25-35.
- 26 Fredersdorf S, Thumann C, Ulucan C, Griese DP, Luchner A, Riegger GA, Kromer EP, Weil J. Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol* 2004; 13:11-19.
- 27 Oltman CL, Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Lund DD, Yorek MA. Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of zucker diabetic fatty and zucker rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E113-122.
- 28 Hakam AC, Hussain T. Renal angiotensin ii type-2 receptors are upregulated and mediate the candesartan-induced natriuresis/diuresis in obese zucker rats. *Hypertension* 2005; 45:270-275.
- 29 Banday AA, Marwaha A, Tallam LS, Lokhandwala MF. Tempol reduces oxidative stress, improves insulin sensitivity, decreases renal dopamine d1 receptor hyperphosphorylation, and restores d1 receptor-g-protein coupling and function in obese zucker rats. *Diabetes* 2005; 54:2219-2226.

- 30 Sista AK, O'Connell MK, Hinohara T, Oommen SS, Fenster BE, Glassford AJ, Schwartz EA, Taylor CA, Reaven GM, Tsao PS. Increased aortic stiffness in the insulin-resistant Zucker fa/fa rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H845-851.
- 31 Bouvet C, de Chantemele EB, Guihot AL, Vessieres E, Bocquet A, Dumont O, Jardel A, Loufrani L, Moreau P, Henrion D. Flow-induced remodeling in resistance arteries from obese Zucker rats is associated with endothelial dysfunction. *Hypertension* 2007; 50:248-254.
- 32 Velasquez MT, Kimmel PL, Michaelis OEt, Carswell N, Abraham A, Bosch JP. Effect of carbohydrate intake on kidney function and structure in SHR/n-cp rats. A new model of NIDDM. *Diabetes* 1989; 38:679-685.
- 33 Nangaku M, Izuhara Y, Usuda N, Inagi R, Shibata T, Sugiyama S, Kurokawa K, van Ypersele de Strihou C, Miyata T. In a type 2 diabetic nephropathy rat model, the improvement of obesity by a low calorie diet reduces oxidative/carbonyl stress and prevents diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:2661-2669.
- 34 Yamaguchi Y, Yamada K, Yoshikawa N, Nakamura K, Haginaka J, Kunitomo M. Corosolic acid prevents oxidative stress, inflammation and hypertension in SHR/ndmcr-cp rats, a model of metabolic syndrome. *Life Sci* 2006; 79:2474-2479.
- 35 Okamoto K, Yamamoto K, Morita N, Ohta Y, Chikugo T, Higashizawa T, Suzuki T. Establishment and use of the m strain of stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens Suppl* 1986; 4:S21-24.
- 36 Ikeda K, Nara Y, Tagami M, Yamori Y. Nitric oxide deficiency induces myocardial infarction in hypercholesterolaemic stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997; 24:344-348.
- 37 Wong VY, Laping NJ, Nelson AH, Contino LC, Olson BA, Gygielko E, Campbell WG, Jr., Barone F, Brooks DP. Renoprotective effects of carvedilol in hypertensive-stroke prone rats may involve inhibition of TGF-beta expression. *Br J Pharmacol* 2001; 134:977-984.
- 38 Manning RD, Jr., Meng S, Tian N. Renal and vascular oxidative stress and salt-sensitivity of arterial pressure. *Acta Physiologica Scandinavica* 2003; 179:243-250.
- 39 Ardiansyah, Shirakawa H, Koseki T, Ohinata K, Hashizume K, Komai M. Rice bran fractions improve blood pressure, lipid profile, and glucose metabolism in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Agric Food Chem* 2006; 54:1914-1920.
- 40 Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, Yamashita T, Tokutomi Y, Dong YF, Matsuba S, Ogawa H, Kim-Mitsuyama S. Pioglitazone exerts protective effects against stroke in stroke-prone spontaneously hypertensive rats, independently of blood pressure. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2007; 38:3016-3022.
- 41 Withers DJ, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of Irs-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391:900-904.
- 42 Kubota N, Tobe K, Terauchi Y, Eto K, Yamauchi T, Suzuki R, Tsubamoto Y, Komeda K, Nakano R, Miki H, Satoh S, Sekihara H, Sciacchitano S, Lesniak M, Aizawa S, Nagai R, Kimura S, Akanuma Y, Taylor SI, Kadowaki T. Disruption of

- insulin receptor substrate 2 causes type 2 diabetes because of liver insulin resistance and lack of compensatory beta-cell hyperplasia. *Diabetes* 2000; 49:1880-1889.
- 43 Janson J, Soeller WC, Roche PC, Nelson RT, Torchia AJ, Kreutter DK, Butler PC. Spontaneous diabetes mellitus in transgenic mice expressing human islet amyloid polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:7283-7288.
 - 44 Vidal J, Verchere CB, Andrikopoulos S, Wang F, Hull RL, Cnop M, Olin KL, LeBoeuf RC, O'Brien KD, Chait A, Kahn SE. The effect of apolipoprotein e deficiency on islet amyloid deposition in human islet amyloid polypeptide transgenic mice. *Diabetologia* 2003; 46:71-79.
 - 45 Butler AE, Jang J, Gurlo T, Carty MD, Soeller WC, Butler PC. Diabetes due to a progressive defect in beta-cell mass in rats transgenic for human islet amyloid polypeptide (hip rat): A new model for type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53:1509-1516.
 - 46 El Midaoui A, de Champlain J. Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 2002; 39:303-307.
 - 47 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.
 - 48 Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 1987; 10:512-516.
 - 49 Kobayashi R, Nagano M, Nakamura F, Higaki J, Fujioka Y, Ikegami H, Mikami H, Kawaguchi N, Onishi S, Ogihara T. Role of angiotensin ii in high fructose-induced left ventricular hypertrophy in rats. *Hypertension* 1993; 21:1051-1055.
 - 50 Zaoui P, Rossini E, Pinel N, Cordonnier D, Halimi S, Morel F. High fructose-fed rats: A model of glomerulosclerosis involving the renin-angiotensin system and renal gelatinases. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1999; 878:716-719.
 - 51 Puyo AM, Mayer MA, Cavallero S, Donoso AS, Peredo HA. Fructose overload modifies vascular morphology and prostaglandin production in rats. *Autonomic & autacid pharmacology* 2004; 24:29-35.
 - 52 Delbosc S, Paizanis E, Magous R, Araiz C, Dimo T, Cristol JP, Cros G, Azay J. 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* 2005; 179:43-49.
 - 53 Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292:F423-429.
 - 54 Ishibashi S. The vascular renin-angiotensin system as a possible source of vascular inflammation in fructose-fed rats. *Hypertens Res* 2007; 30:375-376.
 - 55 Rajasekar P, Palanisamy N, Anuradha CV. Increase in nitric oxide and reductions in blood pressure, protein kinase c beta ii and oxidative stress by l-carnitine: A study in the fructose-fed hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens* 2007; 29:517-530.

- 56 Masek J, Fabry P. High-fat diet and the development of obesity in albino rats. *Experientia* 1959; 15:444-445.
- 57 Oakes ND, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ, Kraegen EW. Mechanisms of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high-fat feeding. *Diabetes* 1997; 46:1768-1774.
- 58 Roberts CK, Vaziri ND, Wang XQ, Barnard RJ. Enhanced no inactivation and hypertension induced by a high-fat, refined-carbohydrate diet. *Hypertension* 2000; 36:423-429.
- 59 Dobrian AD, Davies MJ, Schriver SD, Lauterio TJ, Prewitt RL. Oxidative stress in a rat model of obesity-induced hypertension. *Hypertension* 2001; 37:554-560.
- 60 Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JA, Jen KL, Dunbar JC. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain research bulletin* 2003; 61:511-519.
- 61 Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *American journal of physiology* 2004; 287:R943-949.
- 62 Danda RS, Habiba NM, Rincon-Choles H, Bhandari BK, Barnes JL, Abboud HE, Pergola PE. Kidney involvement in a nongenetic rat model of type 2 diabetes. *Kidney Int* 2005; 68:2562-2571.
- 63 Obrosova IG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, Pavlov IA, Mashtalir N, Nadler JL, Drel VR. High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: Effects of "Healthy" Diet and aldose reductase inhibition. *Diabetes* 2007; 56:2598-2608.
- 64 Zecchin HG, Priviero FB, Souza CT, Zecchin KG, Prada PO, Carnevali JB, Velloso LA, Antunes E, Saad MJ. Defective insulin and acetylcholine induction of endothelial cell-nitric oxide synthase through insulin receptor substrate/akt signaling pathway in aorta of obese rats. *Diabetes* 2007; 56:1014-1024.
- 65 Pinheiro AR, Cunha AR, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17:365-375.
- 66 Hackel DB, Mikat E, Lebovitz HE, Schmidt-Nielsen K, Horton ES, Kinney TD. The sand rat (*psammomys obesus*) as an experimental animal in studies of diabetes mellitus. *Diabetologia* 1967; 3:130-134.
- 67 Hilzenrat N, Sikuler E, Yaari A, Maislos M. Hemodynamic characterization of the diabetic *psammomys obesus*--an animal model of type ii diabetes mellitus. *Israel journal of medical sciences* 1996; 32:1074-1078.
- 68 Raz I, Wexler I, Weiss O, Flyvbjerg A, Segev Y, Rauchwerger A, Raz G, Khamaisi M. Role of insulin and the igf system in renal hypertrophy in diabetic *psammomys obesus* (sand rat). *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:1293-1298.
- 69 El Aoufi S, Gendre P, Sennoune SR, Rigoard P, Maixent JM, Griene L. A high calorie diet induces type 2 diabetes in the desert sand rat (*psammomys obesus*). *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)* 2007; 53 Suppl:OL943-953.

- 70 Pilon M, Wu R, Huot-Marchand J-É, deBlois D, de Champlain J, Couture R. Acceleration of glucose-induced type ii diabetes by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in the rat. *Journal of hypertension* 2007; 25 (suppl 2):S280.
- 71 Wu R, Monassier L, Pilon M, Laplante MA, Couture R, de Champlain J. Effects of cyclooxygenase inhibitors on oxidative stress, insulin resistance and cardiovascular parameters in a model of type 2 diabetes in rat [abstract]. *Journal of hypertension* 2007; 25 (suppl 2):S127.
- 72 Pilon M, Wu R, Huot-Marchand J-É, deBlois D, de Champlain J, Couture R. Involvement of nitric oxide in the development of type 2 diabetes and vascular remodelling in glucose-fed rats. *Journal of Hypertension* 2008 (soumis en janvier);
- 73 Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 2000; 35:1009-1015.
- 74 Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL. Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285:F619-628.
- 75 Mu J, Woods J, Zhou YP, Roy RS, Li Z, Zycband E, Feng Y, Zhu L, Li C, Howard AD, Moller DE, Thornberry NA, Zhang BB. Chronic inhibition of dipeptidyl peptidase-4 with a sitagliptin analog preserves pancreatic beta-cell mass and function in a rodent model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2006; 55:1695-1704.
- 76 Sedova L, Berube J, Gaudet D, Dumont M, Tremblay J, Hamet P, Pausova Z. Diet-induced obesity delays cardiovascular recovery from stress in spontaneously hypertensive rats. *Obesity research* 2004; 12:1951-1958.
- 77 Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension* 2007;