

Université de Montréal

L'expression des gènes du Système Rénine Angiotensine (SRA)

dans les tubules proximaux

de rein de rats diabétiques (type I) et de rats spontanément hypertenseurs (SHR)

Par  
Pierre Fustier

Département de physiologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Maîtrise

en physiologie

Août 2004

©, Pierre Fustier, 2004



w

4

U58

2004

v. 150



**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

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**

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  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

L'expression des gènes du Système Rénine Angiotensine (SRA)

dans les tubules proximaux

de rein de rats diabétiques (type 1) et de rats spontanément hypertenseurs (SHR)

Présenté par :  
Pierre Fustier

A été évalué par les personnes suivantes :

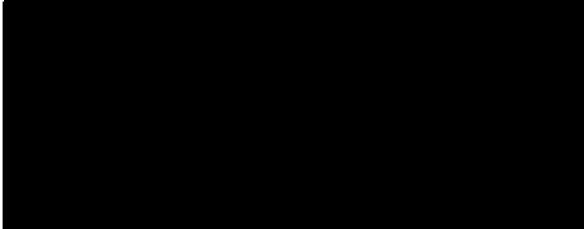
Jean-Louis Chiasson  
Président-rapporteur

John S.D. Chan  
Directeur de recherche

Pavel Hamet  
Codirecteur

Lise Coderre  
Membre du jury

Montréal, le 18 décembre 2003



**Objet : Autorisation de déposer votre mémoire de maîtrise sous forme d'articles**

Monsieur,

Suite à votre demande, j'ai le plaisir de vous autoriser à présenter votre mémoire de maîtrise sous forme d'articles. Il est entendu que vous devrez vous soumettre aux conditions minimales de dépôt décrites dans le "*Guide de présentation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat*", édition mars 2001. Ce document est disponible sur le site de la FES. Vous pouvez également vous le procurer à la Librairie de l'Université de Montréal.

Cependant, afin de respecter la loi canadienne sur les droits d'auteurs, vous devrez, au moment du dépôt de votre mémoire, remettre, avec les formulaires de reproduction et diffusion dûment complétés et signés, les déclarations écrites de tous les coauteurs des articles inclus dans votre mémoire autorisant la reproduction et la diffusion de votre mémoire de maîtrise (tel que mentionné dans le guide de présentation des mémoires de maîtrise... à l'annexe II, page 55).

Veillez recevoir, Monsieur, l'expression de mes sentiments les meilleurs.



Réjean Couture  
Responsable du programme de physiologie  
Département de physiologie  
Faculté de Médecine

CC: John S.D. Chan, Pavel Hamet  
Faculté des Études supérieures - Grades

December 30, 2003

John S.D. Chan, Ph.D.  
Chief, Lab of Molecular Nephrology and Endocrinology  
Universite de Montreal  
Centre Hospitalier de l'Universite de Montreal-Hotel-Dieu  
Centre de recherche  
Pavillon Masson  
Montreal, Quebec  
Canada H2W 1T8

Dear Dr. Chan:

The Endocrine Society grants permission to reproduce Figures 1-10 from Hsieh et al, "High Glucose Stimulates Angiotensinogen Gene Expression and Cell Hypertrophy via Activation of the Hexosamine Biosynthesis Pathways in Rat Kidney Proximal Tubular Cells", *Endocrinology*, Volume 144, p. 4338-4349, 2003, in your thesis contingent upon the following conditions:

1. That you give proper credit to the author(s) and to *Endocrinology*, including in your citation the title of article, volume, issue number, date, and page numbers.
2. That you include the statement, *Copyright 2003. The Endocrine Society*.

**Please understand that permission is granted for one-time use only. Permission must be requested separately for future editions, revisions, translations, derivative works, and promotional pieces.**

Thank you for your interest in The Endocrine Society.



Cordially,

Adrienne Weber  
Publications Journal Coordinator

### A qui de droit

Nous, sous-signés, agréons et consentons que Monsieur Pierre Fustier utilise les articles suivants dans son mémoire de maîtrise intitulé « l'expression des gènes du système rénine angiotensine (SRA) dans les tubules proximaux du rein de rats diabétiques (type I) et de rats spontanément hypertenseurs (SHR) » afin d'être soumis à la faculté des études supérieures, Université de Montréal.

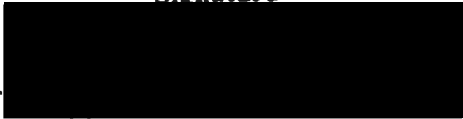

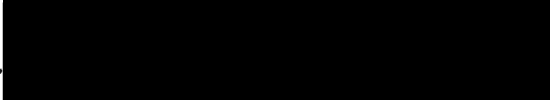
Tusty-Jiuan Hsieh, Pierre Fustier, Shao-Ling Zhang, Janos G. Filep, Shioh-Shih Tang, Julie R. Ingelfinger, I. George Fantus, Pavel Hamet and John S.D. Chan: HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS. Endocrinology 144(10):4338-4349.

Nom	Signature	Date
John.S.D Chan .....		Dec 29, 2003
Pavel Hamet.....		
Janos G. Filep.....		
Shioh-Shih Tang.....		
Julie R. Ingelfinger.....		
Tusty-Jiuan Hsieh.....		Dec 29, 2003
Shao-Ling Zhang.....		
I. George Fantus.....		

### A qui de droit

Nous, sous-signés, agréons et consentons que Monsieur Pierre Fustier utilise les articles suivants dans son mémoire de maîtrise intitulé « l'expression des gènes du système rénine angiotensine (SRA) dans les tubules proximaux du rein de rats diabétiques (type I) et de rats spontanément hypertenseurs (SHR) » afin d'être soumis à la faculté des études supérieures, Université de Montréal.

Tusty-Jiuan Hsieh, Pierre Fustier, Shao-Ling Zhang, Janos G. Filep, Shlow-Shih Tang, Julie R. Ingelfinger, I. George Fantus, Pavel Hamet and John S.D. Chan: HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS. *Endocrinology* 144(10):4338-4349.

Nom	Signature	Date
John.S D Chan .....		<i>Dec 29, 2003</i>
Pavel Hamet.....		
Janos G. Filep.....		
Shiow-Shih Tang.....		<i>Dec 31, 2003</i>
Julie R. Ingelfinger.....		
Tusty-Jiuan Hsieh.....		<i>Dec 29, 2003</i>
Shao-Ling Zhang.....		
I. George Fantus.....		



### A qui de droit

Nous, sous-signés, agréons et consentons que Monsieur Pierre Fustier utilise les articles suivants dans son mémoire de maîtrise intitulé « l'expression des gènes du système rénine angiotensine (SRA) dans les tubules proximaux du rein de rats diabétiques (type I) et de rats spontanément hypertenseurs (SHR) » afin d'être soumis à la faculté des études supérieures, Université de Montréal.

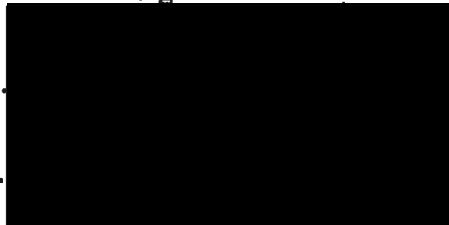
Tusty-Jiuan Hsieh, Pierre Fustier, Shao-Ling Zhang, Janos G. Filep, Shiow-Shih Tang, Julie R. Ingelfinger, I. George Fantus, Pavel Hamet and John S.D. Chan: HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS. *Endocrinology* 144(10):4338-4349.

Nom

Signature

Date

John.S.D Chan .....



Dec 29, 2003

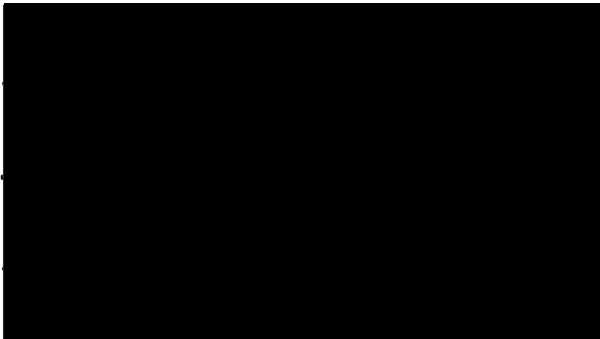
Pavel Hamet.....

Jan 5, 2004

Janos G. Filep.....

Shiow-Shih Tang.....

Julie R. Ingelfinger..



Dec 29, 2003

Tusty-Jiuan Hsieh...

Dec 29, 2003

Shao-Ling Zhang....




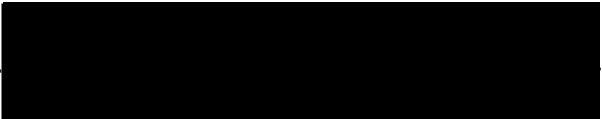
Dec 29, 2003

I. George Fantus.....

### A qui de droit

Nous, sous-signés, agréons et consentons que Monsieur Pierre Fustier utilise les articles suivants dans son mémoire de maîtrise intitulé « l'expression des gènes du système rénine angiotensine (SRA) dans les tubules proximaux du rein de rats diabétiques (type I) et de rats spontanément hypertenseurs (SHR) » afin d'être soumis à la faculté des études supérieures, Université de Montréal.

Tusty-Jiuan Hsieh, Pierre Fustier, Shao-Ling Zhang, Janos G. Filep, Shiow-Shih Tang, Julie R. Ingelfinger, I. George Fantus, Pavel Hamet and John S.D. Chan: HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS. Endocrinology 144(10):4338-4349.

Nom	Signature	Date
John.S.D Chan .....		<i>Dec 29, 2003</i>
Pavel Hamet.....		
Janos G. Filep.....		<i>January 8, 2004</i>
Shiow-Shih Tang.....		
Julie R. Ingelfinger.....		
Tusty-Jiuan Hsieh.....		<i>Dec 29, 2003</i>
Shao-Ling Zhang.....		
I. George Fantus.....		

**Subject: Permission to reprint of our paper**

**Date: Tue, 23 Dec 2003 09:58:55 -0500**

**From: John Chan**

**To:**

Dr. Jeffrey E. Pessin  
Editor-in-Chief, Endocrinology

Dear Dr. Pessin,

I would like to request permission to reprint one of our papers as part of my student's (Pierre Fustier) M.Sc. thesis.

Tusty-Jiuan Hsieh, Pierre Fustier, Shaoling Zhang, Janos G. Filep, Shioh-Shih Tang, Julie R. Ingelfinger, I. George Fantus, Pavel Hamet and John S.D. Chan: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of the hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. Endocrinology 144: 4338-4349, 2003.

Thank you very much for your attention and assistance.

Yours truly,

John S.D. Chan, Ph.D.

Chief, Lab. of Molecular Nephrology and Endocrinology

CHUM, Hotel-Dieu Hospital

Pavillon Masson

3850 Saint Urbain Street

Montreal, Quebec

Canada H2W 1T8

Phone: (514) 890-8000 extension 15080

Fax: (514) 412-7204

## Résumé

Les bloqueurs du système rénine angiotensine (SRA) ont été utilisés dans le traitement et la prévention de l'hypertension et de la néphropathie diabétique. L'existence d'un SRA local intrarénal est désormais acceptée, mais la régulation de l'expression du SRA intrarénal ainsi que ses rôles physiologiques restent encore à découvrir. Les objectifs de cette étude sont : 1) d'étudier le rôle(s) de la voie des hexosamines dans la médiation de l'effet de l'hyperglycémie sur l'expression du gène de l'angiotensinogène (ANG) dans les cellules immortalisées de tubules proximaux de reins (CITPR). 2) d'étudier le rôle(s) du SRA intrarénal dans l'induction de la résistance à l'insuline sur l'inhibition du gène de l'ANG dans les CITPR. ; Et 3) d'étudier l'expression des gènes du SRA dans les tubules proximaux du rein de différentes souches de rats : Wistar, Sprague-Dawley (SD), rats spontanément hypertendus (SHR) et rats spontanément diabétiques (BioBreeding).

Les CITPR sont cultivées en milieu « normal » (5mM glucose) ou riche en glucose (25mM glucose) en absence ou présence de glucosamine, d'inhibiteurs de la protéine kinase C (PKC) et de la glutamine : fructose-6-phosphate aminotransférase (GFAT), ou des bloqueurs du SRA. La protéine et l'ARNm de l'ANG ont été quantifiés respectivement par immunobuvardage et par transcription inverse suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR). La phosphorylation des MAPK p38 et p44/42, de la protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc (CREB) et du facteur d'activation de la transcription (ATF-2) a été étudiée par immunobuvardage avec des anticorps anti-phospho p-p38 MAPK, p-p44/42 MAPK, p-CREB et p-ATF-2. De plus, les rats SD, Wistar et SHR ont développé le diabète suite à l'injection de streptozotocine (STZ) avec ou sans la normalisation de la glycémie par un implant d'insuline. Les tubules proximaux du rein ont été isolés et l'expression des gènes du SRA, de l'ANG, de la rénine, de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA et ECA2), du récepteur AT1 (AT1a et AT1b) et du récepteur AT2 a été quantifiée par RT-PCR.

Cette étude montre que la voie des hexosamines peut médier, en partie, l'effet de l'hyperglycémie sur l'expression du gène de l'ANG dans les CITPR. L'activation chronique du SRA intrarénal par l'hyperglycémie induit la résistance à l'insuline sur l'inhibition de l'expression du gène de l'ANG dans les CITPR. L'expression de l'ARNm de l'ANG est augmentée dans les différentes souches de rats lors du diabète, et les implants d'insuline

normalisent cette expression chez les rats diabétiques Wistar, BB et SHR, mais pas chez les SD. Il apparaît certaines différences significatives dans l'expression des autres gènes du SRA entre les rats normaux et diabétiques avec ou sans implant d'insuline dans les différentes souches de rats.

Pour conclure, ces études démontrent que l'expression intrarénale du gène de l'ANG peut jouer un rôle important dans le développement de la néphropathie diabétique.

**Mots-clés** : Système Rénine- Angiotensine, tubule proximal, diabète, hypertension.

## Summary

Blockers of the renin-angiotensin system (RAS) have been used in the treatment and the prevention of hypertension and diabetic nephropathy. The existence of local intrarenal RAS is now generally accepted, but regulation of expression of intrarenal RAS and its physiological role are still not defined. The objectives of present studies are : 1) to study the role(s) of hexosamine biosynthesis pathway (HBP) in mediating the high glucose effect on angiotensinogen (ANG) gene expression in immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs); 2) to investigate the role(s) of intrarenal RAS in the induction of resistance to insulin inhibition on ANG gene in IRPTCs; and 3) to investigate the expression of RAS genes in kidney proximal tubular cells of diabetic rats of various strains: Wistar, Sprague-Dawley (SD), spontaneously hypertensive rats (SHR) and of spontaneously diabetic rats (BioBreeding).

Rat IRPTCs were cultured in monolayer in normal glucose (ie 5mM) or high glucose (ie 25mM) medium in the absence or presence of glucosamine, protein kinase C (PKC) and glucosamine :fructose-6-phosphate aminotransferase (GFAT) inhibitors, or blockers of RAS. ANG and ANGmRNA expression were quantified by Western blotting and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Phosphorylation of p38- and p44/42 MAPK, cAMP responsive element binding protein (CREB) and activating transcription factor-2 (ATF-2) were assessed by Western blots with anti-phospho p-p38 MAPK, p-p44/42 MAPK, p-CREB and p-ATF-2 antibodies respectively. Furthermore, SD, Wistar and SHR were induced diabetic with streptozotocin (STZ) with or without normalization of blood glucose levels with insulin implant. Kidney proximal tubular cells were isolated and the expression of RAS genes, i.e. ANG, renin, angiotensin converting enzyme (ACE and ACE2), AT1 receptor (AT1a and AT1b) and AT2 receptor were quantified by RT-PCR.

Our studies demonstrated that Hexosamine biosynthesis pathway (HBP) may mediate, at least in part, the high glucose effect on ANG gene expression in IRPTCs. Chronic activation of intrarenal RAS by high glucose induces resistance to insulin inhibitions on ANG gene expression in IRPTCs. ANG mRNA expression increased with diabetes in all strains, and insulin implants normalizes ANG mRNA expression in diabetic Wistar, BB and SHR rats but not in diabetic SD rats. It appears that there is significant differences in the expression of

other RAS genes among normal and diabetics rats with or without insulin implant in all strains of rats.

In conclusion, our studies demonstrate that intrarenal ANG gene expression might play an important role in the development of diabetic nephropathy.

**Key word:** Renin Angiotensin system, kidney proximal tubular cells, diabetes, hypertension.

## TABLE DES MATIERES

Résumé .....	I
Summary .....	III
Liste des figures .....	VIII
Liste des tableaux .....	X
Liste des abréviations.....	XI
Remerciements .....	XIII
<b>1. INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Le diabète sucré.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Histoire et découverte de l'insuline.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2 Diagnostic et classification du diabète sucré.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.3 Le diabète sucré de type 1.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.3.1 Le diabète sucré de type 1 auto-immun .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3.1.1 Le système HLA .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3.1.2 Facteurs environnementaux .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.3.1.3 Le système immunitaire.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1.3.2 Le diabète sucré de type 1 idiopathique .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4 Le diabète sucré de type 2.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4.1 Génétique .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1.4.2 Résistance périphérique à l'insuline.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.4.3 Dysfonction des cellules <math>\beta</math> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.4.4 Gluco- et lipotoxicité .....</b>	<b>9</b>
<b>1.1.5 Type spécifique de diabète : MODY.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.6 Les complications associées au diabète.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.6.1 La microangiopathie .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.6.1.1 Complications oculaires.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.6.1.2 Complications rénales .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.6.2 La macroangiopathie .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.6.3 Les complications neurologiques .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.6.4 Les complications cutanées.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2 La néphropathie diabétique .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1 La néphropathie évoluée selon 5 stades .....</b>	<b>14</b>
<b>1.2.1.1 La néphropathie fonctionnelle .....</b>	<b>14</b>



1.2.1.2	La néphropathie silencieuse .....	14
1.2.1.3	La néphropathie débutante .....	14
1.2.1.4	La néphropathie avérée .....	14
1.2.1.5	Insuffisance rénale terminale .....	14
1.2.2	Microalbuminurie .....	15
1.2.3	Pathogénie .....	16
1.2.4	Mécanismes moléculaires des dommages liés à l'hyperglycémie.....	16
1.2.4.1	La voie des polyols.....	16
1.2.4.2	L'activation de la protéine kinase C .....	18
1.2.4.3	La voie des hexosamines .....	19
1.2.4.4	La glycation.....	20
1.2.4.5	Un élément commun reliant les dommages induits par l'hyperglycémie : le stress oxydatif. ....	21
1.3	L'hypertension et le diabète .....	23
1.4	Le système Rénine Angiotensine (SRA) dans la néphropathie diabétique. .	26
1.4.1	Le système Rénine Angiotensine (SRA) .....	26
1.4.1.1	Le système Rénine Angiotensine (SRA) local intrarénal.....	26
1.4.1.2	L'Angiotensinogène.....	28
1.4.1.3	La Rénine .....	28
1.4.1.4	L'Enzyme de Conversion de l'Angiotensinogène (ECA).....	29
1.4.1.5	L'Angiotensine II et ses récepteurs – AT1 et AT2 .....	29
1.4.1.5.1	Les effets de l'angiotensine II.....	29
1.4.1.5.2	Les récepteurs AT1 et AT2.....	31
1.4.2	Blocage du système rénine-angiotensine .....	31
1.4.2.1	Les Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Ang II (IEC).....	31
1.4.2.2	Les Inhibiteurs de la rénine.....	32
1.4.2.3	Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II.....	32
1.5	L'insuline.....	33
1.5.1	Le récepteur de l'insuline .....	34
1.5.2	Le réseau de signalisation intracellulaire insulino-dépendant. ....	36
1.5.2.1	La voie de la PI(3)K .....	37
1.5.2.2	La voie des MAPK.....	39
2.	HYPOTHESE ET OBJECTIFS .....	41

<b>3.</b>	<b>HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS .....</b>	<b>42</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>43</b>
	<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>44</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>45</b>
	<b>RESULTS .....</b>	<b>52</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>54</b>
	<b>ACKNOWLEDGEMENT .....</b>	<b>60</b>
	<b>REFERENCES.....</b>	<b>61</b>
	<b>FIGURE LEGENDS .....</b>	<b>70</b>
<b>4.</b>	<b>RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM BLOCKADE RESTORES THE INHIBITORY ACTION OF INSULIN ON ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS IN HIGH GLUCOSE .....</b>	<b>81</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>82</b>
	<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>84</b>
	<b>MATERIALS AND METHODS.....</b>	<b>85</b>
	<b>RESULTS .....</b>	<b>90</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>93</b>
	<b>ACKNOWLEDGEMENTS.....</b>	<b>98</b>
	<b>LEGENDS TO FIGURES .....</b>	<b>110</b>
<b>5.</b>	<b>METHODES ET RESULTATS SUPPLEMENTAIRES .....</b>	<b>124</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>136</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>141</b>

## Liste des figures

### 1. INTRODUCTION

**Figure 1.1 :** Interactions entre génétique, facteurs environnementaux et système immunitaire lors de destruction auto-immune des cellules  $\beta$ .

**Figure 1.2 :** Interactions entre résistance à l'insuline, dysfonction des cellules  $\beta$  ainsi que gluco- et lipotoxicité dans la pathogenèse du diabète de type 2.

**Figure 1.3 :** Représentation de l'histoire naturelle de la néphropathie diabétique.

**Figure 1.4 :** La voie des polyols et l'aldose réductase.

**Figure 1.5 :** Conséquences de l'activation de la PKC par l'hyperglycémie.

**Figure 1.6 :** Schéma hypothétique de l'effet de l'hyperglycémie (high glucose) et de la glucosamine (hexosamine) sur la voie anti apoptotique de l'insuline dans les cellules  $\beta$  pancréatiques.

**Figure 1.7 :** La production d'anion superoxyde par la chaîne de transporteurs d'électrons

**Figure 1.8 :** Le mécanisme probable par lequel l'hyperglycémie induirait la surproduction d'anion superoxyde mitochondrial qui active quatre voies des dommages liés à l'hyperglycémie.

**Figure 1.9 :** La cascade rénine-angiotensine

**Figure 1.10 :** A- Expression du SRA ; B- Organisation d'un rein humain.

**Figure 1.11 :** L'insuline.

**Figure 1.12 :** Cartographie des différents domaines du récepteur de l'insuline dans l'espèce humaine.

**Figure 1.13 :** La phosphorylation induite par l'insuline de résidus Sérines (pS) Tyrosines (pY) des protéines IRS-1.

**Figure 1.14 :** Le signal de transduction dans l'action de l'insuline

### 3. HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS.

**Figure 3.1:** Effect of glucosamine (GLcN) on rat ANG and renin mRNA expression in IRPTCs.

**Figure 3.2.:** Effect of azaserine (AZA) and DON on rat ANG mRNA expression in IRPTCs.

**Figure 3.3:** Effects of SB 203580, GF 109203X and Calphostin C on rat ANG mRNA and ANG expression in IRPTCs cultured in the presence of GlcN.

**Figure 3.4.:** Effect of GlcN on p38 MAPK phosphorylation in IRPTCs.

**Figure 3.5:** Effect of GlcN on ATF-2 phosphorylation in IRPTCs.

**Figure 3.6:** Effect of GlcN on CREB phosphorylation in IRPTCs.

**Figure 3.7:** Effect of GlcN, AZA, GF 109203X and SB 203580 on cellular hypertrophy in IRPTCs.

**Figure 3.8:** Effect of high glucose, AZA, GF 109203X and SB 203580 on cellular hypertrophy in IRPTCs.

**Figure 3.9:** Effect of GlcN, high glucose, AZA and GF 109203X on cellular p27<sup>Kip1</sup> levels in IRPTCs.

**Figure 3.10:** Effect of GlcN, high glucose, AZA and GF 109203X on cellular protein levels in IRPTCs.

#### **4. RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM BLOCKADE RESTORES THE INHIBITORY ACTION OF INSULIN ON ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS IN HIGH GLUCOSE.**

**Figure 4.1:** Effect of RAS blockers, PKC inhibitor, Ang II, and PMA on basal ANG mRNA expression in IRPTCs.

**Figure 4.2:** Co-incubation with losartan or PD 123319 restores the insulin action on ANG mRNA expression in IRPTCs in high glucose medium.

**Figure 4.3:** Co-incubation with ACE inhibitors and GF 109203X restores the insulin action on ANG mRNA expression in IRPTCs in high glucose medium.

**Figure 4.4:** Ang II and PMA induce resistance to insulin inhibition on ANG mRNA expression in IRPTCs.

**Figure 4.5:** Effect of Ang II, PMA, RAS inhibitors and GF 109203X on basal p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs.

**Figure 4.6:** Effect of losartan and PD 123319 on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose medium.

**Figure 4.7:** Effect of ACE-inhibitors and GF 109203X on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose medium.

**Figure 4.8:** Ang II and PMA induce insulin resistance on p44/42 MAPK activation in IRPTCs.

## 5. MÉTHODES ET RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

**Figure 5.1:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ANG dans les CTPR de rats Wistar (A), SD (B), SHR (C) et BB (D).

**Figure 5.2:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène rénine dans les CTPR de rats Wistar (A), SD (B), SHR (C) et BB (D).

**Figure 5.3:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ECA dans les CTPR de rats Wistar (A), SD (B), SHR (C) et BB (D).

**Figure 5.4:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ECA2 dans les CTPR de rats Wistar (A), SD (B), SHR (C) et BB (D).

**Figure 5.5:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT1a dans les CTPR de rats Wistar (A), SD (B), SHR (C) et BB (D).

**Figure 5.6:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT1b dans les CTPR de rats Wistar (A), SD (B), SHR (C) et BB (D).

## Liste des tableaux

### 1. INTRODUCTION

**Table 1.1** : Critères de diagnostic du diabète sucré.

**Tableau 1.2** : Classification étiologique du diabète sucré (selon ADA et OMS 1998).

### 5. MÉTHODES ET RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

**Table 5.1**: Oligonucléotides.

## Liste des abréviations

ABCD	Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGE	Advanced glycation end-product ou produits de dégradation du glucose
AMPc	Adénosine-monophosphate cyclique
ANG	Angiotensinogène
Ang I	Angiotensine I
Ang II	Angiotensine II
ARNm	Acide ribonucléique messenger
AT1,2,3 ou 4	Récepteur de type 1,2,3 ou 4 de l'angiotensine II
AT1a, ou b	Récepteur de type 1a ou 1b de l'angiotensine II
CAGE	Chymostatin-sensitive Ang-II-generating enzyme
CITPR	Cellules immortalisées de tubule proximal de rein
CRE	Élément de réponse à l'AMPc
CREB	Protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc
CTPR	Cellules de tubule proximal de rein
DAG	Diacylglycérol
DID	Diabète insulino-dépendant
DIDN	Diabète non insulino-dépendant
ECA	Enzyme de conversion de l'angiotensine
ERE	Élément de réponse aux oestrogènes
FACET	Fosinopril versus Amlodipine Cardiovascular Events Randomized Trial
Fructose-6P	Fructose-6 phosphate
GAPDHase	Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GFAT	Glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransférase
GPx	Glutathion peroxydase
GRB-2	Growth factor receptor bound protein 2
GRE	Élément de réponse aux glucocorticoïdes
Glucosamine-6P	Glucosamine-6 phosphate
GSH	Glutathion
HOPE	Heart Outcomes Prevention Evaluation
HOT	Hypertension Optimal Treatment trial

IRS-1	Insulin-receptor substrate 1
HSE	Élément de réponse aux protéines de choc thermique
HTA	Hypertension Artérielle
IEC	Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Ang II
KO	Knock out
MAPK	Mitogen Activated Protein-kinase
MCV	Maladies cardiovasculaires
MICRO-HOPE	Microalbuminuria and cardiovascular and renal outcomes HOPE
MIDAS	Multicentre Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study
MRFIT	Multiple risk factor intervention trial
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor- kappa B
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PA	Pression Artérielle
PAD	Pression Artérielle Diastolique
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PKC	Protéine kinase C
PI(3)K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PtdIns(3,4,5)P <sub>3</sub>	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
RAGE	Récepteur aux produits de dégradation du glucose
REN	Rénine
ROS	Reactive oxygen species ou espèce réactive de l'oxygène
SD	Sorbitol déshydrogénase
SHEP	Systolic Hypertension in the Elderly Program
SHPTP2	Protéine tyrosine phosphatase Syp
SHR	Spontaneously hypertensive rat
SOD	Superoxyde dismutase
SRA	Système Rénine Angiotensine
STZ	Streptozotocine
Syst Eur	Systolic Hypertension in Europe Trial Investigators
t-PA	tissue plasminogen activator.
TRE	Éléments de réponse aux hormones thyroïdes
UDP-GlcNAc	Uridine Diphosphate N-Acétyleglucosamine
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study



## Remerciements

J'aimerais remercier sincèrement mon superviseur, le Docteur John S.D. Chan, pour sa confiance, son soutien, sa patience et pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ce travail dans les meilleures conditions.

Je remercie également mon codirecteur, le Docteur Pavel Hamet pour sa direction académique et les conseils scientifiques qui ont alimenté mon étude.

Je voudrais remercier le Docteur Tusty-Juan Hsieh pour sa disponibilité, sa gentillesse et l'attention qu'elle a porté sur mon travail au quotidien.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le Docteur Jean-Louis Chiasson pour avoir présidé mon jury, et ces remerciements vont également au Docteur Lise Coderre qui a accepté d'être le rapporteur de mes travaux. Mon manuscrit y a largement gagné.

Je remercie le Docteur Sébastien Sachetelli pour son amitié et ses qualités d'imprimeurs, ainsi que tout les membres du laboratoire, du centre de recherche et de l'animalerie de l'Hôtel-Dieu pour leur aide et leur amitié.

Enfin, je veut remercier mes parents pour m'avoir aider à concrétiser ce projet et pour m'avoir soutenu durant toutes mes études.

# 1. INTRODUCTION

## 1.1 Le diabète sucré

### 1.1.1 Histoire et découverte de l'insuline

Le diabète de type 1 est connu depuis l'Antiquité. L'affection fut décrite en 1550 av. J.-C. dans le manuscrit égyptien Ebers sous le terme « urines très abondantes ». Ce fut tout d'abord des siècles de triste contemplation avant la recherche de l'origine du diabète.

Au premier siècle, c'est à Aretée de Cappadoce que l'on doit la description initiale et la plus précise du diabète. Deux milles ans plus tard il n'y a pas grand-chose à ajouter à sa description clinique : « Le diabète est une maladie remarquable mais heureusement plutôt rare. Elle consiste en une liquéfaction des chairs et des parties solides du corps dans l'urine. Les reins et la vessie qui sont les passages habituels de ce fluide ne cessent d'émettre de l'urine, l'émission est profuse et sans limites, comme si les aqueducs étaient grand ouverts. Le développement de la maladie est progressif mais courte sera la vie de l'homme chez lequel la maladie est complètement développée. Un amaigrissement rapide se produit et la mort survient vite. La vie pour le patient est difficile et douloureuse. Le désir de boire devient de plus en plus impérieux mais, quelle que soit la quantité qu'il absorbe, (la soif) n'est jamais satisfaite et il perd plus d'urines qu'il ne boit. D'où il me semble que cette affection a reçu le nom de diabètes, ce qui signifie siphon, car les fluides ne restent pas dans le corps qu'ils utilisent comme un canal à travers lequel ils peuvent passer ».

La notion de sucre apparue vers le VI<sup>e</sup> siècle dans la littérature Védique sous le terme « urines de miel ». Thomas Willis au XV<sup>e</sup> siècle constate que les urines des diabétiques sont sucrées, mais c'est à Matthew Dobson, en 1776, que revient le mérite de reconnaître que le goût particulier des urines est dû au sucre, et qu'il en est de même dans le sang.

En 1869, Paul Langherans montre que le pancréas contient non seulement des cellules sécrétant du suc pancréatique, mais un autre type de cellules que Laguesse nommera d'« îlots de Langherans ». Oscar Minkowski montre que l'ablation du pancréas chez le chien entraîne l'apparition du diabète sucré, et en 1900, d'après L.W. Szobolev et E.L. Opie, « le diabète sucré est le résultat d'une lésion du pancréas causée par la destruction des îlots de Langherans et ne survient que lorsque ces cellules sont détruites en partie ou en totalité ».

Au début du XX<sup>e</sup> siècle, J. de Meyer et E.A. Sharpey-Schafer proposent que le produit fabriqué par les îlots de Langherans du pancréas porte le nom *d'insuline*. C'est cette hormone que Banting et Best découvriront en 1922.

En matière de diabète, Claude Bernard apporte deux éléments importants : il montre que l'homme est capable de fabriquer du glucose à partir des aliments, et que c'est le foie qui fabrique le glucose à partir des sucres et des protéines. Ainsi, en absence d'alimentation, l'homme est capable de fabriquer du glucose aux dépens des muscles et des os. C'est la « fonction néoglycogénique ».

### 1.1.2 Diagnostic et classification du diabète sucré

Le diabète sucré regroupe divers troubles métaboliques dont la caractéristique principale est une hyperglycémie.

Le diagnostic de diabète sucré peut être posé sur la base de la détermination du glucose plasmatique à jeun ( $>7$  mmol/l) (Tableau 1.1) ou après une charge orale.

1. Glucose plasmatique à n'importe quel moment $\geq 11,1$ mmol/l ( $\geq 200$ mg/dl) et symptômes typiques d'un diabète sucré ou	
2. Glucose plasmatique à jeun (c'est-à-dire après période de jeûne de $>8$ heures) $\geq 7$ mmol/l ( $\geq 126$ mg/dl) ou	
3. Glucose plasmatique 2 heures après charge orale de glucose (75 g) $\geq 11,1$ mmol/l ( $\geq 200$ mg/dl)	
Glucose plasmatique à jeun	
$<6,1$ mmol/l ( $<110$ mg/dl)	pas de diabète sucré
$\geq 6,1$ mmol/l et $<7$ mmol/l ( $\geq 110$ mg/dl et $<126$ mg/dl)	trouble du glucose à jeun
(trouble de l'homéostasie du glucose) $\geq 7$ mmol/l ( $\geq 126$ mg/dl)	diabète sucré
(Diagnostic provisoire, à vérifier par une 2e détermination)	

**Tableau 1.1** : Critères de diagnostic du diabète sucré <sup>1</sup>.

La nouvelle classification répartit le diabète selon l'étiologie. Pour cette raison, on a laissé tomber les notions «insulino-dépendant» et «non insulino-dépendant» (insulin-dependent diabetes mellitus: IDDM, non-insulin-dependent diabetes mellitus: NIDDM). Dans le même sens, les appellations telles que diabète juvénile ou diabète sénile ne devraient plus être utilisées, puisque 50% des patients atteints de diabète de type 1 sont diagnostiqués après leur vingtième année et que l'incidence du diabète de type 1 est également élevée dans chaque décade suivant la vingtième année jusqu'au grand âge. La notion de diabète trophique (malnutrition-related diabetes mellitus) a elle aussi été abandonnée et on a encore gardé, comme forme particulière de diabète, que la pancréatopathie fibrocalculeuse. Les quatre groupes principaux de diabète sont présentés dans le tableau 2.

<p><b>1. Diabète sucré de type 1</b></p> <p>a. auto-immun (trouble des cellules <math>\beta</math>)</p> <p>b. idiopathique (rare, sans élément pour facteur auto-immun)</p>
<p><b>2. Diabète sucré de type 2 (résistance à l'insuline et défaut de sécrétion d'insuline)</b></p>
<p><b>3. Types spécifiques de diabète</b></p> <p>a. Défaut génétique de la fonction des cellules <math>\beta</math> (Maturity-Onset Diabetes of the Young: MODY). Actuellement, cinq défauts différents sont connus dans le diabète de type MODY:</p> <p>MODY 1: défaut de l'Hepatocyte nuclear factor 4<math>\alpha</math> (HNF-4<math>\alpha</math>)</p> <p>MODY 2: défaut de la glucosinase</p> <p>MODY 3: défaut de l'HNF-1<math>\alpha</math></p> <p>MODY 4: défaut de l'IPT-1 (insulin promoter factor-1)</p> <p>MODY 5: défaut de l'HNF-1<math>\alpha</math>, diabètes mitochondriaux, autres</p> <p>b. Défaut génétique dans l'action de l'insuline (résistance à l'insuline de type A, Lepréchaunisme, syndrome de Rabson-Mendenhall: défaut des récepteurs à l'insuline, diabète lipo-atrophique, autres)</p> <p>c. Maladies du pancréas exocrine (pancréatite, néoplasie, fibrose kystique, hémochromatose, pancréatopathie fibro-calculuseuse, autres)</p> <p>d. Endocrinopathies (acromégalie, syndrome de Cushing, phéochromocytome, syndrome de Conn, autres)</p> <p>e. Induit par les médicaments (stéroïdes, pentamidine, acide nicotinique, diazoxyde, thiazides, inhibiteurs de la protéase, autres)</p> <p>f. Infections (rougeole congénitale, oreillons, virus Coxsackie, cytomégalovirus)</p> <p>g. Formes rares de diabète immunogène (syndrome de Stiff-Man, anticorps anti-insuline-récepteurs, autres)</p> <p>h. Autres syndromes génétiques associés au diabète (trisomie 21, syndrome de Klinefelter, syndromes de Turner, dystrophie myotonique, autres)</p>
<p><b>4. Diabète gestationnel</b></p>

**Tableau 1.2** : Classification étiologique du diabète sucré (selon ADA et OMS 1998) <sup>1</sup>.

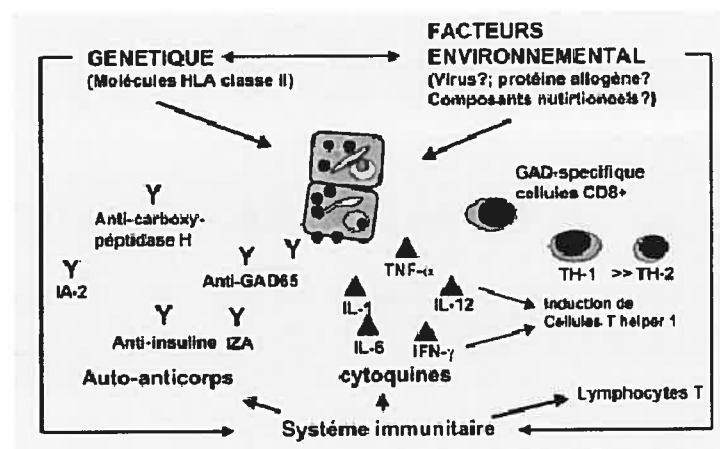
### 1.1.3 Le diabète sucré de type 1

Le diabète sucré de type 1 est dû à une atteinte de nature auto-immune des cellules  $\beta$  des îlots pancréatiques. Lorsque l'hyperglycémie est cliniquement manifeste, l'atteinte touche déjà 80% des cellules  $\beta$ . Pourtant, le trouble autoimmun de ces cellules débute déjà des années avant que le diabète ne soit manifeste (figure 1.1). Durant cette phase progressive de détérioration, on peut déjà observer des altérations immunologiques dans le sang, telles que la présence d'auto-anticorps ou de lymphocytes activés. Avec l'augmentation de la perte de la masse des cellules  $\beta$  apparaissent également des troubles métaboliques, c'est-à-dire une perte de la phase précoce de la sécrétion insuliniqne après administration intraveineuse de glucose et, plus tard, une diminution de la tolérance orale au glucose. Cette phase entre le début de la

destruction des cellules  $\beta$  et la manifestation clinique de déficit en insuline est appelée prédiabète.

Fondamentalement, pour la constitution du diabète de type 1, il faut:

1. une prédisposition immuno-génétique, c'est-à-dire des caractéristiques particulières du système HLA.
2. un facteur déclenchant (facteur environnemental?); ainsi que,
3. une réaction auto-immune dirigée contre les cellules  $\beta$ , à laquelle participent des lymphocytes T auto-réactifs cytotoxiques, des cytokines et des auto-anticorps.



**Figure 1.1** Interactions entre génétique, facteurs environnementaux et système immunitaire lors de destruction auto-immune des cellules  $\beta$ <sup>1</sup>.

### 1.1.3.1 Le diabète sucré de type 1 auto-immun

#### 1.1.3.1.1 Le système HLA

Chez l'homme comme chez les modèles animaux susceptibles de développer un diabète auto-immun connus jusqu'ici (rat BB, souris NOD), la susceptibilité pour la maladie est déterminée par des gènes à l'intérieur du système HLA. Chez l'homme, il s'agit surtout de marqueurs HLA classe II des sous-régions DR et DQ. Ainsi, plus de 90% des diabétiques de type 1 possèdent les marqueurs DR3 et/ou DR4. Les analyses de génétique moléculaire ont montré que les diabétiques DR4-positifs sont aussi porteurs de l'allèle DQ DQw8 (DQB1\*0302), tandis que chez les non-diabétiques DR4-positifs, ce gène est surtout associé avec le DQw7 (DQB1\*0301). A côté des haplotypes HLA favorisant la susceptibilité, il existe

aussi des constellations HLA qui protègent contre le diabète. Ainsi, les individus DR2-DQB1\*0602-positifs ne développent que très rarement un diabète de type 1. On pense que le rapport entre la susceptibilité au diabète et les propriétés structurales des molécules DQ réside dans l'affinité de liaison des peptides qui sont présentés au système immunitaire par les molécules HLA <sup>2</sup>. Mais à côté de la signification des molécules de la classe II HLA pour la susceptibilité à développer un diabète, d'autres facteurs génétiquement déterminés à l'intérieur et à l'extérieur du complexe HLA jouent également un rôle, comme par exemple certains polymorphismes dans des récepteurs génétiques de l'interleukine 1 <sup>3</sup>. La prédisposition immuno-génétique ne suffit pas à elle seule pour développer un diabète de type 1 et pour la destruction des cellules  $\beta$ , il faut en plus un facteur déclenchant (trigger).

#### 1.1.3.1.2 Facteurs environnementaux

Comme possibles déclencheurs du processus auto-immun dirigé contre les cellules  $\beta$ , on postule avant tout des virus, en particulier les rétrovirus, le virus des oreillons, de la rubéole, de la cytomégalie, le virus EBV et surtout la Coxsackie B4. Comme mécanisme d'une pathogenèse virale, on admet que la réaction auto-immune contre les cellules  $\beta$  pourrait être déclenchée en raison d'un «mimétisme moléculaire» entre les protéines virales et les structures de surface des cellules  $\beta$ . Il existe par exemple des homologues séquentielles entre les virus Coxsackie B4 et l'enzyme acide glutamique-décarboxylase (GAD) fortement exprimée par les cellules  $\beta$ , de sorte que théoriquement les cellules immunitaires dirigées contre les Coxsackie B4 pourraient également attaquer les cellules  $\beta$ . Mais pour le moment, il n'existe aucune preuve expérimentale ou clinique que de tels mécanismes pourraient jouer un rôle dans le diabète humain de type 1. On peut aussi penser que des infections virales post-natales pourraient jouer un rôle dans le développement ultérieur d'un diabète. Chez des patients porteurs de diabète de type 1 nouvellement manifesté, des études épidémiologiques ont en effet montré une fréquence augmentée de présence d'anticorps viraux <sup>4</sup>. Il existe quelques rapports de cas où, du pancréas de patients décédés avec un diabète manifeste, on a pu isoler des particules virales. Cependant, en dépit des constatations convaincantes faites sur les modèles animaux de laboratoire, la pathogenèse virale du diabète humain auto-immun reste incertaine, sauf dans le cas d'infection rougeoleuse congénitale. A côté des virus, des composants nutritionnels sont également postulés comme possibles déclencheurs des processus auto-immuns contre les cellules  $\beta$ . Le lait de vache est un facteur alimentaire toujours à nouveau discuté. En Scandinavie surtout, on a observé que les nourrissons nourris

par allaitement maternel durant moins de trois mois (donc nourris précocement par des préparations à base de lait de vache) développaient plus fréquemment un diabète des années plus tard, et que chez les enfants diabétiques nouvellement diagnostiqués on pouvait fréquemment mettre en évidence des auto-anticorps contre certaines protéines du lait de vache, notamment la  $\beta$ -lactoglobuline et la sérum-albumine bovine. On a postulé qu'un peptide (ABBOS) contenu dans l'albumine bovine et présentant une homologie séquentielle avec une protéine (ICA-69) présente à la surface des cellules des îlots de Langerhans, pourrait déclencher une réaction immunitaire contre ces cellules. Mais cette hypothèse n'a pas pu être confirmée jusqu'ici, de sorte qu'on n'a pas pu établir la preuve que le lait de vache (respectivement ses protéines) joue un rôle causal déclenchant dans le diabète. D'autres facteurs diététiques, en particulier les aliments contenant de grandes quantités de protéines et de nitrosamines, sont actuellement encore discutés comme facteurs diabétogènes potentiels<sup>5,6,7</sup>.

#### 1.1.3.1.3 Le système immunitaire

Le tableau histopathologique du diabète de type 1 est spécifique et montre typiquement des infiltrats mononucléaires dans les îlots («insulite»). Chez les patients décédés peu après la manifestation d'un diabète ou dans les biopsies pancréatiques de diabétiques de type 1 récemment manifesté, on a montré que les infiltrats sont constitués de manière prépondérante de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cytotoxiques. Suite à la destruction des cellules  $\beta$ , les antigènes sont libérés et mis en présence du système immunitaire, lequel réagit en fabriquant de nombreux auto-anticorps contre ces auto-antigènes spécifiques des cellules  $\beta$ . Ces auto-anticorps peuvent déjà être présents avant la manifestation clinique du diabète au stade de prédiabète et sont des indicateurs de la réaction auto-immune contre les cellules des îlots. Jusqu'ici, on a identifié une vingtaine d'autoantigènes spécifiques des îlots, respectivement des cellules  $\beta$ . En pratique clinique, on peut aujourd'hui doser de routine les anticorps cytoplasmiques des cellules des îlots, les anticorps GAD, les anticorps IA-2 et les auto-anticorps insuliniques. Mais le dosage d'auto-anticorps n'est pas nécessaire pour l'établissement du diagnostic de diabète de type 1 du fait que les symptômes et signes cliniques sont en règle générale univoques. Dans les cas cliniquement peu clairs comme par exemple les «diabétiques de type 2» maigres qu'on ne peut pas régler correctement avec les antidiabétiques oraux, ou bien les jeunes patients présentant un diabète léger, le dosage des anticorps peut avoir une valeur diagnostique significative. En effet, chez de tels patients, la

mise en évidence d'anticorps anti-cellules  $\beta$  signe le diagnostic de diabète de type 1, indiquant ainsi le traitement insulinique. Il est important de diagnostiquer précocement ces diabétiques de type 1 initialement taxés de diabétiques de type 2, car une insulinothérapie précoce leur permettra de conserver plus longtemps leur réserve de cellules  $\beta$  encore intactes et leur pronostic, quant aux complications tardives, peut être amélioré.

### **1.1.3.2 Le diabète sucré de type 1 idiopathique**

Il s'agit d'un diabète insulino-pénique mais sans cause évidente, immunitaire ou autre. C'est dans ce cadre que s'inscrivent les diabètes particuliers pouvant être rencontrés dans les ethnies noires (*Flatbush Diabetes*) : ce diabète partage avec le diabète de type 1 le début brutal cétosique, la présence de groupes particuliers HLA, mais ne s'accompagne pas de réaction auto-immune, et évolue souvent, après un début brutal, vers un diabète de type non insulino-requérant, quoique plus faiblement insulino-sécréteur que le diabète de type 2 classique. On y retrouve une forte hérédité familiale et une tendance au surpoids, comme dans le diabète de type 2.

## **1.1.4 Le diabète sucré de type 2**

Le diabète sucré de type 2, dont 85 à 90% des patients diabétiques sont atteints, est une maladie hétérogène où les défauts génétiques de l'effet et de la sécrétion de l'insuline en rapport avec des facteurs acquis provoquent une détérioration de l'homéostasie du glucose ainsi que du métabolisme des graisses et des acides aminés. Il résulte à la fois d'un déficit de l'insulinosécrétion et d'une insulino-résistance. Il est associé à une obésité dans 80 % des cas. Il est le plus souvent polygénique résultant de l'association d'une prédisposition génétique et de facteurs environnementaux, en particulier le surpoids, la sédentarité, plus accessoirement la nature des glucides et des lipides de l'alimentation. Il survient majoritairement après 40 ans chez les sujets obèses et sa prévalence augmente avec l'âge <sup>8</sup>.

### **1.1.4.1 Génétique**

Des facteurs génétiques jouent un rôle significatif dans l'apparition du diabète de type 2. Chez les jumeaux monozygotes, les taux de concordance atteignent jusqu'à 90% pour le diabète de type 2. En effet, en raison de leur prédisposition génétique identique, les jumeaux



présentent presque le même risque d'être atteints d'un diabète de type 2, où les circonstances extérieures telles que l'alimentation, le comportement physique et la prise pondérale jouent un rôle important pour que la maladie se manifeste. On admet que le diabète de type 2 se développe sur la base de plusieurs défauts génétiques concomitants (polygénie) et que les défauts génétiques prédisposant à la maladie peuvent eux-mêmes différer d'un diabète de type 2 à un autre diabète de type 2<sup>9</sup>.

#### **1.1.4.2 Résistance périphérique à l'insuline**

La résistance périphérique à l'insuline, respectivement l'insensibilité périphérique à l'insuline est un facteur central dans la pathogenèse du diabète de type 2. Il existe une résistance à l'insuline lorsqu'une concentration normale d'insuline conduit à une réponse biologique subnormale. L'insuline est une hormone métabolique pléiotrope qui agit dans le métabolisme des hydrates de carbone, protidique et lipidique. Pour ce qui concerne le métabolisme des hydrates de carbone, une insensibilité à l'insuline ne se manifeste pas seulement par une utilisation insuffisante du glucose dans le tissu musculaire et graisseux, mais aussi par une production endogène de glucose augmentée par le foie. Dans le domaine du métabolisme protidique et lipidique, l'insensibilité à l'insuline entraîne une diminution de l'incorporation intracellulaire d'acides aminés et une augmentation du catabolisme lipidique avec une augmentation consécutive d'acides gras libres circulants. L'insulino-résistance au cours du diabète de type 2 concerne le foie et les tissus périphériques insulino-requérants (muscle squelettique et tissu adipeux)<sup>10</sup>. L'incorporation de glucose dans la cellule musculaire se fait grâce à un mécanisme de diffusion facilitée par des transporteurs de glucose (GLUT). La principale molécule transporteuse de glucose dans la musculature est l'isoforme GLUT4 dépendante de l'insuline. Les molécules de GLUT4 à l'état de repos sont encastrées dans des micro-vésicules intracellulaires et ne sont amenées à la surface de la cellule que sur un signal insulinique. Dans le diabète de type 2, la translocation de GLUT4 de l'intérieur vers la surface de la cellule est réduite et cette restriction est principalement responsable de la perturbation de l'utilisation du glucose<sup>9</sup>. A côté de la diminution de l'utilisation périphérique du glucose, une production hépatique de glucose augmentée contribue également à l'hyperglycémie du diabète de type 2. La production hépatique de glucose (glycogénolyse et gluconéogenèse hépatiques) est normalement inactivée par l'insuline. Dans le diabète de type 2 avec résistance à l'insuline, la gluconéogenèse hépatique est insuffisamment supprimée, ce qui se traduit par une glycémie à jeun augmentée.

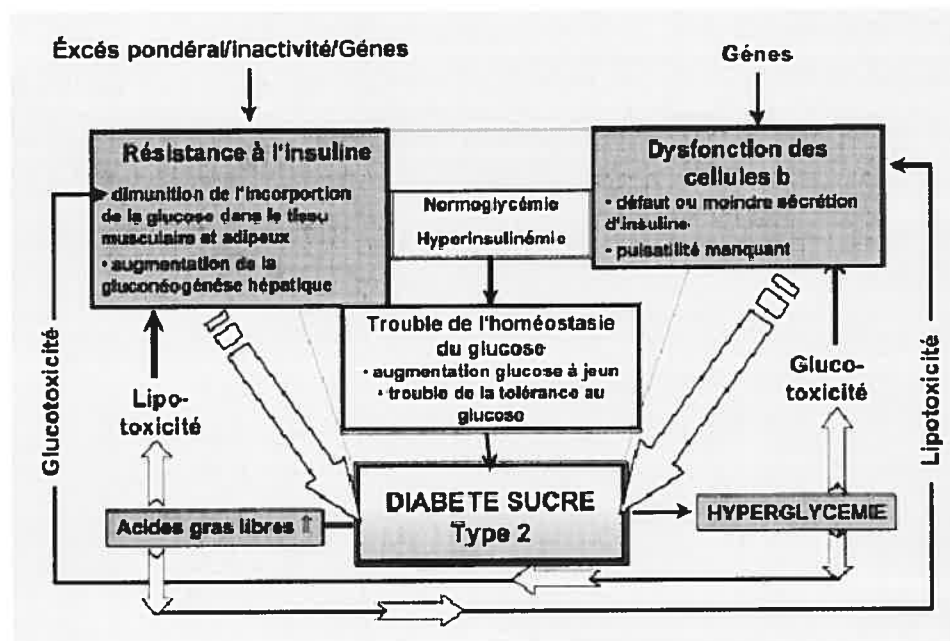
### 1.1.4.3 Dysfonction des cellules $\beta$

Le diabète de type 2 ne se caractérise pas seulement par un trouble de la sensibilité périphérique à l'insuline, mais aussi et dans la même mesure par un trouble fonctionnel des cellules  $\beta$ . Il n'existe pas de diabète sans atteinte de la cellule  $\beta$  pancréatique. Les preuves de cette assertion sont multiples. Tous les patients présentant une obésité massive, voire extrême ne développent pas un diabète. Dans des modèles de souris où une insulino-résistance périphérique majeure a été créée par l'inactivation du gène codant un maillon important de la transduction du message insulinique (souris IRS-1  $-/-$ ), la tolérance au glucose est normale. On admet actuellement que dans le diabète de type 2 il existe au niveau des cellules  $\beta$  elles mêmes, des défauts intrinsèques de la sécrétion et de la production d'insuline, de sorte qu'une sécrétion (supplémentaire) durable d'insuline ne peut pas être maintenue pour surmonter la résistance à l'insuline<sup>9,11</sup> et qu'il s'ensuit une défaillance progressive de la fonction des cellules  $\beta$ . Dans les conditions physiologiques, la sécrétion d'insuline se déroule en deux phases. Une sécrétion rapide d'insuline en excès intervient 5 à 10 minutes après un stimulus glucosique. Cette première phase est suivie par une seconde sécrétion d'insuline lentement progressive, qui dure tant que le stimulus glucosique est maintenu. Dans le diabète de type 2, un des défauts les plus précoces des cellules  $\beta$  consiste en l'abolition de la phase précoce de la sécrétion d'insuline, manifestée cliniquement par une augmentation massive de la glycémie postprandiale. Ce n'est que dans l'évolution ultérieure de la maladie que la sécrétion et la production d'insuline diminuent globalement, entraînant une défaillance progressive des réserves des cellules  $\beta$  avec un besoin correspondant en insuline, comme l'a montré l'étude UKPD. En dépit de la recherche intensive de gènes candidats dans le réseau intermoléculaire complexe intervenant dans la cascade de la sécrétion insulinique des cellules  $\beta$ , on n'a jusqu'ici réussi à identifier aucun défaut moléculaire spécifique responsable de la dysfonction des cellules  $\beta$ .

### 1.1.4.4 Gluco- et lipotoxicité

A côté du défaut cellulaire intrinsèque génétiquement hérité, il existe aussi dans le diabète de type 2 des défauts significatifs acquis de la sécrétion d'insuline, consécutifs à la gluco- et lipotoxicité (figure 1.2). Une hyperglycémie permanente entraîne à la longue une gluco-toxicité en rapport avec une «désensibilisation» et plus tard une apoptose des cellules  $\beta$ . Une exposition des cellules  $\beta$  à de hautes concentrations d'acides gras (hyperlipacidémie)

entraîne, après une phase initiale de sécrétion d'insuline augmentée, une réduction successive des réserves d'insuline des cellules  $\beta$ <sup>12,13</sup>. L'hyperlipacidémie est une conséquence du trouble métabolique lipidique chez le patient diabétique de type 2 insulino-résistant (et en règle générale obèse). Dans les conditions physiologiques, le tissu adipeux hydrolyse une partie de ses réserves de triglycérides en acides gras libres et glycérol, lesquels sont ensuite libérés dans le courant sanguin. Chez le diabétique de type 2 avec excès pondéral, les acides gras libres sont excrétés en plus grande quantité dans le sang en raison de l'augmentation de la masse de tissu adipeux. Une partie de ces acides gras libres est aussi accumulée dans le tissu musculaire où, en conséquence, le métabolisme des hydrates de carbone et l'utilisation du glucose sont perturbés<sup>14</sup>, renforçant ainsi la résistance à l'insuline. En plus, l'offre en dérivés d'acides gras étant augmentée dans les cellules hépatiques, la gluconéogenèse s'intensifie.



**Figure 1.2** Interactions entre résistance à l'insuline, dysfonction des cellules  $\beta$  ainsi que gluco- et lipotoxicité dans la pathogenèse du diabète de type 2<sup>1</sup>.

## 1.1.5 Type spécifique de diabète : MODY

Le diabète de type MODY (*maturity-onset diabetes of the young*) a été initialement défini sur le phénotype suivant : diabète de survenue précoce (classiquement avant l'âge de 25 ans), cliniquement non insulino-requérant, au moins pendant les premières années suivant le diagnostic et de transmission autosomique dominante, évoquant une affection monogénique<sup>15</sup>. La caractérisation d'une partie au moins des gènes de MODY a conduit à compléter cette définition par l'existence d'une anomalie primaire de l'insulinosécrétion. La famille "officielle" des gènes responsables de MODY comprend à ce jour cinq gènes. Quatre d'entre eux codent des facteurs de transcription : les MODY 1, 3, 4 et 5 correspondent respectivement à des mutations des gènes suivants : HNF-4 $\alpha$  (*Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$* ), HNF-1 $\alpha$ , IPF-1 (*Insulin Promoter Factor-1*, également appelé PDX-1) et HNF-1 $\beta$ <sup>16</sup>. Le MODY 2 constitue une exception puisqu'il est dû à des mutations du gène de la glucokinase, enzyme impliquée, dans la cellule  $\beta$ , dans l'étape clé du métabolisme qui conduit à l'insulinosécrétion en réponse au glucose. Plus récemment, un autre facteur de transcription, NEUROD1/BETA2, a également été impliqué dans la survenue d'un diabète à transmission autosomique dominante<sup>17</sup>. Les MODY, tous types confondus, représenteraient 2 à 5 % des diabètes non insulino-requérants<sup>16</sup>, avec une très forte prédominance des MODY 2 et 3, les autres formes ne concernant jusqu'ici que quelques familles. Tous les gènes de MODY ne sont pas identifiés : dans environ 40 % des cas de diabète dont le phénotype est évocateur de MODY, aucune anomalie des gènes connus n'est mise en évidence.

## 1.1.6 Les complications associées au diabète

### 1.1.6.1 La microangiopathie

Le terme de microangiopathie recouvre l'ensemble des lésions constatées au cours du diabète sur les petits vaisseaux (artères, veines, capillaires) d'un diamètre inférieur à 30 $\mu$ . Elle est totalement responsable de l'atteinte des capillaires rétiniens et glomérulaires rénaux. Elle participe aux lésions du système nerveux<sup>18</sup>.

Les quatre hypothèses mécanistiques de la microangiopathie sont :

- La glycation
- La voie des polyols
- La voie des PKC
- La voie des hexosamines.

### 1.1.6.1.1 Complications oculaires

La rétinopathie diabétique est la complication la plus spécifique, et constitue une des complications majeures du diabète sucré par sa fréquence et sa gravité potentielle. D'autres complications ophtalmologiques sont cependant possibles au cours de la maladie diabétique : atteintes du cristallin, de l'iris, glaucome.

### 1.1.6.1.2 Complications rénales

La néphropathie diabétique est responsable d'environ 30% des malades pris en charge dans les programmes d'insuffisance rénale terminale. Après 20 ans ou plus de diabète, elle se voit chez 40 à 50% des diabétiques de type 1 contre 5 à 10% des diabétiques de type 2. L'hypertrophie glomérulaire, l'expansion de la matrice mésangiale et l'épaississement de la membrane basale glomérulaire sont les anomalies structurales caractéristiques de la néphropathie diabétique. D'autres complications néphrologiques peuvent apparaître : infections urinaires, vessie neurologique, nécrose papillaire, hyperkaliémie.

## 1.1.6.2 La macroangiopathie

Ce terme définit les lésions des grosses et moyennes artères. La macroangiopathie est le plus important facteur de mortalité des diabétiques. Coronarite, infarctus du myocarde, artérite des membres inférieurs et hypertension artérielle sont plus fréquents chez les diabétiques. Dans les membres inférieurs des diabétiques, des dépôts lipidiques et des lésions athéroscléreuses sont plus importantes que chez les non diabétiques.

L'athérosclérose prématurée du diabétique est très particulière par sa précocité d'apparition, ses localisations multiples (coronaires, artères cérébrales, artères périphériques) et sa gravité évolutive.

Une surmortalité d'origine cardio-vasculaire est clairement établie, aussi bien chez les diabétiques de type 1 que chez ceux de type 2. De plus, la protection liée au sexe disparaît après 45 ans et les femmes diabétiques sont aussi exposées que les hommes, au moins pour la mortalité coronaire.

Les complications vasculaires sont multiples : maladie coronarienne, insuffisance cardiaque, hypertension artérielle, artériopathie périphérique, occlusion aiguë par embolie ou thrombose aiguë, gangrène, ulcères ischémiques.

### 1.1.6.3 Les complications neurologiques

La neuropathie diabétique concerne n'importe quelle atteinte neurologique en rapport avec le diabète, depuis l'encéphale jusqu'au muscle. Parmi les diabétiques nouvellement découverts, 7.5% d'entre eux ont une neuropathie symptomatique ; la prévalence augmente avec la durée du diabète et atteint près de 50% au bout de 25 ans. On admet que 30% des patients atteints de diabète, tous types et âges confondus, sont atteints de neuropathie.

Classification en 5 syndromes :

- La polyneuropathie : grossièrement bilatérale et symétrique, diffuse et distale, elle frappe les nerfs périphériques, et son expression est surtout sensitive et réflexe.
- Les multinévrites sont des atteintes simultanées ou successives de plusieurs nerfs dans le désordre et sans aucune symétrie.
- Les mononévrites : elles atteignent un seul nerf ou une des ses branches
- La neuropathie motrice proximale (amyotrophie diabétique)
- La neuropathie végétative dont l'expression peut être génitale, urinaire, digestive, vasculaire, sudorale ou cutané-osseuse.

### 1.1.6.4 Les complications cutanées

Les complications cutanées sont nombreuses et variées :

- Lésions cutanées orientant directement vers le diagnostic de diabète : prurit, peau cireuse et raideurs articulaires, bouffées vasomotrices.
- Maladies cutanées liées au diabète : Scléroedème, dermopathie diabétique, nécrobiose lipoïdique, granulome annulaire disséminé, bullose diabétique.
- Complications infectieuses : infections bactériennes, mycoses.
- Lésions cutanées d'origine métabolique : xanthochromie, xanthomatose éruptive, xanthomes cutanés, tendineux et xanthélasma.
- Affections dermatologiques souvent associées au diabète : psoriasis, maladie de Dupuytren, acanthosis nigricans.

## 1.2 La néphropathie diabétique

### 1.2.1 La néphropathie évolue selon 5 stades

#### 1.2.1.1 La néphropathie fonctionnelle

Le flux sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire sont élevés, avec des lésions histologiques qui se résument à une hypertrophie glomérulaire avec augmentation de la surface de filtration et hypertrophie des tubules proximaux du rein <sup>19,20</sup>.

#### 1.2.1.2 La néphropathie silencieuse

Il n'y a pas encore de protéinurie. La membrane basale glomérulaire est épaissie, il y a une expansion membranoïde de la matrice mésangiale et une hyalinose des artères afférente et efférente du glomérule. Le flux sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire restent élevés. Ces faits interviennent dans les 3 à 5 ans après le diagnostic initial.

#### 1.2.1.3 La néphropathie débutante

Elle correspond à l'apparition d'une microprotéinurie (30-300mg/24 heures), et est le premier signe clinique de la néphropathie diabétique.

#### 1.2.1.4 La néphropathie avérée

L'albuminurie dépasse 300 mg/24 heures ; le flux sanguin rénal et le taux de filtration glomérulaire se sont normalisés. De nombreux malades développent une hypertension et une rétinopathie sévère. Il y a une grosse hypertrophie mésangiale.

#### 1.2.1.5 Insuffisance rénale terminale

Perte de la fonction rénale. Atrophie et apoptose des tubules proximaux.

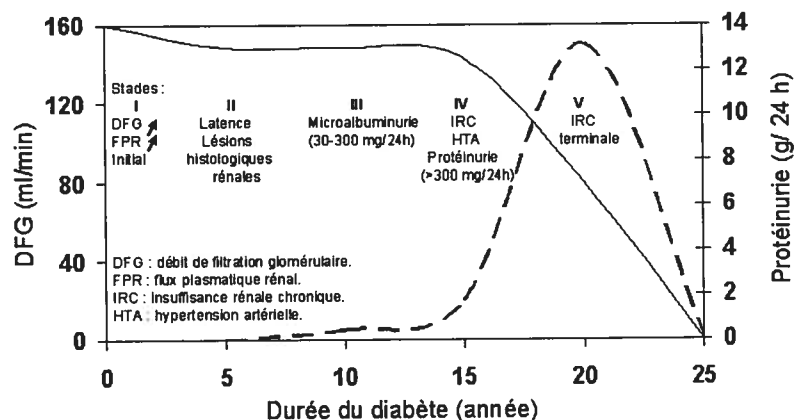


Figure 1.3 Représentation de l'histoire naturelle de la néphropathie diabétique <sup>21</sup>.

### 1.2.2 Microalbuminurie

Le suivi des diabétiques de type 1 montre que vers la fin des 10 premières années de diabète, 25% d'entre eux développent le premier signe clinique de néphropathie diabétique : la microalbuminurie. Chez un sujet normal, l'excrétion urinaire de protéine est inférieure à 30 mg/24h. La recherche de protéine par la bandelette ne devient positive que lorsque la protéinurie dépasse 300 à 500 mg/24h, et on sait qu'à ce taux les lésions de néphropathie diabétique sont déjà importantes. Or l'utilisation de technique radio-immunologique plus sensible permet de détecter l'albumine : le taux normal d'albumine est  $< 20$  mg/24h ( $15\mu\text{g}/\text{min}$ ). La microalbuminurie correspond à un taux de 30 à 300 mg/24h ( $20$  à  $200\mu\text{g}/\text{min}$ ). L'incertitude concernant un recueil correct des urines sur 24 heures a développé l'usage du rapport albumine/créatinine sur un simple échantillon d'urine : une valeur  $> 30$  mg/g (ou  $0,03$  mg/mg) suggère que l'excrétion d'albumine est supérieure à 30 mg/24h, donc qu'une microalbuminurie est présente. Il faudra naturellement éliminer les facteurs autres que le diabète qui peuvent entraîner une élévation de l'albuminurie : la microalbuminurie est augmentée par un exercice physique excessif et par l'orthostatisme, ainsi que par d'autres conditions pathologiques (hypertension artérielle, insuffisance cardiaque, état fébrile). De plus, étant donné la variabilité de l'excrétion d'albumine d'un jour à l'autre, une seule mesure n'est pas suffisante, et au moins deux ou trois déterminations sont recommandées. La microalbuminurie est le signe le plus précoce de néphropathie diabétique. Les biopsies rénales faites chez les sujets microalbuminuriques vont d'une histologie normale chez les sujets excréant moins de 45 mg d'albumine par jour à des lésions typiques de néphropathie diabétique chez ceux qui ont un taux plus important. Sa valeur pronostique varie selon le type de diabète et surtout le moment de son apparition par rapport au début du diabète.

Chez les diabétiques de type 1 qui présentent une microalbuminurie, au total moins de la moitié d'entre eux développeront une néphropathie diabétique cliniquement évidente, mais si la microalbuminurie est décelée au cours des 10 premières années, la plupart des sujets évoluent vers la "macroalbuminurie" et la néphropathie diabétique. Lorsque la microalbuminurie apparaît après la 15e-20e année, le risque de développer une néphropathie diabétique est beaucoup plus faible (18% dans une série), et il est probable que certains de ces patients ont une autre atteinte rénale pour expliquer la microalbuminurie, en particulier l'hypertension artérielle.

Chez les diabétiques de type 2 qui présentent une microalbuminurie, 20 à 40% d'entre eux développeront une néphropathie diabétique cliniquement évidente sur une période de 10



ans. L'étude UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) évalue à 2,8% par année l'incidence du passage de la microalbuminurie à la macroalbuminurie et à 2,3% celle du passage de la macroalbuminurie à l'insuffisance rénale chronique.

La microalbuminurie, en plus de sa relation avec une atteinte rénale, est également un marqueur de risque cardiovasculaire : dans une série de diabétiques de type 2 non protéinuriques, la mortalité cardiovasculaire était de 28% chez les microalbuminuriques et de seulement 4% chez ceux sans microalbuminurie. Par ailleurs, il semble que, en dehors du diabète, la microalbuminurie soit également un indice de risque de mortalité vasculaire chez l'hypertendu, la microalbuminurie étant associée aux paramètres définissant l'athérosclérose

22

### 1.2.3 Pathogénie

Dans les deux types de diabètes entrent en jeu des *facteurs génétiques*, des *anomalies hémodynamiques* (élévation du flux sanguin rénal, de la pression intraglomérulaire et du taux de filtration glomérulaire), et les *mécanismes de microangiopathie* (augmentation de la voie des polyols et de la glycation, libération des facteurs de croissance et de cytokines variées) s'associent pour aboutir au développement des anomalies structurales caractéristiques de la néphropathie diabétique tels que l'hypertrophie glomérulaire, l'expansion de la matrice mésangiale et l'épaississement de la membrane basale glomérulaire.

### 1.2.4 Mécanismes moléculaires des dommages liés à l'hyperglycémie

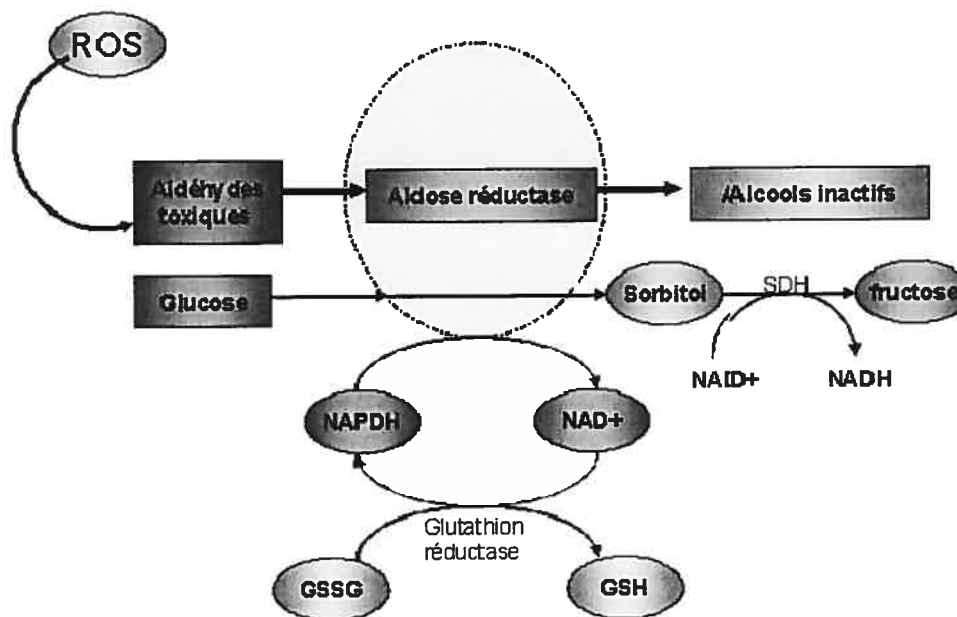
Les quatre hypothèses sont un flux accru de la voie des polyols, la production d'AGE (advanced glycation end-product), l'activation des isoformes de la protéine kinase C (PKC), et un flux accru de la voie des hexosamines. Jusqu'à récemment il n'y avait aucune hypothèse d'unification liant ces quatre mécanismes.

#### 1.2.4.1 La voie des polyols

Si le rôle physiologique de cette voie est encore obscur (génération de fructose et d'osmolytes), de nombreux effets adverses sont attribués à son activation pathologique lors de l'hyperglycémie : désordres osmotiques ; déplétion cellulaire en myoinositol, altération du turnover des phosphoinositides et diminution de l'activité Na-K-ATPase ; modifications

redox par consommation de NADPH favorisant l'augmentation du stress oxydatif, production de fructose et mise en jeu du shunt des pentoses, alimentant la glycation des protéines.

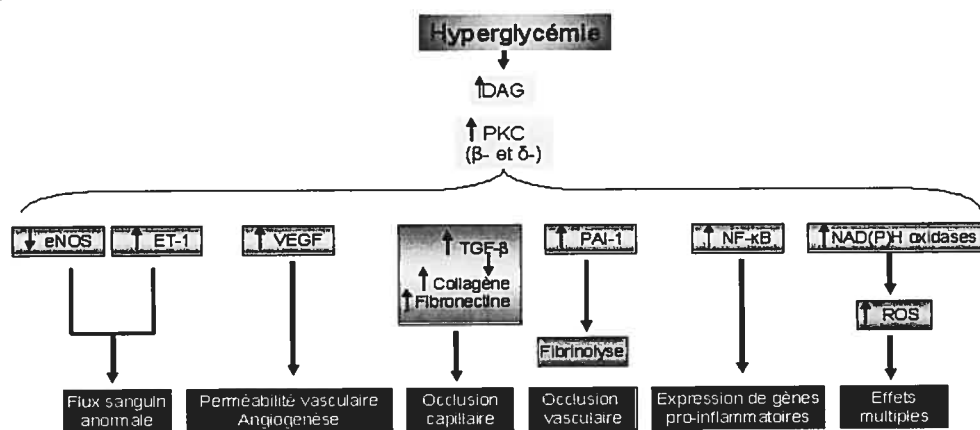
En présence d'une hyperglycémie, un détournement du métabolisme du glucose se produit, celui-ci au lieu d'être essentiellement oxydé dans la voie de la glycolyse se trouve l'être dans la voie des polyols. L'excès de glucose intra-cellulaire est réduit en sorbitol sous l'effet de l'aldose réductase, le sorbitol est ensuite réduit en fructose par la sorbitol déshydrogénase (figure 1.4). L'accumulation de sorbitol exerce un effet osmotique, et paraît capable d'altérer le contenu cellulaire en *myo*-inositol et ainsi l'activité de la protéine kinase C. L'oxydation du sorbitol accroît le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> et altère ainsi le potentiel redox intracellulaire. La pseudo-hypoxie cellulaire ainsi créée diminue l'oxydation mitochondriale du glucose, élève le rapport lactate/pyruvate et expose à la production de radicaux libres. Il en résulte des altérations fonctionnelles vasculaires (augmentation du flux sanguin et hyperperméabilité). En présence d'inhibiteurs de l'aldose-réductase, l'absence d'épaississement de la membrane basale capillaire chez le rat diabétique ou galactosémique suggère l'implication de la voie des polyols<sup>23</sup>. L'extrapolation à l'homme du rôle de ce processus pathogène reste cependant hypothétique face aux résultats médiocres des essais des inhibiteurs de l'aldose-réductase chez les malades diabétiques<sup>24-28</sup>.



**Figure 1.4** La voie des polyols et l'aldose réductase. L'aldose réductase réduit les aldéhydes produits par l'espèce ROS en alcools inactifs, et le glucose au sorbitol en utilisant le NADPH comme cofacteur. Dans les cellules où l'activité de l'aldose réductase est suffisante pour épuiser le glutathion réduit (GSH), le stress oxydant est augmenté. La sorbitol déshydrogénase (SDH) oxyde le sorbitol en fructose en utilisant le NAD<sup>+</sup> comme cofacteur.

### 1.2.4.2 L'activation de la protéine kinase C

La protéine kinase C (PKC) joue un rôle important dans la transduction du signal apporté par les hormones et les facteurs de croissance. Elle intervient ainsi dans des fonctions aussi diverses que la croissance cellulaire et la synthèse d'ADN, le renouvellement des récepteurs membranaires et la réactivité aux facteurs de croissance, la contraction des fibres musculaires lisses et le contrôle du tonus vasculaire, la synthèse des constituants de la membrane basale. Sont activées par le niveau de diacylglycérol (DAG) et d'inositol triphosphate. L'hyperglycémie intracellulaire augmente la quantité de diacylglycérol (DAG), et l'augmentation de la synthèse *de novo* de DAG active la PKC dans des cellules microvasculaires en culture ainsi que dans le glomérule rénal d'animaux diabétiques. Les isoformes PKC- $\beta$  et - $\delta$  sont tout d'abord activées (figure 1.5), mais l'augmentation d'autres isoformes a également été déterminée, comme PKC- $\alpha$  qui augmente la perméabilité endothéliale dans le glomérule de rats diabétiques. L'hyperglycémie peut également activer les isoformes de PKC indirectement par la liaison aux récepteurs des produits de dégradation du glucose (AGE)<sup>29,30</sup> et la plus grande activité de la voie des polyols, vraisemblablement suite à l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS)<sup>31,32</sup>. L'activation anormale de la PKC a été impliquée dans la diminution de la production glomérulaire d'oxyde nitrique (vasodilatateur) dans un diabète expérimental<sup>33</sup>. L'hyperglycémie augmente l'activité MAP-kinase stimulée par l'endothéline 1 (vasoconstricteur) dans les cellules mésangiales glomérulaires en activant les isoformes de PKC<sup>34</sup>. La baisse d'oxyde nitrique et l'augmentation de l'endothéline 1 amène une vasoconstriction.



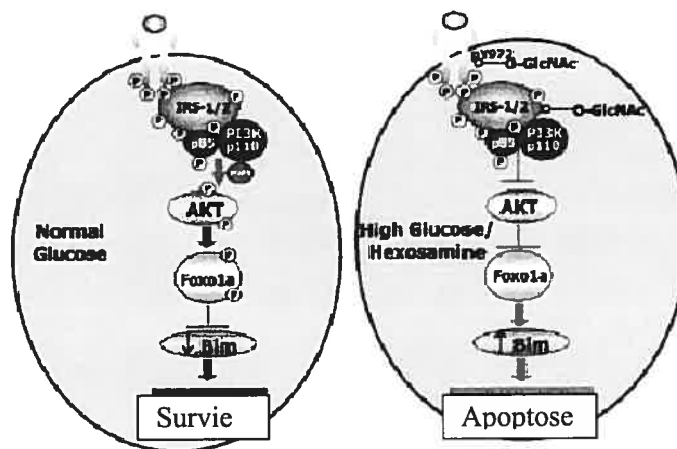
**Figure 1.5** Conséquences de l'activation de la PKC par l'hyperglycémie. L'hyperglycémie augmente le DAG, qui active la PKC, principalement les isoformes  $\beta$  et  $\delta$ . L'activation de PKC affecte l'expression de eNOS, de ET-1, du VEGF, du PAI-1 et TGF- $\beta$ , et active les oxydases NF- $\kappa$ B et NAD(P)H, provoquant des conséquences pathogènes<sup>49</sup>.

### 1.2.4.3 La voie des hexosamines

L'hyperglycémie génèrerait une augmentation du flux du glucose dans la voie des hexosamines, qui consiste en la conversion du glucose en UDP-N-acétylglucosamine. L'augmentation de la concentration intracellulaire en glucose induit la formation accrue de fructose-6P qui est alors métabolisé en glucosamine-6P en présence de glutamine, par l'enzyme glucosamine : fructose amidotransférase (GFAT) puis transformé finalement en UDP-N-acétylglucosamine (l'UDP-GlcNAc)<sup>35</sup>. Les cibles intracellulaires de l'UDP-GlcNAc sont nombreuses. L'inhibition de GFAT, l'enzyme de conversion du glucose en glucosamine, empêche l'augmentation par l'hyperglycémie de la transcription du TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 et de PAI-1<sup>36,37</sup>. L'accumulation de fructose-6P résulterait d'une altération de l'activité GAPDHase, par une production mitochondriale de ROS<sup>37</sup> et/ou d'une baisse du rapport NAD<sup>+</sup>/NADPH par la voie des polyols. L'augmentation du flux de glucose dans cette voie métabolique altérerait l'activité et la translocation du transporteur du glucose Glut-4 à la membrane, probablement par l'activation de PKC<sup>38</sup>. Diverses protéines cytoplasmiques et nucléaires peuvent être O-glycosylées. Les produits de la voie des hexosamines peuvent provoquer la résistance à l'insuline en diminuant l'activité du transporteur GLUT4, ainsi qu'en altérant le nombre de ces transporteurs GLUT4 à la surface de la cellule suite à une O-glycosylation d'un médiateur de fusion de membrane Munc18c<sup>39,40</sup>.

La résistance à l'insuline induite par cette voie des hexosamines est accompagnée par une augmentation de glycosylation, et alors d'une dérégulation, de protéines impliquées dans l'action de l'insuline, dont IRS-1 qui mène à diminuer la phosphorylation de PKB et GSK-3 suite à la stimulation par l'insuline<sup>41</sup>. L'exposition de cellules  $\beta$  à la glucosamine provoque une inhibition de la phosphorylation de tyrosine sur le récepteur de l'insuline (IRS-1 et IRS-2), et une glycosylation du récepteur à l'insuline. L'exposition de cellules  $\beta$  pancréatique au glucose ou à la glucosamine pourrait augmenter la susceptibilité à l'apoptose des cellules  $\beta$  humaines ou de rats par l'activation de la voie des hexosamines (figure 1.6).

L'activation de la voie des hexosamines pourrait ainsi induire diverses modifications biochimiques, comme l'expression de gènes et notamment des gènes du système rénine angiotensine dans les tubules proximaux de reins de rats, et la fonction de protéines impliquées dans la pathogenèse des complications diabétiques.



**Figure 1.6** Schéma hypothétique de l'effet de l'hyperglycémie (high glucose) et de la glucosamine (hexosamine) sur la voie anti apoptotique de l'insuline dans les cellules  $\beta$  pancréatiques <sup>40</sup>.

#### 1.2.4.4 La glycation

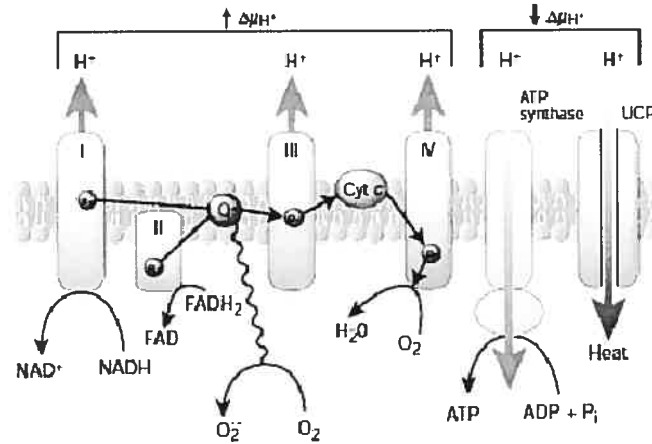
Elle est directement liée à l'hyperglycémie. C'est un mécanisme à la fois intra- et extracellulaire, chimique, direct, par action du glucose lui-même sur la structure et la fonction de diverses substances possédant des groupements aminés primaires (hémoglobine et autres protéines). Les produits de glycation avancé (AGE) sont particulièrement délétères sur la structure des microvaisseaux, et agissent par trois mécanismes généraux. Les protéines intracellulaires modifiées par les AGE ont leurs fonctions altérées. Les composants de la matrice extracellulaire modifiés par les précurseurs des AGE interagissent anormalement avec les autres composants de la matrice et avec les récepteurs des protéines de la matrice sur la cellule (intégrines). Les protéines plasmatiques modifiées par les précurseurs des AGE se lient aux récepteurs des AGE (RAGE) sur les cellules endothéliales, les cellules mésangiales et les macrophages, induisant la production de ROS. La liaison au RAGE activerait le facteur de transcription NF- $\kappa$ B, produisant des changements pathologiques sur l'expression de gènes <sup>42-46</sup>. Des études récentes ont démontré que les AGE agissent par l'intermédiaire de RAGE <sup>47,48</sup>. Le blocage de RAGE a permis d'empêcher le développement de la néphropathie diabétique, et d'augmenter la réparation des blessures dans le modèle murin <sup>49</sup>.

#### **1.2.4.5 Un élément commun reliant les quatre hypothèses proposées pour expliquer les dommages induits par l'hyperglycémie : le stress oxydatif.**

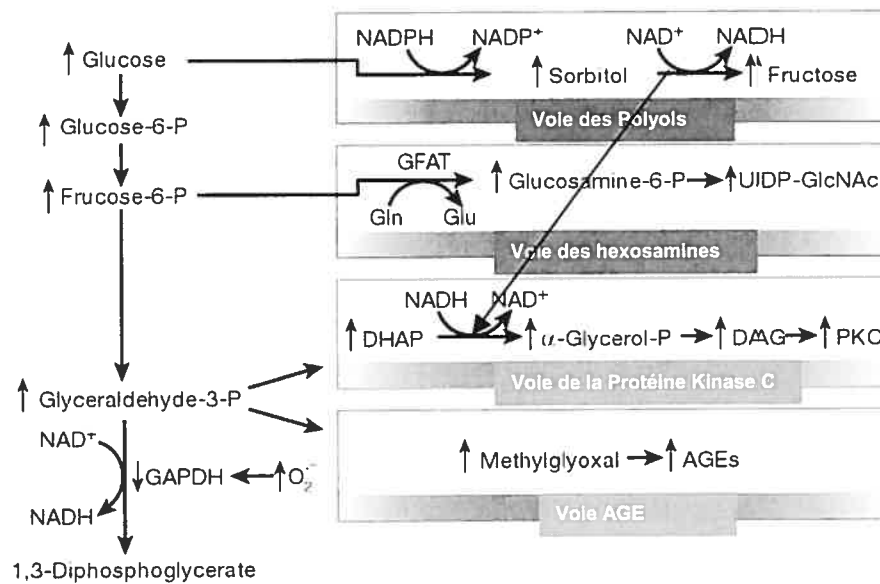
Le stress oxydatif résulte d'un déséquilibre entre la production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) et leur destruction par des systèmes de défenses antioxydantes. Les radicaux libres non détoxifiés peuvent engendrer des dommages de la structure et du métabolisme cellulaire en attaquant de nombreuses cibles, comme les protéines, l'ADN et les lipides. Le rôle du stress oxydatif dans le développement des complications vasculaires liées au diabète reste un sujet de controverse.

Plusieurs études ont montrés que le diabète et l'hyperglycémie augmente le stress oxydatif <sup>50</sup>. L'hyperglycémie peut induire une production accrue de radicaux libres (auto-oxydation du glucose, liaison des AGE à leurs récepteurs, altération du potentiel de réduction par la voie des polyols). L'hyperglycémie augmente la production de ROS, et il semble y avoir une valeur seuil au dessus de laquelle la production d'anion superoxyde est nettement augmentée (figure 1.7). L'hyperglycémie augmente le gradient de proton au dessus de cette valeur seuil étant le résultat de la production d'électrons par la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Ce qui, alternativement, cause une nette augmentation de la production de l'anion superoxide par les cellules endothéliales. Brownlee a formulé une hypothèse reliant directement les ROS et l'anion superoxyde produits par la mitochondrie a la voie des polyols, l'activation de la PKC, la formation d'AGE et la voie des hexosamines <sup>51</sup> (Figure 1.8).

Des études ont rapporté une altération des systèmes antioxydants au cours du diabète <sup>52,53</sup>. La diminution des activités des enzymes antioxydantes pourrait s'expliquer par la glycation de leur site actif (pour SOD érythrocytaire)<sup>54</sup>. Des enzymes comme la catalase, la glutathion réductase (GSH) ou la glutathion peroxydase (GPx) seraient modifiées au cours du diabète <sup>55,56</sup>. Des études ont également rapporté une augmentation des défenses antioxydantes enzymatiques, suggérant un mécanisme compensatoire à une production de ROS. Une augmentation des activités GPx et catalase érythrocytaires a été montrée chez des patients DNID et une augmentation des niveaux d'ARNm de la SOD et de la catalase dans le rein de rats diabétiques a également été mise en évidence <sup>57,58</sup>.



**Figure 1.7** La production d'anion superoxyde par la chaîne de transporteurs d'électrons <sup>49</sup>



**Figure 1.8** Le mécanisme probable par lequel l'hyperglycémie induirait la surproduction d'anion superoxyde mitochondrial qui active quatre voies des dommages liés à l'hyperglycémie <sup>49</sup>.

### 1.3 L'hypertension et le diabète

L'hypertension artérielle (HTA) atteint 50 à 75% des diabétiques<sup>59-62</sup>. Son mécanisme est différent selon le type du diabète. Dans le type 1, elle est essentiellement secondaire à la néphropathie qui ne devient apparente qu'à partir d'une dizaine d'années d'évolution. Dans le type 2, elle est liée à l'insulinorésistance et elle précède souvent l'apparition de l'hyperglycémie<sup>63</sup>. L'hypertension artérielle contribue de façon importante aux complications micro et macrovasculaires du diabète et il est maintenant bien établi que la correction de cette hypertension artérielle permet de prévenir ou de réduire l'incidence des complications, notamment de type microangiopathique<sup>64-66</sup>.

Les patients avec une atteinte rénale, quelle qu'en soit la sévérité manifestent des altérations cardiovasculaires fréquentes et sévères<sup>67</sup>. Ces altérations entraînent une mortalité d'origine cardiovasculaire prématurée qui représente près de 50 % de la mortalité totale de ces patients. De plus, la survie après un évènement cardiaque majeur est nettement inférieure à celle de la population indemne d'atteinte rénale présentant le même évènement<sup>68</sup>. Il existe donc un lien fort entre les atteintes rénales et cardiovasculaires, lien qui n'est pas lié à la dialyse comme on l'a parfois évoqué, mais qui est bien secondaire à l'état urémique<sup>69</sup>. Ce lien s'exprime au cours de différentes formes d'atteinte rénale depuis le stade de la protéinurie isolée, chez les patients présentant une sténose de l'artère rénale jusqu'au stade d'insuffisance rénale terminale.

Les incertitudes qui persistent concernent essentiellement la pression artérielle cible optimale et enfin la définition de la meilleure stratégie des associations médicamenteuses.

La contribution du facteur HTA au surcroît de risque cardiovasculaire du diabétique est estimée à 30%. L'étude MRFIT a bien documenté le rôle aggravant du diabète dans le risque lié à l'HTA par rapport à la population non diabétique, ainsi que la majoration continue du risque du diabétique avec l'augmentation de la pression artérielle<sup>70</sup>.

Les liens entre HTA et risque cardiovasculaire du diabétique ne sont pas univoques selon la nature du diabète :

- Dans le diabète de type 1, c'est l'existence d'une néphropathie diabétique, principal facteur d'HTA, qui est le déterminant majeur du risque cardiovasculaire. Cela a été clairement montré dans l'étude du Registre finlandais du diabète de type 1, dans laquelle à l'âge de 40 ans, 43% des patients diabétiques de type 1 atteints de néphropathie diabétique présentaient



une maladie cardiovasculaire contre 7% de patients diabétiques de type 1 identiques par ailleurs mais indemnes de protéinurie <sup>71</sup>. Cette étude a montré un risque relatif de cardiopathie ischémique de 10.3 chez les patients diabétiques de type 1 néphropathes par rapport aux patients non néphropathes.

- Dans le diabète de type 2, la nature des liens entre HTA, albuminurie et risque reste à préciser, dans la mesure où HTA et albuminurie précède souvent le diagnostic de diabète <sup>72</sup>. En présence d'une microalbuminurie, le risque de mortalité coronarienne est accru d'un facteur 2 à 4 selon les études <sup>73</sup>. La microalbuminurie, plus qu'un marqueur d'atteinte rénale, peut être interprétée comme un indice de dysfonctionnement endothélial diffus faisant le lit de l'athéromatose.

Toujours est-il que toutes les études d'intervention thérapeutique ont démontré l'efficacité du traitement antihypertenseur pour réduire le risque cardiovasculaire du diabétique comme du non-diabétique <sup>74</sup>. La récente étude HOT, qui visait 18790 patients dont 1500 diabétiques avec une pression artérielle diastolique (PAD) de 100-115 mmHg, a montré que le traitement antihypertenseur (Felodipine) exerçait un effet continu de réduction du nombre d'évènement cardiovasculaire chez le diabétique: en d'autres termes, plus le niveau de PAD recherché était bas, plus le nombre d'évènements était faible <sup>75</sup>. Cette continuité dans l'effet bénéfique du traitement antihypertenseur ne permet pas de fixer d'objectifs tensionnels, mais suggère que l'effet favorable sera d'autant plus important que la baisse tensionnelle aura été forte. La limite du bénéfice reste donc à déterminer. Une autre histoire est celle de la stratégie médicamenteuse à privilégier chez le diabétique de type 2. L'étude UKPDS n'a pas permis d'individualiser bêta-bloqueurs et inhibiteurs de l'enzyme de conversion, qui paraissaient également bénéfiques dans la réduction du risque cardiovasculaire du diabétique, si ce n'est une légère tendance à une majoration pondérale avec l'aténolol <sup>76</sup>. A la décharge des bêta-bloquants, rappelons aussi que l'on a observé un risque relatif d'hypoglycémie sévère plus fort avec les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Angiotensine II (IECA) qu'avec les bêta-bloquants <sup>77</sup>. En ce qui concerne les diurétiques, malgré leurs effets métaboliques délétères, il existe des niveaux de preuve convaincants quant à leur effet de réduction du risque cardiovasculaire <sup>78</sup>. Enfin, la classe des bloqueurs calciques et notamment des dihydropyridines fait l'objet d'une controverse récente quant à leur utilisation chez le diabétique. Si l'étude HOT a illustré l'intérêt de cette classe thérapeutique, trois autres études (MIDAS, FACET et ABCD), dont le protocole comparait un IECA et une dihydropyridine, ont individualisé un risque relatif d'accident cardiovasculaire plus élevé dans le groupe bloqueurs

calciques<sup>79-81</sup>. L'absence de groupe placebo ne permet cependant pas encore de conclure sur ce débat<sup>82</sup>. Les IECA sont volontiers proposés en première ligne car ils réduisent la microalbuminurie, surtout chez les diabétiques de type 1, et ils ont montré leur efficacité sur la prévention du risque vasculaire dans l'étude MICRO HOPE<sup>83</sup>. D'autres études récentes ont vérifié l'efficacité des antagonistes du récepteur de l'Angiotensine II (ARA) sur la prévention du risque vasculaire et de la néphropathie<sup>84-86</sup>: leur utilisation, comme celle des IECA, est logique car l'augmentation de l'angiotensine II créée par l'hyperglycémie participe à l'athérogénèse. En revanche, l'innocuité des inhibiteurs calciques a été contestée, mais non prouvée. En fait, chez la plupart des patients, il faut généralement associer aux mesures hygiénodététiques 2, 3 ou 4 anti-hypertenseurs pour atteindre l'objectif, l'association comprenant toujours un diurétique thiazidique ou de l'anse en fonction de l'état rénal. Le bien fondé de cette attitude a été démontré<sup>87</sup>.

L'hyperglycémie post-prandiale qui caractérise l'état prédiabétique constitue un facteur de risque important dans le développement du diabète ainsi que des maladies cardiovasculaires et d'hypertension. L'étude STOP-NIDDM («stopper le diabète non-insulino-dépendant», diabète dit de type 2) a permis de démontrer que le traitement de sujets prédiabétiques (intolérance au glucose) avec l'acarbose diminuait de façon significative le risque de développer le diabète de type 2, l'hypertension et, surtout, les maladies cardiovasculaires<sup>88</sup>. L'étude a démontré après 3,3 ans de traitement que l'acarbose est associée à une réduction significative de risque relatif de développer le diabète de 36%, développer des maladies cardiovasculaires de 49%, et développer de l'hypertension de 35%. Donc la réduction de l'hyperglycémie avec l'acarbose peut prévenir, ou du moins retarder chez des sujets prédiabétiques, le développement du diabète et des maladies cardiovasculaires.

Les dernières grandes études dans le domaine de l'hypertension artérielle et l'analyse de populations diabétiques concernées, permettent d'affiner la stratégie thérapeutique concernant la prise en charge de l'hypertension artérielle au cours du diabète. La première notion est que le contrôle rigoureux de l'hypertension artérielle est prérequis à toute prévention cardiovasculaire dans ce domaine. La deuxième notion importante est que toutes les classes médicamenteuses ne sont pas strictement équivalentes. La troisième notion est enfin que dans la très grande majorité des cas, une combinaison de 2 médicaments, voire 3 ou plus, sera nécessaire pour obtenir les cibles recommandées.

## 1.4 Le système rénine angiotensine (SRA) dans la néphropathie diabétique.

Durant les dernières années, différentes études ont démontré qu'une insulinothérapie intensive et qu'un traitement avec des bloqueurs du SRA permet de retarder la progression de la néphropathie diabétique, sans pouvoir toutefois la guérir<sup>89-98</sup>. Ces résultats indiquent que l'hyperglycémie et l'activation du SRA sont deux des causes majeures dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique. Cependant, les événements moléculaires reliant l'hyperglycémie et l'activation du SRA sont encore mal connus.

### 1.4.1 Le système rénine angiotensine (SRA)

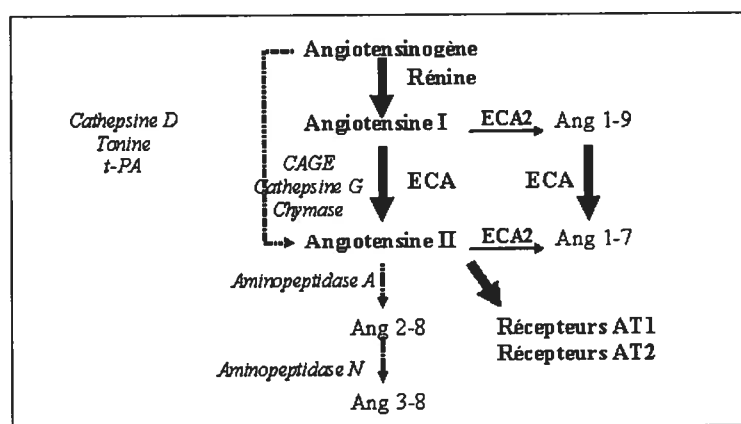
Le SRA est une cascade enzymatique faisant partie du système endocrinien. C'est en 1898 que Tigerstedt<sup>99</sup> obtenaient des extraits d'une substance du cortex de reins de lapin ayant des effets presseurs lorsque injectés à d'autres lapins. Cette substance sécrétée par l'appareil juxtaglomérulaire<sup>100</sup> fut appelée « rénine ». Plus tard, il fut montré que la rénine n'était pas l'agent presseur mais une enzyme clivant l'angiotensinogène (substrat spécifique de la rénine active) hépatique en angiotensine I<sup>101</sup>. L'angiotensine I est ensuite clivée par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ECA), et donne naissance à l'angiotensine II (Ang II) qui est l'élément le plus actif du système. Des angiotensinases cliveront ensuite l'angiotensine II en angiotensine III, et l'angiotensine III en angiotensine IV<sup>102</sup>. L'angiotensine II est transportée vers les cellules cibles et interagit avec au moins deux types de récepteur, les récepteurs AT1 (a et b)<sup>103</sup> et AT2. Ce système joue un rôle important dans le maintien de l'équilibre hydro-minéral, dans la perfusion des organes, et dans le contrôle de la pression artérielle à court et long terme.

Des enzymes autres que la rénine peuvent convertir l'angiotensinogène en Ang I ou Ang II, et d'autres enzymes que L'ECA peuvent convertir l'Ang I en Ang II (Figure 1.9).

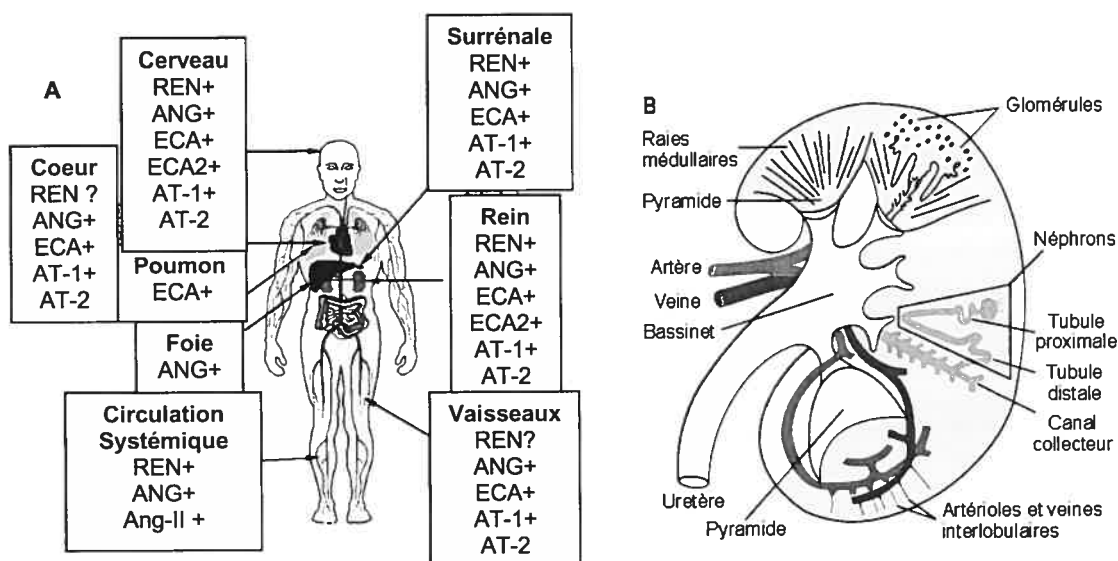
#### 1.4.1.1 Le système rénine angiotensine (SRA) local intrarénal

Parallèlement au SRA circulant, plusieurs études suggèrent l'existence d'un SRA au niveau rénal qui serait dépendant ou indépendant du système circulant. Plusieurs tissus dont le cerveau, les vaisseaux sanguins, le cœur, le tissu adipeux, les surrénales, le pancréas, le placenta et les reins expriment des ARNm des composants du SRA (Figure 1.10A)<sup>104-109</sup>.

Les ARNm et protéines du SRA, c'est-à-dire l'angiotensinogène, la rénine, l'enzyme de conversion et les récepteurs sont exprimés dans les cellules des tubules proximaux de rein (Figure 1.10B)<sup>110</sup>. Le rein est le seul site connu où la pro-rénine est convertie en rénine, et la seule source de rénine plasmatique. La protéine angiotensinogène (ANG) est synthétisée et sécrétée dans les cellules de tubules proximaux de reins (CTPR) de rats<sup>111</sup>, et l'Ang II intrarénal est dérivé de l'ANG synthétisé dans les CTPR. Des études physiologiques ont démontrés des niveaux d'Ang I et d'Ang II dans le fluide luminal ainsi que des concentrations tissulaire en Ang II respectivement 1000 et 100 fois supérieur à celles dans le plasma<sup>112,113</sup>.



**Figure 1.9** La cascade rénine-angiotensine. La cascade classique du SRA est représentée par les flèches pleines, et la voie alternative par les flèches en pointillés. Ang 2-8, Angiotensine III; Ang 3-8, Angiotensine IV; CAGE, chymostatin-sensible Ang-II-generating enzyme; t-PA, tissu plasminogène activateur.



**Figure 1.10** A- Expression du SRA<sup>68</sup>. B- Organisation d'un rein humain. (Université de Liège).

### 1.4.1.2 L'Angiotensinogène

L'ANG est une glycoprotéine d'origine hépatique de 452 acides aminés (62 kDa) portant la séquence de l'Ang II dans sa partie N-terminal <sup>114</sup>. Le gène ANG est de 11,8 kb comprenant 5 exons <sup>115</sup>. Il a été cartographié sur les chromosomes 19 du rat, 8 de la souris et 1 de l'homme <sup>116-118</sup>. La séquence 5' régulatrice a été analysée, démontrant la présence d'éléments de réponse aux hormones thyroïdes (TRE), à l'AMPc (CRE), aux glucocorticoïdes (GRE), aux oestrogènes (ERE) et aux protéines de choc thermique (HSP) <sup>119-125</sup>. Ce gène est essentiel dans le maintien de la pression sanguine et dans le développement et le maintien de la morphologie du rein. Des expériences de dominant négatif ont démontré que des souris sans gène ANG (ANG<sup>-/-</sup>) développent une hypotension, des lésions du cortex rénal, une inflammation interstitielle, une atrophie tubulaire et une réduction de la taille de la papille rénale <sup>126,127</sup>.

Les études génétiques ont montré que le locus du gène ANG est associé à une prédisposition à l'hypertension <sup>128</sup>. L'élévation d'Ang II intrarénal provoque une diminution de la fonction rénale et de l'excrétion du sodium, contribuant à une hypertension progressive avec développement de complications vasculaires et rénaux <sup>129-130</sup>.

### 1.4.1.3 La Rénine

La rénine est produite dans les cellules de l'appareil juxta-glomérulaire du rein, est relâchée dans la circulation et joue un rôle dans la formation de l'angiotensine dans le plasma par le clivage de l'Ang I à partir de la prohormone ANG. La rénine est une protéase enzymatique de nature glycoprotéiques de 37 à 40 kDa <sup>131</sup>. Le gène de la rénine contient 9 exons chez le rat et la souris et 10 exons chez l'homme. Le gène est localisé sur le chromosome 1 chez le rat et l'homme et le 13 chez la souris. Plusieurs éléments régulateurs sont présents dans la région 5' du gène dont GRE, ERE, et CRE. La rénine est un marqueur de complications microvasculaires et du développement de la néphropathie <sup>132,133</sup>.

La sécrétion de la rénine est sous contrôle de trois mécanismes : la voie macula densa (concentration en NaCl, contrôle négatif), la voie intrarénale barorécepteur (pression vasculaire intrarénale, contrôle négatif) et la voie des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques de l'appareil juxta-glomérulaire (contrôle positif). Une augmentation de la sécrétion de la rénine stimule la formation d'Ang II, qui se lie sur les récepteurs AT1 des cellules de l'appareil juxta-glomérulaire, qui inhibera la relâche de rénine. C'est le mécanisme de la petite boucle de

rétro-action négative du SRA. En faisant augmenter la pression via ses récepteurs AT1 et activant des barorécepteurs, l'AngII peut inhiber la relâche de la rénine. C'est le mécanisme de grande boucle de rétro-action négative du SRA.

#### **1.4.1.4 L'Enzyme de conversion de l'angiotensinogène (ECA)**

L'ECA est une dipeptidylcarboxypeptidase qui clive l'Ang I en Ang II. Il existe deux isoformes de l'ECA : somatique, et germinale ou testiculaire. L'ECA somatique est une glycoprotéine de 170kDa retrouvée dans les vaisseaux sanguins, le cœur, le rein et le cerveau. L'ECA plasmatique est dérivée de l'ECA somatique suite au clivage post-transcriptionnel de la région C-terminale. L'ECA germinale est une glycoprotéine de 90kDa retrouvée exclusivement dans les cellules germinales et les testicules. Le gène de l'ECA est localisé sur le chromosome 17 chez l'homme et contient 26 exons. L'ECA somatique est transcrit par les exons 1 à 6, et l'ECA germinale par les exons 13 à 26. Un CRE a été identifiées dans le promoteur de l'ECA germinale de souris <sup>134,135</sup>.

Récemment un homologue de l'ECA, l'ECA 2 a été identifié chez l'homme au niveau du rein, du cœur et des testicules. Le gène de l'ECA2 est localisé sur le chromosome X et présente 83% d'homologies entre la souris et l'homme. Les domaines catalytiques de type métalloprotéase sont identiques à 42% avec l'ECA. Il régulerait négativement le SRA. L'ECA2 clive respectivement l'Ang I et l'Ang II en Ang 1-9 et Ang 1-7 inactif. Des études récentes ont suggérées un rôle de l'ECA2 dans la régulation de la pression sanguine et le développement de l'hypertension. Le rôle physiologique de l'ECA2 dans le rein et dans la régulation de la pression sanguine n'est pas encore claire <sup>136-139</sup>.

#### **1.4.1.5 L'angiotensine II et ses récepteurs – AT1 et AT2**

##### **1.4.1.5.1 Les effets de l'angiotensine II**

Les effets centraux de l'angiotensine ont été mis en évidence essentiellement par l'expérimentation animale. Introduite dans des zones particulières du cerveau, l'angiotensine provoque :

- une hypertension artérielle par stimulation du système sympathique et libération de noradrénaline.
- un effet dipsogène : augmentation de la soif et de la consommation d'eau.
- une augmentation de la sécrétion de vasopressine et d'ACTH.
- une augmentation de l'appétence sodique.

Les effets périphériques de l'angiotensine sont essentiellement cardiovasculaires :

- Effet vasoconstricteur

Exprimé en activité molaire, l'effet vasoconstricteur de l'angiotensine II est environ 40 fois plus important que celui de la noradrénaline. Son effet vasoconstricteur (AT1) qui est responsable de son effet hypertensif, est surtout artériolaire (vaisseaux splanchniques, rénaux et cutanés) mais aussi veineux, ce qui tend à réduire le volume sanguin. L'Ang II augmente la résistance vasculaire périphérique en augmentant la relâche des catécholamines et le tonus sympathique. L'Ang II provoque la contraction des artérioles pré-capillaires induisant ainsi une élévation de la pression systolique et diastolique <sup>140</sup>.

Au niveau rénal, l'angiotensine provoque une vasoconstriction de l'artériole efférente du glomérule, ce qui permet de maintenir une pression artérielle suffisante pour assurer la filtration glomérulaire, notamment en cas de sténose de l'artère afférente. L'Ang II induit une augmentation intracellulaire de la PKC qui stimule l'échange  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dans les cellules du tubule proximal <sup>141</sup>.

- Effet cardiaque

L'angiotensine a un effet tachycardisant et faiblement inotrope positif (AT1) mais, in vivo, si l'effet vasoconstricteur est suffisant pour provoquer une hypertension artérielle, on observe une bradycardie réflexe. D'autre part, l'angiotensine participe directement, en plus des conséquences indirectes de son effet hypertenseur, au développement de l'hypertrophie cardiaque et des lésions athéromateuses vasculaires par son effet de type facteur de croissance (AT1). L'Ang II altère la structure cardiovasculaire en stimulant la migration, la prolifération, et/ou la capacité de synthèse des cellules de muscle lisse vasculaire, des cardiomyocytes et des fibroblastes. L'Ang II provoque une augmentation de synthèse des protéines de la matrice extracellulaire, et contribue au remodelage et à l'hypertrophie vasculaire et cardiaque. Elle mettrait en jeu d'une part la voie MAP-kinase par l'intermédiaire de la phospholipase C et de la protéine kinase C, et d'autre part la voie JAK/STAT. Cette activation conduit à la transcription de gènes à l'origine de facteurs de croissance.

- Effet sur l'aldostérone

A doses très faibles non vasoconstrictrices, l'angiotensine II et III stimulent la synthèse et la sécrétion d'aldostérone qui retient le sodium dans l'organisme et favorise l'élimination du potassium (effet AT1) <sup>142-143</sup>.

- Autre effet

Par ailleurs, l'angiotensine II exerce in vitro une action contracturante sur diverses fibres lisses : iléon, utérus, bronches.

#### 1.4.1.5.2 Les récepteurs AT1 et AT2

L'Ang II induit ses effets en se liant à 2 types de récepteurs membranaires, AT1 et AT2 (gènes localisés respectivement sur les chromosomes 3 et X de l'homme)<sup>144,145</sup> qui sont distincts de par leurs structures moléculaires et leurs propriétés pharmacologiques. Ils appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. AT1 et AT2 partagent 30% d'homologie de séquence. Chez le rat on retrouve les récepteurs AT1a et AT1b (gènes localisés respectivement sur les chromosomes 17 et 2)<sup>146</sup>. AT1a est le récepteur principal dans les vaisseaux sanguins, le cerveau, le rein, le poumon, le foie et la surrénale. AT1b est exprimé seulement dans des régions spécifiques de la surrénale et du rein. AT2 est exprimé durant la période fœtale, et chez l'adulte dans la surrénale, le cerveau et le cœur mais ne serait pas exprimé dans le rein de l'adulte. D'autres récepteurs à l'angiotensine ont été identifiés, AT3, AT4 et un récepteur à l'Ang (1-7), mais leur rôle reste à déterminer.

La stimulation des récepteurs AT1 est responsable de la plupart des effets de l'angiotensine II, notamment la vasoconstriction, mais aussi de l'angiogenèse, nécessaire à la croissance tumorale, de la stimulation de la transmission sympathique, de la croissance cellulaire, de la relâche d'aldostérone, et spécifiquement dans le rein la diminution de la filtration glomérulaire, la croissance, la différenciation et la stimulation de la réabsorption du sodium et des fluides dans les tubules proximaux<sup>147-150</sup>. Le rôle du récepteur AT2 reste à déterminer mais des études ont suggéré qu'il serait impliqué dans l'apoptose, l'inhibition de la croissance et de la prolifération<sup>151,152</sup>, et leur stimulation entraînerait une vasodilatation par ouverture de canaux potassiques ou par activation de la guanylate cyclase et un effet antimitogène au niveau de l'endothélium, peut-être par activité protéine phosphatase, neutralisant l'effet des kinases. La densité des récepteurs AT2 est beaucoup plus élevée dans les tissus fœtaux que dans ceux de l'adulte, sans que l'on en sache la raison. Les récepteurs AT1 et AT2 seraient impliqués dans le développement de la néphropathie diabétique chez des souris diabétiques induites par STZ<sup>153</sup>.

### 1.4.2 Blocage du système rénine-angiotensine

#### 1.4.2.1 Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'Ang II (IECA)

Plusieurs classes de molécules ont été créées pour tenter de bloquer le SRA. Les premiers bloqueurs du SRA ont été les inhibiteurs de l'ECA. L'efficacité des molécules



captopril et énalapril les a destiné au traitement de l'hypertension. De nombreuses études *in vivo* ont démontré le bénéfice de l'inhibition de l'ECA. Des études dans le model animal SHR ont montré que l'utilisation des IECA abaissait la pression artérielle systolique, et qu'un traitement avec le captopril prévenait l'hypertrophie ventriculaire gauche et la diminution de la performance cardiaque <sup>154,155</sup>. Le ramipril administré à des rats hypertendus et à des doses non-antihypertensive, était capable de prévenir l'hypertrophie ventriculaire gauche et la fibrose cardiaque <sup>156</sup>. Le blocage de l'ECA conduit également à la diminution de la dégradation des kinines et l'effet antihypertrophique du ramipril est aboli par un antagoniste du récepteur BK2 des kinines (HOE140) <sup>157</sup>. Le blocage de l'ECA aurait ainsi des effets bénéfiques grâce à sa double action sur la voie des angiotensines et sur la voie des kinines. Cependant, les travaux de Linz présentent des résultats différents <sup>158</sup>. De plus, l'ECA2 est insensible aux inhibiteurs classiques utilisés pour l'ECA, mais un nouveau peptide, le DX600 est un inhibiteur spécifique de l'ECA2 <sup>159</sup>.

#### **1.4.2.2 Les inhibiteurs de la rénine**

Ces inhibiteurs ont une structure basée sur celle de l'angiotensinogène, et se lient à la rénine sans être clivés par elle. Les inhibiteurs de la rénine diminuent la pression artérielle, l'activité de la rénine plasmatique, les concentrations d'angiotensine II et d'aldostérone circulantes, alors qu'ils augmentent la concentration de rénine chez les individus hypertendus <sup>160</sup>.

#### **1.4.2.3 Les antagonistes des récepteurs à l'angiotensine II**

Il était important de maîtriser l'élément le plus actif du SRA : l'angiotensine II. L'antagoniste le plus communément utilisé a été la saralazine, qui bloque les deux types de récepteurs. Ce peptide a aussi une activité agoniste qui selon les conditions d'administration peut être faible ou forte. L'effet bénéfique du losartan a été testé cliniquement <sup>161,162</sup>. Le losartan (antagoniste du récepteur AT1) est capable d'abaisser la pression artérielle chez des animaux hypertendus suite à une sténose complète d'une artère rénale. Récemment, une étude a été effectuée sur des patients hypertendus avec néphropathie due à un diabète de type 2 et traités avec l'irbesartan. Cette étude a montré une diminution de risque d'insuffisance rénale terminale de 23% suite au traitement par irbesartan. L'utilisation d'irbesartan a donc un effet rénoprotectif significatif chez des patients diabétiques de type 2 <sup>163</sup>. Chez des rats Wistar diabétiques, l'excrétion d'albumine dans les urines est fortement augmentée, et l'utilisation de captopril et de DuP 753 (antagoniste du récepteur AT1) atténue significativement cette

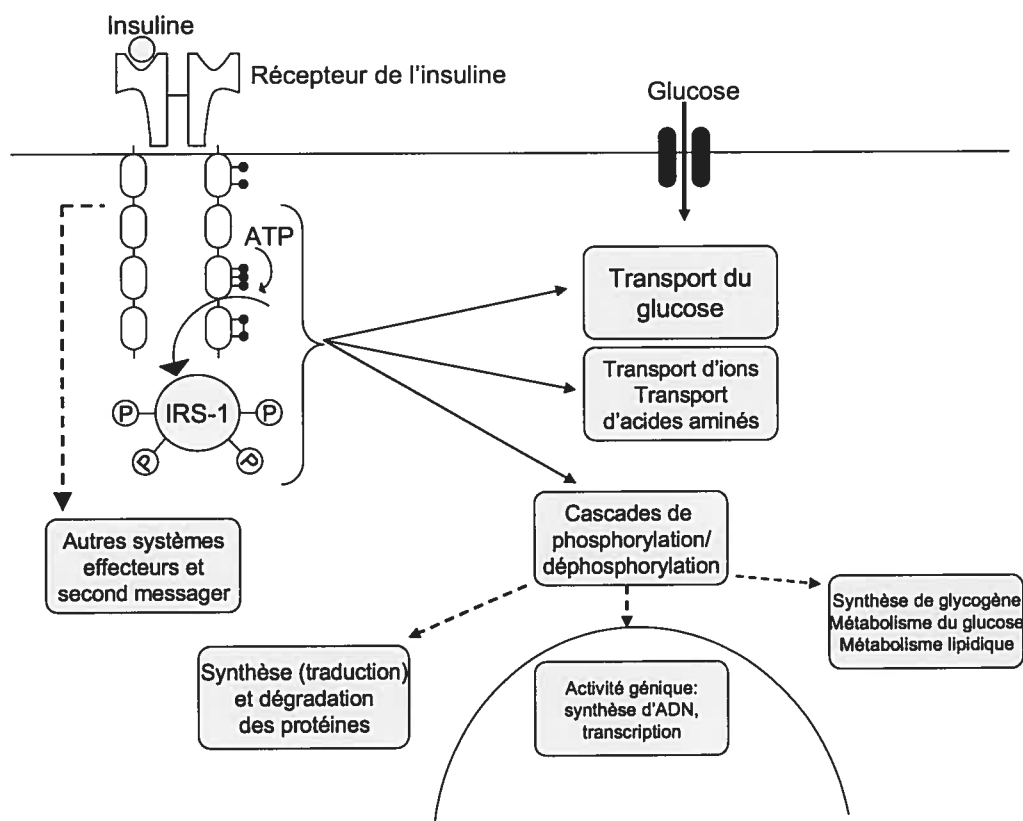
excrétion urinaire d'albumine. Le PD 123177 (antagoniste du récepteur AT<sub>2</sub>) permet également d'atténuer l'excrétion urinaire d'albumine<sup>153</sup>.

## 1.5 L'insuline

La glycémie est la résultante de l'équilibre entre la production hépatique de glucose et son utilisation par les principaux tissus dits insulino-dépendants (muscles squelettiques, tissu adipeux) et par les tissus dits insulino-indépendants (cerveau, rein). Cet équilibre est étroitement contrôlé par les hormones pancréatiques, l'insuline et le glucagon. Une augmentation de la glycémie suite à un repas riche en hydrates de carbone se traduit par une augmentation de la sécrétion d'insuline par les cellules  $\beta$  pancréatiques et une mise au repos des cellules  $\alpha$  pancréatiques qui sécrètent le glucagon ; lors d'un repas mixte, le glucagon est stimulé comme l'insuline. C'est l'augmentation des concentrations circulantes d'insuline qui stimule le transport du glucose dans les tissus périphériques et freine la glycogénolyse et la néoglucogenèse hépatique. L'insuline module toute une série d'évènements cellulaires tels que le transport transmembranaire de glucose, d'acides aminés et de certains ions, la lipogenèse et la lipolyse, la synthèse et la dégradation du glycogène, la transcription de certains gènes, le renouvellement de certains ARNm, la protéosynthèse et la protéolyse, et la synthèse de l'ADN<sup>164,165</sup>.

En fonction de leur cinétique d'apparition, on distingue trois types d'effets physiologiques de l'insuline (figure 1,4). Les effets rapides qui surviennent juste après l'exposition de la cellule cible à l'hormone, comme l'activation des systèmes de transport du glucose, d'acides aminés ou d'ions, ou des modifications covalente d'enzymes induites par des modifications de leur phosphorylation. Les effets intermédiaires correspondent à la modulation de l'activité de certains gènes et à des modifications de la quantité de certaines protéines. Les effets à long terme apparaissent après plusieurs heures, et correspondent à une activation par l'insuline de la synthèse d'ADN, de la synthèse protéique, de la prolifération et de la croissance cellulaire.

Pour exercer ses effets pléiotropes sur le métabolisme et la croissance cellulaire, l'insuline doit tout d'abord se fixer (de façon réversible) à un récepteur spécifique présent à la surface de la membrane plasmique.



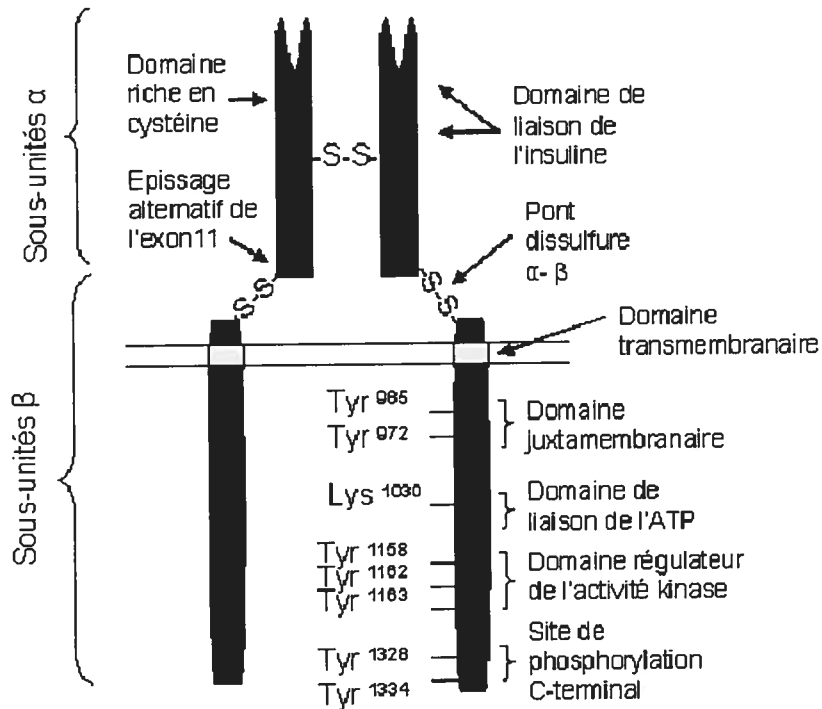
**Figure 1.11** : L'insuline se fixe sur la sous-unité  $\alpha$  et stimule l'activité tyrosine-kinase portée par la sous-unité  $\beta$  du récepteur de l'insuline. L'insuline induit la translocation des transporteurs du glucose (Glut 4 en particulier) depuis le pool intracellulaire vers la membrane plasmique ; elle module des enzymes cytosoliques (glycogène synthase activée par déphosphorylation, l'acétyl-CoA carboxylase activée par phosphorylation ou encore la phosphoénolpyruvate-carboxykinase désactivée par inhibition de la transcription de son gène) et des enzymes mitochondriales (telles que la pyruvate-déshydrogénase activée par déphosphorylation). Elle module aussi la synthèse protéique (elle la favorise au niveau traductionnel en augmentant le niveau de phosphorylation de la protéine ribosomale S6) et la protéolyse. Enfin, elle favorise la croissance cellulaire. Outre son activité enzymatique propre de type tyrosine-kinase, le récepteur de l'insuline pourrait activer d'autres systèmes effecteurs membranaires générateurs de médiateurs intracellulaires de faible poids moléculaire <sup>166</sup>.

- = résidu tyrosine phosphate.
- = site de phosphorylation

### 1.5.1 Le récepteur de l'insuline

La structure du récepteur de l'insuline l'apparente à la famille des tyrosine-kinases incluant le récepteur de IGF-1 (insulin-like growth factor 1) et le récepteur IRR (insulin receptor-related receptor) <sup>167,168</sup>. Le récepteur de l'insuline est composé de deux sous unités  $\alpha$  et de deux sous unités  $\beta$ , liées de façon covalente par des ponts dissulfures, pour constituer un hétérotétramère (figure 1.12). Cet holorécepteur a un poids moléculaire de 350 000 Da, et chaque moitié du dimère comporte une sous-unité  $\alpha$  de 135 kDa et une sous-unité  $\beta$  de 95 kDa.

La sous-unité  $\alpha$  est entièrement extracellulaire et contient le site de liaison de l'hormone ; la sous-unité  $\beta$  est transmembranaire et porte l'activité tyrosine-kinase <sup>169-172</sup>.



**Figure 1.12 :** Cartographie des différents domaines du récepteur de l'insuline dans l'espèce humaine. La chaîne  $\alpha$  est extracellulaire ; la chaîne  $\beta$  est transmembranaire <sup>166</sup>.

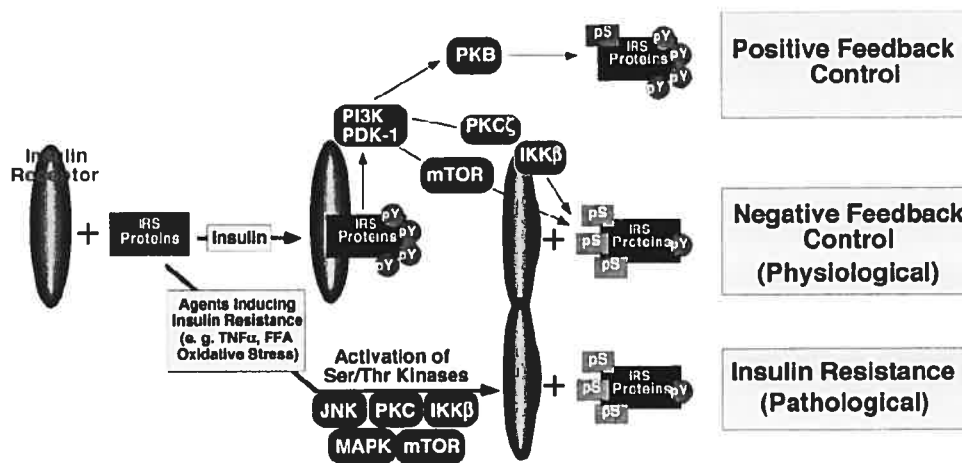
L'insuline se lie à la sous-unité  $\alpha$  induisant une dépression de l'activité kinase dans la sous-unité  $\beta$  suivit par la transphosphorylation de la sous-unité  $\beta$  avec un changement conformationnel favorisant l'activité kinase <sup>168</sup>. Les récepteurs de l'insuline, de l'IGF-I et de l'IRR peuvent former des hybrides fonctionnels; ainsi, une mutation dans un de ces récepteurs peut empêcher l'activité des autres <sup>138</sup>.

Le récepteur de l'insuline est exprimé dans la plupart des tissus chez les mammifères, sa densité varie néanmoins d'un tissu à l'autre et est maximale (> 300 000 récepteurs par cellule) dans deux des tissus cibles de l'insuline : le foie et le tissu adipeux. Ce nombre diminue dans l'obésité, le diabète de type 2, l'acromégalie, l'administration de corticoïdes et d'œstrogénostatifs.

## 1.5.2 Le réseau de signalisation intracellulaire insulino-dépendant.

Depuis l'identification de la protéine IRS-1 (insulin-receptor substrate 1), substrat intracellulaire du récepteur, la voie des interactions protéines-protéines assurant la connexion du récepteur de l'insuline avec les effecteurs intracellulaires est privilégiée pour expliquer la propagation intracellulaire du signal une fois que le récepteur de l'insuline est autophosphorylé<sup>169-172,174</sup>. Une fois activé, le récepteur de l'insuline peut phosphoryler au moins neuf substrats sur des résidus tyrosines. Quatre d'entre eux appartiennent à la famille des protéines IRS<sup>175</sup> (IRS1/2/3/4). Les autres substrats sont Gab-1, p60<sup>dok</sup>, Cbl, APS et des protéines adaptatrices Shc<sup>176</sup>.

IRS-1 n'a pas d'activité enzymatique décelable mais contient des sites potentiels de phosphorylation sur des résidus tyrosines qui sont reconnus par des protéines contenant des domaines SH2 (Src-homology-2). IRS-1 est une protéine adaptatrice (*docking protein*) qui connecte le récepteur de l'insuline avec des effecteurs intracellulaires comme la protéine Grb2, la protéine tyrosine-phosphatase Syp (ou SHPTP-2), Nck, Cfn, CrkII ou encore la sous-unité p85 de la PI(3)K. IRS-1 contient également des sites de phosphorylation sérine/thréonine qui représentent autant de possibilités de phosphorylation par les caséines-kinases II, protéines kinases C, protéines kinases A, kinases GMPc-dépendantes, MAP-kinases et cdc2 kinases (figure 1.13).



**Figure 1.13** : La phosphorylation induite par l'insuline de résidus Sérines (pS) Tyrosines (pY) des protéines IRS-1 sert aussi bien de mécanisme de rétro-côntrol positif ou négatif dans des conditions physiologiques, qu'un moyen d'induire un état de résistance à l'insuline dans des conditions pathologiques<sup>177</sup>.

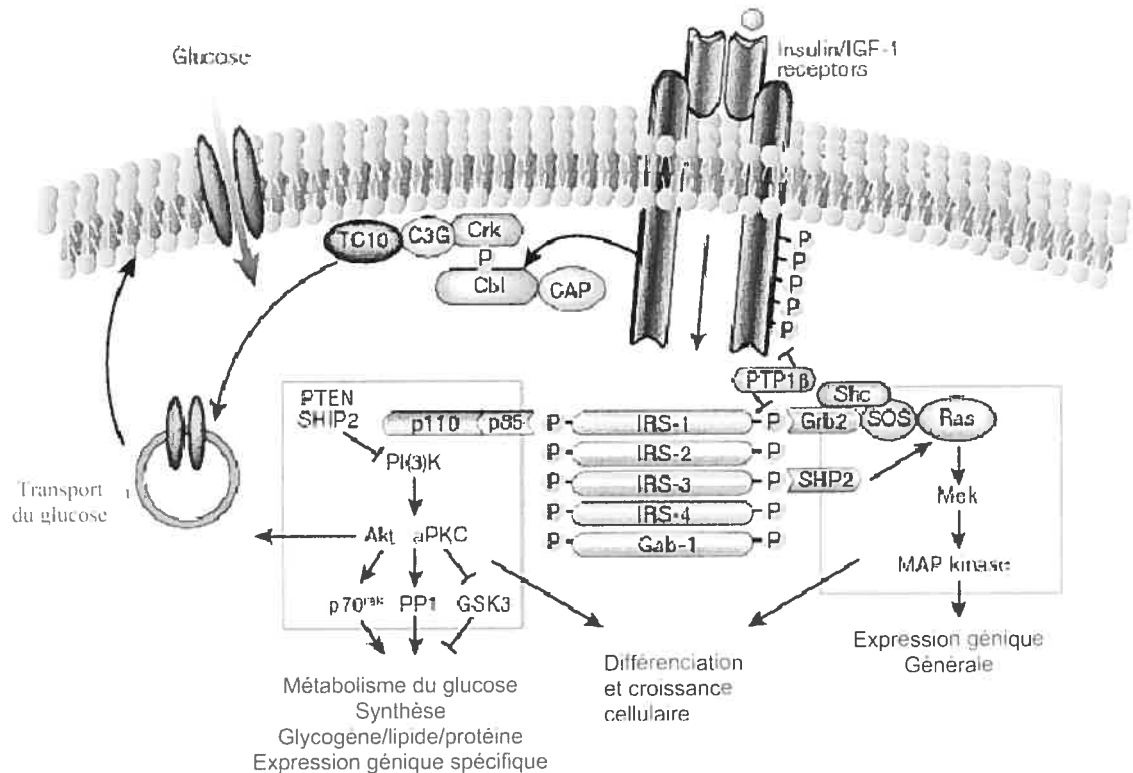


Figure 1.14 : Le signal de transduction dans l'action de l'insuline <sup>178</sup>.

### 1.5.2.1 La voie de la PI(3) K

La PI(3) Kinase joue un rôle clé dans l'action métabolique et mitogénique de l'insuline <sup>179</sup>. La PI(3) K est rapidement stimulée par l'insuline dans le tissu adipeux blanc et le muscle. L'activation est corrélée avec le recrutement de la protéine depuis le cytosol vers la membrane plasmique, ce qui aurait pour effet de mettre la PI(3) K en présence de ses substrats phospholipidiques membranaires. La sous-unité p85 s'associe avec la protéine IRS-1 et la phosphorylation de IRS-1 entraîne l'activation de la PI(3) K. La mutation dans la région juxtamembranaire du récepteur de l'insuline qui se traduit par la perte de la phosphorylation de IRS-1 et de l'effet biologique de l'insuline entraîne aussi la perte de l'activation par l'insuline de la PI(3) K <sup>169-172,174,180</sup>. Des inhibiteurs de classe Ia de la PI(3) K, ou des transfections avec des dominants négatifs de l'enzyme, empêche la plupart des actions métaboliques de l'insuline, dont la stimulation du transport du glucose, la synthèse de lipide et de glycogène.

La PI(3) K est une enzyme hétérodimérique constituée par une sous-unité régulatrice de 85kDa (protéine p85) et une sous-unité catalytique de 110 kDa (protéine p110). L'association de la PI(3) K avec IRS-1 phosphorylée sur des Tyr, passe par les domaines SH2. Cette interaction protéine-protéine implique les motifs spécifiquement phosphorylés sur le récepteur, avec les séquences YMXM ou YVXM (X= acide aminé indifférent, Y=tyrosine, V=valine, M=méthionine) <sup>181</sup>. Des isoformes des sous-unités régulatrices ont été identifiées et sont dérivées de trois gènes (*p85<sup>α</sup>*, *p85<sup>β</sup>* et *P55<sup>PIK</sup>*) <sup>182</sup> alternativement épissé de *p85α* pour produire *AS53/p55α* et *p50α* <sup>183,184</sup>. Le rôle exacte des différentes sous unités régulatrices de la PI(3) K dans l'action de l'insuline est encore mal connu. Ces variants d'épissage présentent des différences de puissances pour l'activation enzymatique, dans la distribution tissulaire et la sensibilité de l'insuline <sup>185</sup>.

La PI(3) K catalyse la phosphorylation des phosphoinositides en position D3 du noyau inositol, ce qui a pour conséquence la production de phosphatidylinositol-3-phosphates (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), qui lie un domaine PH ( *pleckstrin homology domain* ) d'une variété de molécules de signalisation de manière à altérer leur activité ou leur localisation cellulaire <sup>186</sup>. La PI(3) K possède également une activité sérine kinase, et les sous-unités régulatrices et catalytiques de l'enzyme peuvent interagir avec d'autres protéines de signalisation, suggérant que ces protéines peuvent être importante dans l'action de l'insuline indépendamment de la génération de PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> <sup>187-188</sup>. Phosphatidylinositol-3-phosphates régule trois principales classes de molécules de signalisation : La famille AGC de protéines kinases sérine/thréonine <sup>189</sup>, les protéines de la famille des GTPases Rho <sup>190</sup>, et des tyrosine kinases de la famille TEC <sup>191</sup>. La PI(3) K active également la voie mTOR/FRAP. La PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) est une des protéines kinases qui active la sérine/thréonine kinase Akt/PKB <sup>192</sup>. L'activation de la PI(3) K par l'insuline conduit à l'activation de Akt et est médiée par la PDK1 <sup>193</sup>. Akt comporte un domaine catalytique très proche de celui de la protéine-kinase A, précédé par un domaine PH. Akt semble impliqué dans la translocation de Glut-4 induite par l'insuline. Akt activerait également la pp70-S6-kinase, ainsi que le facteur de transcription FKHR et la protéine CREB <sup>194</sup>. Akt diminue l'activité de la glycogène synthase kinase 3 en la phosphorylant <sup>195</sup>.

### 1.5.2.2 La voie des MAPK

Parmi les autres protéines pouvant s'associer à la forme phosphorylée d'IRS-1, on trouve la protéine GRB-2 (*growth factor receptor bound protein 2*), la protéine Nck, la protéine tyrosine phosphatase Syp (ou SHPTP2)<sup>169-172,174,180</sup>.

Comme pour les autres facteurs de croissance, l'insuline active les MAPK. Cette voie implique la phosphorylation (sur tyrosines) des protéines IRS et/ou Shc, qui en retour interagissent avec la protéine adaptatrice GRB-2 (par un domaine SH2). GRB-2 est une protéine cytosolique contenant également deux domaines SH3 assurant son association constitutive à la protéine SOS (*son of sevenless*). SOS est un facteur d'échange de GTP/GDP qui favorise l'activation de la p21-ras-GDP (inactive) à la p21-ras-GTP (active). La protéine p21-ras est un membre de la famille des petites protéines de liaison du GTP impliquées dans la régulation cellulaire de la croissance, du contrôle des flux de protéines (chaperons moléculaires) et du transport de vésicules. L'activation de Ras a également besoin de la stimulation de SHP2<sup>188</sup>.

L'activation de p21-ras stimule une cascade de phosphorylation sur des résidus sérines et thréonines et *in fine*, active la voie des MAP-kinases (*mitogen-activated protein kinases*). Les MAP-kinases sont impliquées dans les effets mitogènes des facteurs de croissance et la transformation cellulaire, et également dans la régulation du métabolisme cellulaire par l'insuline, puisque PPG-1 (*glycogen-associated protein phosphatase*), qui déphosphoryle et active la glycogène-synthase musculaire, est phosphorylée et activée par la protéine pp90-S6-kinase (ISPK, *insulin sensitive protein kinase*) lorsque cette dernière est activée par l'insuline. Or la pp90-S6-kinase est phosphorylée et activée par les MAP-kinases en réponse à l'insuline. Les étapes intermédiaires conduisant à l'activation des MAP-kinases comportent l'interaction directe du complexe actif p21-ras-GTP avec la Raf1-kinase, l'activation de cette dernière enzyme, puis les activations successives de la MAPK-kinase-kinase (MEK-kinase) et de la MAP-kinase. Selon ce modèle, les MAP-kinase joueraient alors un rôle clé dans la régulation d'un effet majeur de l'insuline comme la synthèse du glycogène dans le muscle squelettique. Cependant, ce modèle d'activation de la synthèse du glycogène par l'insuline a été remis en question sur la base d'observations concluant que l'activation de MAP-kinases et de ISPK n'était ni nécessaire ni suffisante, pour activer la glycogénogenèse dans le muscle squelettique<sup>196</sup>. Les MAP-kinases pourraient être aussi impliquées dans la régulation du transport du glucose (Glut-4) en phosphorylant la petite protéine G, Rab4, un des éléments de la machinerie réglant la translocation du transporteur du glucose<sup>197</sup>. Cependant l'inhibition de



MEK (par PD98059 and U0126) ne change pas le transport de glucose stimulé par l'insuline<sup>198</sup>. On sait par ailleurs que les MAP-kinases jouent un rôle dans la régulation de la transcription de certains gènes, puisque plusieurs facteurs de transcription tels que c-Myc ou c-Myb comptent parmi leurs substrats. L'activation de ERK (MAPK) peut catalyser la phosphorylation de facteurs de transcription comme p62<sup>TCF</sup> dirigeant la prolifération et la différenciation cellulaire. Le blocage de cette voie avec un mutant dominant négatif ou un inhibiteur pharmacologique prévient la stimulation de la croissance cellulaire par l'insuline, mais n'a pas d'effets sur les actions métaboliques de l'hormone<sup>199,200</sup>.

L'insuline stimule la phosphorylation des MAP-kinases p44/42 dans les cellules isolées de tubules proximaux de reins non diabétiques, et l'utilisation d'un inhibiteur de MEK (PD 98059) empêche cet effet. Mais l'insuline ne peut stimuler cette phosphorylation dans ces mêmes cellules de rat diabétique. L'utilisation d'un inhibiteur de PI(3) K (Wortmannin) n'affecte pas l'action de l'insuline sur la phosphorylation de ces MAP-kinases dans les cellules de tubules proximaux de reins (CTPR) de rats sains ou diabétique, suggérant que le défaut dans la signalisation de l'insuline sur cette phosphorylation des MAP-kinases serait localisé en amont de cette phosphorylation des MAP-kinases, sur IRS1/2 ou Ras ou Raf-1<sup>201</sup>.

## 2. HYPOTHESE ET OBJECTIFS

L'hyperglycémie et l'activation du système rénine-angiotensine sont deux principales causes dans la pathogenèse de la néphropathie diabétique. Précédemment, il a été démontré que l'insuline stimule la phosphorylation des MAPK P44/42 dans des cellules immortalisées de tubules proximaux de reins de rats cultivées dans un milieu normal en glucose, mais que cet effet n'est pas reproduit lorsque ces cellules sont cultivées en milieu enrichi de glucose.

Dans notre laboratoire, nous avons démontré que l'effet de l'hyperglycémie sur l'expression de gène de l'ANG serait médié, en partie, par la génération de ROS et l'activation de la voie de la MAPK p38. De récentes études ont déterminé que la glucosamine et la voie des hexosamines stimule également l'expression du gène de l'ANG.

**Hypothèse :** Nous avons formulé l'hypothèse que l'hyperglycémie stimule l'expression du gène de l'angiotensinogène dans les cellules de tubules proximaux de reins de rats *in vitro* et *in vivo*. Cet effet stimulateur induit par l'hyperglycémie serait médié, au moins en partie, par la voie des hexosamines. De plus, l'activation du SRA intrarénal peut induire la résistance à l'insuline sur l'expression du gène de l'angiotensinogène dans les cellules immortalisées de tubules proximaux de reins (CTPR) dans un milieu riche en glucose.

Le travail vise donc à étudier :

- 1) La stimulation de l'expression du gène de l'ANG dans les CTPR par l'hyperglycémie et le rôle de la voie des hexosamines.
- 2) L'induction de la résistance à l'insuline sur l'expression du gène ANG dans les CTPR par l'incubation prolongée dans un milieu riche en glucose.
- 3) L'activation par l'hyperglycémie de l'expression intrarénale du SRA chez les rats diabétiques (type 1).

### **3. HIGH GLUCOSE STIMULATES ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION AND CELL HYPERTROPHY VIA ACTIVATION OF THE HEXOSAMINE BIOSYNTHESIS PATHWAY IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS**

Tusty-Jiuan Hsieh\*, Pierre Fustier\*, Shao-Ling Zhang\*, Janos G. Filep\*\*,  
Shiow-Shih Tang\*\*\*, Julie R. Ingelfinger\*\*\*, I. George Fantus\*\*\*\*, Pavel Hamet\*  
and John S.D. Chan\*†

\*Université de Montréal  
Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Hôtel-Dieu  
Centre de recherche  
Pavillon Masson  
3850 Saint-Urbain Street  
Montreal, Quebec  
Canada H2W 1T8

\*\*Maisonneuve-Rosemont Hospital  
Research Center  
5415 boul. De l'Assomption  
Montreal, Quebec,  
Canada, H1T 2M4

\*\*\*Harvard Medical School  
Massachusetts General Hospital  
Pediatric Nephrology Unit  
15 Parkman Street, WAC 709  
Boston, MA 02114-3117  
USA

\*\*\*\*Mount Sinai Hospital  
Dept. of Medicine  
University of Toronto  
600 University Avenue, Room 780  
Toronto, Ontario  
Canada M5G 1X5

\*† To whom correspondence should be addressed  
Telephone: (514) 890-8000 extension 15080  
Fax: (514) 412-7204  
E-mail: john.chan@umontreal.ca

Short Title: Hexosamine biosynthesis pathway and angiotensinogen gene expression

## ABSTRACT

The present study investigated whether activation of the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) might mediate, at least in part, the high glucose effect on ANG gene expression and IRPTC hypertrophy. IRPTCs were cultured in monolayer. ANG, renin and  $\beta$ -actin mRNA expression were determined by specific reverse transcription-polymerase chain reaction assays. Phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), activating transcription factor-2 (ATF-2) and cAMP-responsive element-binding protein (CREB) was determined by Western blot analysis. Cell hypertrophy was assessed by flow cytometry, intracellular p27<sup>kip1</sup> protein levels and by <sup>3</sup>H-leucine incorporation into proteins. Glucosamine stimulated ANG and renin mRNA expression and enhanced p38 MAPK, ATF-2 and CREB phosphorylation in normal glucose (5 mM) medium. Azaserine and DON (inhibitors of glutamine: fructose-6-phosphate amino transferase enzyme) blocked the stimulatory effect of high glucose but not that of glucosamine on ANG gene expression in IRPTCs. SB 203580 (a specific p38 MAPK inhibitor) attenuated glucosamine action on ANG gene expression as well as p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation but not that of CREB. GF 109203X and Calphostin C (inhibitors of protein kinase C) blocked glucosamine effect on ANG gene expression and CREB phosphorylation but had no impact on p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation. Finally, both glucosamine and high glucose induced IRPTC hypertrophy. The hypertrophic effect of glucosamine was blocked in the presence of GF 109203X but not azaserine and SB 203580. In contrast, the hypertrophic effect of high glucose was blocked in the presence of azaserine, GF 109203X but not SB203580. Our studies demonstrate that the stimulatory effect of high glucose on ANG gene expression and IRPTC hypertrophy may be mediated, at least in part, via activation of HBP signaling.

Index words: Hexosamine biosynthesis pathway, angiotensinogen, kidney

## INTRODUCTION

High levels of glucose and/or angiotensin II (Ang II) may be responsible, directly or indirectly for renal proximal tubular hypertrophy and interstitial fibrosis in diabetes. *In vitro* studies have shown that the incubation of murine proximal tubular cells in high glucose medium ( $\geq 25$  mM) and/or in the presence of high concentrations of Ang II ( $\geq 10^{-8}$  M) induces cellular hypertrophy and extracellular matrix protein expression (1-5). Clinical trials have demonstrated beneficial effects of angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors or Ang II-receptor antagonists in reducing proteinuria and slowing the progression of nephropathy in diabetic patients (6-10). These studies indicate an important role for Ang II in the development of diabetic nephropathy.

In addition to the systemic or circulatory renin-angiotensin system (RAS), it is now well accepted that there is a local intrarenal RAS (11,12). The mRNA and protein components of the RAS, including angiotensinogen (ANG), renin, ACE and Ang II receptors (AT<sub>1</sub>-R and AT<sub>2</sub>-R) are expressed in murine (mouse and rat) immortalized proximal tubular cell lines (13-18). We have reported that high concentrations (25 mM) of glucose stimulate ANG gene expression in rat immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs) (19, 20). Inhibitors of aldose reductase (Tolrestat), protein kinase C (PKC) (staurosporine or H-7), and p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) (SB 203580) blocked the stimulatory effect of high glucose on ANG gene expression (19, 20). These studies indicate that high glucose action on ANG expression gene in IRPTCs is mediated, at least in part, via polyol/PKC and p38 MAPK signal transduction pathways. We have also reported that blockers of RAS and stable transfection of antisense rat ANG cDNA prevented the induction of IRPTC hypertrophy in high glucose (21, 22). Such studies provided the evidence that intrarenal RAS activation plays an important role(s) in the pathogenesis of nephropathy in diabetes.

More recently, we reported that high glucose evoked the generation of reactive oxygen species in IRPTCs (23). Antioxidants and superoxide scavengers, inhibitors of mitochondrial oxidation, a manganese superoxide dismutase (Mn SOD) mimetic (Mn TBAP) and catalase (CAT) suppressed ANG gene expression and p38 MAPK phosphorylation evoked by high glucose (23). Hydrogen peroxide also stimulates p38 MAPK phosphorylation and ANG gene expression in IRPTCs, and its effect is inhibited by CAT and SB 203580 (23). These studies demonstrated that the high glucose action on ANG gene expression is mediated, at least in part, via reactive oxygen species (ROS) generation and activation of p38 MAPK signaling. The molecular mechanism(s) of ROS action on ANG gene expression, however, remain(s) largely undefined.

A major function of the hexosamine biosynthesis pathway (HBP) is diverting hexose phosphate and glutamine to the glycosylation pathway and synthesis of glycoproteins, mainly in the liver. Normally, this pathway accounts for only a small percentage (1-3%) of the glucose metabolised and is an ideal candidate as a cellular nutrient “sensor” responding to energy availability (see reviews 24, 25). Recent studies have reported that glucosamine also stimulates ANG gene expression in the rat liver and adipose tissue (26). Thus, the aim of present experiments was to investigate whether the HBP could also mediate the high glucose effect on ANG gene expression and hypertrophy in IRPTCs. Our results provide evidence that high glucose-induced ANG gene expression and IRPTC hypertrophy is indeed mediated, at least in part, via activation of the HBP signal transduction pathway.

## **MATERIALS AND METHODS**

Glucosamine, D-mannitol, azaserine (O-diazoacetyl-L-serine, an inhibitor of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase (GFAT) enzyme), DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucine, an inhibitor of GFAT), GF 109203X (an inhibitor of PKC), Calphostin C (an inhibitor of PKC) and monoclonal antibodies against  $\beta$ -actin were purchased from Sigma-

Aldrich Canada Ltd. (Oakville, ON, Canada). SB 203580 (a specific inhibitor of p38 MAPK) was obtained from Calbiochem Inc. (La Jolla, CA, USA). Normal glucose (5 mM) Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, catalogue no. 12320), 100× penicillin/streptomycin and fetal bovine serum (FBS) were bought from Invitrogen, Inc. (Burlington, ON, Canada). <sup>3</sup>H-Leucine was bought from Amersham-Pharmacia Biotech (Baie d'Urfé, QC, Canada). Monoclonal antibodies against p27<sup>Kip1</sup> and rat ANG were obtained from Transduction Laboratories, Inc. (Mississauga, ON, Canada) and Research Diagnostics, Inc. (Flanders, NJ, USA), respectively.

The PhosphoPlus p38 MAPK, PhosphoPlus activating transcription factor-2 (ATF-2) and PhosphoPlus cAMP-responsive element binding protein (CREB) antibody kits were purchased from New England Biolabs (NEB), Inc. (Mississauga, ON, Canada). The PhosphoPlus p38 MAPK kit was used for the rapid analysis of p38 MAPK (Thr<sup>180</sup>/Tyr<sup>182</sup>) phosphorylation status that function in the stress-activated protein kinase cascade. The PhosphoPlus CREB and PhosphoPlus ATF-2 were deployed for the rapid analysis of CREB (Ser<sup>133</sup>) and ATF-2 (Thr<sup>71</sup>) phosphorylation status, respectively.

Oligonucleotides were synthesized by Alpha DNA (Montreal, Quebec, Canada). Restriction and modifying enzymes were purchased from Invitrogen Inc., La Roche Biochemicals, Inc. (Laval, QC, Canada), or Amersham-Pharmacia Biotech.

### Cell Culture

IRPTCs (cell line #93-p-2-1) at passages 11 to 18 were used in the present studies. The characteristics of this cell line have been described previously (27).

IRPTCs were grown in 100 X 20 mm plastic Petri dishes (Life Technologies Inc.) in normal glucose (i.e., 5 mM) DMEM (pH 7.45), supplemented with 10% FBS, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin, in a humidified atmosphere in 95% air and 5% CO<sub>2</sub>

at 37 °C. For subculturing, the cells were trypsinized (0.05% trypsin and EDTA) and plated at  $2.5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 100 X 20 mm Petri dishes.

Effect of Glucosamine (GlcN), Azaserine (AZA), DON, SB 203580, GF 109203X and Calphostin C on ANG mRNA Expression in IRPTCs

To study the effect of GlcN on the expression of ANG mRNA in IRPTCs, these cells were incubated in 5 mM glucose medium containing 1% depleted fetal bovine serum (dFBS) in the absence or presence of various concentrations of GlcN ( $10^{-10}$  M to  $10^{-4}$  M), or in 25 mM glucose medium in the absence or presence of various concentration of azaserine (AZA) or DON ( $10^{-9}$  to  $10^{-7}$  M) for 24 h. At the end of the incubation period, the cells were collected and total RNA was extracted using Trizol reagent according to the protocol of the supplier (Invitrogen, Inc.). Total RNA was used in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) to quantify the amount of ANG, renin and  $\beta$ -actin mRNA as described previously (23). Briefly, 2  $\mu$ g of total RNA was used to synthesize first-strand cDNAs by employing the Super-Script pre-amplification system according to the supplier's protocol (Invitrogen, Inc.). Then, first-strand cDNA was diluted with water to a ratio of 1:4, and aliquots were processed to amplify the rat ANG, renin and  $\beta$ -actin cDNA fragments with the PCR core kit according to the supplier's instructions (Invitrogen, Inc.). First-strand cDNA (5  $\mu$ l) and primers of rat ANG (400 nM) and rat  $\beta$ -actin (100 nM) were added in a final volume of 50  $\mu$ l PCR mixture (final concentration: 1 x PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, and 2.0 units of Taq DNA polymerase) (Life Technologies, Inc.). The PCR mixture was amplified in a Perkin-Elmer Cetus 2400 thermocycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA). After denaturation at 94°C for 3 min, ANG or renin and  $\beta$ -actin cDNA were co-amplified in the same tube under the following conditions: 94°C for 45 second, 60°C for 45 second, and 72°C for 1 min 30 sec. PCRs were further extended at 72°C for 7 min After 30 cycles.



The sense and antisense rat ANG primers used were 5'-CCT CGC TCT CTG GAC TTA TC-3' and 5'-CAG ACA CTG AGG TGC TGT TG-3', corresponding to the nucleotide sequences N+676 to N+695 and N+882 to N+901 of rat ANG cDNA (32), respectively. The sense and antisense rat renin primers used were 5'-CTG CCA CCT TGT TGT GTG AG-3' and 5'-CCA GTA TGC ACA GGT CAT CG-3', corresponding to the nucleotide sequences N+1033 to N+1052 and N+1277 to N+1296 of rat ANG cDNA (33), respectively. The sense and antisense rat  $\beta$ -actin primers were 5'-ATG CCA TCC TGC GTC TGG ACC TGG C-3' and 5'-AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG G-3', corresponding to the nucleotide sequences N+155 to N+179 of exon 3, and nucleotide sequences of N+115 to N+139 of exon 5 of the rat  $\beta$ -actin gene (34), respectively.

To identify rat ANG, renin and  $\beta$ -actin cDNA fragments, 10  $\mu$ l of the PCR product were electrophoresed on 1.2% agarose gel and transferred onto a Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham-Pharmacia Biotech). Digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotide 5'-GAG GGG GTC AGC ACG GAC AGC ACC-3' or 5'-TCC CAG GGC TTG CAT GAT CA-3' corresponding to nucleotide N+775 to N+798 of rat ANG cDNA (32) and nucleotide N+1119 to N+1139 of rat renin cDNA (33), respectively, prepared with a DIG oligonucleotide 3'-end labeling kit (La Roche Biochemicals, Inc.), was used to hybridize the PCR products on the membrane. After stringent washing, the membrane was detected with a DIG luminescent detection kit (La Roche Biochemicals, Inc.) and exposed to Kodak BMR film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). After ANG or renin mRNA analysis, the same membrane was stripped and rehybridized with a  $\beta$ -actin oligonucleotide probe (sequence: 5'-TCC TGT GGC ATC CAT GAA ACT ACA TTC-3', corresponding to nucleotides N+9 to N+35 of exon 4 of the rat  $\beta$ -actin gene (34)). ANG or renin mRNA levels were normalized by corresponding  $\beta$ -actin mRNA levels.

To determine the putative signaling pathway(s) downstream of GlcN action on ANG mRNA expression in IRPTCs, the cells were incubated in 5 mM glucose medium plus GlcN ( $10^{-6}$  M) in the absence or presence of AZA, DON, SB 203580, GF 109203X and Calphostin C for 24 h. At the end of the incubation period, they were collected, and total RNA was extracted for RT-PCR analysis to quantify the amount of ANG and  $\beta$ -actin mRNA expressed in IRPTCs.

The depleted FBS (dFBS) was prepared by incubation with 1% activated charcoal and 1% AG 1X 8 ion-exchange resin (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) for 16 to 24 h at room temperature as described by Samuel et al. (35). This procedure removes endogenous steroid and thyroid hormones from the FBS.

### **Effect of GlcN on ANG expression, p38 MAPK, ATF-2 and CREB Phosphorylation in IRPTCs**

The effect of GlcN on ANG protein expression, p38 MAPK, ATF-2 and CREB phosphorylation was determined by Western blots with monoclonal antibodies against rat ANG (1:500 dilutions), PhosphoPlus p38 MAPK, PhosphoPlus ATF-2 and PhosphoPlus CREB antibody kits, respectively, according to the instruction of the supplier. Briefly,  $1 \times 10^7$  cells were plated in 100-mm petri dishes in 5 mM glucose DMEM containing 10% FBS, cultured until reaching 80-90% confluence, and then synchronized in 5 mM glucose medium for 24 h. Subsequently, the cells were incubated in 5 mM glucose in the presence or absence of SB 203580 ( $10^{-6}$  M) or GF 109203X ( $10^{-6}$  M) for 10 min and then further incubated for various time period with GlcN ( $10^{-6}$  M). Then, cells were lysed in 300  $\mu$ l lysis buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, containing 1% NP-40, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10  $\mu$ g/ml leupeptin, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate and 50 mM NaF], and transferred into Eppendorf tubes. The cell lysates were sonicated for 15 sec, heated at 95°C for 5 min, and centrifuged at  $12,000 \times g$  for 5 min. Thirty-five  $\mu$ l of the supernatants were

subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS)-10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), then transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Hybond-P, Amersham-Pharmacia Biotech). The membrane was initially blotted for anti-ANG antibodies, phosphorylated p38 MAPK, phosphorylated ATF-2 or phosphorylated CREB, and then re-blotted for  $\beta$ -actin, total p38 MAPK, total ATF-2 or total CREB, respectively, according to the instructions of the suppliers.

#### Effect of GlcN and High Glucose on IRPTC Hypertrophy

The effect of GlcN and high glucose on IRPTC hypertrophy was evaluated by flow cytometry, cellular p27<sup>Kip1</sup> expression and <sup>3</sup>H-leucine incorporation. To determine cell size, the cells were plated at  $5 \times 10^4$  cells/well in 6-well plates in 5 mM glucose DMEM containing 10% FBS. The cells were then synchronized in 5 mM glucose medium for 24 h and subsequently incubated in 5 mM glucose medium, 5 mM glucose plus GlcN ( $10^{-6}$  M) or 25 mM glucose medium in the presence of AZA ( $10^{-7}$  M), GF 109203X ( $10^{-6}$  M) or SB 203580 ( $10^{-6}$  M). The cells were harvested at the end of the incubation period, dispersed to a single cell suspension, and resuspended at a density of  $10^6$  cells/ml in phosphate-buffered saline (PBS), and subjected to flow cytometry analysis (FACScan) (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) with CellQuest Pro software as described previously (21, 22). Briefly, a 14 mWatt argon laser (emission: 488 nm) delivered forward-angle light scatter (FSC)-side-angle light scatter (SSC) histograms (voltage: E-1, amplification gain: 4, threshold: 100 channel units based on FSC). FSC, which is proportional to relative cell size for  $10^4$  cells per sample, was analyzed with Cell Quest Pro software, while gating on physical parameters to exclude cell debris. Changes in FSC served to assess relative cell size for  $10^4$  cells per sample. Cell viability was determined by staining with propidium iodide (0.5  $\mu$ g/ml).

The intracellular levels of p27<sup>Kip1</sup> protein, an indicator of renal proximal tubular cell hypertrophy (36, 37), were measured by Western blotting using monoclonal antibodies against p27<sup>Kip1</sup>. Briefly, the cells were incubated in medium containing 5 mM glucose, 5 mM glucose plus GlcN ( $10^{-6}$  M) or 25 mM glucose in the absence or presence of AZA ( $10^{-7}$  M), GF 109203X ( $10^{-6}$  M) or SB 203580 ( $10^{-6}$  M) for 4 h. Then, cells were lysed in 300  $\mu$ l of lysis buffer. Fifty  $\mu$ g of cellular proteins were subjected to 10% SDS-PAGE and then transferred onto a Hybond-P membrane. The membrane was blotted by p27<sup>Kip1</sup> monoclonal antibody and ECL-chemiluminescent developing reagent (Amersham-Pharmacia Biotech). To normalize the amount of proteins applied, the same membrane was re-blotted by monoclonal antibody against  $\beta$ -actin.

<sup>3</sup>H-leucine incorporation was used to assess cellular protein synthesis. Briefly,  $1 \times 10^4$  cells were plated in 24-well plates and quiescent for 24 h. Then, the cells were incubated with 0.5  $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H-leucine in 5 mM glucose, 5 mM glucose plus GlcN ( $10^{-6}$  M) or 25 mM glucose medium in the absence or presence of AZA ( $10^{-7}$  M), GF 109203X ( $10^{-7}$  M) or SB 203580 ( $10^{-6}$  M) at 37°C for 24 h. At the end of the incubation period, the cells were washed with PBS and dissolved in 100  $\mu$ l 2M NaOH and then counted for radioactivity (<sup>3</sup>H-leucine incorporation).

### Statistical Analysis

Four to six separate experiments per protocol were performed, and each treatment group was assayed in duplicate or triplicate. The data were analysed by one-way ANOVA and Bonferroni test. A probability level of  $p \leq 0.05$  was regarded as statistically significant.

## RESULTS

### Effect of GlcN, AZA and DON on ANG mRNA and ANG Protein Expression in IRPTCs

Figure 1A and 1B show that GlcN at  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M in media containing 5 mM D-glucose significantly stimulated the accumulation of ANG mRNA and renin mRNA to a level greater than 1.5- to 2.5-fold higher than that found in control cells (without glucosamine), respectively. High glucose enhanced ANG mRNA expression, and this effect was inhibited by AZA and DON in a dose-dependent manner with maximal effect observed at  $10^{-7}$  M (Figure 2A and 2B). 20 mM D-mannitol was added in 5 mM D-glucose medium to normalize the osmolarity in comparison to 25 mM D-glucose medium.

The stimulatory effect of GlcN on ANG mRNA and protein expression was suppressed in the presence of GF 109203X ( $10^{-6}$  M), SB 203580 ( $10^{-6}$  M) or Calphostin C ( $10^{-7}$  M) but not in the presence of AZA ( $10^{-7}$  M) and DON ( $10^{-7}$  M) (Figure 3A and 3B). These studies indicate that the effect of GlcN on ANG gene expression is mediated via PKC and p38 MAPK signaling.

### Effect of GlcN on p38 MAPK and ATF-2 Phosphorylation in IRPTCs

We tested the hypothesis that p38 MAPK signaling mediates the GlcN effect by assaying p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation. Figure 4 and 5 show that GlcN ( $10^{-6}$  M to  $10^{-5}$  M) significantly stimulates p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation in IRPTCs (Fig. 4A and 5A), respectively, that can be suppressed by SB 203580 ( $10^{-6}$  M) (Figure 4B and 5B), whereas GF 109203X had no effect. These studies confirm that the GlcN action on ANG gene expression is mediated, at least in part, via activation of p38 MAPK signaling and ATF-2 phosphorylation in IRPTCs.

### Effect of GlcN on CREB Phosphorylation in IRPTCs

Figure 6 shows that GlcN at  $10^{-6}$  to  $10^{-5}$  M also significantly stimulated CREB phosphorylation in IRPTCs 2.0-fold higher as compared to controls (without GlcN) (Fig. 6A). This GlcN action was inhibited by the presence of GF 109203X ( $10^{-6}$  M) but not by SB 203580 ( $10^{-6}$  M) (Fig. 6B). These studies suggest that the GlcN effect on ANG gene expression is mediated, at least in part, via activation of PKC signaling and CREB phosphorylation in IRPTCs.

#### Effect of GlcN and High Glucose on IRPTC Hypertrophy

Figure 7A and 8A show a right shift in forward-angle light scatter (FSC) of cells cultured in 5 mM glucose medium plus GlcN ( $10^{-6}$  M) or in 25 mM glucose medium alone, respectively, compared to the scatter of control cells (5 mM glucose medium). Cell diameter of the cells treated with GlcN or 25 mM glucose medium was about 8% (range 5-12%) larger than that of cells cultured in 5 mM glucose medium, indicating a considerable increase in cell size. AZA ( $10^{-7}$  M) could not prevent the hypertrophic effect of GlcN (Fig. 7B) but prevented the hypertrophic effect of high glucose (Fig. 8B). GF 109203X ( $10^{-6}$  M) blocked the hypertrophic effect of both GlcN (Fig. 7C) and high glucose (Fig. 8C). In contrast, SB 203580 could not prevent the increase in cell diameter stimulated by GlcN (Fig. 7D) or 25 mM glucose medium (Fig. 8D).

Cellular p27<sup>Kip1</sup> protein content was significantly augmented in IRPTCs incubated either in 5 mM glucose plus GlcN ( $10^{-6}$  M) or in 25 mM glucose as compared to that of control cells (incubated in 5 mM glucose) (Figure 9A and B). AZA ( $10^{-7}$  M) could not inhibit the stimulatory effect of GlcN (Figure 9A) but inhibited the stimulatory effect of high glucose on p27<sup>Kip1</sup> expression (Figure 9B). GF 109203X ( $10^{-6}$  M) inhibited the stimulatory effect of GlcN and high glucose on p27<sup>Kip1</sup> expression (Figure 9 A and B) whereas SB 203580 had no significant inhibitory effect (Figure 9A and B).

Protein synthesis was also significantly elevated in IRPTCs incubated in 5 mM glucose medium plus GlcN ( $10^{-6}$  M) and in high glucose medium (Figure 10A and B). AZA ( $10^{-7}$  M) could not inhibit the stimulatory effect of GlcN (Fig. 10A) but prevented the stimulatory effect of high glucose on protein synthesis (Fig. 10B). GF109203X ( $10^{-6}$  M) inhibited the stimulatory effect of GlcN and high glucose on cellular protein synthesis (Figure 10A and B) whereas SB 203580 has no significant effect (Figure 10A and B).

## DISCUSSION

The present studies demonstrate that high glucose action on ANG gene expression and induction of IRPTC hypertrophy is mediated, at least in part, by activation of the HBP. This stimulatory action of HBP appears to be p38 MAPK- and PKC-dependent.

ROS have increasingly been implicated in the progression of renal disease (38, 39). Although the high glucose milieu may induce oxidative stress in the diabetic kidney (40, 41), the underlying mechanism(s) of ROS-induced damage remains incompletely understood. Recently, Brownlee's group (42, 43) proposed a unifying concept to explain the mechanisms of high glucose in tissue injury. This concept suggests that increased glucose metabolism via mitochondrial oxidation results in excess ROS generation. Elevation of ROS partially inhibits glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, thereby slowing glucose flux through the glycolytic- tricarboxylic acid (TCA) cycle pathway. The elevated ROS simultaneously promote glucose metabolism via alternate pathways, such as polyol/PKC pathway and the HBP, as well as through nonenzymatic conversion of glucose to advanced glycation endproducts. All these effects subsequently influence gene expression. Indeed, studies have shown that activation of the HBP stimulated the expression of several genes, including transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) (44, 45), leptin (46, 47), plasminogen activator

inhibitor-1 (48, 49) and fibronectin (50). Recent studies have also revealed that GlcN stimulates ANG gene expression in the rat liver and adipose tissue (26), supporting the role of this pathway in ANG gene expression. Thus, we speculated that HBP may mediate some of the high glucose effect on ANG gene expression and may play a role in induction of hypertrophy in kidney proximal tubular cells.

We have chosen rat IRPTCs for the present studies. Ninety to ninety-five percent of cells are stained positively for antigens specific to the proximal tubule as well as for RAS components including ANG, renin, ACE and Ang-II receptors (27). Thus, IRPTCs resemble rat RPTCs *in vivo*. In contrast to primary cultures of non-diabetic rat RPTCs that will not grow after 2-3 passages. IRPTCs grow continuously with a population doubling time of 16-18 h. Most importantly, both IRPTCs and primary cultures of non-diabetic rat RPTCs respond similarly to both high glucose and insulin on ANG gene expression (19-23, 28-31). Hence, the data obtained with IRPTCs could be extrapolated to the normal biology of RPTCs *in vivo*.

Our present studies demonstrate that GlcN ( $10^{-8}$  to  $10^{-4}$  M) stimulates ANG and renin mRNA expression in IRPTCs in normal glucose medium (5 mM) (Fig. 1A and 1B) with a maximum effect observed at  $10^{-6}$  M. These stimulatory concentrations of GlcN are lower than those used by Gabriel et al., who reported that GlcN at 2 mM concentration enhanced ANG gene expression in the diabetic liver and adipose tissue (26). In contrast, we observed that GlcN at  $10^{-4}$  M or higher started to inhibit ANG mRNA and renin mRNA expression in IRPTCs (Fig. 1A and 1B). At present, we do not have an explanation for this discrepancy. One possibility is that high concentrations of GlcN (i.e.,  $\geq 10^{-4}$  M) are toxic to IRPTCs but not to liver or adipose tissue. Indeed, we have found that GlcN ( $10^{-4}$  to  $10^{-3}$  M) increases the percentage of cell death from 5 to 12 % in IRPTCs after 24 hours of incubation as determined by trypan-blue exclusion method (unpublished results). These data suggest that the renal tubular cells might be more sensitive to GlcN toxicity of than liver or adipose tissue.



Definitely, more studies are warranted to clarify these discrepancies. It is interesting that GlcN also stimulates renin mRNA expression (Fig. 1B). To our best knowledge, this is the first report that GlcN could enhance renin gene expression in kidney proximal tubular cells. Thus, our data indicate that GlcN could directly activate intrarenal RAS to yield Ang II and subsequently affects cell hypertrophy. Furthermore, our results reveal that AZA and DON block the stimulatory effect of high glucose (25 mM) on ANG mRNA expression in IRPTCs in a dose-dependent manner (Fig. 2A and 2B). Taken together, these studies suggest that a major portion of the stimulatory effect of high glucose on ANG gene expression is mediated, at least in part, via activation of the HBP.

Interestingly, the addition of GF 109203X, Calphostin C and SB 203580 inhibited the stimulatory effect of GlcN on ANG mRNA and ANG expression in IRPTCs, whereas AZA and DON had no effect (Fig. 3A and 3B). These studies indicate that the GlcN effect on ANG gene expression in IRPTCs could by-pass the GFAT enzyme and is PKC- and p38 MAPK-dependent. At present, it is unclear whether GlcN could affect the half-life or stability of ANG mRNA, or if it has an effect at the transcriptional level in IRPTCs.

Our results showed that GlcN stimulated p38 MAPK, ATF-2 and CREB phosphorylation in IRPTCs (Figures 4A, 5A and 6A). SB 203580 inhibited p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation (Figures 4B and 5B), whereas it did not affect CREB phosphorylation (Figure 6B). In contrast, GF 109203X had no effect on p38 MAPK and ATF-2 phosphorylation (Fig. 4B and 5B) but significantly inhibited CREB phosphorylation stimulated by GlcN (Figure 6B). These data further support the notion that GlcN-stimulated ANG gene expression is mediated via both p38 MAPK and PKC signal transduction pathways.

Culture of IRPTCs in 5 mM glucose medium plus GlcN or in 25 mM glucose medium induced cell hypertrophy as evidenced by the rightward shift in forward light scatter (FSC) on

flow cytometry compared to 5 mM glucose medium (Figures 7A and 8A), by the enhancement of cellular p27<sup>Kip1</sup> expression (Fig. 9) and protein synthesis (Fig. 10). Although flow cytometry does not allow the precise measurement of cell size, an 5% to 10% increase in cell diameter observed in our studies (Fig. 7A and 8A) would indicate a considerable increment in the average size of IRPTCs cultured in GlcN and high levels of glucose. These results are in agreement with previous observations, including ours, that high glucose levels (i.e.,  $\geq 25$  mM) induce hypertrophy of murine and porcine proximal tubular cells by 5-10%, as analyzed by flow cytometry (1-5). Our present experiments also show that the addition of AZA did not block the GlcN effect but prevented the high glucose effect on IRPTC hypertrophy (Fig. 7B and 8B), p27<sup>Kip1</sup> expression (Fig. 9) and cellular protein synthesis (Fig. 10). In contrast, GF 109203X was effective in preventing the stimulatory effect of GlcN and high glucose on IRPTC hypertrophy (Fig. 7C and 8C), p27<sup>Kip1</sup> expression (Fig. 9) and cellular protein synthesis (Fig. 10) whereas SB 203580 had no significant effect (i.e.,  $p \geq 0.05$ ) on these parameters (Figs. 7D, 8D, 9 and 10). We were surprised that SB 203580 inhibited the stimulatory effect of GlcN and high glucose on ANG gene expression (Fig. 3A and 3B) but not on cell hypertrophy. At present, we do not have a good explanation for these observations. One possibility might be that SB 203580 does not inhibit the expression of other yet unidentified factors involved in cell hypertrophy whereas the expression of these factors can be inhibited by PKC inhibitors. On the other hand, our findings are similar to those of Hannken et al. (51) who reported that SB 203580 failed to abolish Ang II-stimulated p27<sup>Kip1</sup> expression in mouse renal proximal tubular cells. Indeed, more studies are needed along this line. Nevertheless, our data indicate that the blockade of activation of the local renal RAS by HBP or PKC signaling is an effective method of attenuating or preventing renal proximal tubular cell hypertrophy induced by hyperglycemia.

At present, we do not know the exact molecular mechanism(s) underlying the stimulatory action of high glucose (i.e., the downstream pathway after p38 MAPK and PKC activation) on ANG gene expression in IRPTCs. One possibility is that high glucose induces CREB phosphorylation via the PKC signaling pathway, as demonstrated by our present data and reported by Kreisberg et al. (52). The phosphorylated CREB might have dimerized to form a homodimer or interacts with phosphorylated nuclear ATF-2 to form a heterodimer which binds to the cAMP-responsive element (CRE) in the 5'-flanking region of the rANG gene (53) and subsequently enhances gene expression. This possibility is supported by our present work that high glucose levels augmented the phosphorylation of both CREB and ATF-2 in IRPTCs. Furthermore, our preliminary studies showed that GlcN enhances ANG mRNA expression in IRPTCs that have been co-transfected with sense CREB cDNA and ATF-2 cDNA but not in IRPTCs that have been co-transfected with antisense CREB cDNA and sense ATF-2 cDNA (unpublished results). Nevertheless, more studies are warranted to confirm this possibility.

In summary, our studies reveal that exposure of IRPTCs to GlcN or 25 mM glucose enhances ANG gene expression and induces IRPTC hypertrophy. This stimulatory effect of high glucose is blocked by inhibitors of HBP and PKC. These results suggest that HBP blockade might offer a novel therapeutic approach to prevent or attenuate glucose-induced ANG gene expression and, consequently, the development of diabetic nephropathy. However, it remains to be seen whether long-term HBP blockade may indeed be beneficial in the treatment of diabetic nephropathy.

## Appendix

Abbreviations used in this article are: ACE, angiotensin-converting enzyme; ANG, angiotensinogen; Ang II, angiotensin II; ATF-2, activating transcription factor-2; AZA, azaserine (O-diazoacetyl-L-serine); CREB, cAMP-responsive element binding protein; CAT, catalase; dFBS, depleted fetal bovine serum; DIG, digoxigenin; DMEM, Dulbecco's modified medium; DON (6-Diazo-5-oxo-L-norleucine); FBS, fetal bovine serum; FCS, forward-angle light scatter; GFAT, glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase; GF 109203X, an inhibitor of protein kinase C; HBP, hexosamine biosynthesis pathway; IRPTCs, immortalized renal proximal tubular cells; PKC, protein kinase C; p38 MAPK, p38 mitogen-activated protein kinase; RAS, renin-angiotensin system; ROS, reactive oxygen species; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SB 203580, an inhibitor of p38 MAPK kinase ; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis.

## ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association (#1061 to J.S.D.C. and P.H.), the Kidney Foundation of Canada, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-13420 (J.S.D.C), MT-15070 (J.S.D.C and J.G.F.), and MOP-12573 (J.G.F.) and NET-54012 (I.G.F. et al)) and the National Institutes of Health (NIH) of USA (HL-48455 to J.R.I. and DK-50836 to S.S.T.). Shao-Ling Zhang is the recipient of a CIHR Doctoral Research Award. The authors thank Mr. Ovid M. Da Silva, Éditeur-Rédacteur, Research Support Office, Research Centre, CHUM, for editing this manuscript.

## REFERENCES

1. **Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alvarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP** 1990 High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* 259: F704-F714
2. **Wolf G, Neilson EG** 1990 Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine tubular cells. *Am J Physiol* 259: F768-F777
3. **Wolf G, Neilson EG, Goldfarb S, Ziyadeh FN** 1991 The influence of glucose concentration on angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 179: 902-909
4. **Rocco M, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN** 1992 Elevated glucose stimulates TGF- $\beta$  gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney Int* 41: 107-114
5. **Wolf G, Mueller E, Stahl RAK, Ziyadeh FN** 1993 Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- $\beta$ . *J Clin Invest* 92:1366-1372
6. **Bakris GL** 1993 Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the progression of diabetic nephropathy. *Ann Intern Med* 118: 643-644
7. **Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain KP, Rhode RD** 1993 The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 329:1456-1462

8. **Ravid M, Lang R, Rachmani R, Lishner M** 1996 Long-term renoprotective effect of angiotensin converting enzyme inhibition in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 156: 286-289
9. **Andersen S, Tarnow L, Rensing P, Hansen BV, Parving HH** 2000 Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 57: 601-606
10. **Fliser D, Haller H** 2001 Angiotensin II subtype 1-receptor antagonists in the treatment of diabetic nephropathy. *J Hypertens* 19 (Suppl 1) : S57-S60
11. **Dzau VJ, Ingelfinger JR** 1989 Molecular biology and pathophysiology of the intrarenal renin-angiotensin system. *J Hypertens* 7 (Suppl. 7): 53-58
12. **Johnston CI, Fabris B, Jandeleit K** 1993 Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathophysiology. *Kidney Int* 44 (Suppl. 42): 559-563
13. **Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ** 1990 In situ hybridization evidence for angiotensinogen mRNA in the rat proximal tubule. A hypothesis for the intrarenal renin angiotensin system. *J Clin Invest* 85: 417-423
14. **Wolf G, Neilson EG** 1993 Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int* 43 (Suppl 39): S100-S107

15. **Chen M, Harris MP, Rose D, Smart A, He X-R, Kretzler M, Briggs JP, Schnermann J** 1994 Renin and renin mRNA in proximal tubule of the rat kidney. *J Clin Invest* 94: 237-243
16. **Tang SS, Jung FF, Diamant D, Brown D, Bachinsky D, Hellman P, Ingelfinger JR** 1995 Temperature-sensitive SV 40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 268: F435-F436
17. **Loghman-Adham M, Rohrwasser A, Helin C, Zhang S, Terreros D, Inoue I, Lalouel J-M** 1997 A conditionally immortalized cell line from murine proximal tubule. *Kidney Int* 52: 229-239
18. **Wang L, Lei C, Zhang S-L, Roberts KD, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 1998 Synergistic effect of dexamethasone and isoproterenol on the expression of angiotensinogen in immortalized rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 53: 287-295
19. **Zhang S-L, Filep JG, Hohman TC, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 1999 Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 55: 454-464
20. **Zhang S-L, Tang S-S, Chen X, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JSD** 2000 High levels of glucose stimulate angiotensinogen gene expression via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 141: 4637-4646



21. **Zhang S-L, To C, Chen X, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Carrière S, Chan JSD** 2001 Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. *Exp Nephrol* 9: 109-117
22. **Zhang S-L, Hsieh T-J, Chen X, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 2002 Essential role(s) of intrarenal renin-angiotensin system on transforming growth factor-beta 1 expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *J Am Soc Nephrol* 13: 302-312
23. **Hsieh T-J, Zhang S-L, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 2002 High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species (ROS) generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143: 2975-2985, 2002
24. **Schleicher ED, Weigert C** 2000 Role of the hexosamine biosynthesis pathways in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 77: S13-S18
25. **McClain DA** 2002 Hexosamines as mediators of nutrient sensing and regulation in diabetes. *J Diabetes Complications* 16: 72-80
26. **Gabriel I, Yang XM, Cases JA, Ma XH, Rossetti L, Barzhai N** 2001 Hyperglycemia modulates angiotensinogen gene expression. *Am J Physiol* 281: R795-R802
27. **Ingelfinger JR, Jung F, Diamant D, Haveran L, Lee E, Brem A, Tang S-S** 1999 Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine Ang II feedback. *Am J Physiol* 276: F218-F227

28. **Zhang S-L, Chen X, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 1999 Insulin inhibits angiotensinogen gene expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 140: 5285-5292
29. **Chen X, Zhang S-L, Pang Li, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 2001 Characterization of a putative insulin-responsive element and its binding protein(s) in rat angiotensinogen gene promoter: regulation by glucose and insulin. *Endocrinology* 142: 2577-2585
30. **Zhang S-L, Chen X, Wei C-C, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 2002 Insulin inhibits dexamethasone effect on angiotensinogen gene expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *Endocrinolog* 143: 4627-4635
31. **Zhang S-L, Chen X, Hsieh T-J, Leclerc M, Henley N, Allidina A, Hallé, Brunette M-G, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD** 2002 Hyperglycemia induces insulin resistance on angiotensinogen gene expression in diabetic rat kidney proximal tubular cells. *J Endocrinol* 172: 333-344
32. **Ohlubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S** 1983 Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2196-3000

33. **Burnham CE, Hawelu-Johnson CL, Frank BM, Lynch KR** 1987 Molecular cloning of rat renin cDNA and its gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5605-5609
34. **Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D** 1983 The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acid Res* 11: 1759-1771
35. **Samuel HH, Stanby F, Shapiro LE** 1979 Control of growth hormone synthesis in cultured GH cells by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and glucocorticoid agonists and antagonists: studies on the independent and synergistic regulation of the growth hormone response. *Biochemistry* 18: 715-721
36. **Wolf G** 1999 Molecular mechanisms of renal hypertrophy: role of p27 Kip1. *Kidney Int* 54: 1262-1265
37. **Preisig P** 1999 A cell cycle-dependent mechanism of renal tubule epithelial cell hypertrophy. *Kidney Int* 56: 1193-1198
38. **Andreoli S, McAteer JA, Mallett C** 1990 Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubular cells in vitro. *Kidney Int* 38:785-794
39. **Nath KA, Fischaeder M, Hostetter TH** 1994 The role of oxidants in progressive renal injury. *Kidney Int* 45: S111-S115

40. **Yaqoob M, McClelland P, Patrick AW, Stevenson A, Mason H, White MC, Bell GM** 1994 Evidence of oxidant injury and tubular damage in early diabetic nephropathy. *Q J Med* 87: 601-607
41. **Ha H, Lee HB** 2000 Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose. *Kidney Int* 58 (Suppl 77): S19-S25
42. **Nishikawa T, Edelstein D, Brownlee M** 2000 The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int* 58 : 26-30
43. **Brownlee M** 2001 Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature* 414: 813-820
44. **Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich A, Lehmann F, Schleicher ED** 1998 High glucose-induced transforming growth factor- $\beta$ 1 production is mediated by the hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 101: 160-169
45. **Daniels MC, McClain DA, Crook ED** 2000 Transcriptional regulation of transforming growth factor beta 1 by glucose: investigation into role of the hexosamine biosynthesis pathway. *Am J Med Sci* 319: 138-142
46. **Wang J, Liu R, Hawkins M, Barailai N, Rossetti L** 1998 A nutrient sensing pathway regulates leptin gene expression in muscle and fat. *Nature* 393: 684-688

47. **McClain DA, Alexander T, Cooksey RC, Considine RV** 2000 Hexosamines stimulate leptin production in transgenic mice. *Endocrinology* 141: 1999-2002
48. **Goldberg HJ, Scholey J, Fantus IG** 2000 Glucosamine activates the plasminogen activator inhibitor 1 gene promoter through Sp1 DNA binding sites in glomerular mesangial cells. *Diabetes* 49: 863-871
49. **James LR, Fantus IG, Goldberg H, Ly H, Scholey JW** 2000 Overexpression of GFAT activates PAI-1 promoter in mesangial cells. *Am J Physiol* 279: F718-F727
50. **Singh LP, Andy J, Anyamale V, Greene K, Alexander M, Crooke ED** 2001 Hexosamine-induced fibronectin protein synthesis in mesangial cells is associated with increases in cAMP responsive element binding (CREB) phosphorylation and nuclear CREB : the involvement of protein kinases A and C. *Diabetes* 50: 2355-2362
51. **Hannken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl RAK, Wolf G** 2000 Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27<sup>Kip1</sup>: Role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1387-1397
52. **Kreisberg JI, Radnik RA, Kreisberg SH** 1996 Phosphorylation of cAMP responsive element binding protein after treatment of mesangial cells with high glucose plus TGF $\beta$  or PMA. *Kidney Int* 50: 805-810

53. **Wu J, Jiang Q, Chen X, Wu X-H, Chan JSD** 1998 Identification of a novel mouse hepatic 52 kDa protein that interacts with the cAMP response element of the rat angiotensinogen gene. *Biochem J* 329: 623-629

## FIGURE LEGENDS

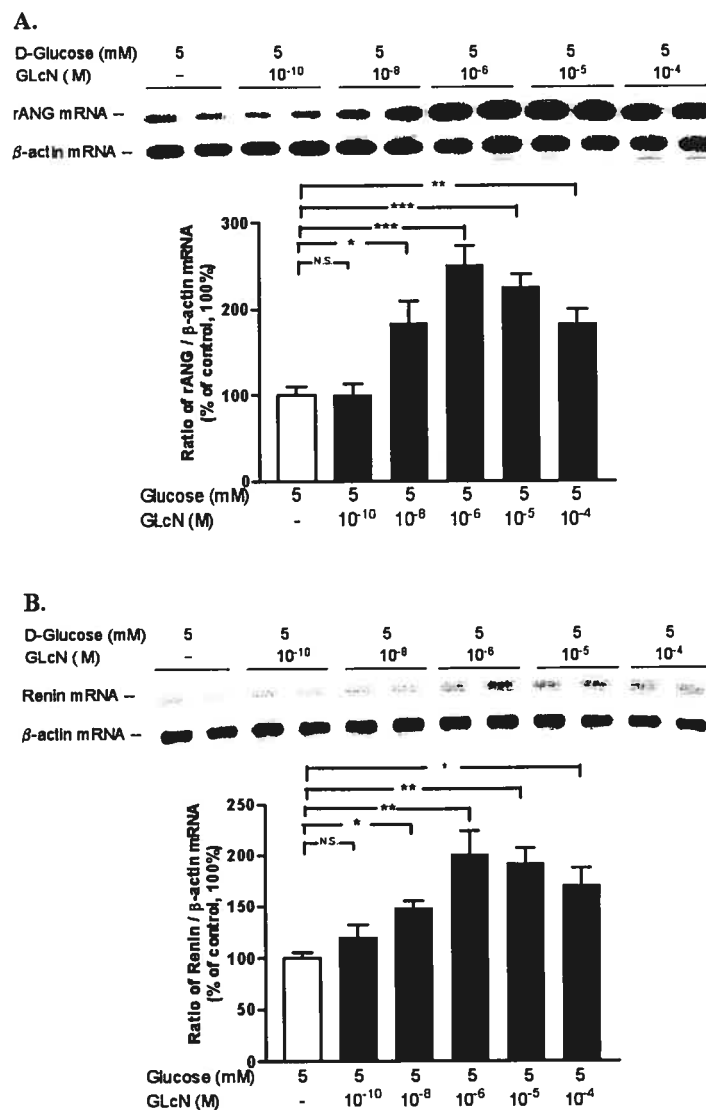


Figure 3.1: Effect of glucosamine (GLcN) on rat ANG and renin mRNA expression in IRPTCs. Cells were incubated for 24 h in normal glucose (5 mM D-glucose) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) in the absence or presence of various concentrations of GlcN. Cells were collected and assayed for rat ANG mRNA (A) and renin mRNA (B) by RT-PCR as described in "Materials and Methods". The relative densities of the ANG were normalized with the  $\beta$ -actin control. ANG and renin mRNA levels in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose DMEM (A and B) were considered as the control (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicates in A and B, respectively (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).

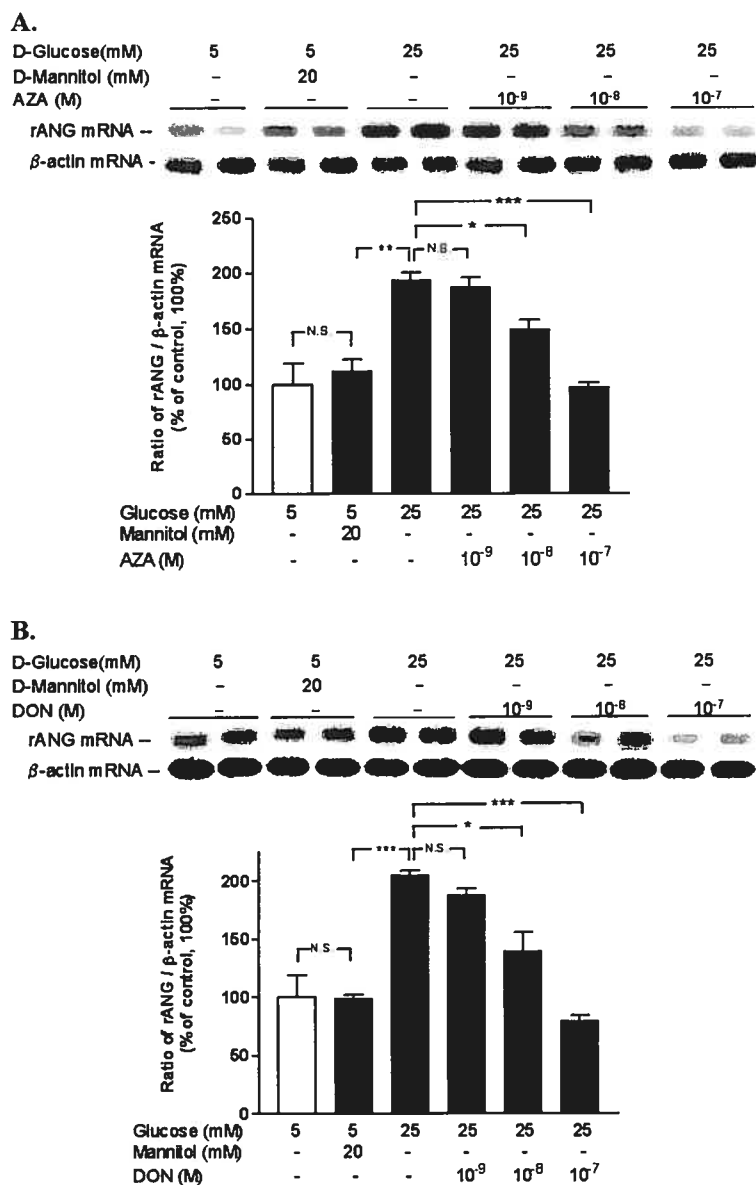


Figure 3.2. Effect of azaserine (AZA) and DON on rat ANG mRNA expression in IRPTCs. Cells were incubated in normal glucose (5 mM) with or without 20 mM D-mannitol or in high glucose (25 mM D-glucose) DMEM in the absence or presence of different concentrations of AZA (A) or DON (B). Cells were collected and assayed for rat ANG and  $\beta$ -actin mRNAs by RT-PCR as described in "Materials and Methods". The relative densities of the ANG were normalized with the  $\beta$ -actin control. ANG mRNA levels in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose DMEM (A and B) were considered as the control (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicates in A and B, respectively (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).



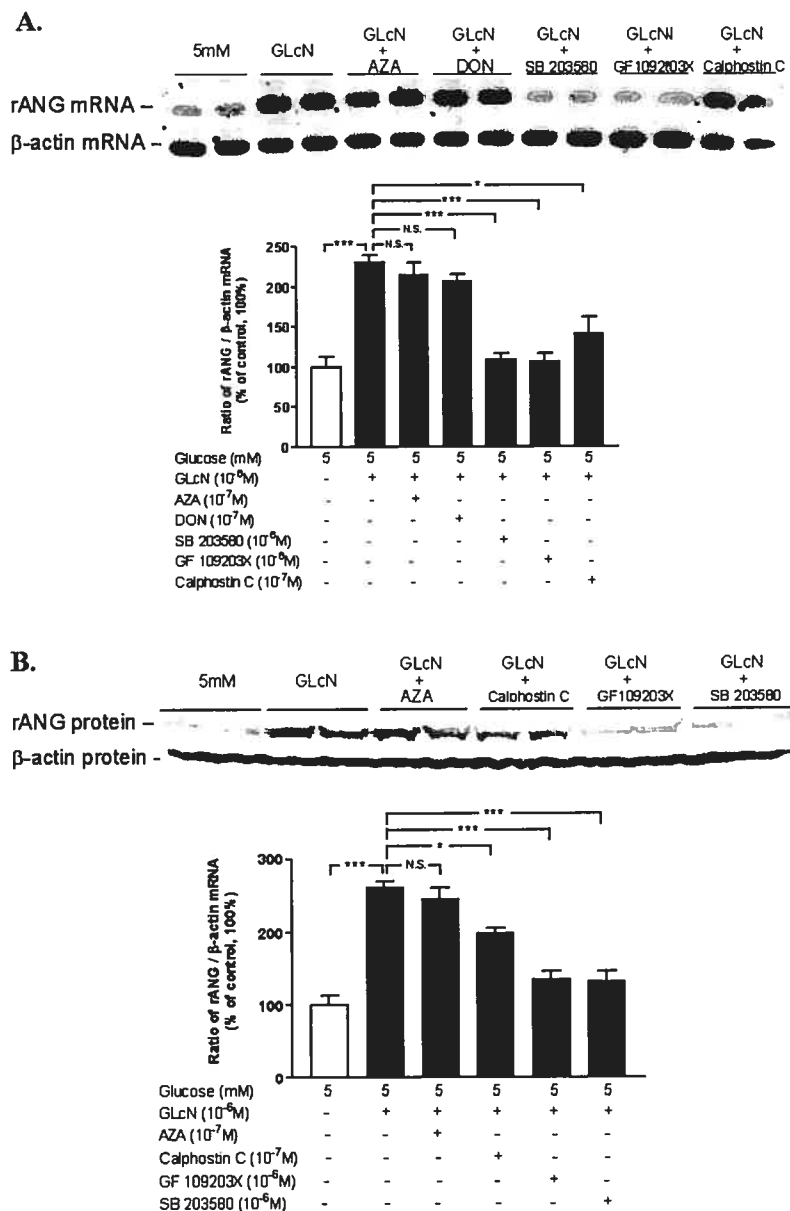
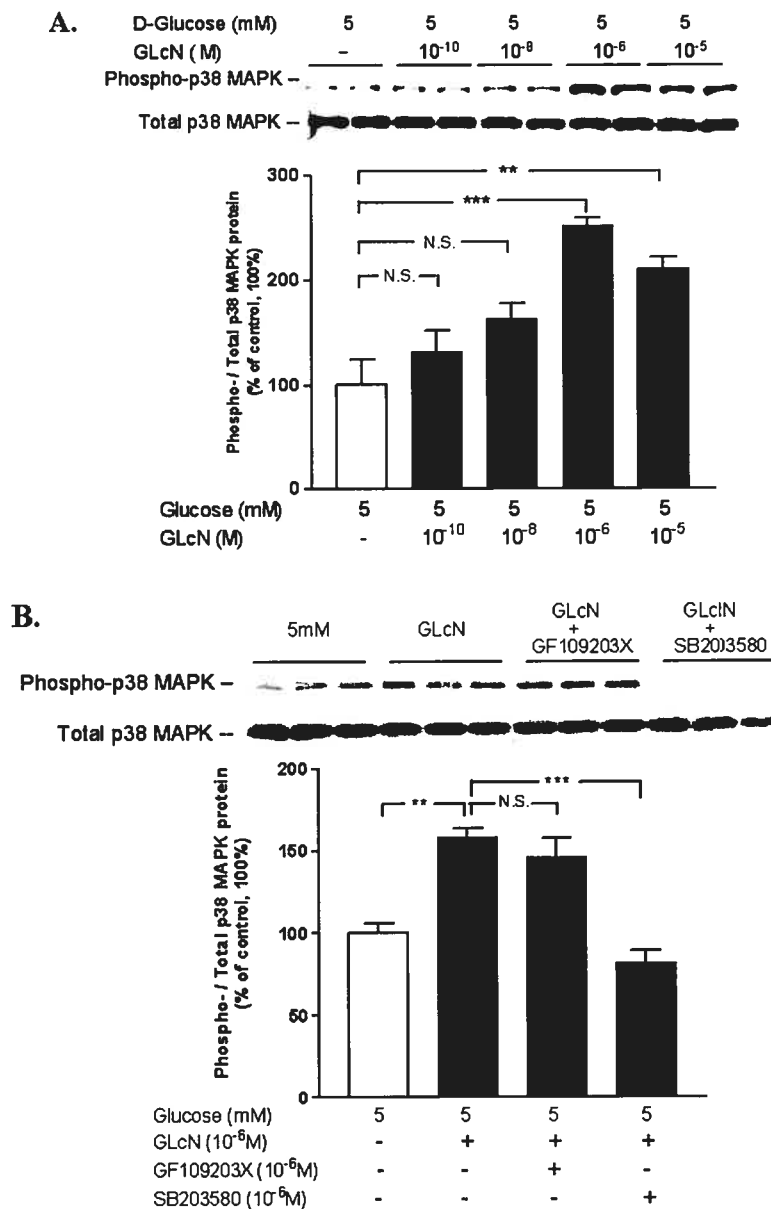


Figure 3.3. Effects of SB 203580, GF 109203X and Calphostin C on rat ANG mRNA and ANG expression in IRPTCs cultured in the presence of GlcN. Cells were incubated for 24 h in normal glucose DMEM and GlcN ( $10^{-6}$  M) in the absence or presence of SB 203580 ( $10^{-6}$  M), GF 109203X ( $10^{-6}$  M) or Calphostin C ( $10^{-7}$  M). Cells were harvested and assayed for ANG and  $\beta$ -actin mRNA levels by RT-PCR (A) or for ANG levels by Western blot (B) as described in the “Materials and Methods”. The ANG mRNA and ANG levels in IRPTCs incubated in normal glucose DMEM in the absence of GlcN was considered as the control (100%). The inhibitory effects of SB 203580, GF 109203X and Calphostin C were compared with the cells incubated in normal DMEM in the presence of GlcN. Each point represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments in duplicates in A and B (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).



**Figure 3.4.** Effect of GlcN on p38 MAPK phosphorylation in IRPTCs. Cells were incubated for 10 min in normal glucose DMEM in the absence or presence of various concentrations of GlcN (i.e.,  $10^{-10}$  M to  $10^{-5}$  M), then harvested and assayed for phosphorylated p38 MAPK (A). Or, after 10 min of incubation in normal glucose DMEM with or without GlcN ( $10^{-6}$  M) in the absence or presence of SB 203580 or GF 109203X, cells were harvested and assayed for p38 MAPK (B). Phosphorylated p38 MAPK levels in normal glucose DMEM are considered as controls (100%). The results are given as percentages of the controls (mean  $\pm$  SD; N = 3 independent experiments in duplicates (A) and in triplicates (B) (\*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).

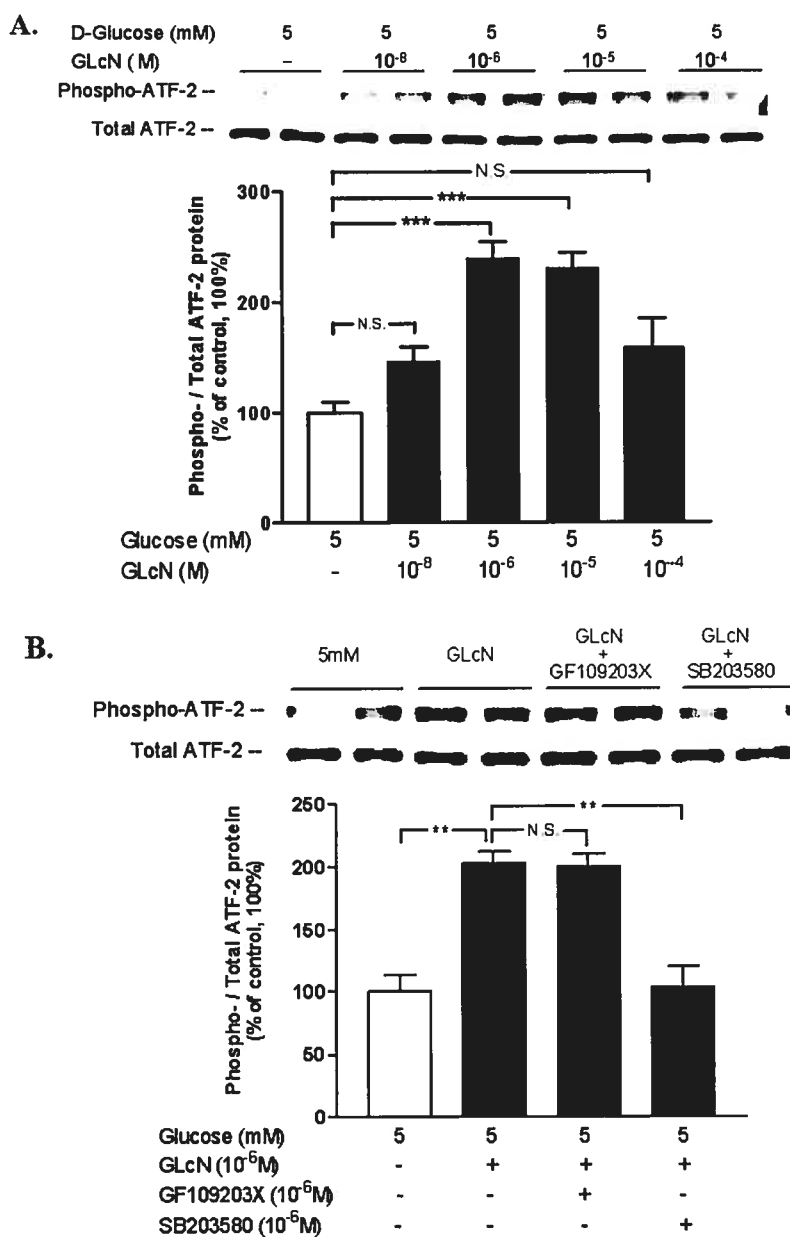
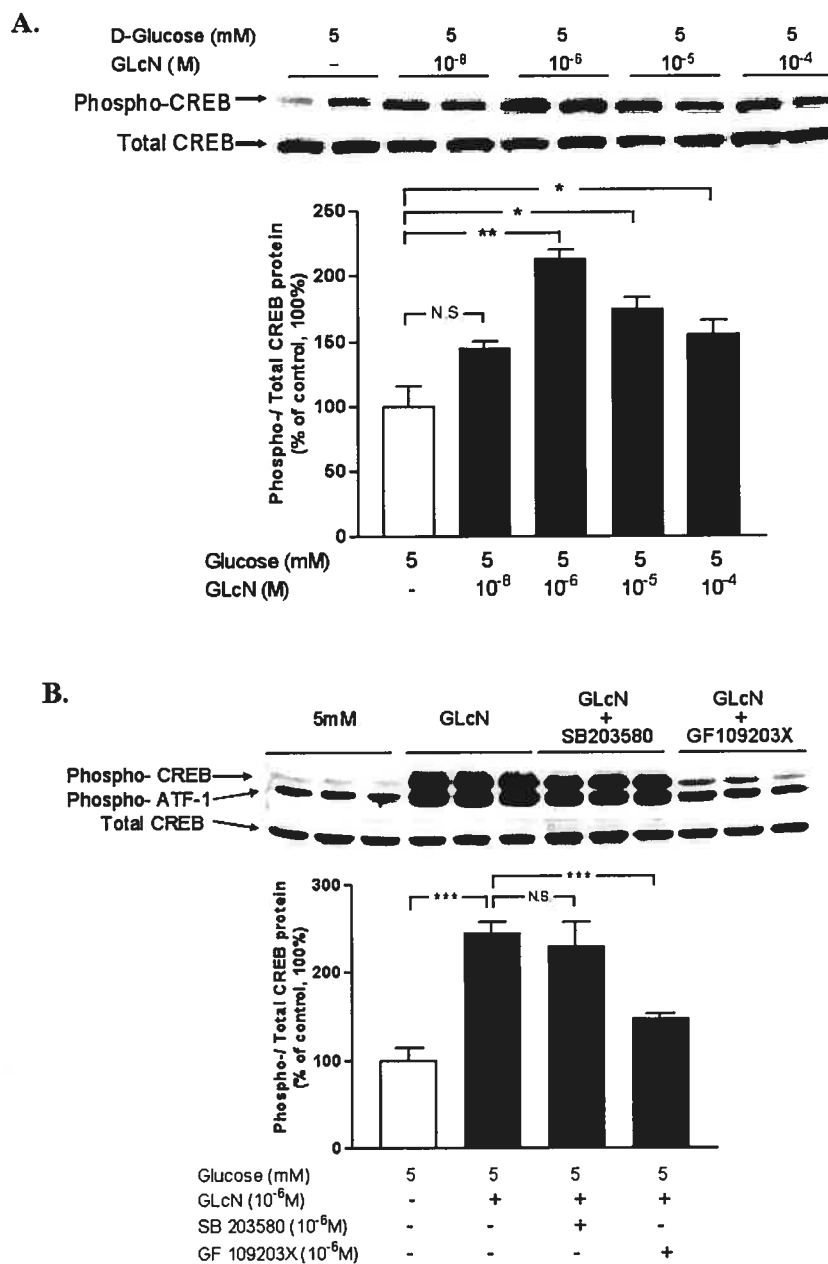


Figure 3.5. Effect of GlcN on ATF-2 phosphorylation in IRPTCs. (A) Cells were incubated for 10 min in normal glucose DMEM in the absence or presence of various concentrations of GlcN (i.e.,  $10^{-8}$  M to  $10^{-4}$  M), then harvested and assayed for phosphorylated ATF-2. (B) After 10 min of incubation in normal glucose DMEM with or without GlcN ( $10^{-6}$  M) in the absence or presence of SB 203580 or GF 109203X, cells were harvested and assayed for ATF-2. The phosphorylated ATF-2 level in cells incubated in normal glucose DMEM was considered as the control (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicates (A) and 6 independent experiments in duplicates (B) (\*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).



**Figure 3.6.** Effect of GlcN on CREB phosphorylation in IRPTCs. (A) Cells were incubated for 30 min in normal glucose DMEM in the absence or presence of various concentrations of glucosamine (i.e.,  $10^{-12}$  M to  $10^{-6}$  M), then harvested and assayed for phosphorylated CREB. (B) After 30 min of incubation in normal glucose DMEM with or without glucosamine ( $10^{-6}$  M) in the absence or presence of SB 203580 or GF 109203X, cells were harvested and assayed for CREB. The relative density of the phosphorylated CREB band was compared with non-phosphorylated CREB. The phosphorylated CREB level in cells incubated in 5 mM D-glucose medium was considered as the control (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments in

duplicates (A) and 4 independent experiments in triplicates (B) (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).

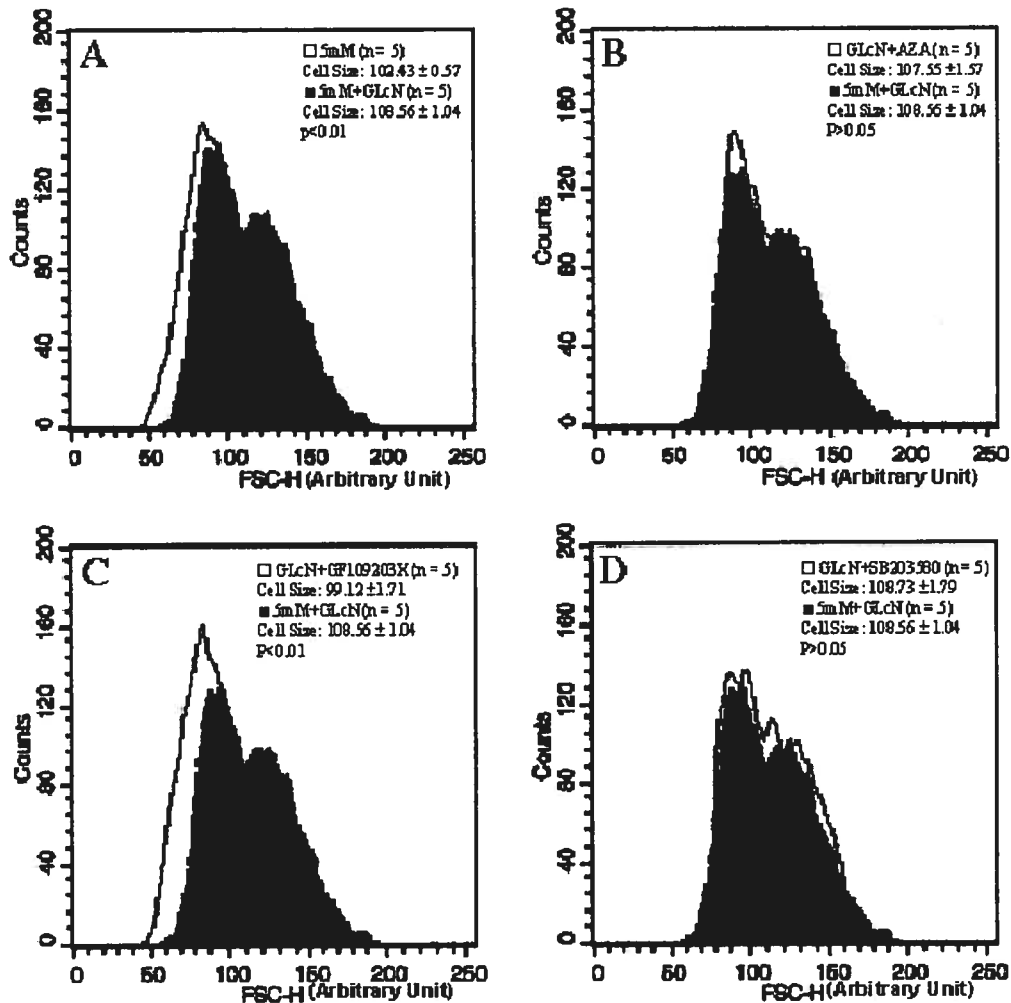


Figure 3.7. Effect of GlcN, AZA, GF 109203X and SB 203580 on cellular hypertrophy in IRPTCs. After 48 h of incubation in media containing 5 mM D-glucose with or without GlcN ( $10^{-6}$ M) (A), or 5 mM glucose plus GlcN in the absence or presence of AZA ( $10^{-7}$  M) (B), GF 109203X ( $10^{-6}$  M) (C) or SB 203580 ( $10^{-6}$  M), IRPTCs were analyzed by flow cytometry. Propidium iodide was used to assess cell viability. Forward light scatter was expressed in arbitrary units. Rightward shift of the plot on the X-axis indicates an increase in cell size.

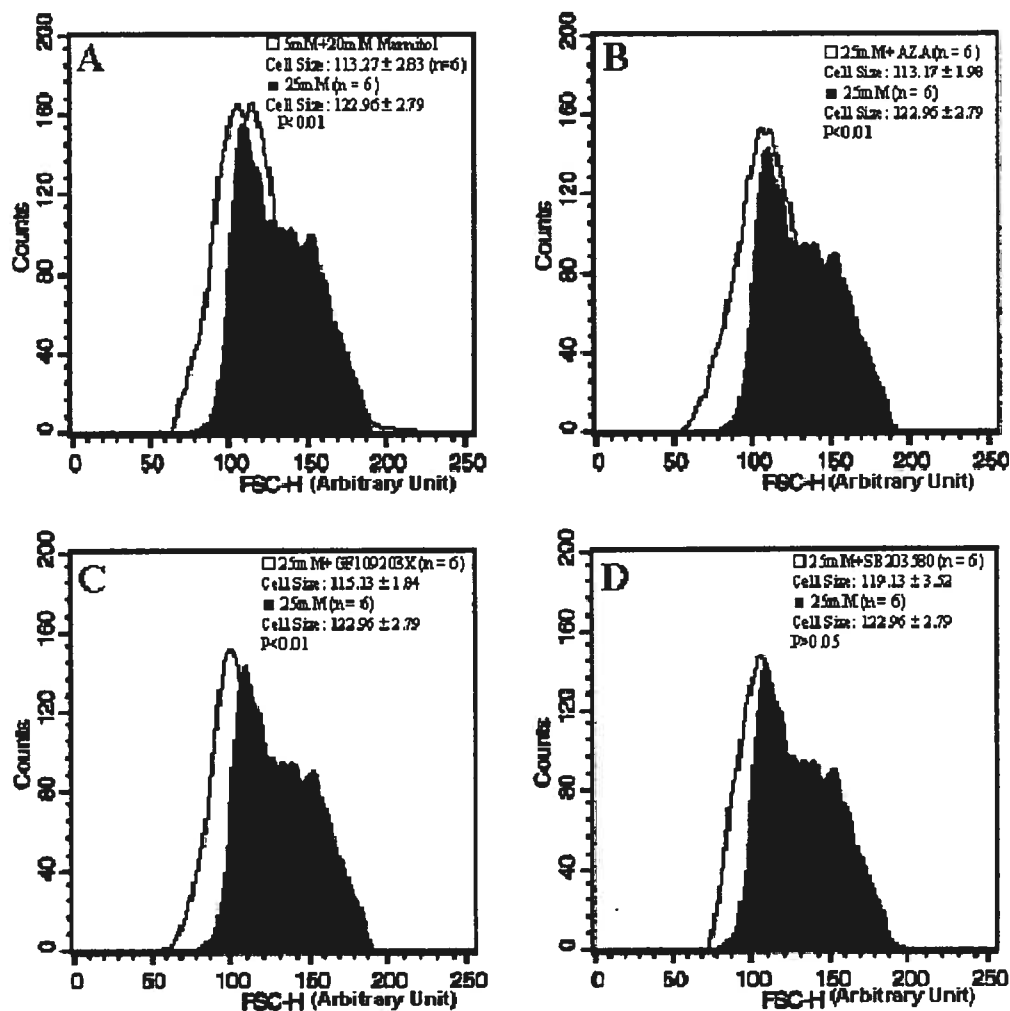


Figure 3.8. Effect of high glucose, AZA, GF 109203X and SB 203580 on cellular hypertrophy in IRPTCs. After 48 h of incubation in media containing 5 mM D-glucose plus 20 mM D-mannitol or 25 mM D-glucose (A), or 25 mM D-glucose in the absence or presence of AZA ( $10^{-7}$  M) (B), GF 109203X ( $10^{-6}$  M) (C) or SB 203580 ( $10^{-6}$  M) (D), IRPTCs were analyzed by flow cytometry. Propidium iodide was used to assess cell viability. Forward light scatter was expressed in arbitrary units. Rightward shift of the plot on the X-axis indicates an increase in cell size.

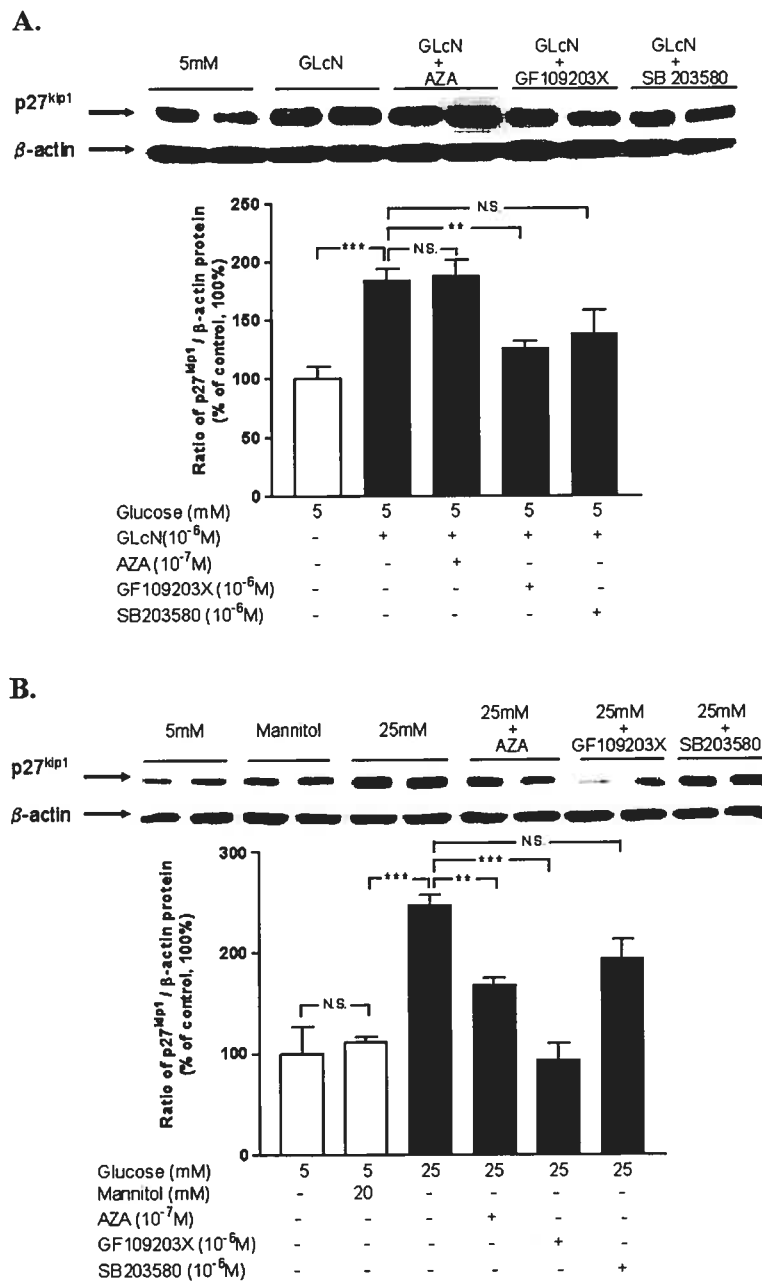
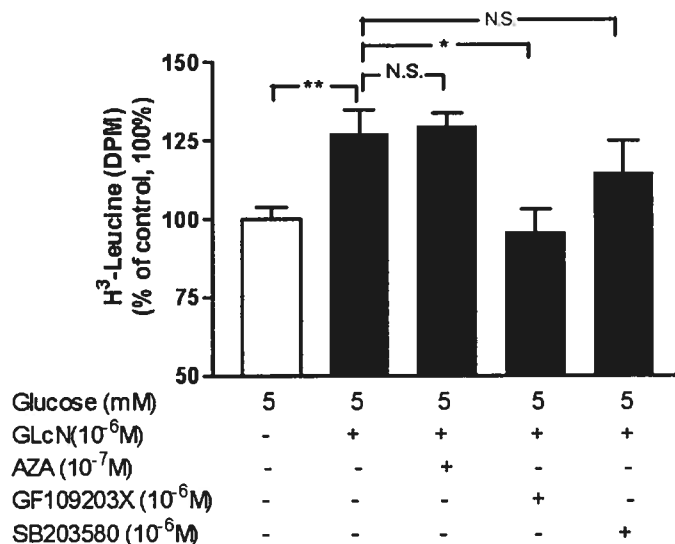


Figure 3.9. Effect of GlcN, high glucose, AZA and GF 109203X on cellular p27<sup>Kip1</sup> levels in IRPTCs. After 4 h of incubation in media containing 5 mM D-glucose with or without GlcN and in the absence or presence of AZA, GF 109203X or SB 203580 (A), the cells were harvested and assayed for p27<sup>Kip1</sup> levels by Western blotting. Similarly, cells were incubated in 25 mM D-glucose in the absence or presence of AZA, GF 109203X or SB 203580 for 4 h (B) and then assayed for p27<sup>Kip1</sup> levels. The relative densities of the p27<sup>Kip1</sup> band were normalized with β-actin. The p27<sup>Kip1</sup> protein levels in cells cultured in 5 mM D-glucose medium

represent the control (100%) Each bar is the mean  $\pm$  SD of 6 independent experiments (\*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., Not significant).

A.



B.

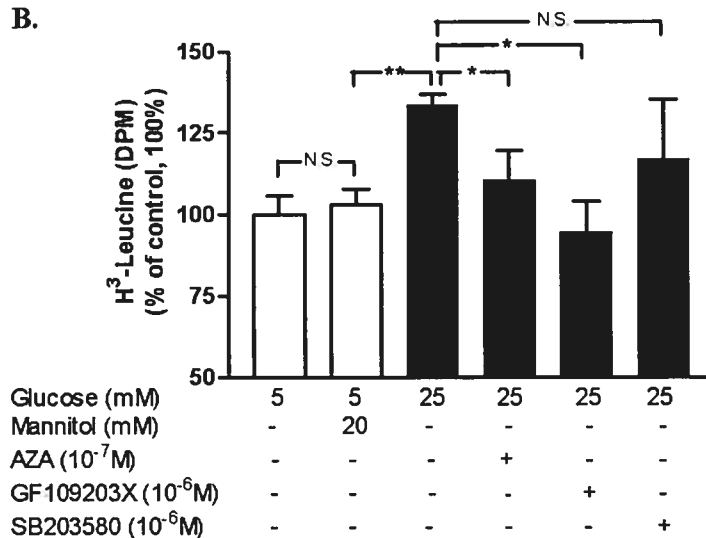


Figure 3.10. Effect of GlcN, high glucose, AZA and GF 109203X on cellular protein levels in IRPTCs. Protein synthesis in IRPTCs was determined by  $^3\text{H}$ -Leucine incorporation and expressed per  $4 \times 10^4$  cells. The cells were incubated for 24 h in 5 mM D-glucose with or without GlcN ( $10^{-6}$  M), and in the absence or presence of AZA ( $10^{-7}$ M), GF 109203X ( $10^{-6}$  M) or SB 203580 ( $10^{-6}$  M) and were then harvested and analyzed for protein synthesis (A). Similarly, cells were incubated in 25 mM D-glucose in the absence or presence of AZA, GF 109203X or SB 203580 for 24 h (B) and then assayed for  $^3\text{H}$ -leucine protein levels. Cellular protein synthesis in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose medium



represents the control (100%). Each bar is the mean  $\pm$  SD of 6 independent experiments (\* $p \leq 0.05$  and \*\* $p \leq 0.01$ ; N.S., not significant).

#### 4. RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM BLOCKADE RESTORES THE INHIBITORY ACTION OF INSULIN ON ANGIOTENSINOGEN GENE EXPRESSION IN RAT KIDNEY PROXIMAL TUBULAR CELLS IN HIGH GLUCOSE

Tusty-Jiuan Hsieh\*, Pierre Fustier\*, Chih-Chang Wei\*, Shao-Ling Zhang\*,  
Janos G. Filep\*\*, Shiow-Shih Tang\*\*\*, Julie R. Ingelfinger\*\*\*, Serge Carrière\*\*\*\*,  
Pavel Hamet\* and John S.D. Chan\*†  
(Tusty-Jiuan Hsieh and Pierre Fustier are equal contributors)

\*Research Centre  
Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)  
Hôtel-Dieu Hospital  
3850, Saint Urbain Street  
Montreal, Quebec ,  
Canada, H2W 1T8

\*\*Research Centre  
Maisonneuve-Rosemont Hospital  
5415 boul. de l'Assomption  
Montreal, Quebec  
Canada H1T 2M4

\*\*\*Harvard Medical School  
Massachusetts General Hospital  
Pediatric Nephrology Unit  
15 Parkman Street, WAC 709  
Boston, MA 02114-3117  
USA

\*\*\*\*Servier Amérique  
235 boul. Armand Frappier  
Laval, Quebec,  
Canada H7V 4A7

\*† To whom correspondence should be addressed  
Telephone: (514) 890-8000, extension 15080  
Fax: (514) 412-7204  
[REDACTED]

Short Title: Renin-angiotensin system and insulin resistance

## ABSTRACT

*Background.* We reported previously that insulin inhibits angiotensinogen (ANG) gene expression in non-diabetic rat renal proximal tubular cells (RPTCs), but has no effect on ANG gene expression in diabetic rat RPTCs. We hypothesize that high glucose induction of resistance to insulin inhibition of ANG gene expression in RPTCs is mediated, at least in part, via intrarenal renin-angiotensin system (RAS) activation.

*Methods.* Rat immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs) were cultured for 2 weeks in either high glucose (25 mM) medium in the absence or presence of losartan ( $10^{-6}$  M), PD 123319 ( $10^{-6}$  M), perindopril ( $10^{-4}$  M), captopril ( $10^{-4}$  M), or GF 109203X ( $10^{-7}$  M), or cultured for 2 weeks in normal glucose (5 mM) medium in the absence or presence of angiotensin II (Ang II) ( $10^{-7}$  M) or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ( $10^{-7}$  M). Cellular ANG mRNA level was measured by a specific reverse transcription- polymerase chain reaction assay. Phosphorylation of p44/42 mitogen-activated protein kinase (p44/42 MAPK) was evaluated by Western blot analysis.

*Results.* Insulin ( $10^{-7}$  M) inhibited the acute stimulatory effect of high glucose on ANG mRNA expression and enhanced p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs cultured in normal glucose medium. In contrast, the inhibitory action of insulin was lost when IRPTCs were cultured for 2 weeks in high glucose medium. Co-incubation with losartan, PD 123319, perindopril, captopril, or GF 109203X restored the suppressive action of insulin on ANG gene expression in IRPTCs in high glucose. Finally, Ang II and PMA induced resistance to insulin inhibition on ANG gene expression in IRPTCs in normal glucose medium.

*Conclusions.* These studies demonstrate that high glucose induction of resistance to insulin inhibition on ANG gene expression in IRPTC is mediated, at least in part, via intrarenal RAS activation and protein kinase C (PKC) signaling. RAS blockade is effective in restoring the inhibitory action of insulin on ANG gene expression in RPTCs in high glucose medium.

Index words: Glucose, insulin resistance, RAS blockers, kidney

## INTRODUCTION

Diabetic nephropathy (DN) is the leading cause of end-stage renal disease (ESRD) in North America (1). Approximately 30-40% of all new ESRD cases in Canada and U.S.A. are attributed to diabetes (2,3). The progression of DN to ESRD is associated with kidney hypertrophy, hypertension, proteinuria, tubulo-interstitial injury and fibrosis (4,5). Studies over the last 10 years have demonstrated that intensive insulin treatment and chronic administration of renin-angiotensin system (RAS) blockers retard and delay the progression of nephropathy, but do not cure it (6-15). Such results demonstrate, however, that hyperglycemia and RAS activation are major determinants of DN progression.

Angiotensinogen (ANG) is the sole substrate in the RAS. All components of the RAS are expressed in human, rat and murine renal proximal tubular cells (RPTCs) (16-26). Angiotensin II (Ang II) levels, ANG and renin mRNA expression in the kidney are elevated in early diabetes (27-29), indicating that hyperglycemia and/or Ang II may be directly or indirectly responsible for renal proximal tubular hypertrophy and tubulofibrosis in diabetes. Indeed, *in vitro* studies have shown that the incubation of murine proximal tubular cells in high glucose medium (i.e.  $\geq 25$  mM) and high concentrations of Ang II (i.e.  $\geq 10^{-8}$  M) induce cellular hypertrophy and extracellular matrix protein expression (30-35). We have also reported that high glucose (i.e., 25 mM) stimulates ANG gene expression in rat immortalized renal proximal tubular cells (IRPTCs) (36-39). RAS blockers and stable transfection of antisense rat ANG cDNA inhibit the high glucose effect on ANG and transforming growth factor- $\beta 1$  gene expression and induction of IRPTC hypertrophy (40,41). These studies have established that intrarenal ANG gene expression and subsequent RAS activation induced by high glucose are essential for IRPTC hypertrophy.

We have also reported that insulin inhibited the acute stimulatory effect of high glucose on ANG gene expression in IRPTCs and non-diabetic rat renal RPTCs via the

activation of p44/42 mitogen-activated protein kinase (p44/42 MAPK) (42-45). In contrast, insulin could not suppress ANG gene expression and activate p44/42 MAPK phosphorylation in diabetic rat RPTCs (45). These data demonstrate that hyperglycemia impairs insulin signaling on p44/42 MAPK activation in diabetic rat RPTCs (45).

In the present studies, we investigated whether prolonged exposure of IRPTCs to high glucose for 2 weeks could induce resistance to insulin inhibition on ANG gene expression and p44/42 MAPK activation. We also examined whether losartan (an Ang II (AT<sub>1</sub>-subtype) receptor (AT<sub>1</sub>R) blocker), PD 123319 (an Ang II (AT<sub>2</sub>-subtype) receptor (AT<sub>2</sub>R) blocker), perindopril and captopril (angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors) and GF 109203X (a protein kinase C (PKC) inhibitor) could prevent this high glucose effect. Finally, we determined whether incubation of IRPTCs with Ang II or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) alone in normal glucose medium could evoke resistance to insulin inhibition of ANG gene expression and p44/42 MAPK activation.

Our studies revealed that prolonged exposure of IRPTCs in high glucose induces resistance to insulin inhibition on ANG gene expression and p44/42 MAPK activation. Co-incubation with RAS blockers and PKC inhibitor in high glucose was effective in restoring the inhibitory action of insulin on ANG gene expression and the stimulatory action on p44/42 MAPK activation in IRPTCs. Furthermore, incubation of IRPTCs with Ang II or PMA alone also induced resistance to insulin inhibition on ANG gene expression in IRPTCs.

#### **MATERIALS AND METHODS**

D(+)-glucose, D-mannitol, human Ang II, captopril (an ACE inhibitor), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (a PKC activator), and GF 109203X (a PKC inhibitor) were purchased from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario, Canada). PD 123319 (an AT<sub>2</sub>R blocker) was bought from Calbiochem-Novobiochem Inc. (San Diego, CA, USA). Losartan (a non-peptide AT<sub>1</sub>R blocker) was obtained from Dr. Ronald D. Smith (Dupont

Merck, Wilmington, DE, USA). Perindopril (an ACE inhibitor ) was a gift from Dr. Brigitte Riveline (Servier Amérique, Laval, Quebec, Canada). Normal glucose (1,000 mg/L or 5 mM) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (pH 7.45) (catalog #12320-032), 100× penicillin/streptomycin and fetal bovine serum (FBS) were obtained from Invitrogen, Inc. (Burlington, Ontario, Canada).

Oligonucleotides were synthesized by Invitrogen, Inc. Restriction and modifying enzymes were purchased from Invitrogen Inc., La Roche Biochemicals, Inc. (Laval, Quebec, Canada), or Amersham-Pharmacia Biotech (Baie d'Urfe, Quebec, Canada).

The PhosphoPlus p44/42 MAPK antibody kit from New England Biolabs, Inc. (Mississauga, Ontario, Canada) was deployed for the rapid analysis of p42/44 MAPK (Thr<sup>202</sup>/Tyr<sup>204</sup>) phosphorylation status in the MAPK cascade. Monoclonal antibodies against  $\beta$ -actin were obtained from Sigma-Aldrich Canada Ltd.

### Cell Culture

IRPTCs (cell line #93-p-2-1) at passages 18 to 25 were used in the present studies. The characteristics of this cell line have been described previously (22, 46). These cells express the mRNA and protein of ANG, renin, ACE and Ang II (both AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R) (22, 46).

IRPTCs were grown in 100 X 20 mm plastic Petri dishes (Invitrogen, Inc.) in normal glucose (i.e., 5 mM) DMEM (pH 7.45), supplemented with 5% FBS, 100 U/ml of penicillin, and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin, in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. For subculturing, cells were trypsinized (0.05% trypsin and EDTA) and plated at 2.5 X 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> in 100 X 20 mm Petri dishes.

Effect of RAS blockers, GF 109203X, Ang II, and PMA on ANG mRNA Expression in IRPTCs

IRPTCs were cultured for 2 weeks in either high glucose (i.e., 25 mM) DMEM containing 5% FBS in the absence or presence of losartan ( $10^{-6}$  M), PD 123319 ( $10^{-6}$  M), perindopril ( $10^{-4}$  M), captopril ( $10^{-4}$  M), or GF 109203X ( $10^{-7}$  M) or in normal glucose (i.e., 5 mM) DMEM containing 5% FBS in the absence or presence of Ang II ( $10^{-7}$  M) or PMA ( $10^{-7}$  M). The media was changed every 24 hours. After a 2-week incubation period, cell growth was arrested by incubation in serum-free medium with normal glucose DMEM for 24 hours. Then, the cells were incubated in normal or high glucose culture medium containing 1% depleted FBS (dFBS) in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M) for an additional 24 hours. At the end of the incubation period, the cells were harvested and extracted for ANG and  $\beta$ -actin mRNA levels as described previously (36-45).

Briefly, total RNA was extracted with Trizol reagent (Invitrogen, Inc.) for reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay to quantify the amount of ANG and  $\beta$ -actin mRNA as described previously (36-45). Total RNA (2  $\mu$ g) was used to synthesize first-strand cDNAs in the Super-Script pre-amplification system (Invitrogen, Inc.). Then, the first-strand cDNAs were diluted with water to a ratio of 1:4, and aliquots were processed to amplify rat ANG and  $\beta$ -actin cDNA fragments with the PCR core kit (Invitrogen, Inc.). First-strand cDNAs (5  $\mu$ l) and primers of rat ANG (400 nM) and rat  $\beta$ -actin (100 nM) were added in a final volume of 50  $\mu$ l PCR mixture (final concentration: 1 x PCR buffer, 0.2 mM dNTP, 1.5 mM  $MgCl_2$ , and 2.0 units of Taq DNA polymerase) (Invitrogen, Inc.). The PCR mixture was amplified in a Perkin-Elmer Cetus 2400 thermocycler (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA). After denaturation at 94°C for 3 minutes, ANG and  $\beta$ -actin cDNA were co-amplified in the same tube under the following conditions: 94°C for 45 seconds, 60°C for 45



seconds, and 72°C for 1 minute 30 seconds. PCRs were further extended at 72°C for 7 minutes after 30 cycles.

The sense and antisense rat ANG primers employed were 5'-CCT CGC TCT CTG GAC TTA TC-3' and 5'-CAG ACA CTG AGG TGC TGT TG-3', corresponding to nucleotide sequences N+676 to N+695 and N+882 to N+901 of rat ANG cDNA (47), respectively. The sense and antisense rat  $\beta$ -actin primers were 5'-ATG CCA TCC TGC GTC TGG ACC TGG C-3' and 5'-AGC ATT TGC GGT GCA CGA TGG AGG G-3', corresponding to nucleotide sequences N+155 to N+179 of exon 3, and nucleotide sequences of N+115 to N+139 of exon 5 of the rat  $\beta$ -actin gene (48), respectively.

To identify rat ANG and  $\beta$ -actin cDNA fragments, 10  $\mu$ l of the PCR product were electrophoresed on 1.2% agarose gel and transferred onto a Hybond-N<sup>+</sup> nylon membrane (Amersham-Pharmacia Biotech). Digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotide 5'-GAG GGG GTC AGC ACG GAC AGC ACC-3', corresponding to nucleotides N+775 to N+798 of rat ANG cDNA (47), prepared with a DIG oligonucleotide 3'-end labeling kit (La Roche Biochemicals, Inc.), was used to hybridize PCR products on the membrane. After stringent washing, the membrane was detected with a DIG luminescent detection kit (La Roche Biochemicals, Inc.) and exposed to Kodak BMR film (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). After ANG mRNA analysis, the same membrane was stripped and rehybridized with a  $\beta$ -actin oligonucleotide probe (sequence: 5'-TCC TGT GGC ATC CAT GAA ACT ACA TTC-3', corresponding to nucleotides N+9 to N+35 of exon 4 of the rat  $\beta$ -actin gene (48)). ANG mRNA levels were normalized by corresponding  $\beta$ -actin mRNA levels.

To maintain constant isotonicity or osmolality, the 5-mM glucose media were supplemented with D-mannitol (20 mM) (final concentration).

The dFBS was prepared by incubation with 1% activated charcoal and 1% AG 1X 8 ion-exchange resin (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) for 16 to 24 h at room

temperature as described by Samuels et al. (49), a procedure that removes endogenous steroid and thyroid hormones from the FBS.

Effect of RAS blockers, GF 109203X, Ang II, and PMA on p44/42 MAPK Activation in IRPTCs

The effect of RAS inhibitors, GF 109203X, Ang II, and PMA on p44/42 MAPK activation in IRPTCs was determined by Western blotting with the PhosphoPlus p44/42 MAPK antibody kit. After 2 weeks of incubation, cell growth was arrested by incubating the cells in serum-free medium with normal glucose DMEM for 24 hours. Then, the cells were incubated in normal glucose or high glucose DMEM containing 1% dFBS in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M) for 10 minutes, which was followed by harvesting and assay for p44/42 MAPK phosphorylation as described previously (42-45).

Briefly, the cells were lysed in 700  $\mu$ l lysis buffer [62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 2% (wt/vol) sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 50 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, and 0.1% (wt/vol) bromophenol blue], and transferred into Eppendorf tubes. The cell lysates were sonicated for 15 seconds, heated at 95°C for 5 minutes, and centrifuged at 12,000  $\times$  g for 5 minutes. Thirty-five  $\mu$ l of the supernatants were subjected to SDS-10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Hybond-P, Amersham-Pharmacia Biotech). The membrane was initially blotted for phosphorylated p44/42 MAPK and then re-blotted for total p44/42 MAPK, according to the instructions of the supplier (New England Biolabs, Inc.).

### Statistical Analysis

Three to four separate experiments were performed per protocol, and each treatment group was assayed in duplicate or triplicate. The data were analyzed by one-way ANOVA and the Bonferroni test. A probability level of  $p \leq 0.05$  was regarded as statistically significant.

## RESULTS

### **Effect of RAS Blockers, GF 109203X, Ang II, and PMA on Basal ANG mRNA Expression in IRPTCs**

Figure 1 shows that prolonged incubation (i.e., 2 weeks) of IRPTCs with high glucose enhanced basal ANG mRNA expression compared to the controls (cells incubated in 5-mM glucose medium). Co-incubation with losartan ( $10^{-6}$  M), PD 123319 ( $10^{-6}$  M), perinodopril ( $10^{-4}$  M), captopril ( $10^{-4}$  M), or GF 109203X ( $10^{-7}$  M) inhibited the stimulatory effect of high glucose on basal ANG mRNA expression in IRPTCs. Co-incubation of IRPTCs with Ang II ( $10^{-7}$  M) or PMA ( $10^{-7}$  M) also enhanced basal ANG mRNA expression in normal glucose medium compared to the controls. These data suggest that the high glucose action on ANG mRNA expression in IRPTCs is mediated, at least in part, via RAS activation and PKC signaling.

### **RAS Blockers and GF 109203X Restored the Insulin Action on ANG mRNA Expression in IRPTCs in High Glucose Medium**

Figure 2A shows that neither high glucose nor insulin had any effect on ANG mRNA expression in IRPTCs that had been incubated for 2 weeks in high glucose medium. Co-incubation with losartan ( $10^{-6}$  M) or PD 123319 ( $10^{-6}$  M), however, restored the stimulatory

and inhibitory action of high glucose and insulin on ANG mRNA expression in IRPTCs (Figures 2B and 2C). Similarly, co-incubation with perindopril ( $10^{-4}$  M) (Figure 3A), or GF 109203X ( $10^{-7}$  M) (Figure 3B) restored the stimulatory and inhibitory effect of high glucose and insulin on ANG mRNA expression in IRPTCs, respectively. These data demonstrate that high glucose induction of resistance to insulin inhibition on ANG mRNA expression is probably mediated via RAS activation in IRPTCs. RAS blockers and the GF 109203X are effective in restoring the inhibitory action insulin on ANG mRNA expression in IRPTCs in high glucose.

### **Ang II and PMA Induced Insulin Resistance on Inhibition of ANG mRNA expression in IRPTCs**

Figure 4A shows that high glucose stimulated and insulin inhibited ANG mRNA in IRPTCs that had been cultured for 2 weeks in normal glucose medium. Neither high glucose nor insulin, however, had any effect on ANG mRNA expression in IRPTCs that had been cultured for 2 weeks with Ang II (Figure 4B) or PMA (Figure 4C) in normal glucose medium. These data reveal that prolonged exposure to Ang II or PMA induced resistance to insulin inhibition on ANG mRNA expression in IRPTCs.

#### Effect of RAS Blockers, GF 109203X, Ang II, and PMA on basal p44/42 MAPK Phosphorylation in IRPTCs

Figure 5 displays basal p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs that had been cultured for 2 weeks in high glucose medium in the absence or presence of RAS blockers or the PKC inhibitor. It is apparent that basal p44/42 MAPK phosphorylation was not affected by high glucose in the absence or presence of RAS blockers or GF 109203X. Similarly,

incubation of IRPTCs for 2 weeks in normal glucose medium in the absence or presence of Ang II or PMA also had no impact on basal p44/42 MAPK phosphorylation.

#### RAS Blockers and GF 109203X Restored Insulin Signaling on p44/42 MAPK Phosphorylation in IRPTCs in High Glucose Medium

Figure 6A shows that neither high glucose nor insulin exerted any effect on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs that have been incubated for 2 weeks in high glucose medium. In contrast, co-incubation with losartan (Figure 6B) or PD 123319 (figure 6C) restored insulin signaling on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose. Similarly, co-incubation with perindopril (Figure 7A), or GF 109203X (Figure 7B) restored insulin signaling on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose. High glucose alone had no effect on p44/42 MAPK phosphorylation in these cells. These data demonstrate that RAS blockers and GF 109203X are effective in restoring insulin signaling on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose.

#### Ang II and PMA Induced Insulin Resistance on p44/42 MAPK Phosphorylation in IRPTCs

Figure 8A illustrates that insulin stimulated p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs that had been incubated for 2 weeks in normal glucose medium, whereas high glucose had no significant effect in this respect. On the other hand, neither high glucose nor insulin had any influence on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs that had been incubated in normal glucose with Ang II (Figure 8B) or PMA (Figure 8C). These data demonstrated that prolonged incubation with Ang II or PMA impairs insulin signaling on p44/42 MAPK activation in IRPTCs.

## DISCUSSION

The present studies demonstrate that RAS blockade and PKC inhibition restore the inhibitory action of insulin on ANG gene expression and the stimulatory effect on p44/42 MAPK activation in IRPTCs in high glucose medium. These data suggest that high glucose and intrarenal RAS activation play an important role in the induction of resistance to insulin inhibition on ANG gene expression in RPTCs via impairment of insulin signaling on p44/42 MAPK phosphorylation.

The beneficial effects of ACE inhibition on cardiovascular disease have been reported in many clinical trials (50). RAS inhibition can increase insulin sensitivity in patients with hypertension and cardiovascular diseases (51-53), implicating a role for the RAS in the regulation of insulin action. Cross-talk between the insulin and Ang II signaling systems has been demonstrated in animal studies (54). Injection of Ang II into rats resulted in acute inhibition of both basal and insulin-stimulated insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS-1/2)-associated phosphoinositide 3 kinase (PI3-K) activity in the heart, and this effect was blocked by AT<sub>1</sub>R antagonists (54). Studies by others have also shown that Ang II stimulates serine phosphorylation of both the insulin receptor (IR)- $\beta$  subunit and IRS-1, and this subsequently impairs insulin stimulation of IRS-tyrosine phosphorylation and coupling of the insulin signaling to PI3-K in cultured rat aortic vascular smooth muscle cell (VSMCs) (55-57). Taken together, these studies suggest that RAS activation may contribute to insulin resistance in VSMCs.

Our present studies have demonstrated that incubation of IRPTCs for 2 weeks in high glucose increases basal ANG mRNA expression in comparison to the controls (i.e., cells incubated in normal glucose medium) (Figure 1). Co-incubation with GF 109203X, losartan, PD 123319, perindopril, or captopril abolished the stimulatory effect of high glucose on basal ANG mRNA expression in IRPTCs. Furthermore, IRPTC culture in normal glucose medium

with Ang II or PMA enhanced basal ANG mRNA expression (Figure 1). These results support the notion that the stimulatory effect of high glucose on ANG mRNA expression is probably mediated via local IRPTC Ang II that interact with both AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R. Indeed, our unpublished results showed that the levels of IR-rAng II in 25 mM glucose media were 1.5-fold higher ( $p \leq 0.05$ ) than those in 5 mM glucose media. Thus, these findings confirm our previous studies (40, 41, 46) that Ang II exerts "positive" feedback on ANG mRNA expression of in RPTCs both *in vitro* and *in vivo*.

We are surprised that PD 123319 could also inhibit the stimulatory effect of high glucose on ANG mRNA expression in IRPTCs. Our data suggest that the stimulatory action of Ang II on ANG mRNA expression could be mediated, at least in part, via AT<sub>1</sub>R and AT<sub>2</sub>R in RPTCs. To the best of our knowledge, this is the first report of AT<sub>2</sub>R blockade attenuating ANG gene expression in RPTCs in high glucose. The signaling mechanism(s) of AT<sub>2</sub>R activation on ANG gene expression is (are) not clear at the moment. Studies are under way in our laboratory to elucidate the mechanism(s) of AT<sub>2</sub>R activation on ANG gene expression.

Prolonged exposure of IRPTCs to high glucose induced resistance to insulin inhibition on ANG mRNA expression in IRPTCs (Figure 2A), whereas incubation of IRPTCs with losartan (Figure 2B), PD 123319 (Figure 2C), perindopril (Figure 3A), or GF 109203X (Figure 3B) restored the acute stimulatory effect of high glucose and the inhibitory action of insulin on ANG mRNA in high glucose. These data support the notion that intrarenal RAS activation plays an important role in the induction of resistance to insulin inhibition on ANG gene expression.

Insulin suppressed the acute stimulatory effect of high glucose on ANG mRNA in IRPTCs that had been cultured for 2 weeks in normal glucose medium (Figure 4A). Neither high glucose nor insulin, however, had any significant impact on ANG mRNA expression in IRPTCs that had been incubated for 2 weeks in normal glucose medium in the presence of

Ang II (Figure 4B) or PMA (Figure 4C). At present, we do not know the reason why high glucose could not stimulate ANG mRNA expression in these cells. One possibility might be that prolonged exposure to high glucose, Ang II or PMA down-regulated PKC activity and protein expression levels as shown by others (58). Indeed, this possibility has been supported by our previous studies demonstrating that the stimulatory effect of PMA on ANG secretion was abolished after 24-hour pre-incubation of IRPTCs with 5 mM glucose medium in the presence of PMA compared to control cells without pre-incubation with PMA (36).

Similarly, we do not understand the exact reason why insulin had no influence on ANG gene expression in cells that had been cultured in high glucose, Ang II or PMA. One possibility is that activated PKC isoform(s) impairs insulin signaling by increasing of IRS-1/2 phosphorylation at serine/threonine residues. This possibility is supported by studies showing that PKC isoform(s) attenuate(s) insulin signaling by IRS-1 phosphorylation at serine/threonine residues (57, 59-64). Therefore, PKC isoform(s) activation might be an important negative regulator of insulin receptor function. Most importantly, AT<sub>1</sub>R activation may play a pivotal role in this cascade by activation of PKC signaling. Definitely, more studies are warranted to elucidate the molecular signaling of high glucose and Ang II in the induction of resistance to insulin inhibition on ANG gene expression in RPTCs.

Basal p44/42 MAPK phosphorylation was relatively constant in cells that had been incubated for 2 weeks in high glucose medium in the absence or presence of losartan, PD 123319, perindopril, captopril, or GF 109203X as well as in cells that had been incubated for 2 weeks in normal glucose medium in the absence or presence of Ang II or PMA (Figure 5). These data are in agreement with the data of Hannken et al. (65) who reported that there was no statistically significant difference of phosphorylated p44/42 MAPK expression in mouse proximal tubular cells after 24-hour incubation with or without Ang II.



We found that insulin could not stimulate p44/42 MAPK phosphorylation in cells that had been incubated for 2 weeks in high glucose medium (Figure 6A). Co-incubation with losartan (Figure 6B), PD 123319 (Figure 6C), perindopril (Figure 7A), or GF 109293X (Figure 7B) restored the insulin effect on p44/42 MAPK phosphorylation in high glucose medium. On the other hand, insulin stimulated p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs that had been incubated in normal glucose medium (Figure 8A). In contrast, prolonged exposure to Ang II or PMA blocked the insulin action on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs (Figure 8B and 8C). Thus, these data further support our hypothesis that high glucose-induced resistance to insulin inhibition on ANG gene expression might be mediated, at least in part, via local intrarenal RAS activation, and subsequently impairs insulin signaling on p44/42 MAPK phosphorylation.

In summary, our studies show that prolonged exposure of IRPTCs to high glucose or to Ang II and PMA in normal glucose medium induces resistance to insulin inhibition on ANG mRNA expression. The high glucose effect was reversed by co-culture with RAS blockers. These results suggest that local renal RAS activation may contribute to the development of resistance to insulin inhibition on ANG gene expression in early diabetic RPTCs. Inhibition of renal ANG gene expression and Ang II formation, stimulated by high levels of glucose, may be an important step whereby RAS blockers could prevent the development of insulin resistance in diabetes. Finally, the results of our present studies revealed that the p44/42 MAPK signal transduction pathway is altered in cells that have been exposed chronically to high glucose as well as in cells that have been incubated in normal glucose with Ang II or PMA. These findings raise the possibility that restoration of insulin sensitivity on p44/42 MAPK activation might be an important step for insulin to suppress local renal RAS activation. This approach should be explored further rather than treatment with insulin alone in insulin-dependent diabetic patients.

## Abbreviations

Abbreviations used in this article are: ACE, angiotensin-converting enzyme; ANG, angiotensinogen; Ang II, angiotensin II; dFBS, depleted fetal bovine serum; DIG, digoxigenin; DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium; DN, diabetic nephropathy; ESRD, end stage renal disease; FBS, fetal bovine serum; GF 109203X, a protein kinase C (PKC) inhibitor; IR, insulin receptor; IRPTCs, immortalized renal proximal tubular cells; IRS-1/2, insulin receptor substrates-1/2; PD 123319, an AT<sub>2</sub>R blocker; PI3-K, phosphoinositide-3 kinase; PKC, protein kinase C; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; p44/42 MAPK, p44/42 mitogen-activated protein kinase; RAS, renin-angiotensin system; RPTCs, renal proximal tubular cells; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; VSMC, vascular smooth muscle cells.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Kidney Foundation of Canada, the Canadian Diabetes Association, the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP-13420 and MOP-62920 to J.S.D.C. and MOP-12573 to J.G.F.) and the National Institutes of Health (NIH) of the USA (HL-48455 to J.R.I. and DK-50836 to S.S.T.). Shao-Ling Zhang is the recipient of a CIHR Doctoral Research Award and CIHR Fellowship. The authors thank Ovid M. Da Silva, Editor, Research Support Office, Research Centre, CHUM, for editing this manuscript.

## REFERENCES

1. Groggel GC: Diabetic nephropathy. *Arch Family Med* 5:513-520, 1996
2. Berneger TV, Brancati FL, Welten PK, Klag MJ: End stage renal disease attributable to diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 121:912-918, 1994
3. United States Renal Data System: USRDS Annual Data Report. Bethesda, MD: The National Institutes of Health, NIDDK, 2003
4. Parving HH, Osterby R, Anderson PW, Hsueh W: Diabetic nephropathy. In: Brenner BM (ed.): *The Kidney*, 5<sup>th</sup> edition. Philadelphia, PA: Saunders, 1996, pp 1864-1892
5. Jensen T, Borch-Johnsen K, Kofoed-Enevoldsen A, Deckert T: Coronary artery disease in young type 1 (insulin-dependent) diabetic patients with and without diabetic nephropathy: incidence and risk factors. *Diabetologica* 30:144-148, 1987
6. Stackhouse S, Miller PL, Park SK, Meyer TW: Reversal of glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy by blood glucose normalization in diabetic rats. *Diabetes* 39: 989-995, 1990
7. Fukui M, Nakamura T, Ebihara I, Shirato I, Tomino Y, Koide H: ECM gene expression and its modulation by insulin in diabetic rats. *Diabetes* 41:1520-1527, 1992
8. Reichard P, Nilsson B-Y, Rosenqvist V: The effect of long-term intensified treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:304-309, 1993

9. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: 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* 329:977-986, 1993
10. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in the diabetes control and complications trial. *Kidney Int* 47:1703-1720, 1995
11. Nakamura T, Takahashi T, Fukui M, Ebihara I, Osada S, Tomino Y, Koide H: Enalapril attenuates increased gene expression of extracellular matrix components in diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 5: 1492-1497, 1995
12. Ravid M, Lang R, Rachmani R, Lishner M: Long-term renoprotective effect of angiotensin converting enzyme inhibition in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arch Intern Med* 156: 286-289, 1996
13. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Groups: Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive insulin therapy. *N Engl J Med* 342:381-389, 2000
14. Andersen S, Tarnow L, Rensing P, Hansen BV, Parving HH: Renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int* 57:601-606, 2000

15. Fliser D, Haller H: Angiotensin II subtype 1-receptor antagonists in the treatment of diabetic nephropathy. *J Hypertens* 19 (Suppl 1):S57-S60, 2001
16. Dzau VJ, Ingelfinger JR: Molecular biology and pathophysiology of the intrarenal renin-angiotensin system. *J Hypertens* 7 (Suppl. 7):53-58, 1989
17. Johnston CI, Fabris B, Jandeleit K: Intrarenal renin-angiotensin system in renal physiology and pathophysiology. *Kidney Int* 44 (Suppl. 42):559-563, 1993
18. Ingelfinger JR, Zuo WM, Fon EA, Ellison KE, Dzau VJ: In situ hybridization evidence for angiotensinogen mRNA in the rat proximal tubule. A hypothesis for the intrarenal renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 85:417-423, 1990
19. Chan JSD, Chan AHH, Nie Z-R, Sikstrom R, Lachance S, Hashimoto S, Carrière S: Thyroid hormone, L-T<sub>3</sub>, stimulates the expression of the angiotensinogen gene in cultured opossum kidney (OK) cells. *J Am Soc Nephrol* 2:1360-1367, 1992
20. Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II as a hypertrophic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int* 43 (Suppl. 39):S100-S107, 1992
21. Terada Y, Tomita K, Nonoguch H, Marumo F: PCR localization of angiotensin II receptor and angiotensinogen mRNA in rat kidney. *Kidney Int* 43:1251-1259, 1993

22. Tang SS, Jung F, Diamant D, Brown D, Bachinsky D, Hellman P, Ingelfinger J: Temperature-sensitive SV 40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 268:F435-F446, 1995
23. Loghman-Adham M, Rohrwasser A, Helin C, Zhang S, Terreros D, Inoue I, Lalouel J-M: A conditionally immortalized cell line from murine proximal tubule. *Kidney Int* 52:229-239, 1997
24. Chen M, Harris MP, Rose D, Smart A, He XR, Kretzler M, Briggs JP, Schnermann J: Renin and renin mRNA in proximal tubule of the rat kidney. *J Clin Invest* 94: 237-243, 1994
25. Burns KD, Inagami T, Harris RC: Cloning of a rabbit kidney cortex AT<sub>1</sub> angiotensin II receptor that is present in proximal tubule epithelium. *Am J Physiol* 264 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 33):F645-F654, 1993
26. Wang L, Lei C, Zhang S-L, Roberts KD, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Synergistic effect of dexamethasone and isoproterenol on the expression of angiotensinogen in immortalized rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 53:287-295, 1998
27. Anderson S, Jung FF, Ingelfinger JR: Renal renin-angiotensin system in diabetes: functional, immunohistochemical, and molecular biological corrections. *Am J Physiol* 265:F477-F486, 1993

28. Lai KN, Leung JCK, Lai KB, To WY, Yeung VTF, Lai FM-M: Gene expression of the renin-angiotensin system in human kidney. *J Hypertens* 16:91-102, 1998
29. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G, Imig JD, Navar LG, Burns KD: Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int* 58:2320-2330, 2000.
30. Ziyadeh FN, Snipes ER, Watanabe M, Alavarez RJ, Goldfarb S, Haverty TP: High glucose induces cell hypertrophy and stimulates collagen gene transcription in proximal tubule. *Am J Physiol* 259:F704-F714, 1990
31. Wolf G, Neilson EG: Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine tubular cells. *Am J Physiol* 259:F768-F777, 1990
32. Wolf G, Neilson EG, Goldfarb S, Ziyadeh FN: The influence of glucose concentration on angiotensin II-induced hypertrophy of proximal tubular cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 179:902-909, 1991
33. Wolf G, Killen PD, Neilson EG: Intracellular signalling of transcription and secretion of type IV collagen after angiotensin II-induced cellular hypertrophy in cultured proximal tubular cells. *Cell Reg* 2:219-227, 1991
34. Wold G, Zahner G, Mondorf U, Schoeppe W, Stahl RAK: Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK1 cells through the AT<sub>1</sub> receptor. *Nephrol Dial Transplant* 8:128-133, 1993



35. Wolf G, Mueller E, Stahl RAK, Ziyadeh FN: Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor- $\beta$ . *J Clin Invest* 92:1366-1372, 1993
36. Zhang S-L, Filep JG, Hohman TC, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 55:454-464, 1999
37. Zhang S-L, Tang S-S, Chen X, Filep JG, Ingelfinger JR, Chan JSD: High levels of glucose stimulate angiotensinogen gene expression via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 141:4637-4646, 2000
38. Hsieh T-J, Zhang S-L, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression via reactive oxygen species (ROS) generation in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 143:2975-2985, 2002
39. Hsieh T-J, Fustier P, Zhang S-L, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Fantus IG, Hamet P, Chan JSD: High glucose stimulates angiotensinogen gene expression and cell hypertrophy via activation of hexosamine biosynthesis pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 144:4338-4349, 2003
40. Zhang S-L, To C, Chen X, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Carrière S, Chan JSD: Effect of renin-angiotensin system blockade on the expression of the angiotensinogen

- gene and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells. *Exp Nephrol* 9:109-117, 2001
41. Zhang S-L, Hsieh T-J, Chen X, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Essential role(s) of intrarenal renin-angiotensin system on transforming growth factor-beta 1 expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *J Am Soc Nephrol* 13:302-312, 2002
  42. Zhang S-L, Chen X, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Insulin inhibits angiotensinogen gene expression via the mitogen-activated protein kinase pathway in rat kidney proximal tubular cells. *Endocrinology* 140:5285-5292, 1999
  43. Chen X, Zhang S-L, Pang L, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Characterization of a putative insulin-responsive element and its binding protein(s) in rat angiotensinogen gene promoter: regulation by glucose and insulin. *Endocrinology* 142:2577-2585, 2001
  44. Zhang S-L, Chen X, Wei C-C, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Insulin inhibits dexamethasone effect on angiotensinogen gene expression and induction of hypertrophy in rat kidney proximal tubular cells in high glucose. *Endocrinology* 143:4627-4635, 2002
  45. Zhang S-L, Chen X, Hsieh T-J, Leclerc M, Henley N, Allidina A, Hallé JP, Brunette M-G, Filep JG, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Hyperglycemia induces insulin

- resistance on angiotensinogen gene expression in diabetic rat kidney proximal tubular cells. *J Endocrinol* 172:333-344, 2002
46. Ingelfinger JR, Jung F, Diamant D, Haveran L, Lee E, Brem A, Tang S-S: Rat proximal tubule cell line transformed with origin-defective SV40 DNA: autocrine Ang II feedback. *Am J Physiol* 276 (Renal Physiol 45):F218-F227, 1999
  47. Ohkubo H, Kageyama R, Ujihara M, Hirose T, Inayama S, Nakanishi S: Cloning and sequence analysis of cDNA for rat angiotensinogen. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2196-3000, 1983
  48. Nudel U, Zakut R, Shani M, Neuman S, Levy Z, Yaffe D: The nucleotide sequence of the rat cytoplasmic  $\beta$ -actin gene. *Nucleic Acid Res* 11:1759-1771, 1983
  49. Samuels HH, Standby F, Shapiro LE: Control of growth hormone synthesis in cultured GH cells by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and glucocorticoid agonists and antagonists: studies on the independent and synergistic regulation of the growth hormone response. *Biochemistry* 18:715-721, 1979
  50. Garg R, Yusuf S: Overview of randomized trials of angiotensin-converting enzyme inhibitors on mortality in patients with heart failure. *JAMA* 273:1450-1456, 1995
  51. Torlone E, Mritta M, Rambotti AM, Perriello G, Santeusano F, Brunetti P, Bolli GB: Improved insulin action and glycemic control after long-term angiotensin-converting

- enzyme inhibition in subjects with arterial hypertension and type II diabetes. *Diabetes Care* 16:1347-1355, 1993
52. Shieh S, Shen D, Sheu WHH, Fuh M, Jeng CY, Jeng JR, Chen YI, Reaven GM: Improvement in metabolic risk factors for coronary heart disease associated with cilazapril. *Am J Hypertens* 5: 506-510, 1992
53. Raccach D, Pettenuzzo-Mollo M, Provendier O, Boucher L, Cozic JA, Gorlier R, Huin P, Sicard J, Vagus P: Comparison of the effects of captopril and nicardipine on insulin sensitivity and thrombotic profile in patients with hypertension and android obesity. *Am J Hypertens* 7:731-738, 1994
54. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJA, Kahn CR: Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:12490-12495, 1996
55. Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP: Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels: a potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 100:2158-2169, 1997
56. Fukuda N, Satoh C, Hu W-Y, Nakayama M, Kishioka H, Kanmatsuse K: Endogenous angiotensin II suppresses insulin signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 19:1651-1658, 2001

57. Motley ED, Eguchi K, Gardner C, Hicks AL, Reynolds CM, Frank GD, Mifune M, Ohba M, Eguchi S: Insulin-induced Akt activation is inhibited by angiotensin II in the vasculature through protein kinase C- $\alpha$ . *Hypertension* 41:775-780, 2003
58. Hug H, Sane TF: Protein kinase C isozymes: divergence in signal transduction? *Biochem J* 291:329-343, 1993
59. Chin JE, Liu F, Roth RA: Activation of protein kinase C  $\alpha$  inhibits insulin stimulated tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 8:51-58, 1994
60. Bossenmaier B, Mosthaf L, Mischak H, Ullrich A, Haring HU: Protein kinase C isoforms beta-1 and beta-2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor. *Diabetologia* 40:863-866, 1997
61. De Fea K, Roth RA: Protein kinase C modulation of insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation requires serine 612. *Biochemistry* 36:12939-12947, 1997
62. Kellerer M, Mushack J, Mischak H, Haring HU: Protein kinase C (PKC) epsilon enhances the inhibitory effect of TNF- $\alpha$  on insulin signaling in HEK 293 cells. *FEBS Lett* 418:119-122, 1997
63. Kellerer M, Mushack J, Seffer E, Mischak H, Ullrich A, Haring HU: Protein kinase C isoforms alpha, delta and theta require insulin receptor substrate-1 to inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor in human kidney embryonic cells (HEK 293 cells). *Diabetologia* 41:833-838, 1998

64. Strack V, Hennige AM, Krutzfeldt J, Bossenmaier B, Klein HH, Kellerer M, Lammers R, Haring HU: Serine residues 994 and 1023/25 are important for insulin receptor kinase inhibition by protein kinase C isoform beta-2 and theta. *Diabetologica* 43: 443-449, 2000
  
65. Hancken T, Schroeder R, Zahner G, Stahl RAK, Wolf G: Reactive oxygen species stimulate p44/42 mitogen-activated protein kinase and induce p27<sup>Kip1</sup>: role in angiotensin II-mediated hypertrophy of proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol* 11: 1387-1397, 2000

## LEGENDS TO FIGURES

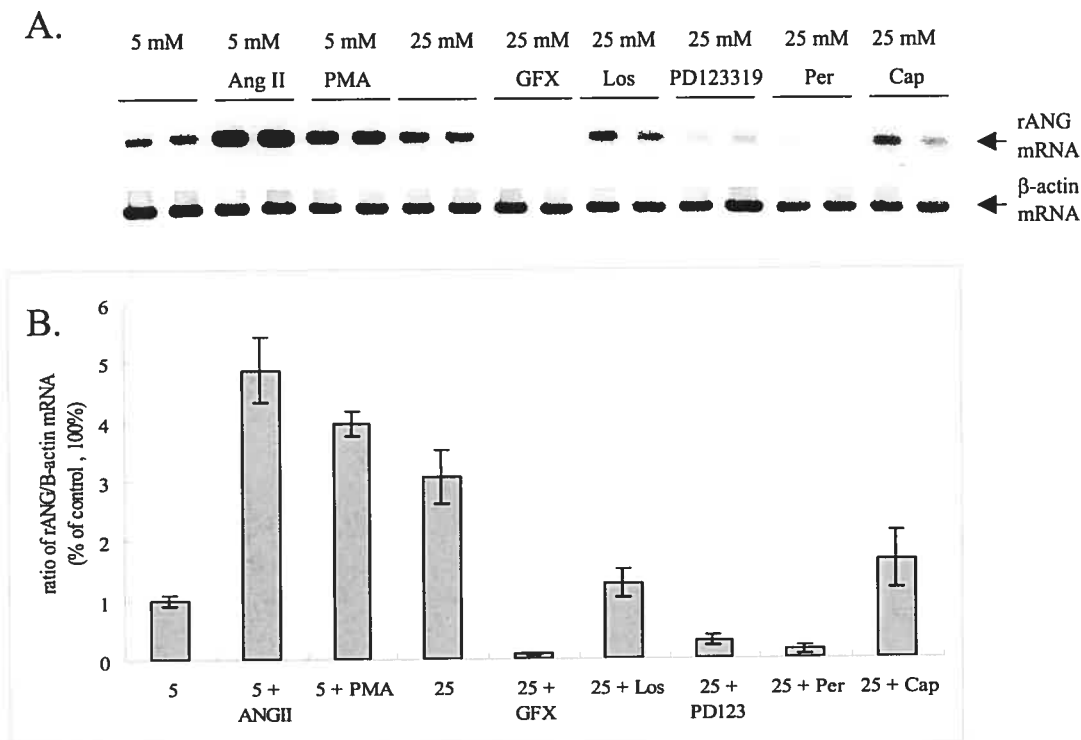
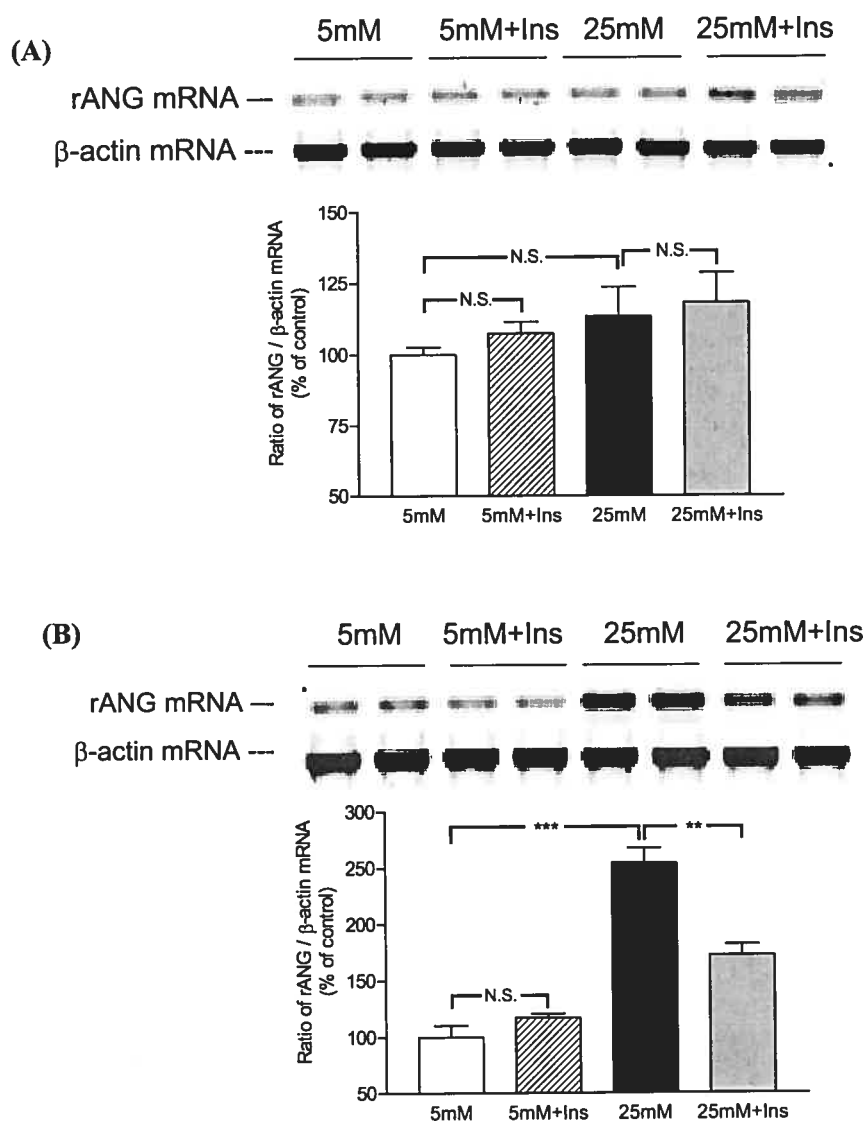


Figure 4.1: Effect of RAS blockers, PKC inhibitor, Ang II, and PMA on basal ANG mRNA expression in IRPTCs. The cells were pre-incubated for 2 weeks in 5 mM glucose medium in the presence of Ang II or PMA or in 25 mM glucose medium in the absence or presence of losartan, PD 123319, perindopril, captopril, or GF 109203X. They were collected and assayed for rat ANG and  $\beta$ -actin mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). DNA fragments of the RT-PCR mixture were separated on 1.2 % agarose gel and then transferred onto a nylon membrane. Subsequently, the membrane was blotted with a digoxigenin (DIG)-labeled oligonucleotide probe corresponding to the nucleotides N+994 to N+1020 of rat ANG, washed and exposed to autoradiography. The same blot was stripped and reprobed with DIG-labeled oligonucleotide corresponding to nucleotides N+9 to N+35 (exon 4) of rat  $\beta$ -actin

cDNA to standardize the amount of cDNA. The relative densities of ANG were normalized with the  $\beta$ -actin control. ANG mRNA levels in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose DMEM were considered as controls (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).





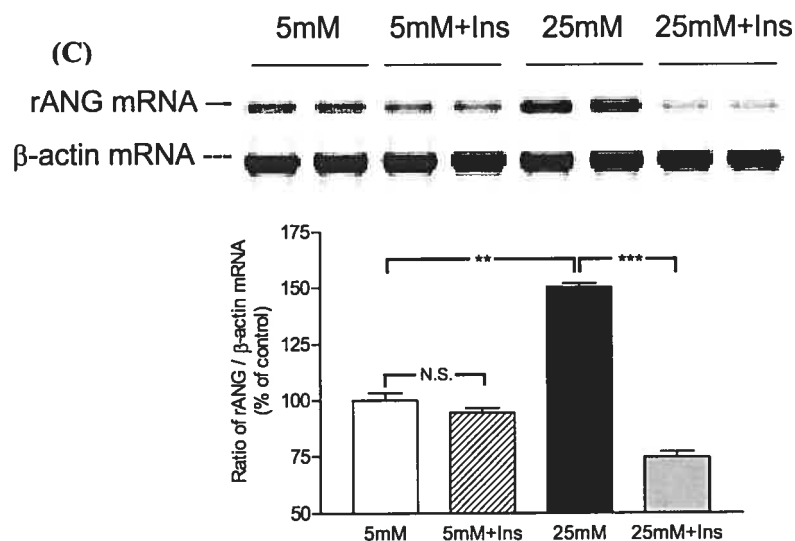


Figure 4.2: Co-incubation with losartan or PD 123319 restores the insulin action on ANG mRNA expression in IRPTCs in high glucose medium. After incubation for 2 weeks in 25 mM glucose medium (A) in the absence or presence of losartan ( $10^{-6}$  M) (B) or PD 123319 ( $10^{-6}$  M) (C), the cells were synchronized for 24 hours in serum-free medium. Then, they were incubated in 5 mM or 25 mM glucose medium in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M) for 24 hours, harvested and assayed for levels of ANG and  $\beta$ -actin mRNA by RT-PCR as described in Figure 1. The relative densities of ANG mRNA were normalized with the  $\beta$ -actin mRNA control. ANG mRNA levels in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose DMEM were considered as controls (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).

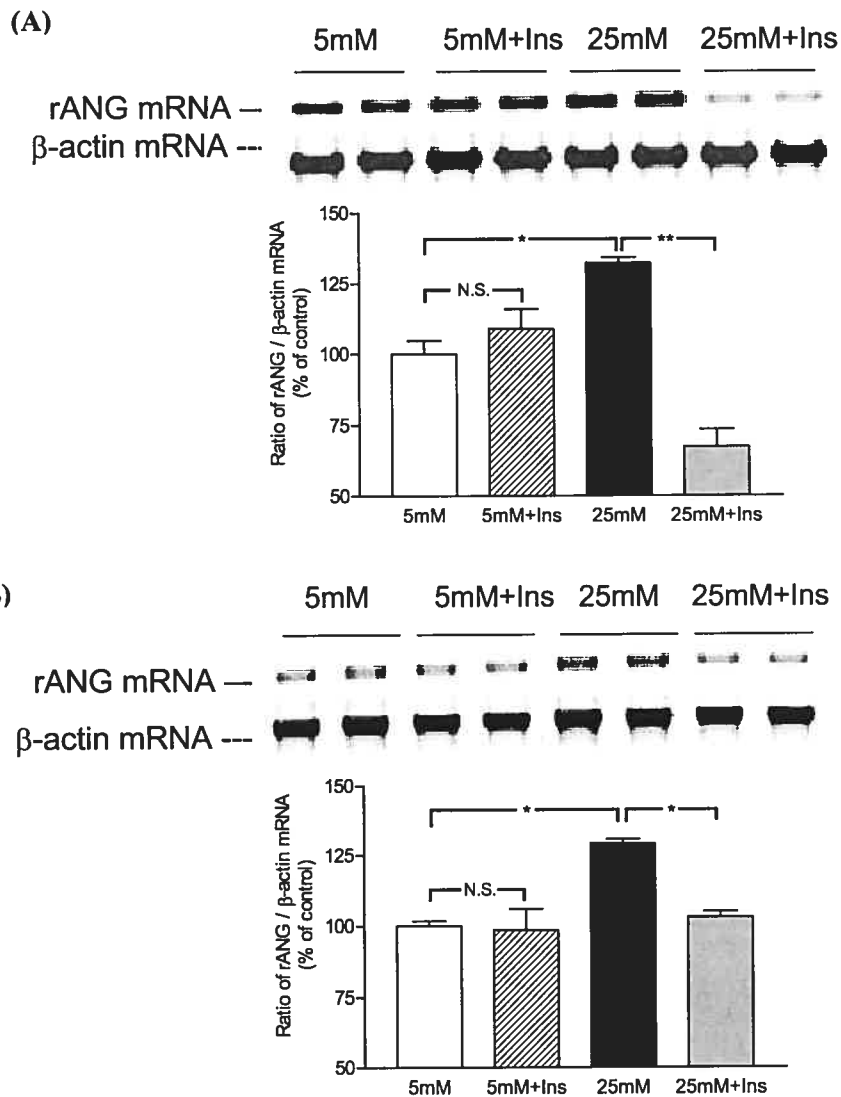


Figure 4.3: Co-incubation with ACE inhibitors and GF 109203X restores the insulin action on ANG mRNA expression in IRPTCs in high glucose medium. After incubation for 2 weeks in 25 mM glucose medium in the presence of perindopril ( $10^{-4}$  M) (A) or GF 109203X ( $10^{-7}$  M) (B), the cells were synchronized for 24 hours in serum-free medium. Then, they were incubated for 24 hours in 5 mM or 25 mM glucose medium in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M), harvested and assayed for levels of ANG and  $\beta$ -actin mRNA by RT-PCR as described in Figure 1. The relative densities of ANG mRNA were normalized with the  $\beta$ -actin

mRNA control. ANG mRNA levels in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose DMEM were considered as controls (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).

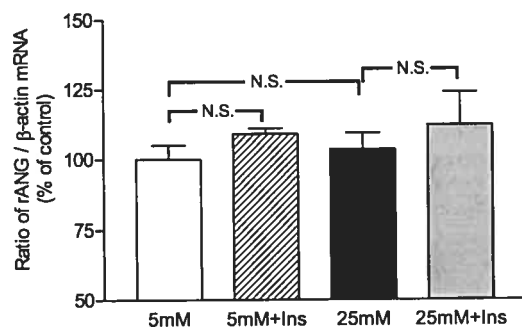
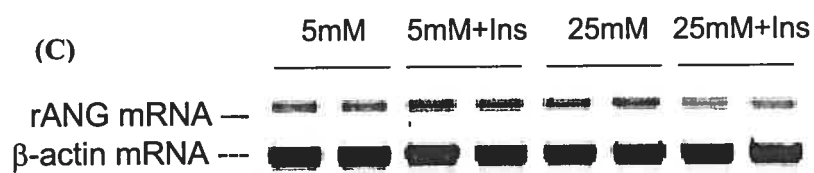
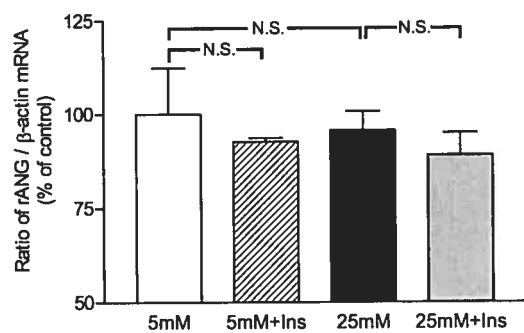
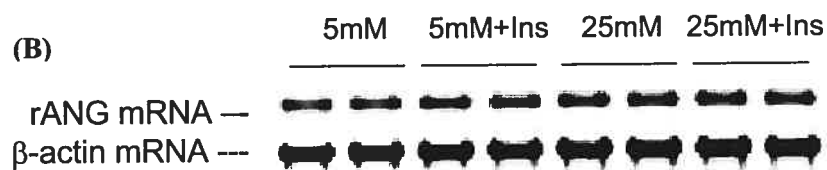
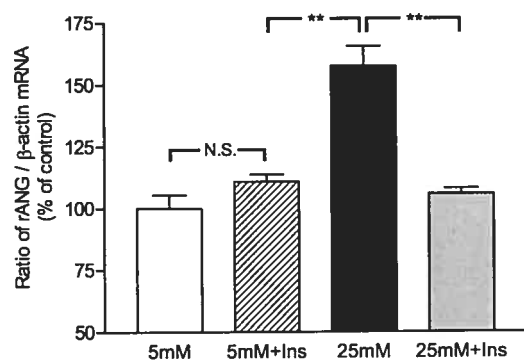
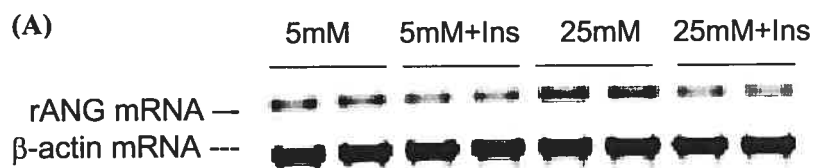


Figure 4.4: Ang II and PMA induce resistance to insulin inhibition on ANG mRNA expression in IRPTCs. After incubation for 2 weeks in 5 mM glucose medium (A) in the absence or presence of Ang II ( $10^{-7}$  M) (B) or PMA ( $10^{-7}$  M) (C), the cells were synchronized for 24 hours in serum-free medium. Then, cells were incubated for 24 hours in 5 mM or 25 mM glucose medium in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M), harvested and assayed for levels of ANG and  $\beta$ -actin mRNA by RT-PCR as described in Figure 1. The relative densities of ANG were normalized with the  $\beta$ -actin control. ANG mRNA levels in IRPTCs incubated in 5 mM D-glucose DMEM were considered as controls (100%). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  and \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., not significant).

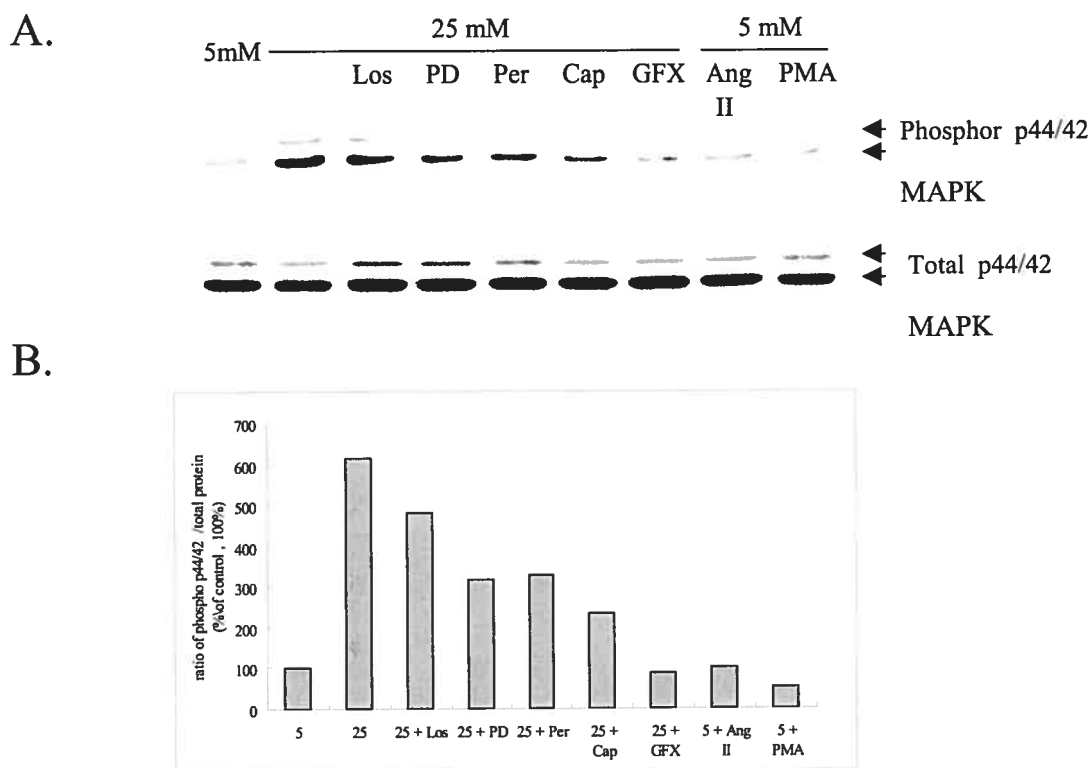


Figure 4.5: Effect of Ang II, PMA, RAS inhibitors and GF 109203X on basal p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs. The cells were incubated for 2 weeks in 5 mM glucose medium in the absence or presence of Ang II or PMA or in 25 mM glucose medium in the absence or presence of losartan, PD 123319, perindopril, captopril or GF 109203X. They were then harvested and assayed for phosphorylated p44/42 MAPK and total p44/42 MAPK with the PhosphoPlus p44/42 MAPK antibody kit. The ratio of relative densities of phosphorylated p44/42 MAPK to total p44/42 MAPK in cells incubated in 5 mM glucose DMEM was considered as 100% (control). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$ ; NS, not significant).

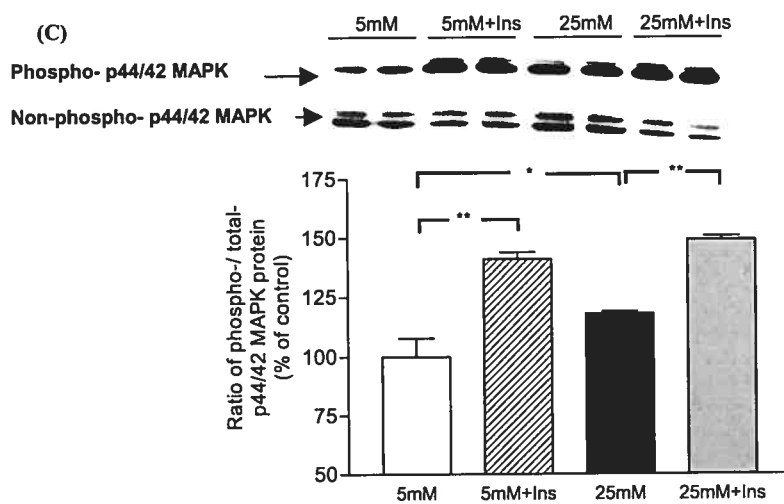
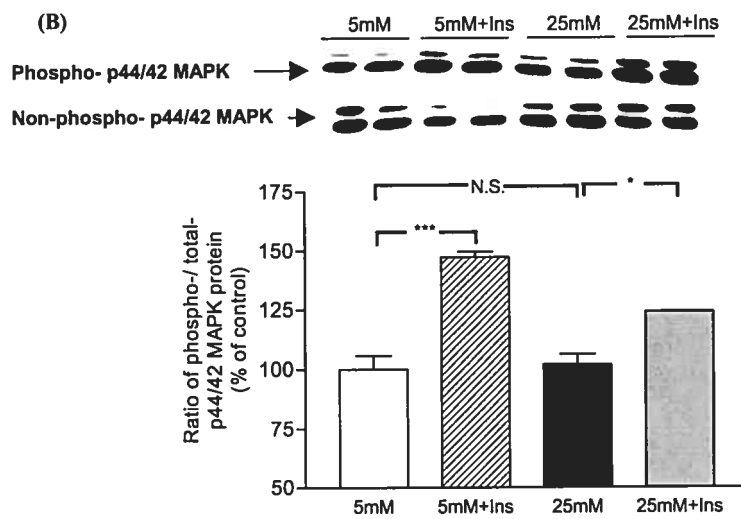
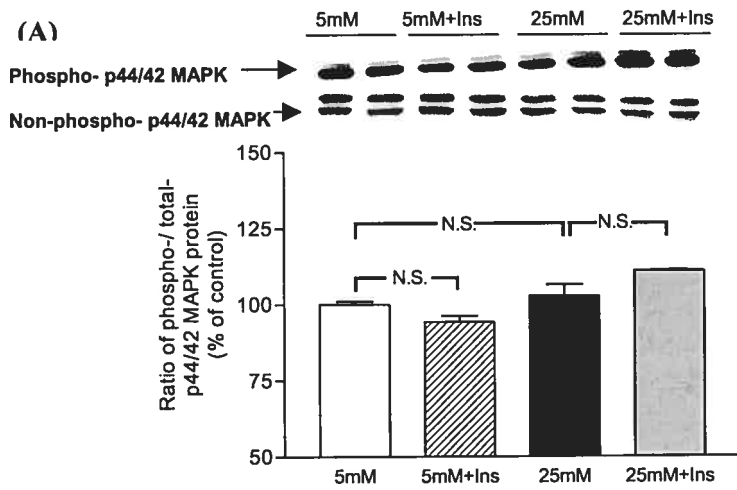


Figure 4.6: Effect of losartan and PD 123319 on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose medium. After 2 weeks of incubation in 25 mM glucose (A) or 25 mM glucose plus losartan ( $10^{-6}$  M) (B) or PD 123319 ( $10^{-6}$  M) (C), the cells were synchronized for 24 hours in serum-free medium. Then, they were incubated in 5 mM or 25 mM glucose medium in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M) for 10 minutes, harvested and assayed for phosphorylated p44/42 MAPK and total p44/42 MAPK with the PhosphoPlus p44/42 MAPK antibody kit. The ratio of relative densities of phosphorylated p44/42 MAPK to total p44/42 MAPK in cells incubated in 5 mM glucose DMEM was considered as 100% (control). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$ ; NS, not significant).



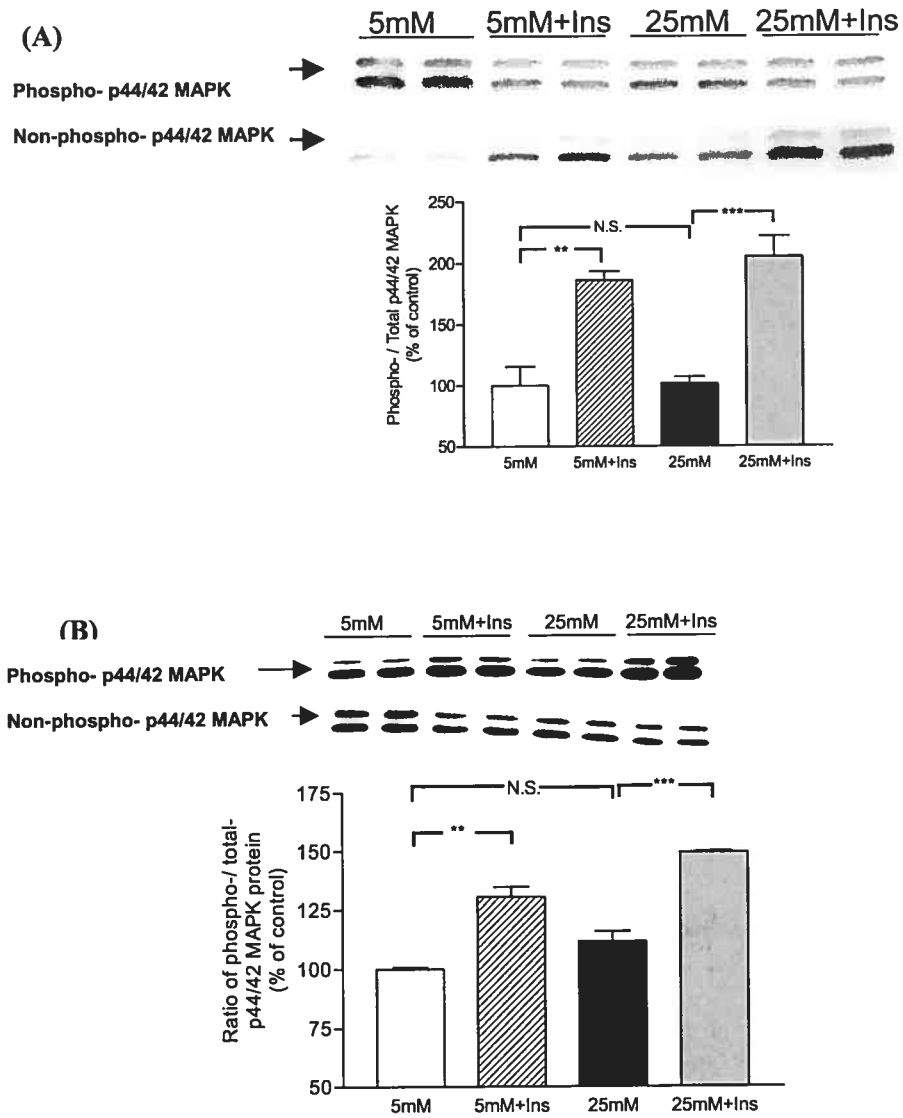


Figure 4.7: Effect of ACE-inhibitors and GF 109203X on p44/42 MAPK phosphorylation in IRPTCs in high glucose medium. After 2 weeks of incubation in 25 mM glucose DMEM plus perindopril ( $10^{-4}$  M) (A), or GF 109203X ( $10^{-7}$  M) (B), the cells were synchronized for 24 hours in serum-free medium. Then, they were incubated in 5 mM or 25 mM glucose medium in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M) for 10 minutes, harvested and assayed for phosphorylated p44/42 MAPK and total p44/42 MAPK with the PhosphoPlus p44/42 MAPK antibody kit. The ratio of relative densities of phosphorylated p44/42 MAPK to total

p44/42 MAPK in cells incubated in 5 mM glucose DMEM was considered as 100% (control). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$ ; NS, not significant).

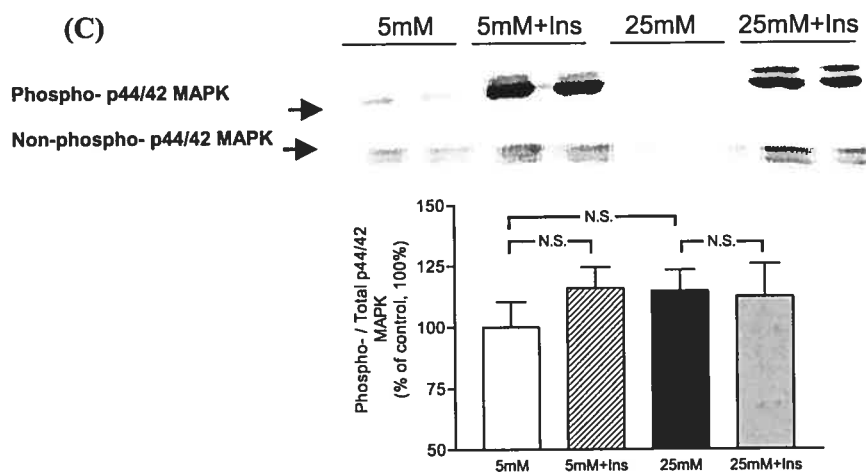
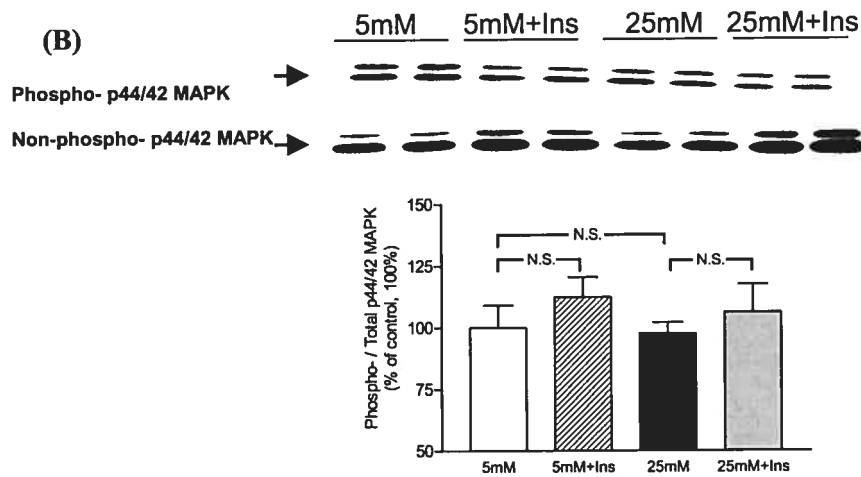
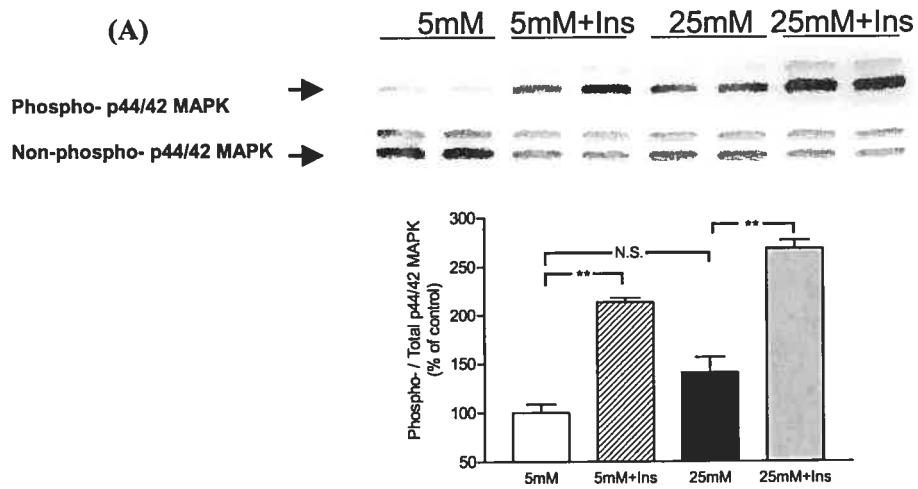


Figure 8: Ang II and PMA induce insulin resistance on p44/42 MAPK activation in IRPTCs. After incubation for 2 weeks in 5 mM glucose medium (A) in the absence or presence of Ang II ( $10^{-7}$  M) (B) or PMA ( $10^{-7}$  M) (C), the cells were synchronized for 24 hours in serum-free medium. Then, they were incubated for 10 minutes in 5 mM or 25 mM glucose medium in the absence or presence of insulin ( $10^{-7}$  M), harvested and assayed for phosphorylated p44/42 MAPK and total p44/42 MAPK with the PhosphoPlus p44/42 MAPK antibody kit. The ratio of relative densities of phosphorylated p44/42 MAPK to total p44/42 MAPK in cells incubated in 5 mM glucose DMEM was considered as 100% (control). Each point represents the mean  $\pm$  SD of 4 independent experiments in duplicate (\* $p \leq 0.05$ ; \*\*\* $p \leq 0.005$ ; NS, not significant).

## 5. METHODES ET RESULTATS SUPPLEMENTAIRES

### *Brève description des méthodes utilisées :*

Pour cette étude, dont le but est d'étudier l'expression des gènes du système rénine-angiotensine dans les tubules proximaux de reins de rats diabétiques, nous avons utilisés quatre différentes souches de rats : Wistar, Sprague-Dawley (SD), rats spontanément hypertendus (SHR) et rats spontanément diabétiques (BioBreeding). Pour chaque souche, trois groupes de rats adultes mâles ont été étudiés : contrôle, diabétique et diabétique avec implant d'insuline. Deux semaines après la détection du diabète, les tubules proximaux du rein étaient isolés afin de déterminer l'expression de l'ensemble des gènes du système rénine-angiotensine.

### Souches de rats utilisées :

**Wistar**, âge : 6 semaines (n= minimum 14/groupes)

**Sprague-Dawley (SD)**, âge : 6 semaines (n= minimum 9/groupes)

**SHR** (rat spontanément hypertendu), âge : 6 semaines (n= minimum 8/groupes), d'origine Wistar.

**BBdp** (Biobreeding), âge : 60-90 jours. La souche BB est considérée comme un bon modèle du diabète juvénile spontané chez l'homme. (n= minimum 9/groupes), d'origine Wistar.

Induction du diabète : Après 24 h de jeûne, 75mg/kg de streptozotocine (STZ) a été injectés chez les rats Wistar, SD et SHR (75mg/kg dissous dans un tampon sodium citrate pH4.0). Une injection tampon sodium citrate, pH4.0, a été effectuée chez les animaux du groupe contrôle.

Utilisation d'implants d'insuline : 48h après l'établissement du diabète, un implant d'insuline est inséré sous la peau en position dorsale.

Contrôle de la glycémie : Tous les deux jours, d'une part pour contrôler l'efficacité de l'injection de STZ et déterminer l'établissement du diabète chez les rats BB, d'autre part pour contrôler l'efficacité de l'implant d'insuline.

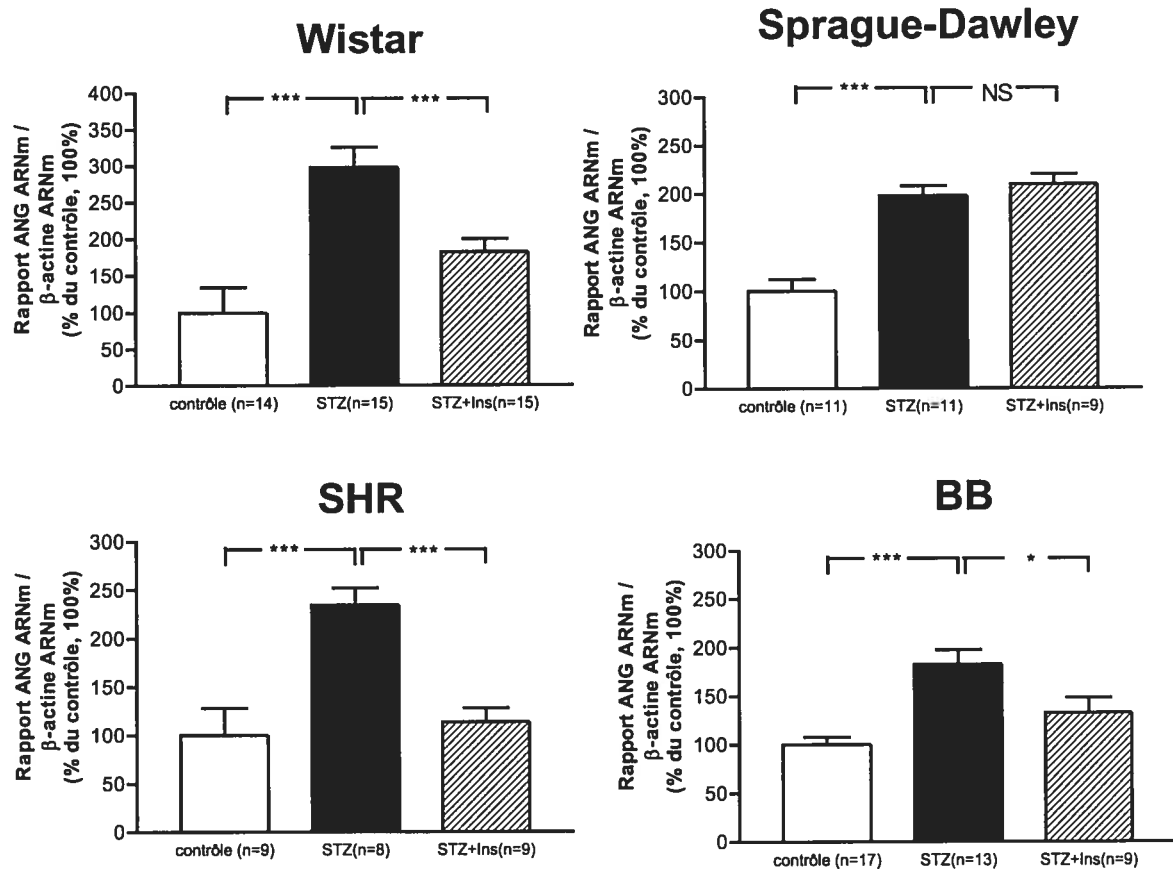
Isolement des tubules proximaux : 2 semaines après l'établissement ou l'induction par STZ du diabète, les animaux ont été sacrifiés et les tubules proximaux isolés. Le cortex rénal a

été séparé de la medulla et coupé en petit morceaux. Ces fragments ont été digérés pendant 1h sous agitation à 37°C dans un milieu DMEM : HAM F-12 contenant de la collagénase (1mg/ml). Après la digestion, le mélange était filtré et lavé dans le milieu DMEM : HAM F-12. Le mélange était ensuite récupéré et ajouté au milieu Percoll tel que décrit précédemment<sup>202</sup>, et centrifugé à 15000RPM pendant 30 min. à 4°C sans frein. Trois bandes peuvent être observées après centrifugation : une bande supérieure contenant tubule distal, une bande moyenne glomérulaire, et une bande inférieure de tubule proximal. La bande inférieure était isolée et lavée.

Expression des gènes du SRA: L'expression des gènes Angiotensinogène, Rénine, ECA, ECA2, AT1a, AT1b et AT2 était déterminée par RT-PCR.

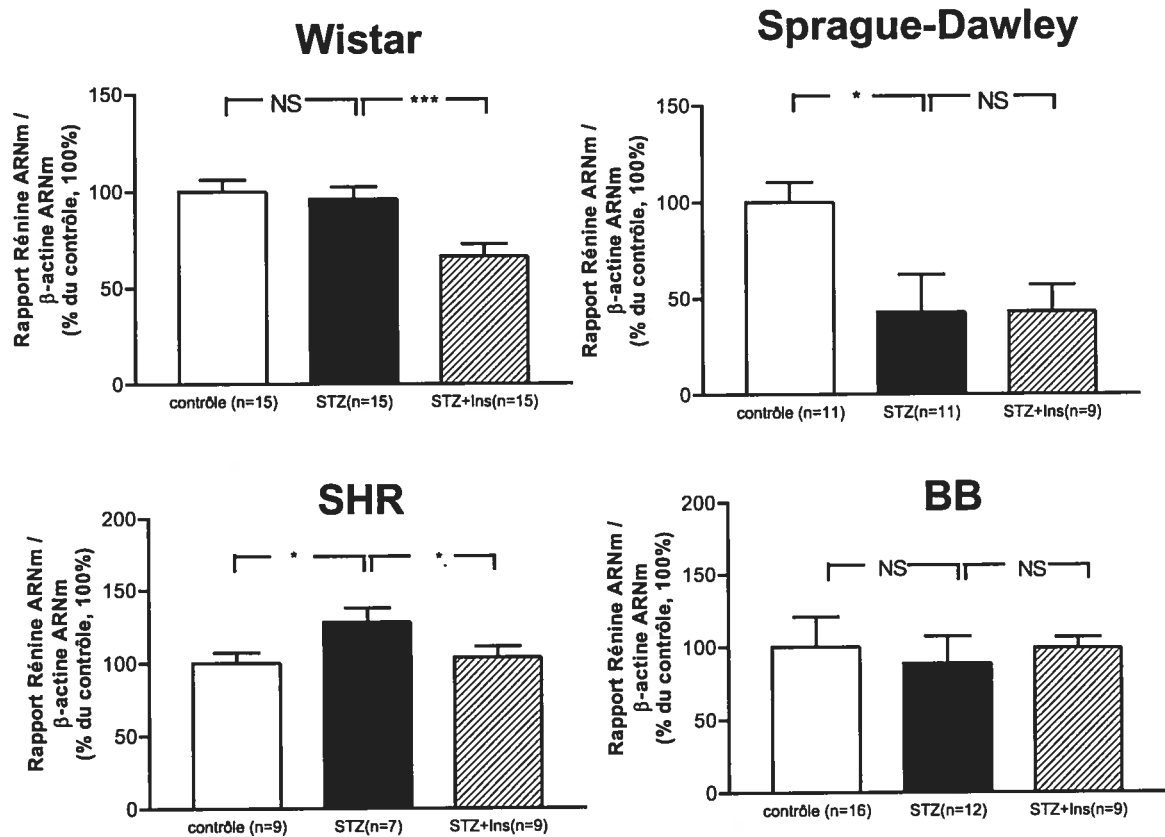
Sondes	Amorces sens	Contrôle interne	Amorces anti-sens	Accession GenBank
Angiotensinogène	676 CCTCGCTCTCTGGACTTATC <sup>965</sup>	775 GAGGGGGTCAAGCAGGGACAGCACC <sup>788</sup>	882 CAGACACTGAGGTGCTGTG <sup>901</sup>	U00090
rénine	1039 CTGCCACCTTGTGTGTGAG <sup>1052</sup>	1136 TCCAGGGCTTGCATGATCA <sup>1116</sup>	1286 CCAGTATGCACAGGTATCG <sup>1277</sup>	J02941
ECA	571 CTTCTCACGAAACTATGCC <sup>590</sup>	612 GGTGGCATGATGCTGTG <sup>620</sup>	769 AGATGCTCCAAACTCTCTC <sup>750</sup>	U03734
ECA2	308 ACAACACCAACATTACGGA <sup>385</sup>	520 CAGCAGAGCGGGCTTCAGCGCTG <sup>543</sup>	777 CAGGACCACATACTCTTC <sup>750</sup>	XM228924
AT1a	1380 GCACACTGGCATGTAATGC <sup>1390</sup>	1548 GATGATGGCTAGCCAAAAGGAAGATC <sup>1583</sup>	1794 GTTGAACAGAACAAAGTGACC <sup>1746</sup>	MB6912
AT1b	1873 GCCTGCAAGTGAAGTGATTT <sup>1882</sup>	1694 CTGACAGCAGAAGCCAGAGGACCA <sup>1717</sup>	1875 TTAACAGTGGCTTTGCTCC <sup>1857</sup>	S69961
AT2	238 TGAGTCCGCAITTAACCTGC <sup>254</sup>	403 ATCTGGCTGTGGCTGACTTACTCC <sup>426</sup>	771 ACCACTGAGCATATTTCTCAGG <sup>750</sup>	U01908
β-Actine	155 ATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGC <sup>176</sup>	9 TCCTGTGGCATCCATGAAACTACATTC <sup>35</sup>	139 AGCATTTCGGGTGCACCATGGAGGG <sup>115</sup>	V01217

Table 5.1: Oligonucléotides

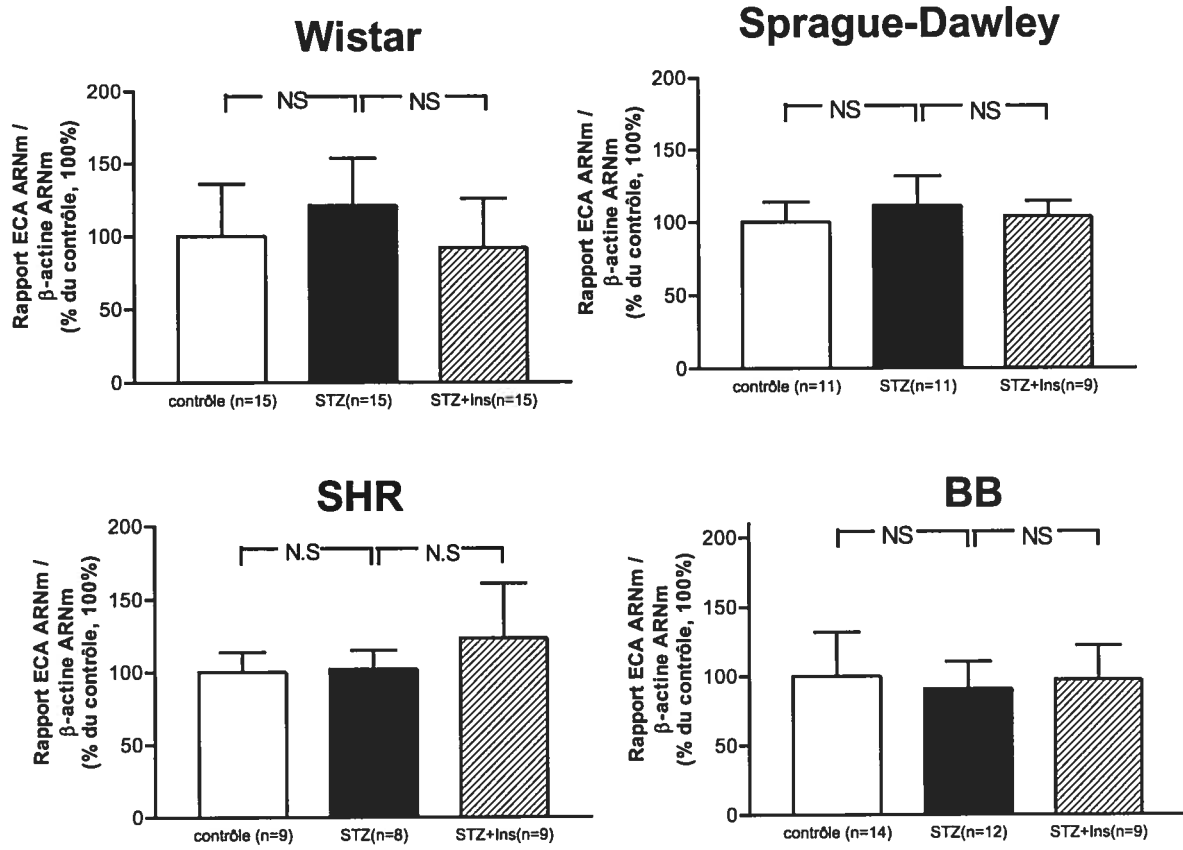
Résultats :

**Figure 5.1:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ANG dans les CTPR de rats Wistar(A), SD(B), SHR(C) et BB(D). Les CTPR sont isolées et analysées pour l'expression de l'ARNm de l'ANG et de  $\beta$ -actine par RT-PCR. La densité d'ANG est normalisée avec le contrôle  $\beta$ -actine. Les niveaux de l'ARNm de l'ANG dans les CTPR de rats contrôles sont considérés comme contrôle (100%). n représente le nombre d'animaux contenu dans le groupe considéré (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  et \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., non significatif).

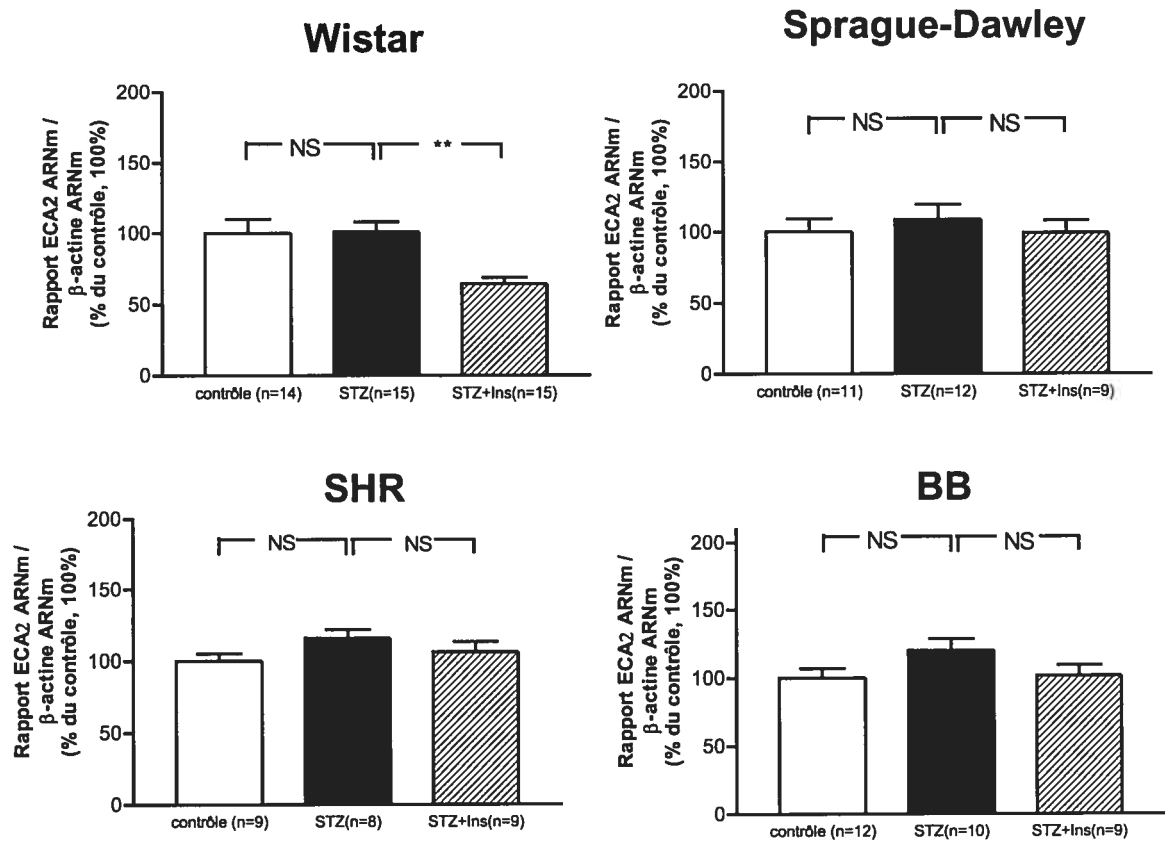




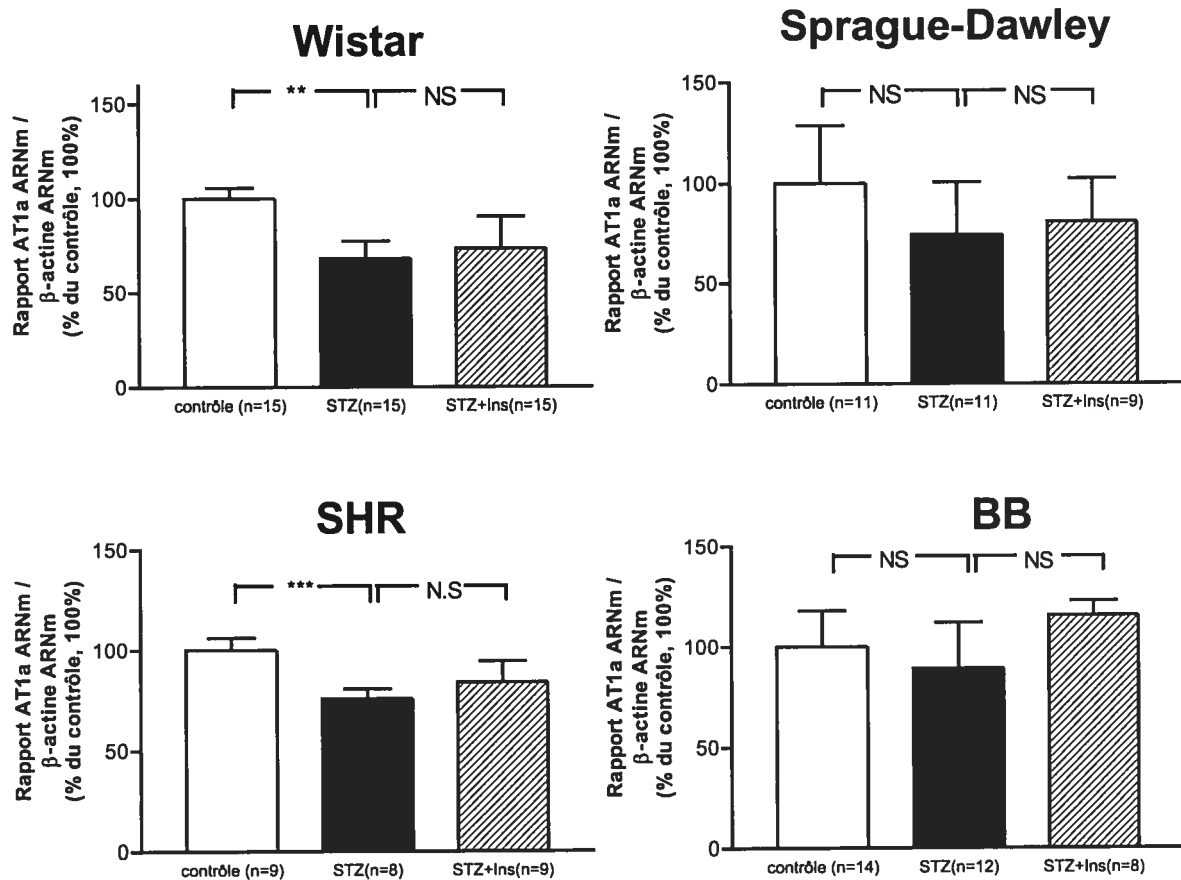
**Figure 5.2:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène rénine dans les CTPR de rats Wistar(A), SD(B), SHR(C) et BB(D). Les CTPR sont isolées et analysées pour l'expression de l'ARNm de rénine et de  $\beta$ -actine par RT-PCR. La densité de rénine est normalisée avec le contrôle  $\beta$ -actine. Les niveaux de l'ARNm de rénine dans les CTPR de rats contrôles sont considérés comme contrôle (100%). n représente le nombre d'animaux contenu dans le groupe considéré (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  et \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., non significatif).



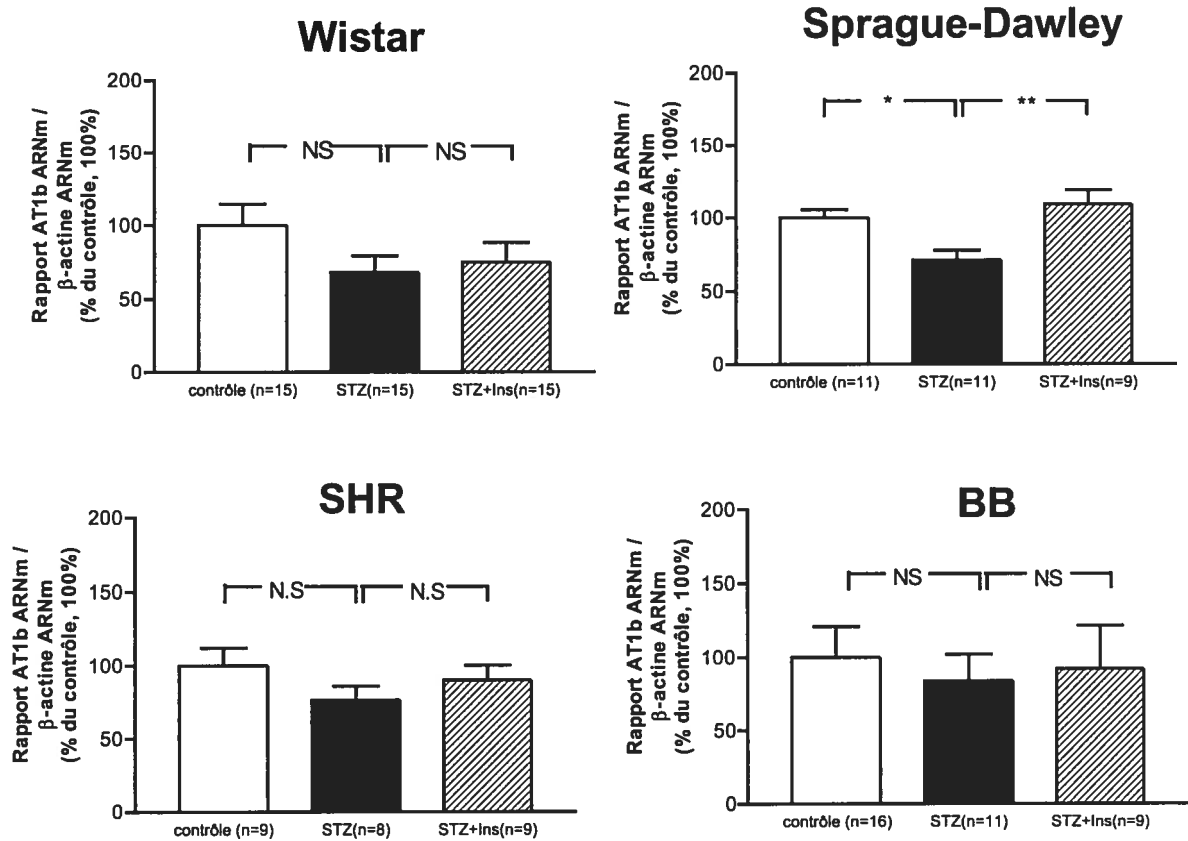
**Figure 5.3:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ECA dans les CTPR de rats Wistar(A), SD(B), SHR(C) et BB(D). Les CTPR sont isolées et analysées pour l'expression de l'ARNm de rénine et de  $\beta$ -actine par RT-PCR. La densité de ECA est normalisée avec le contrôle  $\beta$ -actine. Les niveaux de l'ARNm de ECA dans les CTPR de rats contrôles sont considérés comme contrôle (100%). n représente le nombre d'animaux contenu dans le groupe considéré (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  et \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., non significatif).



**Figure 5.4:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ECA2 dans les CTPR de rats Wistar(A), SD(B), SHR(C) et BB(D). Les CTPR sont isolées et analysées pour l'expression de l'ARNm de rénine et de  $\beta$ -actine par RT-PCR. La densité de ECA2 est normalisée avec le contrôle  $\beta$ -actine. Les niveaux de l'ARNm de ECA2 dans les CTPR de rats contrôles sont considérés comme contrôle (100%). n représente le nombre d'animaux contenu dans le groupe considéré (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  et \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., non significatif).



**Figure 5.5:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT1a dans les CTPR de rats Wistar(A), SD(B), SHR(C) et BB(D). Les CTPR sont isolées et analysées pour l'expression de l'ARNm de rénine et de  $\beta$ -actine par RT-PCR. La densité de AT1a est normalisée avec le contrôle  $\beta$ -actine. Les niveaux de l'ARNm de AT1a dans les CTPR de rats contrôles sont considérés comme contrôle (100%). n représente le nombre d'animaux contenu dans le groupe considéré (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  et \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., non significatif).



**Figure 5.6:** Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT1b dans les CTPR de rats Wistar(A), SD(B), SHR(C) et BB(D). Les CTPR sont isolées et analysées pour l'expression de l'ARNm de rénine et de  $\beta$ -actine par RT-PCR. La densité de AT1b est normalisée avec le contrôle  $\beta$ -actine. Les niveaux de l'ARNm de AT1b dans les CTPR de rats contrôles sont considérés comme contrôle (100%). n représente le nombre d'animaux contenu dans le groupe considéré (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$  et \*\*\* $p \leq 0.005$ ; N.S., non significatif).

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ANG dans les CTPR de rats*

La Fig. 5.1 montre que l'hyperglycémie liée au diabète augmente l'ARNm du gène ANG dans les différentes souches de rats étudiées. Le niveau d'expression est au moins deux fois plus élevé chez les animaux diabétiques comparativement aux animaux contrôles. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats. L'implant d'insuline empêche l'effet stimulateur de l'hyperglycémie sur le niveau de l'ARNm de l'ANG dans les souches Wistar, SHR et BB. A l'opposé, l'insuline ne prévient pas l'augmentation du niveau de l'ARNm de l'ANG chez les rats SD.

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène rénine dans les CTPR de rats*

La Fig. 5.2 montre que l'hyperglycémie liée au diabète n'a pas d'effet sur la concentration d'ARNm du gène rénine chez les rats Wistar, mais que la présence d'insuline est suivie par une diminution d'expression de ce gène. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats. Chez les rats SHR, le niveau d'expression de rénine est plus élevé chez les animaux diabétiques par rapport aux animaux contrôles, et l'insuline empêche l'effet stimulateur de l'hyperglycémie sur le niveau de l'ARNm de rénine. Chez les rats SD, l'hyperglycémie liée au diabète empêche l'expression de l'ARNm de rénine, et l'insuline ne peut restorer l'expression de rénine. L'hyperglycémie et l'insuline ne semblent pas avoir d'effets sur l'expression de l'ARNm de rénine chez les rats BB.

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ECA dans les CTPR de rats*

La Fig. 5.3 montre que l'hyperglycémie et l'insuline ne semblent pas avoir d'effets sur l'expression de l'ARNm de ECA dans les différentes souches de rats étudiées. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats.

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène ECA2 dans les CTPR de rats*

La Fig. 5.4 montre que l'hyperglycémie et l'insuline ne semble pas avoir d'effets sur l'expression de l'ARNm de ECA2 dans les souches de rats SD, SHR et BB. Cependant l'insuline diminue l'expression de l'ARNm de ECA2 dans souche Wistar. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats.

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT1a dans les CTPR de rats*

La Fig. 5.5 montre que l'hyperglycémie et l'insuline ne semblent pas avoir d'effets sur l'expression de l'ARNm du récepteur AT1a dans les souches de rats SD et BB. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats. Dans les souches de rats Wistar et SHR, l'hyperglycémie liée au diabète diminue l'ARNm du récepteur AT1a, et l'insuline ne peut restorer l'expression de ce gène.

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT1b dans les CTPR de rats*

La Fig. 5.6 montre que l'hyperglycémie et l'insuline ne semble pas avoir d'effets sur l'expression de l'ARNm du récepteur AT1b dans les souches de rats Wistar, SHR et BB. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats. Chez les animaux SD, l'hyperglycémie liée au diabète diminue l'expression de l'ARNm du récepteur AT1b, et l'insuline semble restorer l'expression de l'ARNm du récepteur AT1b.

*Effet de l'hyperglycémie et de l'insuline sur l'expression basale de l'ARNm du gène AT2 dans les CTPR de rats.*

Dans les quatre souches de rats étudiées, aucune expression du gène du récepteur AT2 n'a été détectée. Le gène cloné dans le plasmide pCDNA 3.1 a pourtant été détecté par RT-PCR

avec nos amorces. La glycémie chez les rats diabétiques et les diabétiques recevant un implant est comparable entre les différentes souches de rats.



## 6. DISCUSSION

### 6.1. Rôle de la voie des hexosamines sur l'expression du gène ANG dans un milieu riche en glucose.

L'effet de l'hyperglycémie sur l'expression du gène de l'angiotensinogène serait en partie lié à l'activation de la voie des hexosamines, dont la stimulation semble dépendante de la PKC et de la voie de la MAPK p38 *in vitro* dans les CITPR. En effet, la glucosamine semble activer directement le SRA intrarénal, en stimulant l'expression de l'ARNm des gènes de l'ANG et de la rénine. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs de GFAT bloque l'effet stimulateur du milieu riche en glucose sur l'expression de l'ARNm du gène de l'ANG. L'utilisation d'inhibiteurs de PKC et MAPK p38 empêche l'effet de la glucosamine sur l'expression de l'ARNm du gène de l'ANG et sur l'hypertrophie cellulaire. La glucosamine stimule la phosphorylation de la MAPK p38, du facteur ATF-2 et de la protéine liant l'élément de réponse à l'AMPc, CREB. Suite à cette stimulation, l'utilisation d'inhibiteur de la MAPK p38 empêche non seulement la phosphorylation de cette dernière, mais également la phosphorylation d'ATF-2, et l'inhibition de PKC empêche la phosphorylation de CREB. L'hyperglycémie pourrait alors induire la phosphorylation de CREB via la voie de la PKC, CREB pourrait alors former un homodimère ou un hétérodimère avec ATF-2 pouvant lier l'élément de réponse à l'AMPc situé en région 5' du gène ANG.

### 6.2. Rôle du SRA intrarénal dans l'induction de la résistance à l'insuline sur l'inhibition du gène ANG dans les CITPR.

La PKC semble avoir une position importante dans l'induction de la résistance à l'insuline suite à l'hyperglycémie et à l'activation du SRA. Dans les CITPR mises en culture en présence d'activateur de PKC, l'expression du gène ANG ne semble plus répondre ni à l'hyperglycémie ni à l'insuline. L'exposition prolongée de ces cellules à un milieu riche en glucose, ou à un activateur de PKC semble déréguler l'activité de la PKC et son expression protéique<sup>203</sup>. Le glucose ne pourrait plus stimuler l'expression de l'ARNm de l'ANG dans ces cellules car, comme démontré dans une précédente étude<sup>204</sup>, l'effet stimulateur du PMA sur la sécrétion de l'ANG est aboli après 24 h de pré-incubation des CITPR dans un milieu contenant du PMA comparé aux cellules cultivées sans pré-incubation avec PMA. L'insuline ne semble plus avoir d'influence sur l'expression du gène ANG dans les cellules cultivées en

milieu riche en glucose, ou en présence d'activateur de PKC, car l'activation des isoformes de PKC perturbe la voie de signalisation de l'insuline en augmentant la phosphorylation d'IRS-1/2 sur des résidus sérines comme démontré dans de précédentes études. L'activation de ces isoformes de PKC pourrait être un régulateur négatif important sur la fonction du récepteur à l'insuline.

De plus, l'inhibition de la PKC restaure l'action de l'insuline sur l'expression du gène ANG dans les CITPR en milieu riche en glucose, et restaure également l'effet de l'insuline sur la phosphorylation des MAPK p44/42, ce que l'insuline ne pouvait faire après culture des cellules dans un milieu riche en glucose.

L'hyperglycémie et l'activation du SRA intrarénal jouent un rôle important dans l'induction de la résistance à l'insuline sur l'expression du gène ANG dans les CITPR suite à la perturbation de la voie de signalisation de l'insuline sur la phosphorylation des MAPK p44/42. L'incubation de CITPR dans un milieu riche en glucose augmente l'expression basale de l'ARNm de l'ANG, par rapport à des CITPR incubées dans un milieu normal. Au contraire, l'incubation avec des antagonistes des récepteurs AT1 et AT2 et des inhibiteurs de l'ECA dans un milieu riche en glucose abolit l'effet stimulateur du glucose sur l'expression basale de l'ARNm de l'ANG. L'exposition prolongée des CITPR à un milieu riche en glucose provoque une résistance à l'insuline, empêchant l'action de celle-ci sur l'expression de l'ARNm de l'ANG, et l'incubation avec des antagonistes des récepteurs AT1 et AT2, et des inhibiteurs de l'ECA restaure l'effet stimulant du glucose et l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'expression de l'ARNm de l'ANG. Ces résultats confirment l'idée que l'activation du SRA intrarénal joue un rôle important dans l'induction de la résistance à l'insuline sur l'expression du gène ANG. L'insuline est capable de stimuler la phosphorylation des MAPK p44/42 lorsque les CITPR sont incubées dans un milieu normal. L'insuline ne peut stimuler la phosphorylation des MAPK p44/42 dans les cellules incubées dans un milieu riche en glucose, mais l'incubation avec des antagonistes des récepteurs AT1 et AT2, et des inhibiteurs de l'ECA restaure l'effet de l'insuline sur la phosphorylation des MAPK p44/42.

L'exposition prolongée des CITPR au glucose, à l'Ang II, ou au PMA dans un milieu normal induit la résistance à l'insuline sur l'expression de l'ANG. La voie de signalisation des MAPK p44/42 est altérée dans les cellules exposées au glucose, tout comme celles incubées avec de l'Ang II ou un activateur de PKC (PMA). L'effet du glucose est inversé par l'utilisation des bloqueurs du SRA. L'activation du SRA local intrarénal peut alors contribuer au phénomène de la résistance à l'insuline dans le développement du diabète dans les CITPR. L'utilisation des bloqueurs du SRA afin d'empêcher l'expression intrarénale de l'ANG et

ainsi la formation de l'Ang II, pourrait prévenir le développement de la résistance à l'insuline dans le diabète. Et la restauration de la sensibilité à l'insuline sur l'activation des MAPK p44/42 est certainement une étape importante pour améliorer les traitements du diabète.

### 6.3 L'expression des gènes du système rénine angiotensine (SRA) dans les tubules proximaux du rein de rats diabétiques (type 1) et de rats spontanément hypertendus (SHR).

Les résultats présentés dans ce mémoire sont les premiers à faire état de la régulation d'expression de l'ensemble des gènes du SRA intrarénal dans les tubules proximaux de rats diabétiques de différentes souches (Wistar, SD, SHR et BB) en utilisant la même technique d'étude. Dans cette étude, nous avons observé une augmentation de l'expression du gène de l'angiotensinogène chez les rats diabétiques. L'utilisation d'implants d'insuline et la normalisation de la glycémie permet de restaurer l'expression du gène angiotensinogène chez les rats Wistar, SHR et BB, mais l'insuline semble inefficace et n'empêche pas l'augmentation d'expression du gène ANG chez les rats Sprague-Dawley. Cette souche semble développer une résistance à l'insuline sur l'expression du gène de l'ANG suite au diabète et à l'hyperglycémie. Cette observation confirme les résultats de notre laboratoire. D'autres groupes ont cependant présenté des résultats contradictoires. En 1992, Correa-Rotter et al.<sup>205</sup> ont remarqué une diminution d'ARNm d'angiotensinogène dans le rein du groupe de rats diabétiques (4 semaines de diabète), alors que le groupe d'Everett<sup>206</sup> n'a pas observé de changement d'expression de ce gène dans les tubules proximaux de rats BB. Kalinyak<sup>207</sup> en 1993 n'a pas observé de différence d'expression de l'ANG dans le rein de rats SD (2 semaines de diabète), et en 2000, Zimpelmann n'a pas relevé de changement d'expression de l'ARNm d'ANG dans les tubules proximaux de rats SD.

L'expression de l'ARNm du gène rénine ne semble pas varier suite au diabète chez les rats BB, et chez les Wistar où l'insuline semble diminuer l'expression de ce gène. Chez les rats SHR, l'expression de l'ARNm de la rénine est augmentée chez les animaux diabétiques, et l'implant d'insuline peut normaliser cette expression. Nakatani a démontré en 2003 qu'un traitement néphrotoxique provoque une augmentation du niveau d'ARNm de rénine dans le cortex rénal de rats SHR<sup>208</sup>. Et, il est connu que l'hypertension est suivie par une augmentation d'expression du gène rénine<sup>209</sup>. Un résultat notable est la diminution d'expression d'ARNm du gène rénine chez les rats SD diabétiques et diabétiques avec implant d'insuline. Il semble se développer une résistance à l'insuline sur l'expression du

gène rénine suite au diabète et à l'hyperglycémie chez les rats SD. Le groupe de Burns <sup>210</sup> a montré des résultats contradictoires et une augmentation d'ARNm de rénine dans les tubules proximaux de rats SD diabétiques, suivi d'un retour au niveau des animaux contrôles suite au traitement par l'insuline.

Dans les différents groupes d'animaux de notre étude, l'ARNm de l'ECA ne paraît pas régulé par l'hyperglycémie ou lors de l'utilisation d'insuline. L'équipe de Yoshikawa <sup>211</sup> et Tikellis <sup>212</sup> ont remarqué une diminution d'expression rénale de l'ARNm de l'ECA, ainsi qu'une diminution au niveau protéique dans le tubule proximal.

Un résultat intéressant est d'avoir déterminer la présence d'ARNm du gène ECA 2 dans le tubule proximal de toutes les souches de rats étudiées. Nos résultats démontrent que l'insuline diminue cette expression chez les rats Wistar. La présence de cette expression dans le rein est encore controversée malgré les résultats de Tikellis en 2003 <sup>212</sup> qui ont montré une diminution de cette expression.

L'expression de l'ARNm du gène du récepteur AT1a n'est pas changée chez les rats SD et BB, mais est diminuée chez les rats Wistar et SHR, et l'implant d'insuline ne normalise pas l'expression du gène. Une diminution non significative de l'expression d'ARNm du gène AT1b a été détectée chez les rats Wistar, SHR et BB. Cette diminution était cependant significative chez les rats SD, où l'insuline permet un retour d'expression au niveau contrôle. En 2001, Wehbi <sup>213</sup> a montré que l'expression de l'ARNm d'AT1a et AT1b ne varie pas avec le diabète chez les rats SD. Dans des cellules vasculaires de muscle lisse, Sodhi a démontré qu'un milieu riche en glucose provoque une diminution d'expression de l'ARNm du récepteur AT1, suggérant un mécanisme empêchant l'angiotensine II d'induire la prolifération de ces cellules <sup>214</sup>. Et l'équipe de Bonnet a démontré une diminution d'expression de l'ARNm des récepteurs AT1 et AT2 dans le rein de rats SHR diabétiques <sup>215</sup>. L'expression de l'ARNm du gène AT2 n'a été détectée dans aucune des souches étudiées. Le gène cloné dans le plasmide pCDNA 3.1 a pourtant été détecté par RT-PCR avec nos amorces, et l'expression de l'ARNm du gène AT2 est détectée dans les CITPR. Il est reconnu que le rôle du récepteur AT2 est important dans le développement du rein, la différenciation cellulaire, l'apoptose et la réparation tissulaire <sup>216</sup>. Norwood <sup>217</sup> en 1997 n'a plus détecté l'expression du récepteur AT2 dans des reins de rats 28 jours après leur naissance.

Les trois souches d'animaux (Wistar, SHR, BB) ayant une origine ancestrale commune semble réagir de façon similaire, notamment sur l'expression de l'ARNm de l'ANG qui est augmentée dans toutes les souches de rats lors du diabète, et les implants d'insuline normalisent cette expression chez les rats diabétiques Wistar, BB et SHR, mais pas chez les SD.

Il n'y a pas d'explications claires pour analyser ces résultats conflictuels sur l'expression rénale de l'ARNm des gènes du SRA, mais les différences peuvent être attribuées à la durée du diabète et aux différentes souches de rats utilisées par différents utilisateurs. De plus, les différences dans les conditions d'isolement des tubules proximaux peuvent avoir des conséquences sur l'expression de l'ARNm des gènes du SRA.

L'ensemble des études *in vitro* et *in vivo* indique que dans le diabète, la suppression du SRA systémique a déjà été prouvée et que le système rénine angiotensine local intrarénal des tubules proximaux peut être activé dans la néphropathie diabétique par l'hyperglycémie, dirigeant la stimulation de la production d'angiotensine II au niveau local, pouvant exercer une inhibition par rétroaction sur la relâche de la rénine.

Lorsqu'apparaît une résistance à l'insuline provoquée par le diabète et l'hyperglycémie, l'expression du gène ANG est fortement mise à contribution, et va pouvoir favoriser les effets de l'angiotensine II. L'insuline ne pouvant jouer son rôle compensatoire, le système pourrait alors réguler les effets de l'angiotensine II, en régulant tout d'abord sa formation, c'est-à-dire en diminuant l'expression de la première enzyme nécessaire à la formation d'angiotensine II : la rénine.

Dans le cas où l'insuline semble pouvoir compenser l'effet stimulateur de l'hyperglycémie sur l'expression de l'ARNm du gène ANG, l'expression du gène de rénine ne serait pas régulée. L'hyperglycémie et le diabète semblent provoquer une diminution d'expression des gènes du récepteur AT1, permettant probablement de réduire les effets de l'angiotensine II.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

1. Spinas GA, Lehmann R. Diabète sucré : Diagnostic, classification et pathogénèse. *Forum Med Suisse*. 2001 Mai; N°20.
2. Nepon GT. A unified hypothesis for the complex genetics of HLA associations with IDDM. *Diabetes*. 1990; 354:617-21.
3. Spinas GA. Pathogenese des Typ 1. *Diabetes*. In: Böhm BO, Palitzsch K-D, Rosak C, Spinas GA, Hrsg-Klinische. 2000; S.13-24.
4. Virtanen SM, Saukonen T, Savilathi E, Ylonen K, Rasanen L, Aro A. Diet, cow's milk protein antibodies and the risk of IDDM in Finnish children. Childhood Diabetes in Finland Study Group. *Diabetologia*. 1994; 37:38-7.
5. Dahlquist G. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl*. 1998 Oct; 425:5-10.
6. Knip M, Akerblom HK. Environmental factors in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1999; 107 Suppl 3:S93-100.
7. Viskari HR, Koskela P, Lonrot M, Luonuansuu S, Reunanen A, Baer M, Hyoty H. Can enterovirus infections explain the increasing incidence of type 1 diabetes? *Diabetes Care*. 2000 Mar; 23(3):414-6.
8. American Diabetes Association. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2001; 24 (Suppl. 1), S5-S20.
9. Palitzsch K-D, Bollheimer C. Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2. In: Böhm BO, Palitzsch K-D, Rosak C, Spinas GA, Hrsg. *Klinische Diabetologie*. Berlin: Springer. 2000, S.31-48.
10. De Fronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev*. 1997; 5:877-94.
11. Kahn BB. Type 2 diabetes: when insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell*. 1998; 92:593-6.
12. Kaneto H, Fujii J, Myint T, Miyazawa N, Islam KN, Kawasaki Y, Suzuki K, Nakamura M, Tatsumi H, Yamasaki Y, Taniguchi N. Reducing sugars trigger

- oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J.* 1996 Dec 15; 320 ( Pt 3):855-63.
13. Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, Unger RH. Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; Mar 3; 95(5):2498-502.
  14. Randle PJ. Regulatory interactions between the lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes Metab Rev.* 1998; 14:263-83.
  15. Fajan SS. Scope and heterogeneous nature of MODY. *Diabetes Care.* 1990; 13 : 49-64.
  16. Froguel P. Nuclear factors in type 2 diabetes. *Schweiz Med Wochenschr.* 1998; 128: 1936-1939.
  17. Malecki MT, Jhala US, Antonellis A. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. *Nature Genet.* 1999 ; 23: 323-328.
  18. Perlemuter L, Collin de l'Hortet G, Sélam J.L : *Diabète et maladies métaboliques.* 2000, 3ème édition. Edition Masson.
  19. Rasch R, Dorup J. *Diabetologia.* 1997 ; 40 : 802-809.
  20. Thomsen K, Christansen T, Flyvbjerg A. *J Am Ass. Nephrol.* 2000 11: 1287-1293.
  21. Mogensen CE in : Altamirano JJ, « Histoire naturelle et épidémiologie de la néphropathie diabétique », in : *Traité de diabétologie* de G.Tchobroudsky, R.Assan, P.Freychet. Pradel 1990 : 508-510.)
  22. Adler AI, Stevens RJ, Manley SE et al : Development and progression of nephropathy in type 2 diabetes : the United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS 64). *Kidney Int.* 2003; 63 : 225.
  23. Kador PF, Akagi Y, Terubayashi H, Wyman M, Kinoshita JH. Prevention of pericyte ghost formation in retinal capillaries of galactose-fed dogs by aldose-reductase inhibitors. *Arch Ophthalmol.* 1988; 106 : 1099-1102.
  24. Engerman RL. Pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 1989; 38 : 1203-1206.

25. Xia, P., Kramer, R. M. & King, G. L. Identification of the mechanism for the inhibition of Na,K-adenosine triphosphatase by hyperglycemia involving activation of protein kinase C and cytosolic phospholipase A2. *J. Clin. Invest.* 1995; 96, 733-740.
26. Williamson, J. R. *et al.* Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes.* 1993; 42, 801-813.
27. Garcia Soriano, F. *et al.* Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.* 2001; 7, 108-113.
28. Lee, A. Y. & Chung, S. S. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* 1999; 13, 23-30.
29. Xia, P. *et al.* Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes.* 1994; 43, 1122-1129.
30. Koya, D. *et al.* Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J. Clin. Invest.* 1997; 100, 115-126.
31. Portilla, D. *et al.* Etomoxir -induced PPARalpha-modulated enzymes protect during acute renal failure. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000; 278, F667-F675.
32. Keogh, R. J., Dunlop, M. E. & Larkins R. G.. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism.* 1997; 46, 41-47.
33. Craven, P. A., Studer, R. K. & DeRubertis, F. R. Impaired nitric oxide-dependent cyclic guanosine monophosphate generation in glomeruli from diabetic rats. Evidence for protein kinase C-mediated suppression of the cholinergic response. *J. Clin. Invest.* 1994; 93, 311-320.
34. Glogowski, E. A., Tsiani, E., Zhou, X., Fantus, I. G. & Whiteside, C. High glucose alters the response of mesangial cell protein kinase C isoforms to endothelin-1. *Kidney Int.* 1999; 55, 486-499.



35. Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 2000 Sep; 77:S13-8.
36. Kolm-Litty, V., Sauer,U., Nerlich, A., Lehmann,R. Scleicher, ED. High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 160-169.
37. Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J, Brownlee M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Oct 24; 97(22):12222-6.
38. Cooksey RC, Hebert LF Jr, Zhu JH, Wofford P, Garvey WT, McClain DA. Mechanism of hexosamine-induced insulin resistance in transgenic mice overexpressing glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase: decreased glucose transporter GLUT4 translocation and reversal by treatment with thiazolidinedione. *Endocrinology.* 1999 Mar; 140(3):1151-7.
39. Guoli Chen, Ping Liu, Debbie C. Thurmond and Jeffrey S. Elmendorf. Glucosamine-induced insulin resistance is coupled to O-linked glycosylation of Munc18c. *FEBS Letter.* 2003; Volume 534, Issue 1-3, pp. 54-60
40. D'Alessandris C, Andreozzi F, Federici M, Cardellini M, Brunetti A, Ranalli M, Del Guerra S, Lauro D, Del Prato S, Marchetti P, Lauro R, Sesti G. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J.* 2004 Jun; 18(9):959-61. Epub 2004 Apr 01.
41. Baki L, Shioi J, Wen P, Shao Z, Schwarzman A, Gama-Sosa M, Neve R, Robakis NK. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations. *EMBO J.* 2004 Jun 10
42. Degenhardt, T. P., Thorpe, S. R. & Baynes, J. W. Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol. Biol.* 1998; 44, 1139-1145.
43. Soulis-Liparota T., Cooper, M., Papazoglou, D., Clarke, B. & Jerums, G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial

- expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*. 1991; 40, 1328-1334.
44. Nakamura, S. *et al.* Progression of nephropathy in spontaneous diabetic rats is prevented by OPB-9195, a novel inhibitor of advanced glycation. *Diabetes*. 1997; 46, 895-899.
  45. Tanaka, S., Avigad, G., Brodsky, B. & Eikenberry, E. F. Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J. Mol. Biol.* 203, 495-505 (1988). Charonis, A. S. *et al.* 14.Laminin alterations after in vitro nonenzymatic glucosylation. *Diabetes*. 1988; 39, 807-814.
  46. Haitoglou, C. S., Tsilibary, E. C., Brownlee, M. & Charonis, A. S. Altered cellular interactions between endothelial cells and nonenzymatically glucosylated laminin/type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 12404-12407.
  47. Smedsrod, B. *et al.* Advanced glycation end products are eliminated by scavenger-receptor-mediated endocytosis in hepatic sinusoidal kupffer and endothelial cells. *Biochem J.* 1997; 322, 567-573.
  48. Neeper, M. *et al.* Cloning and expression of RAGE: a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J. Biol. Chem.* 1992; 267, 14998-15004.
  49. M. Brownlee: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414, 813 - 820.
  50. Giugliano, D., Ceriello, A. & Paolisso, G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; 19, 257-267.
  51. Nishikawa, T. *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 2000; 404, 787-790.
  52. Ceriello A. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med*. 1997 Aug; 14 Suppl 3:S45-9.
  53. Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Lond)*. 1996; Apr;90(4):255-60.

54. Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N. Increase in the glucosylated form of erythrocyte Cu-Zn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta*. 1987 May 19; 924(2):292-6.
55. Yan H, Harding JJ. Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J*. 1997 Dec; 1;328 ( Pt 2):599-605.
56. Blakytyn R, Harding JJ. Glycation (non-enzymic glycosylation) inactivates glutathione reductase. *Biochem J*. 1992 Nov 15; 288 ( Pt 1):303-7.
57. Rema M, Mohan V, Bhaskar A, Shanmugasundaram KR. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy? *Indian J Ophthalmol*. 1995 Mar; 43(1):17-21.
58. Sechi LA, Ceriello A, Griffin CA, Catena C, Amstad P, Schambelan M, Bartoli E. Renal antioxidant enzyme mRNA levels are increased in rats with experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*. 1997 Jan; 40(1):23-9.
59. Stamler JS et al. Diabetes, other risk factors and 12 year mortality for men screened in the MRFIT trial. *Diabetes Care* 1993; 16: 434.
60. J.R. Sowers; M. Epstein; E.D. Frohlich. Diabetes, Hypertension, and Cardiovascular Disease. An Update. *Hypertension*. 2001; 37:1053.
61. Sowers JR, Epstein M Diabetes mellitus and associated hypertension, vascular disease, and nephropathy: an update. *Hypertension*. 1995; 26(pt 1):869-879.
62. The National High Blood Pressure Education Program Working Group. National high blood pressure education program working group report on hypertension in diabetes. *Hypertension*. 1994; 23:145-158.
63. Reaven GM. Insulin resistance/compensatory hyperinsulinemia, essential hypertension, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2003; 88:2399.
64. UKPDS Group. UK Prospective Diabetes Study 38: tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ*. 1998; 317:703-713

65. UKPDS Group. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. *BMJ*. 1998; 317:713–720.
66. Effects of ramipril on cardiovascular and microvascular outcomes in peoples with diabetes mellitus: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Lancet*. 2000; 355:253–259
67. Luke R. Chronic renal failure-a vasculopathic state. *N. Engl. J. Med.* 1998 ; 339:841-843.
68. Herzog C, Ma J, Collins A. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N. Engl. J. Med.* 1998 ; 339:799-805.
69. Jungers P, Massy A, Nguyen Khoa T, et al. Incidence and risk factors of atherosclerotic cardiovascular accidents in predialysis chronic renal failure patients : a prospective study. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1997 ; 12:2597-2602.
70. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care.* 1993; 16(2): 434-44.
71. Tuomilehto J, Borch-Johnsen K, Molarius A, Forsén T, Rastenyte D, Sarti C, Reunanen A. Incidence of cardiovascular disease in Type 1 (insulin-dependent) diabetic subjects with and without diabetic nephropathy in Finland. *Diabetologia.* 1998; 41:784-790.
72. Mykkanen L, Haffner SM, Kuusisto J, Pyorala K, Laakso M. Microalbuminuria precedes the development of NIDDM. *Diabetes.* 1994; 43 (4): 552-7.
73. MacLeod JM, Lutale J, Marshall SM. Albumin excretion and vascular deaths in NIDDM. *Diabetologia.* 1995; 38(5): 610-6.
74. Turner R, Holman R, Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, Matthews D, Neil A, McElroy H, Kohner E, Fox C, Hadden D, Wright D. Tight blood pressure control and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ*. 1998; 317: 713-720.

75. Hansson L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlöf B, Elmfeldt D, Julius S, Ménard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S for the HOT Study Group. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. *Lancet* 1998; 351 : 1755-1762.
76. Holman R, Turner R, Stratton I, Cull C, Frighi V, Manley S, Matthews D, Neil A, Kohner E, Wright D, Hadden D, Fox C. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. *BMJ* 1998; 317: 703-713.
77. Herings RM, de Boer A, Stricker BH, Leufkens HG, Porsius A. Hypoglycaemia associated with use of inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Lancet*. 1995; 345 (8959): 1195-8.
78. Curb JD, Pressel SL, Cutler JA, Savage PJ, Applegate WB, Black H, Camel G, Davis BR, Frost PH, Gonzales N, Guthrie G, Oberman A, Rutan GH, Stamler J. Effect of diuretic-based antihypertensive treatment on cardiovascular disease risk in older diabetic patients with isolated systolic hypertension: Systolic Hypertension in the Elderly Program Cooperative Research Group (SHEP). *JAMA*. 1996; 276: 1886-92.
79. Byington RP, Craven T, Furberg CD, Pahor M. Isradipine, raised glycosylated hemoglobin, and risk of cardiovascular events. The Multicenter Isradipine Diuretic Atherosclerosis Study (MIDAS). *Lancet*. 1997; 350: 1075-6.
80. Tatti P, Pahor M, Byington RP, Di Mauro P, Guarisco R, Strollo G, Strollo F. Outcome results of the Fosinopril versus Amlodipine Cardiovascular Events Randomised Trial (FACET) in patients with hypertension and NIDDM. *Diabetes Care*. 1998; 21: 597-603.
81. Estacio RO, Jeffers BW, Hiatt WR, Biggerstaff SL, Gifford N, Schrier RW. The effect of nisoldipine as compared with enalapril on cardiovascular outcomes in patients with non-insulin-dependent diabetes and hypertension. *N Engl J Med*. 1998; 338:10, 645-52.
82. Chatellier G, Marre M. Choice of first line treatment for arterial hypertension: should one avoid dihydropyridines in diabetic patients? *Diabetes Metab*. 1998 Sep; 24(4):370-5.

83. HOPE Study Investigators, *Lancet*. 2000 Jan 22; 355(9200):253-9.
84. Hansson L, Lindholm LH, Niskanen L, Lanke J, Hedner T, Niklason A, Luomanmaki K, Dahlof B, de Faire U, Morlin C, et al. Effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition compared with conventional therapy on cardiovascular morbidity and mortality in hypertension: the Captopril Prevention Project (CAPPP) randomised trial. *Lancet*. 1999; 353:611–616.
85. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 2000; 342:145–153.
86. Lindholm LH. Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol, *Lancet*. 2002; 359: 1004.
87. L, Zanchetti A, Carruthers SG, Dahlof B, Elmfeldt D, Julius S, Menard J, Rahn KH, Wedel H, Westerling S. Effects of intensive blood-pressure lowering and low-dose aspirin in patients with hypertension: principal results of the Hypertension Optimal Treatment (HOT) randomised trial. HOT Study Group. *Lancet*. 1998 Jun 13; 351(9118):1755-62.
88. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for the prevention of Type 2 diabetes, hypertension and cardiovascular disease in subjects with impaired glucose tolerance: facts and interpretations concerning the critical analysis of the STOP-NIDDM Trial data. *Diabetologia*. 2004 Jun; 47(6):969-75. Epub 2004 May 26.
89. Stackhouse S, Miller PL, Park SK, Meyer TW: Reversal of glomerular hyperfiltration and renal hypertrophy by blood glucose normalization in diabetic rats. *Diabetes*. 1990; 39: 989-995.
90. The diabetes control and complications trial research group: 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*. 1993; 329:977-986.

91. The diabetes control and complications trial research group: Effect of intensive therapy on the development and progression of diabetic nephropathy in diabetes control and complications trial. *Kidney Int.* 1995; 47: 1703-1720.
92. Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rhode RD: The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N. Eng. J. Med.* 1993; 329:1456-1462.
93. Backris GL: Angiotensin-converting enzyme inhibitors and progression of diabetic nephropathy. *Ann. Intern. Med.* 1993; 118:643-644.
94. Ravid, M, Lang R, Rachmani R, Lishner M: long-term renoprotective effect of angiotensin converting enzyme inhibition in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* 1996; 156: 286-289.
95. Viberti G, Chaturvedi N: Angiotensin converting enzyme inhibitors in diabetic patients with microalbuminuria or normoalbuminuria. *Kidney Int.* 1997; 52 (suppl 63): S32-35.
96. The diabetes Control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications research groups: Retinopathy and nephropathy in patients with type 1 diabetes four years after a trial of intensive insulin therapy. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342:381-389.
97. Andersen S, Tarnow L, Rensing P, Hansen BV, Parving HH: renoprotective effects of angiotensin II receptor blockade in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2000; 57: 601-606.
98. Fliser D, HallerH: Angiotensin II subtype 1-receptor antagonists in the treatment of diabetic nephropathy. *J. Hypertens.* 2001; 19 (suppl 1):S-57-S60.
99. Tigerstedt R., Bergman P.G. Niere und Kreislauf. *Skandinavisches Archiv für Physiologie* 1898; 8:223-271.
100. Pickering G.W., Printmetal M. Some observations on renin, a pressor substance contained in normal kidney, together with a method for its biological assay. *Clin Sci.* 1938; 3:211-227.
101. Skeggs L.T., Linz K.E., Hochstrasser H., Kahn J.R. The chemistry of renin substrate. *Can Med Assoc J.* 1964; 90:185-189.

102. Cesari M, Rossi GP, Pessina AC. Biological properties of the angiotensin peptides other than angiotensin II: implications for hypertension and cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2002 May; 20(5):793-9.
103. Timmermans PB, Benfield P, Chiu AT, Herblin WF, Wong PC, Smith RD. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am J Hypertens*. 1992 Dec; 5(12 Pt 2):221S-235S. Review.
104. Julie L. Lavoie and Curt D. Sigmund Minireview: Overview of the Renin-Angiotensin System—An Endocrine and Paracrine System. *Endocrinology* Vol. 144, No. 6 2179-2183
105. Bader M, Peters J, Baltatu O, Muller DN, Luft FC, Ganten D. Tissue renin-angiotensin systems: new insights from experimental animal models in hypertension research. *J Mol Med*. 2001; 79:76–102
106. Engeli S, Negrel R, Sharma AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*. 2000; 35:1270–1277
107. Sernia C. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system. *J Pancreas*. 2001; 2:50–55.
108. Nielsen AH, Schauser KH, Poulsen K. The uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta*. 2000; 21:468–477.
109. Dzau VJ, Ingelfinger JR. Molecular biology and pathophysiology of the intrarenal renin-angiotensin system. *J Hypertens Suppl*. 1989 Sep; 7(7):S3-8.
110. Tang SS, Jung F, Diamant D, Brown D, Bachinsky D, Hellman P, Ingelfinger JR. Temperature-sensitive SV40 immortalized rat proximal tubule cell line has functional renin-angiotensin system. *Am J Physiol*. 1995 Mar; 268(3 Pt 2):F435-46.
111. Wang L, Lei C, Zhang SL, Roberts KD, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. Synergistic effect of dexamethasone and isoproterenol on the expression of angiotensinogen in immortalized rat proximal tubular cells. *Kidney Int*. 1998 Feb; 53(2):287-95.
112. Navar LG, Lewis L, Hymel A, Braam B, Mitchell KD. Tubular fluid concentrations and kidney contents of angiotensins I and II in anesthetized rats. *J Am Soc Nephrol*. 1994 Oct; 5(4):1153-8.



113. Van Kats JP, Schalekamp MA, Verdouw PD, Duncker DJ, Danser AH. Intrarenal angiotensin II: interstitial and cellular levels and site of production. *Kidney Int.* 2001 Dec; 60(6):2311-7.
114. Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry.* 1984 Jul 31; 23(16):3603-9.
115. Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA.* 1989 Mar; 8(2):87-99.
116. Mori M, Ishizaki K, Yamada T, Chen H, Sugiyama T, Serikawa T, Yamada J. Restriction fragment length polymorphisms of the angiotensinogen gene in inbred rat strains and mapping of the gene on chromosome 19q. *Cytogenet Cell Genet.* 1989; 50(1):42-5.
117. Clouston WM, Fournier RE, Richards RI. The angiotensinogen gene is located on mouse chromosome 8. *FEBS Lett.* 1989 Sep 25; 255(2):419-22.
118. Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P. Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet.* 1990 Mar; 84(4):341-3.
119. Chan JS, Chan AH, Jiang Q, Nie ZR, LaChance S, Carriere S. Molecular cloning and expression of the rat angiotensinogen gene. *Pediatr Nephrol.* 1990 Jul; 4(4):429-35.
120. Chan JS, Chan AH, Nie ZR, Sikstrom R, Lachance S, Hashimoto S, Carriere S. Thyroid hormone, L-T3, stimulates the expression of the angiotensinogen gene in cultured opossum kidney (OK) cells. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Feb; 2(8):1360-7.
121. Chan JS, Ming M, Nie ZR, Sikstrom R, Lachance S, Carriere S. Hormonal regulation of expression of the angiotensinogen gene in cultured opossum kidney proximal tubular cells. *J Am Soc Nephrol.* 1992 Apr; 2(10):1516-22.
122. Ming M, Wang TT, Lachance S, Delalandre A, Carriere S, Chan JS. Expression of the angiotensinogen gene is synergistically stimulated by 8-BrcAMP and Dex in opossum kidney cells. *Am J Physiol.* 1995 Jan; 268(1 Pt 2):R105-11.

123. Wang TT, Lachance S, Delalandre A, Carriere S, Chan JS. Dopaminergic receptors and angiotensinogen gene expression in opossum kidney cells. *Am J Physiol.* 1996 Sep; 271(3 Pt 2):R519-27.
124. Ming M, Chan W, Wang TT, Roberts KD, Bouvier M, Lachance S, Carriere S, Chan JS. beta-Adrenoceptors and dexamethasone synergistically stimulate the expression of the angiotensinogen gene in opossum kidney cells. *Kidney Int.* 1996 Jul; 50(1):94-101.
125. Wang TT, Wu XH, Zhang SL, Chan JS. Molecular mechanism(s) of action of norepinephrine on the expression of the angiotensinogen gene in opossum kidney cells. *Kidney Int.* 1998 Sep; 54(3):785-95.
126. Kim HS, Kregge JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgins JB, Best CF, Jennette JC, Coffman TM, Maeda N, Smithies O. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28; 92(7):2735-9.
127. Nagata M, Tanimoto K, Fukamizu A, Kon Y, Sugiyama F, Yagami K, Murakami K, Watanabe T. Nephrogenesis and renovascular development in angiotensinogen-deficient mice. *Lab Invest.* 1996 Nov; 75(5):745-53.
128. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell.* 1992 Oct 2; 71(1):169-80.
129. Navar LG, Kobori H, Prieto-Carrasquero M. Intrarenal angiotensin II and hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2003 Apr; 5(2):135-43.
130. Navar LG, Harrison-Bernard LM, Nishiyama A, Kobori H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension.* 2002 Feb; 39(2 Pt 2):316-22.
131. Dzau VJ, Burt DW, Pratt RE. Molecular biology of the rennin-angiotensin system. *Am J Physiol.* 1988; 255:F263-573.
132. Luetscher JA, Kraemer FB, Wilson DM, Schwartz HC, Bryer-Ash M. Increased plasma inactive renin in diabetes mellitus. A marker of microvascular complications. *N Engl J Med.* 1985 May 30; 312(22):1412-7.

133. Allen TJ, Cooper ME, Gilbert RE, Winikoff J, Skinni SL, Jerums G. Serum total renin is increased before microalbuminuria in diabetes. *Kidney Int.* 1996 Sep; 50(3):902-7.
134. Riordan JF. Angiotensin-I-converting enzyme and its relatives. *Genome Biol.* 2003; 4(8):225. Epub 2003 Jul 25.
135. Turner AJ, Hooper NM. The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 2002 Apr; 23(4):177-83.
136. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 2000 Sep; 1;87(5):E1-9.
137. Turner AJ, Tipnis SR, Guy JL, Rice G, Hooper NM. ACEH/ACE2 is a novel mammalian metallo-carboxypeptidase and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. *Can J Physiol Pharmacol.* 2002 Apr; 80(4):346-53.
138. Komatsu T, Suzuki Y, Imai J, Sugano S, Hida M, Tanigami A, Muroi S, Yamada Y, Hanaoka K. Molecular cloning, mRNA expression and chromosomal localization of mouse angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (mACE2). *DNA Seq.* 2002 Aug; 13(4):217-20.
139. Oudit GY, Crackower MA, Backx PH, Penninger JM. The role of ACE2 in cardiovascular physiology. *Trends Cardiovasc Med.* 2003 Apr; 13(3):93-101.
140. ReRN. Cellular biology of the renin-angiotensin system. *Arch Int Med.* 1984; 144(10): 2037-2041.
141. Berk BC, Aronow MS, Brock TA, Cragoe E Jr, Gimbrone MA Jr, Alexander RW. Angiotensin II-stimulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in cultured vascular smooth muscle cells. Evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem.* 1987 Apr 15; 262(11):5057-64.
142. Harris PJ, Navar LG. Tubular transport responses to angiotensin. *Am J Physiol.* 1985; 248 (5 pt2):F621-F630.

143. Douglas JG, Michailov M, Khosla MC, Bumpus FM. Comparative studies of receptor binding and steroidogenic properties of angiotensins in the rat adrenal glomerulosa. *Endocrinology*. 1979 Jan; 104(1):71-5.
144. Lazard D, Briend-Sutren MM, Villageois P, Mattei MG, Strosberg AD, Nahmias C. Molecular characterization and chromosome localization of a human angiotensin II AT2 receptor gene highly expressed in fetal tissues. *Receptors Channels*. 1994; 2(4):271-80.
145. Curnow KM, Pascoe L, Davies E, White PC, Corvol P, Clauser E. Alternatively spliced human type 1 angiotensin II receptor mRNAs are translated at different efficiencies and encode two receptor isoforms. *Mol Endocrinol*. 1995 Sep; 9(9):1250-62.
146. Lewis JL, Serikawa T, Warnock DG. Chromosomal localization of angiotensin II type 1 receptor isoforms in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Jul 30; 194(2):677-82.
147. Navar LG, Rosivall L. Contribution of the renin-angiotensin system to the control of intrarenal hemodynamics. *Kidney Int*. 1984 Jun; 25(6):857-68.
148. Harris PJ, Navar LG. Tubular transport responses to angiotensin. *Am J Physiol*. 1985 May; 248(5 Pt 2):F621-30.
149. Kontogiannis J, Burns KD. Role of AT1 angiotensin II receptors in renal ischemic injury. *Am J Physiol*. 1998 Jan; 274(1 Pt 2):F79-90.
150. Tufro-McReddie A, Johns DW, Geary KM, Dagi H, Everett AD, Chevalier RL, Carey RM, Gomez RA. Angiotensin II type 1 receptor: role in renal growth and gene expression during normal development. *Am J Physiol*. 1994 Jun; 266(6 Pt 2):F911-8.
151. Matsubara H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circ Res*. 1998 Dec 14-28; 83(12):1182-91.
152. Yamada T, Horiuchi M, Dzau VJ. Angiotensin II type 2 receptor mediates programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jan 9; 93(1):156-60.
153. Yotsumoto T, Naitoh T, Shikada K, Tanaka S. Effects of specific antagonists of angiotensin II receptors and captopril on diabetic nephropathy in mice. *Jpn J Pharmacol*. 1997 Sep; 75(1):59-64.

154. Sen S., Bumpus F.M. Collagen synthesis in development and reversal of cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Am J Card.* 1979; 44:954-958.
155. Pfeffer J.M., Pfeffer M.A., Mirsky I., Braunwald E. Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; 79:3310-3314.
156. Linz W., Schaper J., Wiemer G., Albus U., Scholkens B.A. Ramipril prevents left ventricular hypertrophy with myocardial fibrosis without blood pressure reduction. A one year study in rats. *Br J Pharmacol.* 1992; 107:970-975.
157. Linz W., Scholkens B.A. A specific B2-bradykinin receptor antagonist HOE 140 abolishes the antihypertrophic effect of ramipril. *Br J Pharmacol.* 1992; 105:771-772.
158. Rhaleb N. E., Yang X. P., Scicli A. G., Carretero O. A. Role of kinins and nitric oxide in the antihypertrophic effect of ramipril. *Hypertension.* 1994; 23:865-8.
159. Huang L, Sexton DJ, Skogerson K, Devlin M, Smith R, Sanyal I, Parry T, Kent R, Enright J, Wu QL, Conley G, DeOliveira D, Morganelli L, Ducar M, Wescott CR, Ladner RC. Novel peptide inhibitors of angiotensin-converting enzyme 2. *J Biol Chem.* 2003 May 2; 278(18):15532-40. Epub 2003 Feb 26.
160. Luther R.R., Glassman H.N., Boger R.S. Renin inhibitors in hypertension. *Clin Nephrol.* 1991; 36:181-186.
161. Christen Y., Waeber B., Nussberger J., Porchet M., Borland R.M., Lee R.J., Maggon K., Shum L., Timmermans P.B.M.W.M., Brunner H.R. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation.* 1991; 83:1333-1342.
162. Tsunoda K., Abe K., Hagino T., Omata K., Misawa S., Imai Y., Yoshinaga K. Hypotensive effect of losartan, a nonpeptide angiotensin II receptor antagonist, in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 1993; 6:28-32.

163. Lewis EJ, Lewis JB. Treatment of diabetic nephropathy with angiotensin II receptor antagonist. *Clin Exp Nephrol*. 2003 Mar; 7(1):1-8.
164. Sparks JD, Sparks CE. Insulin regulation of triacylglycerol-rich lipoprotein synthesis and secretion. *Biochem Biophys Acta*. 1994; 1251 : 9-32.
165. Kimball SR, Vary TC, Jefferson LS. Regulation of protein synthesis by insulin. *Annu Rev Physiol*. 1994 ; 56:321-348.
166. Traité de nutrition artificielle de l'adulte. Chapitre 12. Mode d'action cellulaire de l'insuline. Editions Mariette Guéna.1998.
167. Kahn CR. Insulin receptors and insulin signalling in normal and disease states. International textbook of diabetes mellitus. 2<sup>nd</sup> edition. Edited by K.G.M.M Alberti, P. Zimmet, R.A. DeFronzo, and H. Keen (honorary), pp:437-467, 1997.
168. Patti, M. E. & Kahn, C. R. The insulin receptor-a critical link in glucose homeostasis and insulin action. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol*. 1998; 9, 89-109.
169. Baron V, Van Obberghen E. [Mechanism of insulin action] *C R Seances Soc Biol Fil*. 1995; 189(1):25-41.
170. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev*. 1995 Apr;16(2):117-42.
171. Kahn CR, Folli F. Molecular determinants of insulin action. *Horm Res*. 1993; 39(suppl 3):93-100.
172. White MF. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia*. 1997; 40:S2-17.
173. Butler, A. A. & LeRoith, D. Tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology*. 2001; 142, 1685-1688.
174. Rondinone CM, Wang LM, Lonroth P, Wesslau C, Pierce JH, Smith U. Insulin receptor substrate IRS-1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for phosphatidylinositol 3-kinase in adipocytes from subjects with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:4171-5.

175. White, M. F. The IRS-signalling system: a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 182, 3-11.
176. Pessin, J. E. & Saltiel, A. R. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 2000; 106, 165-169.
177. Y Zick, R Arbel-Goren, S Boura-Halfon, A Herchkovitz, Y Levy, YF Liu, D Ronen. Transmembrane signaling: Molecular basis of insulin resistance. Cell communication and signaling transduction. *Life Sciences Open Day Book.* 2002.
178. A. R. Saltiel and C.R. Kahn. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001; 414, 799 - 806.
179. Shepherd, P. R., Nave, B. T. & Siddle, K. Insulin stimulation of glycogen synthesis and glycogen synthase activity is blocked by wortmannin and rapamycin in 3T3-L1 adipocytes: evidence for the involvement of phosphoinositide 3-kinase and p70 ribosomal protein-S6 kinase. *Biochem. J.* 1995; 305, 25-28.
180. Shepherd PR, Nave BT, O'Rahilly S. The role of phosphoinositide 3-kinase in insulin signalling. *J Mol Endocrinol.* 1996 Dec;17(3):175-84.
181. Myers, M. G. Jr *et al.* IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1992; 89, 10350-10354.
182. Pons, S. *et al.* The structure and function of p55PIK reveal a new regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol. Cell. Biol.* 1995; 15, 4453-4465.
183. Antonetti, D. A., Algenstaedt, P. & Kahn, C. R. Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain. *Mol. Cell. Biol.* 1996; 16, 2195-2203.
184. Fruman, D. A., Cantley, L. C. & Carpenter, C. L. Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene. *Genomics.* 1996; 37, 113-121.

185. Kerouz, N. J., Horsch, D., Pons, S. & Kahn, C. R. Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and-2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (*ob/ob*) mouse. *J. Clin. Invest.* 1997; 100, 3164-3172.
186. Lietzke, S. E. *et al.* Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol. Cell.* 2000; 6, 385-394.
187. Kessler, A., Uphues, I., Ouwens, D. M., Till, M. & Eckel, J. Diversification of cardiac insulin signaling involves the p85 alpha/beta subunits of phosphatidylinositol 3-kinase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; 280, E65-E74.
188. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
189. Peterson, R. T. & Schreiber, S. L. Kinase phosphorylation: keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 1999; 9, R521-R524.
190. Mackay, D. J. & Hall, A. Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 1998; 273, 20685-20688.
191. Ziegler, S. F., Bird, T. A., Schneringer, J. A., Schooley, K. A. & Baum, P. R. Molecular cloning and characterization of a novel receptor protein tyrosine kinase from human placenta. *Oncogene.* 1993; 8, 663-670.
192. Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr. Biol.* 1997; 7, 261-269.
193. Summers SA, Birnbaum MJ. A role for the serine/threonine kinase, Akt, in insulin-stimulated glucose uptake. *Biochem Soc Trans.* 1997 Aug; 25(3):981-8.
194. Cross, D. A. *et al.* The inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin or insulin-like growth factor 1 in the rat skeletal muscle cell line L6 is blocked by wortmannin, but not by rapamycin: evidence that wortmannin blocks activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in L6 cells between Ras and Raf. *Biochem. J.* 1994; 303, 21-26.
195. L Baki, J Shioi, P Wen, Z Shao, A Schwarzman, M Gama-Sosa, R Neve and NK Robakis. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau



- overphosphorylation: effects of FAD mutations. *The EMBO Journal*. 10 June 2004; doi: 10.1038/sj.emboj.7600251.
196. Nakae, J., Park, B. C. & Accili, D. Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway. *J. Biol. Chem.* 1999; 274, 15982-15985).
197. NJ. Bryant, R Govers & DE. James. Regulated transport of the glucose transporter Glut4. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002; 3, 267-277.
198. Anne W. Harmon, David S. Paul, and Yashomati M. Patel. MEK Inhibitors Impair Insulin-Stimulated Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. June 1, 2004; 10.1152/ajpendo.00581.2003.
199. Boulton, T. G. *et al.* ERKs: a family of protein-serine/threonine kinases that are activated and tyrosine phosphorylated in response to insulin and NGF. *Cell*. 1991; 65, 663-675.
200. Lazar, D. F. *et al.* Mitogen-activated protein kinase kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J. Biol. Chem.* 1995; 270, 20801-20807.
201. L.Pirola, AM Johnston, E Van Obberghen. Modulation of insulin action. *Diabetologia*. 2004; 47: 170-184.
202. S-L Zhang, Chen X, Hsieh TJ, Leclerc M, Henley N, Allidina A, Halle JP, Brunette MG, Filep JG, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. Hyperglycemia induces insulin resistance on angiotensinogen gene expression in diabetic rat kidney proximal tubular cells. *J Endocrinol*. 2002 Feb; 172(2):333-44.
203. Hug H, Sane TF: Protein kinase C isozymes: divergence in signal transduction? *Biochem J*. 1993; 291:329-343.
204. Zhang S-L, Filep JG, Hohman TC, Tang S-S, Ingelfinger JR, Chan JSD: Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int*. 1999; 55:454-464.
205. Correa-Rotter R, Hostetter TH, Rosenberg ME. Renin and angiotensinogen gene expression in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int*. 1992 Apr; 41(4):796-804.

206. Everett AD, Scott J, Wilfong N, Marino B, Rosenkranz RP, Inagami T, Gomez RA. Renin and angiotensinogen expression during the evolution of diabetes. *Hypertension*. 1992 Jan; 19(1):70-8.
207. Kalinyak JE, Sechi LA, Griffin CA, Don BR, Tavangar K, Kraemer FB, Hoffman AR, Schambelan M. The renin-angiotensin system in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 1993 Dec; 4(6):1337-45.
208. Nakatani T, Uchida J, Iwai T, Matsumura K, Naganuma T, Kuratsukuri K, Sugimura K. Renin mRNA expression and renal dysfunction in tacrolimus-induced acute nephrotoxicity. *Int J Mol Med*. 2003 Jan; 11(1):75-8.
209. Jurkovicova D, Dobesova Z, Kunes J, Krizanova O. Different expression of renin-angiotensin system components in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Physiol Res*. 2001; 50(1):35-42.
210. Zimpelmann J, Kumar D, Levine DZ, Wehbi G, Imig JD, Navar LG, Burns KD. Early diabetes mellitus stimulates proximal tubule renin mRNA expression in the rat. *Kidney Int*. 2000 Dec; 58(6):2320-30.
211. Yoshikawa H. Renal angiotensin converting enzyme (ACE) expression in diabetic rats: the effect of ACE inhibitors. *Nippon Jinzo Gakkai Shi*. 1999 Aug; 41(5):486-92.
212. Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, Burns WC, Burrell LM, Risvanis J, Cooper ME. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension*. 2003 Mar; 41(3):392-7. Epub 2003 Feb 24.
213. Wehbi GJ, Zimpelmann J, Carey RM, Levine DZ, Burns KD. Early streptozotocin-diabetes mellitus downregulates rat kidney AT2 receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2001 Feb; 280(2):F254-65.
214. Sodhi CP, Kanwar YS, Sahai A. Hypoxia and high glucose upregulate AT1 receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Mar; 284(3):H846-52. Epub 2002 Nov 14.

215. Bonnet F, Candido R, Carey RM, Casley D, Russo LM, Osicka TM, Cooper ME, Cao Z. Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade. *J Hypertens*. 2002 Aug; 20(8):1615-24.
216. Wolf G. Angiotensin II and tubular development. *Nephrol Dial Transplant*. 2002; 17 Suppl 9:48-51. Kaschina E, Unger T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood Press*. 2003; 12(2):70-88.
217. Norwood VF, Craig MR, Harris JM, Gomez RA. Differential expression of angiotensin II receptors during early renal morphogenesis. *Am J Physiol*. 1997 Feb; 272(2 Pt 2):R662-8.