

2m11.3510.6

Université de Montréal

Étude des récepteurs des kinines dans les complications diabétiques chez le rat

par

Calin-Andrei Lungu

Département de Physiologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en physiologie

Janvier, 2007

© Calin Andrei Lungu, 2007



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 :

Étude des récepteurs des kinines dans les complications diabétiques chez le rat

présenté par :

Calin Andrei Lungu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Arlette Kolta, président-rapporteur

Réjean Couture, directeur de recherche

Pierre Beaulieu, membre du jury

Résumé

Les kinines (des-Arg⁹-bradykinine, bradykinine) agiraient comme neuromédiateurs centraux dans les circuits neuronaux impliqués dans le contrôle de la douleur et de la pression artérielle. Ces peptides agissent via l'activation de deux types de récepteurs (B₁R et B₂R) couplés aux protéines G. Une augmentation de la densité des sites de liaison des B₁R et B₂R a été montrée dans la moelle épinière des rats traités au glucose (10 % dans l'eau de boisson) pendant 4 semaines. L'objectif de ce travail était d'utiliser ce modèle sur une période de 12-14 semaines, afin de: a) mesurer les signes de neuropathies (allodynie tactile et au froid), les élévations de pression artérielle et d'expression du B₁R dans plusieurs tissus; b) déterminer l'impact d'une diète anti-oxydante enrichie d'acide alpha-lipoïque sur ces changements; c) évaluer les effets d'antagonistes B₁R et B₂R sur les neuropathies et l'hypertension artérielle. Les rats traités au glucose ont développé une allodynie tactile et au froid ainsi qu'une augmentation de la pression artérielle systolique entre 4 et 12 semaines. L'expression du B₁R (ARNm) était fortement augmentée après 14 semaines de traitement au glucose (foie, aorte, poumons, reins, moelle épinière). Tous ces changements incluant l'augmentation des sites de liaison pour le B₁R dans la moelle épinière ont été réduits par l'acide alpha-lipoïque. Les antagonistes non peptidiques B₁R (LF22-0542; 10 mg/kg, s.c.) et B₂R (Anatibant; 3 mg/kg, s.c.) ont réduit significativement l'allodynie tactile et au froid et la pression artérielle systolique, tandis que l'antagoniste peptidique B₁R (R-715; 10 mg/kg, i.p.) n'a bloqué que les allodynies. Ces résultats suggèrent que le stress oxydant est impliqué dans l'induction et la surexpression du B₁R, lequel contribuerait avec le B₂R à l'hypertension artérielle par un mécanisme central chez le rat traité au glucose. En périphérie, ces récepteurs seraient des cibles thérapeutiques pour le traitement de la douleur neuropathique dans le diabète de type 2.

Mots-clés : récepteurs des kinines; bradykinine; stress oxydant; diabète; allodynie; pression artérielle; anti-oxydant; antagonistes B₁ et B₂ des kinines.

Abstract

Kinins (des-Arg⁹-bradykinin, bradykinin) are thought to be mediators of central neuronal pathways involved in the autonomic control of blood pressure and pain process. These peptides act through the activation of two G-protein-coupled receptors, known as B₁ and B₂ receptors (B₁R and B₂R). An increased density of B₁R and B₂R binding sites has been shown in the spinal cord of rats treated with glucose (10% in drinking water) for a period of 4 weeks. The aim of this study was to use this model for 12-14 weeks in order to a) assess symptoms of pain neuropathies (tactile and cold allodynia), increases of blood pressure and B₁R expression in several tissues; b) determine the impact of an anti-oxidant diet enriched with alpha-lipoic acid on these alterations; c) assess the effects of B₁R and B₂R antagonists on diabetic neuropathy and arterial hypertension.

Glucose-fed rats exhibited tactile and cold allodynia along with increases in systolic blood pressure between 4 and 12 weeks. B₁R expression (mRNA) was markedly increased after 14 weeks of treatment with glucose (liver, aorta, lungs, kidneys, spinal cord). All these alterations including the increased density of B₁R binding sites in the spinal cord of glucose-fed rats were inhibited by alpha-lipoic acid. Non-peptide antagonists for B₁R (LF22-0542; 10 mg/kg, s.c.) and B₂R (Anatibant; 3 mg/kg, s.c.) significantly reduced tactile and cold allodynia and high arterial blood pressure while the peptide B₁R antagonist (R-715; 10 mg/kg, i.p.) only blocked tactile and cold allodynia. These data suggest that the oxidative stress is involved in the induction and overexpression of B₁R which appears to contribute with the B₂R to arterial hypertension through a central mechanism in glucose-fed rats. In the periphery, these receptors may represent therapeutic targets in the treatment of pain neuropathy in type 2 diabetes.

Keywords: kinin receptors; bradykinin; oxidative stress; diabetes, allodynia; blood pressure; anti-oxidant; B₁R and B₂R antagonists.

Table des matières

Résumé.....	III
Abstract.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des figures.....	VII
Liste des abréviations.....	VIII
Dédicace.....	X
Remerciements.....	XI
PREMIER CHAPITRE	
INTRODUCTION	
1. Mise en contexte	2
2. Recension de la littérature.....	3
3. Le diabète de type 1 (insulino-dépendant; DID).....	5
3.1 La Streptozotocine et le diabète de type 1	6
4. Syndrome métabolique et diabète de type 2 (non-insulino-dépendant; DNID).....	7
4.1 Modèles expérimentaux pour étudier le diabète de type 2	9
5. Stress oxydant et diabète.....	10
6. La neuropathie diabétique.....	15
6.1 Modèles animaux pour étudier la douleur neuropathique.....	20
7. Le système kallibréine-kinines.....	22
7.1 Récepteurs des kinines.....	23
7.2 Voies de signalisation des récepteurs des kinines.....	25
8. Rôle des kinines dans le diabète	26
9. Relation entre les kinines et l'insuline	32
10. Hypothèses de travail :	34
11. Buts de l'étude	34
DEUXIÈME CHAPITRE	
Article: Involvement of kinin B ₁ receptor and oxidative stress in pain neuropathy and arterial hypertension in an experimental rat model of type 2 diabetes	
Abstract.....	38

Introduction.....	40
Materials and Methods.....	42
Results.....	49
Discussion.....	53
Acknowledgements.....	56
References.....	57
Figure Legends.....	63

TROISIÈME CHAPITRE

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Le stress oxydant et le modèle de diabète de type 2	75
2. Rôle du récepteur B ₁ des kinines dans le diabète.....	81
3. Rôle du récepteur B ₂ des kinines dans le diabète.....	84
Conclusion	90
Bibliographie.....	91
Annexe	I

Liste des figures

	Page
Figure 1 Classification schématique des complications diabétiques	5
Figure 2 Rôle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I dans la réduction du stress oxydant durant l'hyperglycémie	14
Figure 3 La pathogenèse multifactorielle de la neuropathie diabétique	19
Figure 4 Synthèse et récepteurs des kinines	24
Figure 5 Les mécanismes d'action de la bradykinine et de la des-Arg ⁹ -BK dans la nociception thermique chez le rat STZ-diabétique	30
Figure 6 L'effet de Sar-[D-Phe ⁸]-des-Arg ⁹ -BK chez les rats traités au glucose pendant 6 semaines (A) et après 2 semaines de l'arrêt du traitement (B)	86
Figure 7 L'effet anti-hypertenseur de l'Anatibant chez les rats traités au glucose	87
Figure 8 L'effet de l'Anatibant sur l'allodynie tactile (A) et l'allodynie au froid (B) chez les rats traités au glucose	88

Liste des abréviations

AGE: produits terminaux de glycation

AGL : acides gras libres

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

AMPK : protéine- kinase activée par AMP

B₁R-KO : “knock out” pour le récepteur B₁

BB/WOR : BioBreeding/Worchester

BK : bradykinine

CGRP : peptide relié au gène de la calcitonine

COX-2 : cyclooxygénase 2

DAG : diacylglycérol

DOCA: deoxycorticostérone acétate

ECA: enzyme de conversion de l’angiotensine I

Glu : glutamate

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

GPX: glutathione peroxidase

HOMA: “Homeostatic Model Assessment”

i.c.v. : intra cérébro-ventriculaire

IEC : inhibiteurs de l’enzyme de conversion de l’angiotensine I

IFN-gamma: interféron gamma

IG : index glycémique

IL-1 β : interleukine 1 beta

IL-2: interleukine 2

iNOS: “inductible Nitric Oxide Synthase”

IP3 : inositol 1,4,5- triphosphate

IRS-1 : substrat du récepteur de l’insuline

MAP kinases : protéine kinases activées par un mitogène

NA : noradrénaline

NAD(P)H : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite.

NAD: nicotinamide dinucléotide

NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide, forme positive

NADH: nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite

NF-kB: facteur de transcription nucléaire (NF) kappa B

NO: monoxyde d'azote

NOS_e : NO synthase endothéliale

NOS_n :NO synthase neuronale

NTS: noyau du tractus solitaire

O₂⁻ : anion superoxyde

OH^{*} : radical hydroxyl

ONOO⁻ : peroxydinitrite

PG : prostaglandines

PGI₂ : prostacyclines

PKC: protéine kinase C

PLA₂ : phospholipase A₂

PLC : phospholipase C

PPAR- α : "peroxisome proliferator-activated receptor alpha"

RO^{*} : radical alkoxyde

ROO^{*} : radical peroxyde

ROS: espèces réactives d'oxygène

RT PCR: "real-time polymerase chain reaction"

SHR: rats spontanément hypertendus

SOD: superoxyde dismutase

souris NOD : souris diabétique non-obèse

SP : substance P

SP5: noyau du paratriméisme

STZ: streptozotocine

TGF- β : "transforming growth factor beta"

TNF- α : facteur tumoral nécrosant alpha

TRP : "transient receptor potential"

VMH : noyau ventro-médial de l'hypothalamus

ZDF : "Zucker Diabetic Fatty rats"

A mon épouse, Anca

Remerciements

Je désire sincèrement remercier le Dr Réjean Couture pour sa direction tout au long de ce mémoire, ainsi que pour sa disponibilité et sa patience. L'aide et les conseils prodigués, son enthousiasme et ses qualités pédagogiques, ont été grandement appréciés et m'ont redonné motivation dans les moments difficiles. Le passage dans son laboratoire a été très enrichissant et a contribué largement à ma formation scientifique.

Un grand merci aux Drs Pierre Beaulieu et Denis de Blois pour les commentaires et les suggestions pertinentes sur mon projet de recherche.

J'adresse toute ma sympathie à mes amis et collègues du laboratoire avec qui j'ai eu le plaisir de travailler: Kathleen, Brice, Mihai, Jenny, Camilla et Helaine. Je n'oublierai pas non plus l'ambiance chaleureuse au sein des laboratoires du GRSNA à laquelle ont particulièrement contribué: Marcel, Giorgios et Marc-André.

Toute ma gratitude aux membres du personnel du Département de Physiologie pour leur soutien logistique et leur professionnalisme.

Je suis également reconnaissant à mon directeur de recherche et au GRSNA, qui, par leur support financier, m'ont permis de me dédier complètement à mes études de maîtrise.

J'aimerais notamment remercier ma famille et mon épouse, Anca pour les nombreux encouragements et leur appui inconditionnel.

PREMIER CHAPITRE

INTRODUCTION

1. Mise en contexte

Les kinines (la bradykinine, la kallidine) sont des peptides autacoïdes pro-inflammatoires libérés en périphérie, au site d'un dommage tissulaire. Elles exercent des effets vasodilatateurs et de la douleur en stimulant les fibres de type C et A δ . Au niveau central, les kinines agissent comme neuromédiateurs dans les voies autonomiques impliquées dans le contrôle de la pression artérielle et dans les circuits neuronaux de la douleur. Leurs effets se produisent via l'activation de deux types de récepteurs couplés aux protéines G: le récepteur B₁ (inductible) et le récepteur B₂ (constitutif).

Les kinines sont actives dans le diabète où l'hyperglycémie non contrôlée conduit à des complications sévères. Des études récentes ont montré une augmentation de l'expression des récepteurs B₁ et B₂ dans le système nerveux central chez l'animal diabétique (El Midaoui et al., 2005; Campos et al., 2005a; b). Dans un modèle de diabète de type 1 (rats STZ diabétiques), une régulation à la hausse du récepteur B₁ dans la moelle épinière thoracique et dans des régions spécifiques du cerveau (hippocampe, amygdale, cortex cérébral) a été mise en évidence par autoradiographie et hybridation in situ (Ongali et al., 2004; Campos et al., 2005a). L'augmentation de l'expression de ce récepteur dans la moelle épinière du rat a été associée à des augmentations de pression artérielle et à une hyperalgésie thermique après l'administration intrathécale de l'agoniste préférentiel du récepteur B₁, la des-Arg⁹-BK. Ces réponses ont été bloquées par des antagonistes sélectifs du récepteur B₁ (Cloutier et Couture, 2000; Couture et al., 2001).

Dans le même modèle de diabète de type 1, la densité du récepteur B₂ est significativement augmentée dans la couche I de la corne dorsale de la moelle épinière et

dans les aires du cerveau associées aux réflexes cardiovasculaires : le noyau du paratrimé (SP5) et le noyau du tractus solitaire (NTS) (Campos et al., 2005b). Une augmentation de la pression artérielle a été notée après l'activation du récepteur B₂ par son agoniste injecté par voie intrathécale (Cloutier et Couture, 2000).

Dans le diabète de type 2 induit par un traitement de 4 semaines au glucose, une augmentation importante des sites de liaison des récepteurs B₁ et B₂ des kinines a été mesurée dans la moelle épinière (El Midaoui et al., 2005). Une diète riche en acide alpha-lipoïque (antioxydant) a pu montrer que le stress oxydant est un facteur important pour l'induction du récepteur B₁ mais pas du récepteur B₂ dans ce modèle. De plus, le stress oxydant a aussi été impliqué dans l'apparition de l'hypertension artérielle et de l'insulino-résistance, deux complications qui accompagnent l'état d'hyperglycémie chronique du diabète (El Midaoui et al., 2005).

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux rôles des kinines centrales et du stress oxydant dans l'hypertension artérielle et les neuropathies diabétiques chez les rats traités au glucose (10% dans l'eau à boire) pendant 14 semaines. Le second objectif a été de vérifier, sur ce modèle de diabète de type 2, les effets d'antagonistes des récepteurs des kinines sur la pression artérielle et les neuropathies diabétiques.

2. Recension de la littérature

Au Canada, plus de deux millions de personnes sont atteintes du diabète, dont 550 000 au Québec. L'organisation mondiale de la santé prévoit que le nombre de personnes diabétiques doublera d'ici l'an 2025, faisant du diabète la nouvelle épidémie (données obtenues de l'Association Canadienne du Diabète et de l'Association Diabète

Québec). On distingue trois types de diabète, soit le type 1 (diabète insulino-dépendant), le type 2 (diabète non-insulino-dépendant) et le diabète de grossesse.

Ce qui contribue le plus à la morbidité et à la mortalité élevée du diabète, ce sont ses complications. Selon deux études majeures (DCCT, 1988; EDIC, 1999), la cause primaire des complications diabétiques est l'hyperglycémie. Tel que montré dans la figure 1, les complications diabétiques peuvent être divisées en complications macrovasculaires (l'infarctus du myocarde, l'athérosclérose, l'hypertension artérielle et les accidents cérébrovasculaires) et microvasculaires (la néphropathie, la polyneuropathie et la rétinopathie) (Feldman, 2003; Couture et Girolami, 2004).

Ces complications, qui sont irréversibles, se retrouvent chez 20-30% des personnes qui souffrent de diabète et conduisent à la phase chronique ou terminale de la maladie (Feldman, 2003; Zimmet, 2003).

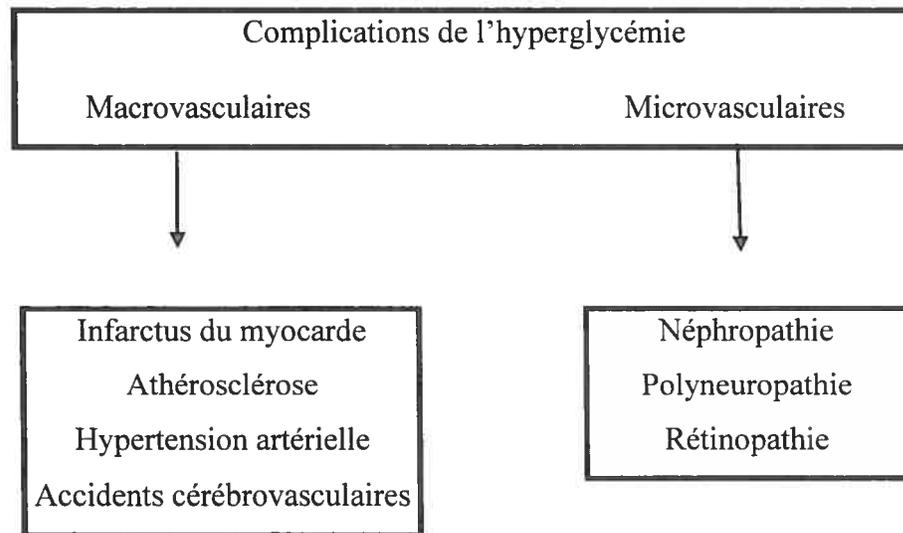


Figure 1. Classification schématique des complications diabétiques.

Tiré de : Couture et Girolami, 2004

3. Le diabète de type 1 (insulino-dépendant; DID)

Le diabète de type 1 est une maladie d'étiologie multiple qui implique une susceptibilité génétique, des mécanismes auto-immuns et des facteurs environnementaux. Cette maladie est la conséquence d'une incapacité de l'organisme à sécréter en quantité suffisante l'insuline, suite à la destruction des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. Sur le continent nord-américain, le diabète de type 1 représente entre 5 et 10% de tous les cas diagnostiqués (données obtenues du National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, 2005). La maladie apparaît généralement pendant l'enfance ou à l'adolescence, mais elle peut aussi survenir à tout âge.

La thérapie disponible pour le diabète de type 1 comprend l'administration de l'insuline à laquelle s'est ajoutée plus récemment (mars 2005) un nouveau produit :

l'acétate de pramlintide (Symlin®), un analogue synthétique de l'amyline humaine. L'amyline est une hormone sécrétée par le pancréas en même temps que l'insuline suite à un repas. Son rôle est de ralentir la vidange gastrique et de réduire l'augmentation de la glycémie après un repas. L'acétate de pramlintide s'utilise essentiellement en association avec l'insuline et aide à mieux contrôler la glycémie postprandiale chez les patients diabétiques adultes (Laustsen, 2005). Des stratégies novatrices pour inhiber des voies métaboliques dans le diabète, comme par exemple, la cascade du stress oxydant, sont présentement en phase de développement.

3.1 La Streptozotocine et le diabète de type 1

Le modèle de rat traité à la streptozotocine (STZ) est le plus connu pour évaluer le diabète de type 1 et ses complications. La STZ (2-déoxy-2-(3-méthyl-3-nitrosouréido)-D-glucopyranose; *Zanosar*) est un antibiotique dérivé de l'actinomycine *Streptomyces achromogenes* et utilisé comme un agent diabétogène expérimental. Son administration chez les rongeurs produit la destruction sélective des cellules β du pancréas. Plusieurs mécanismes ont été trouvés pour expliquer l'action de la STZ : 1) dommage de l'ADN nucléaire et inhibition de sa biosynthèse subséquente, via la diminution de la nicotinamide dinucléotide (NAD) intracellulaire, un facteur essentiel pour l'enzyme de réparation de l'ADN (poly (ADP-ribose) synthase) (Wilson et al., 1988); 2) production des radicaux libres (anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène, radicaux hydroxyl) qui peuvent activer le facteur de transcription nucléaire NF- κ B. Ce facteur initie la transcription de plus de 150 gènes, parmi lesquels se trouvent les gènes des cytokines et de la NO synthase inducible (iNOS) (Baldwin, 1996; Giannoukakis et al., 1999; Yerneni et al., 1999; DeLeo et Yeziarski, 2001); 3) inflammation des cellules β (insulite) associée aux cytokines (Lukic et

al., 1998). Il a été trouvé que la génération de NO dans les cellules β du pancréas augmente les effets diabétogènes et que l'induction du diabète est corrélée avec une production plus élevée de IL-2, IFN-gamma et TNF-alpha. Ces cytokines peuvent activer les lymphocytes Th1 qui sécrètent des molécules capables d'activer les macrophages et entraînent la destruction des cellules β du pancréas par des mécanismes impliquant ou pas le NO (Lukic et al., 1998).

La demi-vie de la STZ est courte (15 minutes). Le médicament s'accumule très rapidement dans les premières 15 minutes dans les cellules β du pancréas et plus lentement dans les 60 à 120 minutes subséquentes (Like et Rossini, 1976; Schnedl et al., 1994). Le diabète est confirmé 24-48h après l'administration de STZ par la prise de la glycémie. Des valeurs non à jeun du glucose sanguin dépassant 15 mmol/l témoignent de la présence du diabète (Calcutt et al., 1996). L'hyperglycémie pathologique est associée aux signes classiques du diabète : polyphagie (faim insatiable), polydipsie (soif intense), polyurie (urines fréquentes), perte de poids.

4. Syndrome métabolique et diabète de type 2 (non-insulino-dépendant; DNID).

Le diabète de type 2 est la forme la plus commune du diabète et représente 90% de la population diabétique. Un changement de comportement alimentaire et l'adoption d'un style de vie plus sédentaire sont des facteurs responsables de l'incidence élevée des cas de diabète de type 2, associé à l'obésité. De 1935 à 1996, la prévalence des cas diagnostiqués de diabète de type 2 a augmenté de 765% (CDCP, 1997; Basciano et al., 2005). Le maintien

de l'homéostasie du glucose implique l'action simultanée de trois tissus: le foie, le pancréas et le muscle squelettique (DeFronzo, 1988). Suite à l'ingestion d'un repas, les cellules β du pancréas sécrètent de l'insuline qui augmente la captation du glucose par les tissus périphériques (muscle squelettique, tissu adipeux) et en même temps freine la production hépatique de glucose (DeFronzo, 1988). Ces actions concertées permettent de rétablir rapidement le taux de glucose sanguin à un niveau normal. L'inefficacité de l'insuline à normaliser la glycémie, appelée résistance à l'insuline, serait une condition préalable au développement du diabète de type 2 (DeFronzo, 1988; Shepherd et Kahn, 1999). Cette situation entraîne une hyperinsulinémie compensatoire qui persiste jusqu'au moment où les cellules β du pancréas ne peuvent plus sécréter suffisamment d'insuline pour promouvoir le retour à une glycémie normale menant aux premiers symptômes cliniques du diabète (DeFronzo, 1988; Shepherd et Kahn, 1999).

La résistance à l'insuline et l'hyperinsulinémie sont fréquemment associées aux pathologies comme l'obésité, l'hypertension artérielle, la dyslipidémie et l'intolérance au glucose et portent le nom collectif de syndrome métabolique (anciennement connu comme syndrome X ou syndrome de résistance à l'insuline). Ce syndrome de la vie moderne, également appelé diabésité (*diabesity*) est présent chez 25 à 50% de la population des États-Unis (Basciano et al., 2005) et atteint des niveaux épidémiques dans d'autres pays comme l'Inde ou la Chine (Basciano et al., 2005). Le syndrome métabolique peut s'installer tôt dans la vie selon l'influence de la diète et des habitudes de vie moderne et sa persistance de l'enfance jusqu'à l'âge adulte conduit aux maladies cardio-vasculaires et au diabète de type 2 (Bao et al., 1996; Freedman et al., 2001).

Dans le passé, il a été montré que les diètes riches en gras saturés conduisent à la prise de poids, à l'insulino-résistance et à l'hyperlipidémie chez l'humain et les animaux (Romieu et al., 1988; Feskens et al., 1995; Kromhout et al., 1995). Le déclin ultérieur de la consommation des graisses n'entraîne pas la diminution de l'obésité mais au contraire, multiplie le nombre de cas (Willett, 2002). Des travaux plus récents mettent en cause la consommation élevée de carbohydrates, particulièrement des sucres raffinés à teneur élevée en fructose, pour expliquer les causes du syndrome métabolique (Basciano et al., 2005).

4.1 Modèles expérimentaux pour étudier le diabète de type 2

Hwang et al. (1987) a été le premier à montrer qu'une diète riche en fructose produit une hypertension artérielle chez les rats normaux. Une augmentation de la pression sanguine de 20 mmHg par rapport à la normale a été notée chez ces rats, une valeur inférieure à celle mesurée chez les rats SHR (Rodrigues et McNeill, 1986; Buchanan et al., 1992) ou traités au DOCA (*deoxycorticosterone acetate*) (Dai et McNeill, 1992). La même diète a causé une insulino-résistance, une hyperinsulinémie et une hypertriglycémie chez les rats normaux (Zavaroni et al., 1980; Tobey et al., 1982).

Il a été montré que l'augmentation de la pression sanguine induite par le traitement au fructose n'est pas due à l'activité élevée du système rénine-angiotensine (Hwang et al., 1989). Suite aux recherches montrant que l'entraînement physique simultanément à l'infusion de somatostatine atténue l'hypertension, l'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie induite par le fructose, Reaven et al. (1988; 1989) émettent l'hypothèse que l'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie jouent un rôle important dans la pathogénese de l'hypertension induite par le fructose.

Dans un autre modèle de diabète de type 2, chez des rats traités au glucose (10% dans l'eau à boire), l'hypertension et l'insulino-résistance ont été prévenues par un traitement anti-oxydant (diète riche en acide alpha lipoïque), ce qui suggère l'implication du stress oxydant dans ces complications du diabète (El Midaoui et de Champlain, 2002). La diète anti-oxydante prévient également l'augmentation du récepteur B₁ des kinines sans affecter la distribution du récepteur B₂ des kinines dans la moelle épinière chez les rats traités au glucose (El Midaoui et al., 2005). Le récepteur B₁ des kinines dans la moelle épinière joue un rôle dans la transmission des informations nociceptives et le contrôle de la pression artérielle (Couture et Lindsey, 2000; Couture et al., 2001). Le potentiel préventif de la diète antioxydante a été davantage exploré chez des rats traités conjointement avec le glucose et l'insuline et qui présentaient une densité élevée des récepteurs B₁ des kinines dans la moelle épinière. Le traitement antioxydant a prévenu l'augmentation des récepteurs B₁ dans la moelle épinière, ainsi que l'hypertension artérielle et la production de l'anion superoxyde dans l'aorte. Ces résultats suggèrent un rôle important pour le stress oxydant dans la genèse du récepteur B₁ des kinines et des complications diabétiques (El Midaoui et al., 2005).

5. Stress oxydant et diabète

Le stress oxydant est considéré comme un facteur pathogénique commun des complications diabétiques et devient une cible pour les traitements thérapeutiques. Dans un organisme sain, les radicaux libres issus de réactions métaboliques normales sont généralement rapidement inactivés par des mécanismes antioxydants endogènes efficaces. Le terme collectif de radicaux libres ou des espèces réactives d'oxygène (*reactive oxygen*

species ; ROS) regroupe les radicaux d'oxygène comme l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), le radical alkoxy (RO^{\bullet}), le radical peroxy (ROO^{\bullet}), les radicaux hydroxyl (OH^{\bullet}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les radicaux libres ont la propriété d'interagir avec les lipides, les protéines et les acides nucléiques en les oxydant. Le stress oxydant est dû soit à une production excessive de ROS ou soit à l'affaiblissement des mécanismes antioxydants de l'organisme. Les cellules de l'organisme contiennent un répertoire impressionnant d'enzymes antioxydantes bien que de petites molécules antioxydantes soient aussi issues de l'alimentation. Parmi les piègeurs de radicaux (*scavengers*) qui diminuent les phénomènes d'oxydation, notons : la superoxyde dismutase (SOD) qui accélère la transformation de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , la catalase, la glutathione peroxidase (GPX), l'ascorbate, les tocophérols, les caroténoïdes et l'ubiquinol (Beckman et Ames, 1998).

Plusieurs études ont montré que l'acide α -lipoïque, un puissant antioxydant, prévient la formation des produits terminaux de glycation (*Advanced Glycation End Products* ; *AGEs*) et du stress oxydant chez les rats diabétiques (Maritim et al., 2003; Midaoui et al., 2003). L'acide α -lipoïque, appelé aussi acide thioctique ou acide lipodominique est un composé naturellement trouvé dans la mitochondrie où il participe comme cofacteur dans les réactions énergétiques. Chez des vieux rats, la supplémentation diététique avec ce produit améliore la fonction mitochondriale et diminue le stress oxydant (Hagen et al., 1999). Chez les rats STZ-diabétiques, un traitement avec l'acide α -lipoïque normalise les biomarqueurs du stress oxydant (Maritim et al., 2003), rétablit la perfusion sanguine dans les nerfs périphériques (Nagamatsu et al., 1995) et le ganglion cervical supérieur considéré comme responsable de l'altération des fonctions nociceptives (Cameron et al., 2001) et

améliore la conduction distale des fibres nerveuses sensorielles et motrices (Nagamatsu et al., 1995; Cameron et al., 1998). Chez les rats Zucker (diabète de type 2), le traitement avec l'acide α -lipoïque augmente le métabolisme oxydatif et non oxydatif du glucose et diminue la résistance à l'insuline (Jacob et al., 1996). Il a été montré que la normalisation de la production de l'anion superoxyde dans les mitochondries empêche le dommage induit par l'hyperglycémie dans les cellules de l'endothélium (Nishikawa et al., 2000). Par rapport aux autres tissus du système cardiovasculaire, le cœur contient le nombre le plus élevé de mitochondries (40% du contenu des cellules myocardiques). Selon une étude plus récente, chez les rats traités au glucose (diabète de type 2), une diète à l'acide α -lipoïque prévient la formation de l'anion superoxyde dans les mitochondries du cœur et des AGE dans l'aorte (El Midaoui et de Champlain, 2002). Le même traitement prévient l'apparition de l'hypertension artérielle et l'insulino-résistance chez les rats traités au glucose pendant 4 semaines (Midaoui et al., 2003).

L'acide α -lipoïque a été approuvé en Europe pour le traitement de la neuropathie diabétique suite aux essais cliniques effectués chez des patients. Ces études ont montré qu'un traitement de courte durée (3 semaines) à l'acide α -lipoïque réduit les symptômes principaux et les déficits de la neuropathie diabétique jusqu'à un niveau jugé cliniquement acceptable. Un traitement prolongé à l'acide α -lipoïque (4-7 mois) améliore les déficits neuropathiques et la neuropathie autonome cardiaque chez ces patients (Ziegler, 2004). Aux États-Unis, un important essai clinique de phase III sur l'acide α -lipoïque est présentement en cours (Sullivan et Feldman, 2005).

Des rapports indiquent que les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IEC) augmentent les mécanismes de défense antioxydante dans les tissus

chez la souris (de Cavanagh et al., 1997) et rétablissent la déficience des systèmes antioxydants chez les patients hémodialysés chroniques par interaction avec le système de la NAD(P)H oxydase (de Cavanagh et al., 1999). Les IEC inhibent la formation de l'angiotensine II, qui est connue pour ses effets vasoconstricteurs, mitogènes et profibrotiques (Couture et Girolami, 2004). Tel que montré dans la figure 2, l'angiotensine II, via le récepteur AT₁, active la NAD(P)H oxydase qui joue un rôle important dans la formation de l'anion superoxyde et des autres ROS. L'inhibition du récepteur AT₁ ou de la formation de l'angiotensine II par les IEC inhibe la NAD(P)H oxydase ce qui va ainsi bloquer le stress oxydant directement à son origine (Couture et Girolami, 2004). Les IEC augmentent aussi la formation de NO, via l'accumulation des kinines, qui exerce un effet inhibiteur sur la NAD(P)H oxydase et prévient les effets négatifs de la formation de ROS : augmentation de la prolifération cellulaire, bioactivité réduite pour le NO, peroxydation des lipides (Lee et al., 2000a; b).

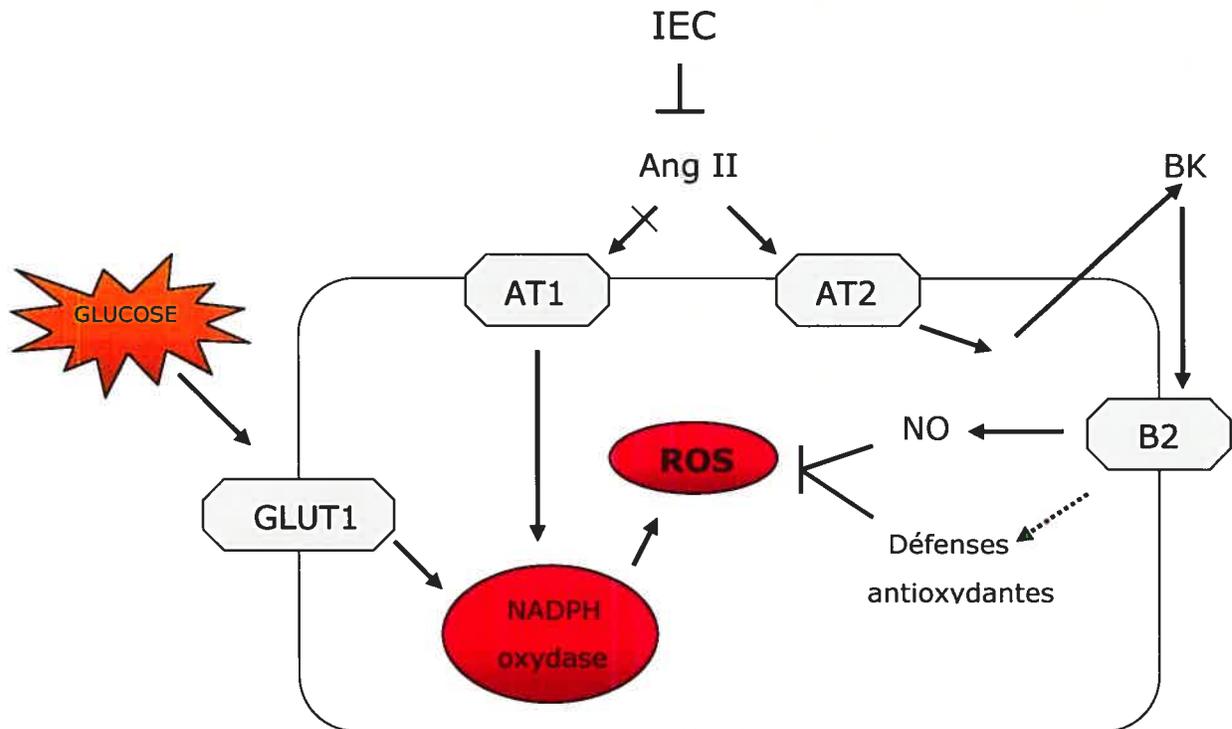


Figure 2. Représentation schématique du rôle des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (IEC) dans la réduction du stress oxydant durant l'hyperglycémie.

Les IEC préviennent la formation de l'angiotensine II, qui stimule, via le récepteur AT1, la NADPH oxydase et la production des espèces réactives d'oxygène (ROS). Par contre, la stimulation du récepteur AT2 de l'angiotensine II, produit des effets antioxydants, via l'activation du récepteur B₂ des kinines. La bradykinine active le récepteur B₂ et produit le monoxyde d'azote (NO), un puissant piègeur de radicaux libres mais stimule aussi d'autres mécanismes de défenses antioxydantes.

Adapté de : Couture et Girolami, 2004

6. La neuropathie diabétique

Les neuropathies constituent un groupe hétérogène de maladies, d'étiologie multiple, souvent rencontrées dans le diabète de type 1 et de type 2 ce qui suggère que l'atteinte du système neurologique n'est pas relié à la déficience d'insuline mais à l'hyperglycémie (Calcutt et al., 1996). Jusqu'à la moitié des patients diabétiques des États-Unis peuvent développer une neuropathie durant leur vie (Boulton et al., 2005). La neuropathie augmente le risque d'amputation de 1,7 fois et de 36 fois si le patient a une histoire positive d'ulcère diabétique (Armstrong et al., 1998). La neuropathie diabétique est classifiée selon le type de fibres atteintes. Ainsi, elle peut affecter les fibres sensorielles, motrices ou autonomiques ce qui oblige à considérer chaque type de fibre nerveuse comme vulnérable. Tout organe dont la fonction est contrôlée par l'innervation peut être affecté par la neuropathie diabétique.

La forme la plus commune de neuropathie diabétique est la polyneuropathie sensori-motrice périphérique. Cette neuropathie affecte les fibres nerveuses des membres inférieurs et l'atteinte est le plus souvent distale, sensitive et symétrique (Duby et al., 2004). Les patients décrivent de la douleur, des paresthésies (sensations anormales) et de l'engourdissement. Les symptômes douloureux apparaissent chez un pourcentage minoritaire de patients diabétiques atteints de neuropathie (11-32%) (Duby et al., 2004). La perte de sensation est un symptôme plus commun et qui se manifeste en cours du diabète (Vinik et al., 2000).

Une autre cause importante de morbidité et de mortalité dans le diabète est la neuropathie autonome qui affecte les fibres nerveuses autonomes des systèmes cardiovasculaire, digestif et génito-urinaire. L'infarctus du myocarde silencieux, la

dépression respiratoire et la mort subite sont des dangers pour le patient diabétique atteint de neuropathie autonome (Duby et al., 2004; Vinik et Mehrabyan, 2004). La neuropathie autonome cardiovasculaire a été la plus étudiée à cause de son importance clinique majeure. Elle peut affecter autant l'innervation sympathique que parasympathique du cœur et des vaisseaux coronaires (Vinik et al., 2003). Une analyse des données publiées a aussi montré qu'une réduction de la fonction autonome cardiovasculaire augmente fortement le risque d'apparition de l'infarctus silencieux et des décès (Vinik et al., 2003).

Au niveau cellulaire, chaque tissu a une réponse spécifique au glucose qui dépend de l'expression des transporteurs du glucose (GLUTs) sur la membrane plasmatique (Heilig et al., 1997). La réponse la plus commune des transporteurs de glucose à des taux élevés de glucose est la régulation à la baisse de leur expression membranaire ce qui leur permet de se protéger contre les effets toxiques de l'excès du glucose. Un exemple est GLUT-4, un transporteur de glucose insulino-dépendant, présent dans le muscle squelettique et le tissu adipeux, qui diminue son expression pendant l'hyperglycémie, ce qui conduit à une résistance à l'insuline (Heilig et al., 1997). Les cellules sensibles à des concentrations élevées de glucose (rétiennes, mésangiales et neuronales) expriment GLUT-1, un transporteur de glucose insulino-indépendant. Ce transporteur est régulé à la hausse par l'excès de glucose extracellulaire (Heilig et al., 1997; 2001) et facilite l'influx rapide du glucose excédentaire dans ces cellules. L'augmentation rapide des taux de glucose intracellulaire produit l'activation des protéines kinases C, des voies de polyols, du diacylglycérol, du TGF- β (Heilig et al., 1997; Ha et Kim, 1999) et la voie des MAP kinases (*mitogen activated protein kinases*) (Cellier et al., 2003). Dans les cellules mésangiales, l'activation de ces différentes voies produit la synthèse et la libération en excès des

protéines de la matrice extracellulaire ce qui conduit à la sclérose glomérulaire et à l'insuffisance rénale diabétique. L'inactivation du gène du transporteur GLUT-1 par une molécule antisens qui possède une séquence complémentaire d'acides nucléiques et qui est capable de modifier l'expression de ce gène, protège la cellule mésangiale de l'induction du transporteur par le glucose et contre l'expression de la fibronectine (Heilig et al., 2001).

Le facteur déclenchant dans la pathogénèse de la neuropathie diabétique est l'hyperglycémie (Simmons et Feldman, 2002). L'hyperglycémie perturbe le métabolisme par plusieurs mécanismes (figure 3):

1) stimulation de l'activité de l'enzyme aldose-réductase qui conduit à l'accumulation de sorbitol et de fructose (*via* sorbitol déhydrogénase) et à la diminution de la concentration intraneuronale de myoinositol ;

2) auto-oxydation du glucose avec production subséquente des espèces réactives d'oxygène;

3) formation des produits terminaux de glycation (*advanced glycation end products ; AGEs*) suite à la glycation non enzymatique des protéines, des lipides et des acides nucléiques ;

4) activation inappropriée de la protéine kinase C (PKC) (Simmons et Feldman, 2002).

Ces changements métaboliques conduisent au stress oxydant et interfèrent avec la fonction des mitochondries provoquant l'apoptose des neurones et des cellules de Schwann. De plus, les lésions vasculaires, notamment dans les microvaisseaux des nerfs périphériques (microangiopathie épineurale et endoneurale), les lésions dégénératives

(diminution de l'activité du *nerve growth factor*) et les anomalies auto-immunitaires, peuvent accélérer et aggraver les lésions nerveuses (Haberer, 1998).

La douleur associée à la neuropathie diabétique se manifeste spontanément à des stimuli normaux (allodynie) ou faiblement nociceptifs (hyperalgésie) (Brown et Asbury, 1984; Clark et Lee, 1995; Khan et al., 2002). Parmi les mécanismes pathologiques de la neuropathie diabétique, plusieurs ont été considérés : démyélinisation des nerfs périphériques, diminution de la vitesse de conduction dans les fibres nerveuses périphériques, dégénérescence des afférences sensorielles myélinisées ou non myélinisées (Dyck et al., 1988; Fox et al., 1999). Les incertitudes quant à la cause de la neuropathie diabétique expliquent les échecs des traitements médicamenteux.

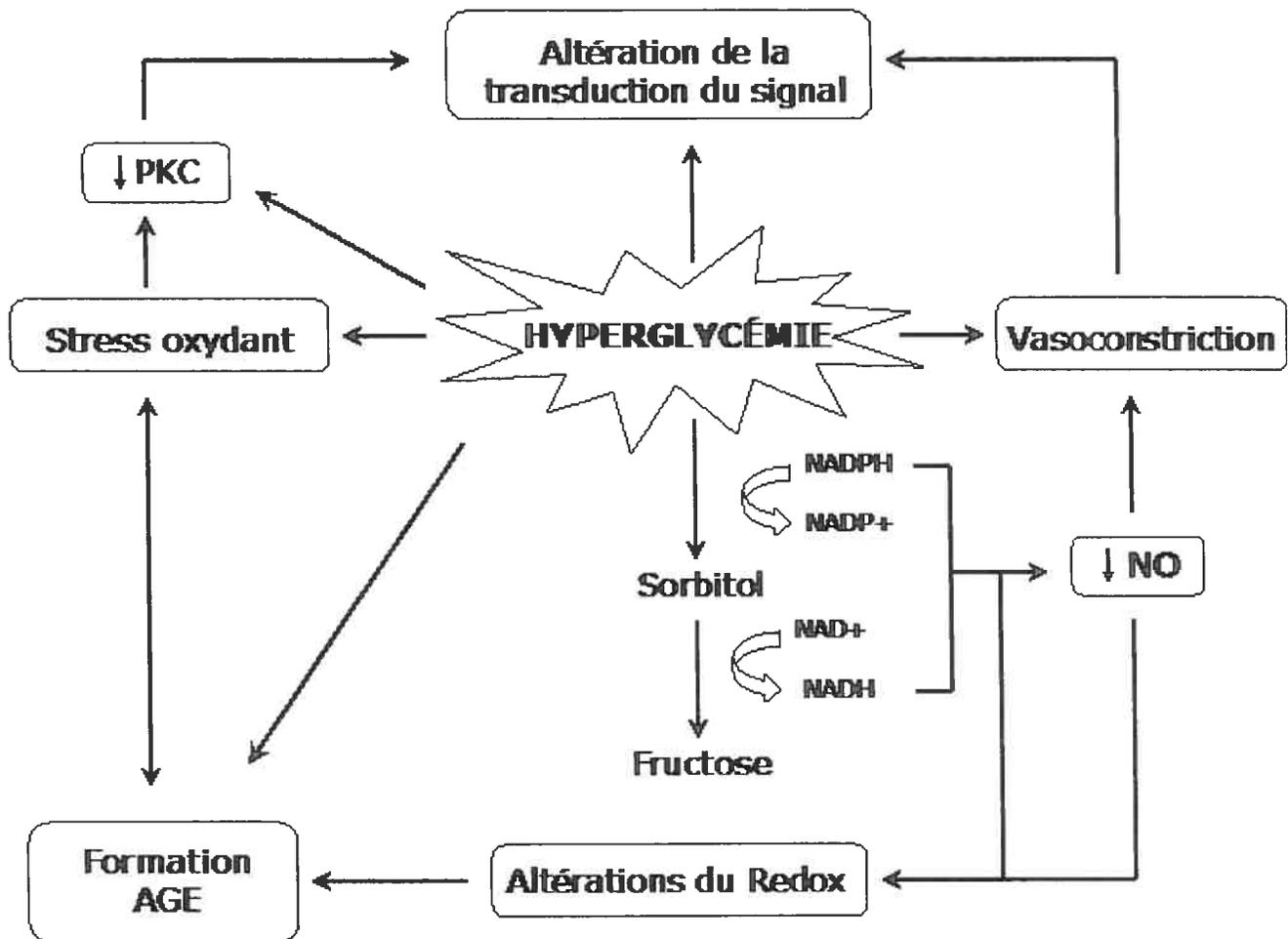


Figure 3. La pathogénèse multifactorielle de la neuropathie diabétique

Abréviations : AGE, produits terminaux de glycation; NAD⁺, nicotinamide adénine dinucléotide, forme positive; NADH, nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite; NADP⁺, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme positive; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, forme réduite; NO, monoxyde d'azote; PKC, protéine kinase C, ↓, diminution; ↑, augmentation.

Adapté de: Simmons et Feldman, 2002.

6.1 Modèles animaux pour étudier la douleur neuropathique

Les modèles animaux de choix pour les études comportementales sur la douleur neuropathique sont les rongeurs (le rat et la souris) et l'apparition des animaux transgéniques ouvre la voie à de nouvelles alternatives pour la recherche.

Les études sur les animaux éveillés sont fréquemment désignées comme des « études comportementales » parce que toutes les réponses, y compris un simple réflexe de retrait, font partie du répertoire comportemental de l'animal (Le Bars et al., 2001).

L'absence de la communication verbale est un obstacle dans l'évaluation de la douleur chez les animaux. La mesure de la « sensation douloureuse » se fait de manière indirecte. Il n'y a pas de moyens pour évaluer directement le type de douleur (coupante, lancinante, sourde, crampe, etc.) dans les modèles animaux. À l'exception du comportement aversif (vocalisation, léchage/secousse de la patte affectée) envers des stimuli potentiellement nociceptifs, toutes les autres mesures sont basées sur des réflexes nociceptifs. Ces réflexes sont mesurés par le temps de retrait de la patte ou de la queue suite à l'exposition à la chaleur, au froid ou à une pression. Les modèles animaux de douleur aiguë et chronique utilisent les mêmes enregistrements. Le "tail-flick test" (analgésimètre) et la plaque chauffante utilisent la stimulation thermique directe pour évoquer le retrait de la queue ou de la patte à des valeurs thermiques nociceptives (45°C ; 52°C). Ces tests permettent de détecter l'hyperalgésie thermique et la caractérisation des effets des drogues analgésiques ou anti-hyperalgésiques.

Chez les rats diabétiques, l'hyperalgésie à des stimuli nociceptifs thermiques (Lee et McCarty, 1992; Courteix et al., 1993), mécaniques (Ahlgren et Levine, 1993) ou chimiques (Courteix et al., 1993; Malmberg et al., 1993; Calcutt et al., 1995) a été rapportée. Les rats

traités avec la streptozotocine développent aussi l'allodynie thermique, mesurée par l'immersion de la queue dans l'eau à 42°C, une température qui n'évoque pas de réponses nociceptives chez les rats témoins (Courteix et al., 1993). L'allodynie mécanique se manifeste quand des stimuli anodins, non-douloureux provoquent le retrait de la patte. Les tests d'allodynie mécanique utilisent les filaments von Frey pour appliquer une pression légère sur la patte. En présence d'allodynie, le toucher léger est désagréable et l'animal retire sa patte. L'allodynie mécanique (aussi appelée tactile) est un symptôme commun dans la neuropathie chez l'humain.

Pourtant chez le rat, le diabète insulino-dépendant induit par la streptozotocine n'induit pas la démyélinisation segmentaire ou la dégénérescence des fibres nerveuses comme chez l'humain (Calcutt et al., 1996). Une étude par Thomas et Tomlinson (1993) montre que les anomalies morphologiques dans ce modèle sont limitées à une diminution du calibre axonal et à la réduction de la vitesse de conduction dans les fibres nerveuses.

Une controverse existe dans la littérature concernant le rôle des fibres de type C dans la neuropathie diabétique. Ainsi, des études en électrophysiologie ont suggéré que la neuropathie diabétique est le résultat d'une hyperactivité des fibres de petit calibre, de type C (Burchiel et al., 1985; Chen et Levine, 2001). Une augmentation des décharges spontanées a été enregistrée dans ces fibres, dans le diabète par rapport à l'état normal. Mais une autre étude chez les rats STZ-diabétiques a montré que l'administration systémique de la résinifératoxine, un puissant analogue de la capsaïcine qui produit une déplétion et une désensibilisation de longue durée des fibres non-myélinisées de type C, ne bloque pas l'apparition et le développement de l'allodynie tactile (Khan et al., 2002). La

même étude a montré que les stimulations sensorielles anormales via les fibres A δ et A β sont à l'origine de la douleur neuropathique dans le diabète.

7. Le système kallibréine-kinines

Les kinines (bradykinine, kallidine) sont générées en périphérie pendant les dommages tissulaires et jouent un rôle critique dans la pathogénèse de l'inflammation et de la douleur. Ces peptides sont aussi des neuromédiateurs des voies neuronales impliquées dans le contrôle central de la pression artérielle et de la nociception (Couture et Lindsey, 2000).

Tel que présenté dans la figure 4, les kinines sont générées par le clivage enzymatique de leurs précurseurs, les kininogènes, par des protéases sériques nommées kallibréines (Bhoola et al., 1992).

Les kinines sont soumises à une dégradation métabolique rapide par des amino-, carboxy- et endopeptidases trouvées dans les tissus et les liquides biologiques. Les enzymes qui ont un rôle physiologiquement important sont la kininase I (carboxypeptidase N du plasma ou M de la membrane cellulaire) qui clive l'arginine de sa position COOH-terminale pour produire les métabolites actifs des-Arg⁹-bradykinine et des-Arg¹⁰-kallidine ; l'endopeptidase neutre 24.11 (enképhalinase) et la kininase II, également appelée l'enzyme de conversion de l'angiotensine I (ECA) qui clivent le dipeptide Phe⁸-Arg⁹ de la position COOH-terminale de la bradykinine pour produire le métabolite inactif BK (1-7). La kininase II enlève également le fragment Ser⁶-Pro⁷ du métabolite BK (1-7). Le peptide qui résulte, BK (1-5), est le métabolite final de la bradykinine et de la des-Arg⁹-bradykinine.

La kallidine et son métabolite actif des-Arg¹⁰-kallidine peuvent être convertis en bradykinine et en des-Arg⁹-bradykinine par l'activité des aminopeptidases (Campbell, 2000; Couture et Lindsey, 2000).

7.1 Récepteurs des kinines

Les kinines produisent leurs effets par l'activation de deux types de récepteurs trans-membranaires couplés aux protéines G : les récepteurs B₁ et B₂ (Marceau et Regoli, 2004). Le récepteur B₂ est constitutif chez l'humain et est activé par la bradykinine et la kallidine, tandis que le récepteur B₁ est sous-exprimé dans les tissus sains et il est activé par les métabolites dépourvus de l'Arg en position COOH-terminale : des-Arg⁹-bradykinine et des-Arg¹⁰-kallidine. L'induction et l'augmentation de l'expression du récepteur B₁ ont lieu après un dommage tissulaire ou en présence d'endotoxine bactérienne, de facteurs de croissance et de cytokines comme IL-1 β ou TNF- α (Marceau et al., 1998). L'induction du récepteur B₁ des kinines est contrôlée par les MAP kinases (*mitogen-activated protein kinases*) et le facteur de transcription nucléaire NF- κ B (Schanstra et al., 1998; Sardi et al., 1999). L'analyse séquentielle du gène du récepteur B₁ des kinines a montré la présence de sites de régulation pour le facteur NF- κ B dans la région promotrice du gène (Bachvarov et al., 1996). Un rôle pour le NO dans l'induction du récepteur B₁ par le stress thermique chez le rat a aussi été postulé (Lagneux et al., 2000).

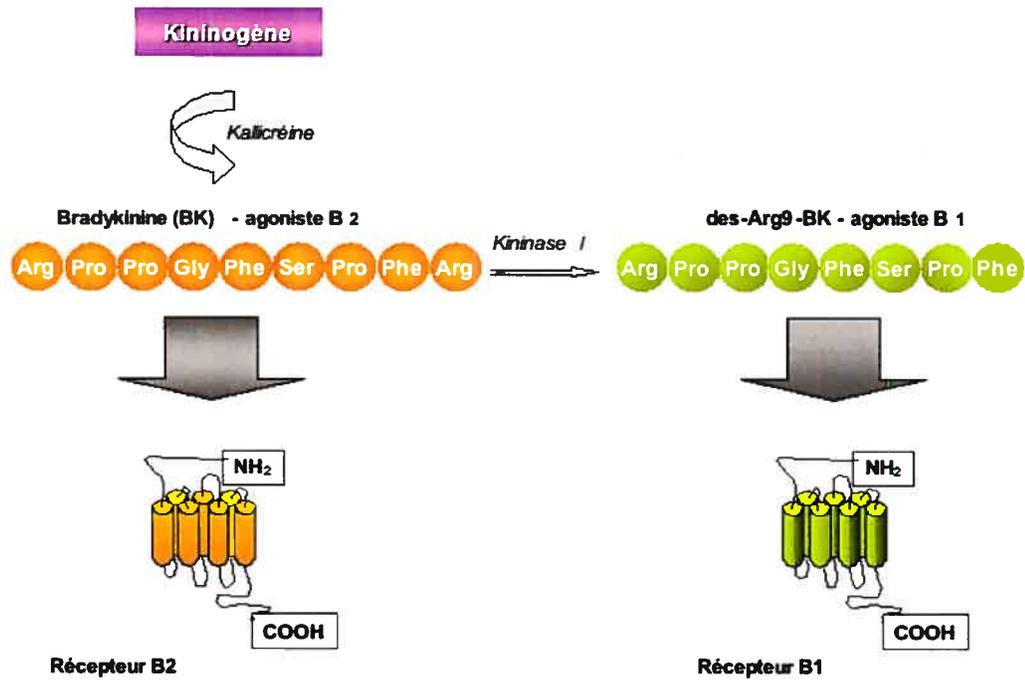


Figure 4. Synthèse et récepteurs des kinines.

La BK est l'agoniste préférentiel du récepteur B₂, tandis que son métabolite principal, la des Arg⁹-BK, est l'agoniste du récepteur B₁.

7.2 Voies de signalisation des récepteurs des kinines

Les voies de signalisation des récepteurs B₁ et B₂ sont différents, selon le type cellulaire et incluent :

- l'activation directe ou indirecte de l'adénylate cyclase et de la guanylate cyclase menant à la formation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC) et de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc) ;

- l'activation des canaux ioniques ;

- l'activation des phospholipases A₂, C et D. La phospholipase C (PLC) stimule la formation de l'inositol 1,4,5- triphosphate (IP3) et du diacylglycérol (DAG), impliqués respectivement dans la libération du Ca²⁺ intracellulaire et dans l'activation de la protéine kinase C (PKC) ;

- la production de l'acide arachidonique issu des phospholipides membranaires, via l'activation de la phospholipase A₂ (PLA₂) ou à partir du diacylglycérol (DAG) sous l'action d'une lipase, génère les prostaglandines (PG) et la prostacycline (PGI₂) (Gallagher et al., 1998; Yamasaki et al., 2000).

Mis à part la cascade de signalisation classique des récepteurs couplés aux protéines G, des voies de signalisation alternatives, indépendantes du recrutement des protéines G, viennent d'être décrites. Une interaction directe a été montrée entre le récepteur B₂ et des enzymes comme la phospholipase C_γ, la NO synthase neuronale (NOSn), la NO synthase endothéliale (NOSe) (Harris et al., 2001; Bascands et al., 2003) et la tyrosine phosphatase SHP₂ (Duchene et al., 2002b; Bascands et al., 2003).

Ces voies alternatives de signalisation intracellulaire peuvent expliquer les effets opposés des kinines observés sur la prolifération des cellules en culture, incluant les

fibroblastes, les cellules du muscle lisse et les cellules mésangiales. Selon les conditions expérimentales, les agonistes des récepteurs des kinines stimulent ou inhibent la prolifération de ces cellules. L'activation de la voie classique des protéines G a été associée avec les effets pro-mitogènes des kinines (Alric et al., 1999; Bascands et al., 2003), tandis que l'effet inhibiteur sur la prolifération cellulaire implique des mécanismes alternatifs : activation de la NO synthase (NOS) ou interaction directe protéine - protéine entre le récepteur B₂ des kinines et la protéine tyrosine phosphatase qui n'implique pas l'activation de la protéine G (Duchene et al., 2002a; b).

8. Rôle des kinines dans le diabète

Plusieurs études suggèrent l'implication du système kallibréine-kinines dans le diabète. Chez l'humain, des rapports cliniques montrent une excrétion rénale augmentée (Mayfield et al., 1984) ou diminuée (Pelikanova et al., 1998) de la kallibréine chez les sujets atteints du diabète de type 1 insulino-dépendant et une excrétion rénale diminuée chez les patients atteints du diabète de type 2 avec néphropathie (Baba et al., 1986). Les preuves récentes suggèrent que la kallibréine tissulaire est la principale enzyme génératrice des kinines, *in vivo* (Meneton et al., 2001). Chez les patients ayant un diabète de type 1, des valeurs élevées de pré-kallibréine plasmatique ont été associées avec l'augmentation de la pression artérielle et la macroalbuminurie (Jaffa et al., 2003), ce qui amène à considérer la pré-kallibréine plasmatique comme un marqueur de risque pour l'hypertension et la néphropathie.

Chez le rat diabétique type 1, des taux circulants élevés de kininogène et de pré-kallibréine ont été trouvés (Rothschild et al., 1999) malgré une expression réduite du gène

de la kallibréine dans le myocarde cardiaque et le rein (Jaffa et al., 1997; Tschope et al., 1999).

La production rénale élevée des kinines dans le diabète de type 1 conduit à l'hyperfiltration glomérulaire et à la vasodilatation rénale qui peuvent être inhibées par un antagoniste du récepteur B₂ des kinines (Jaffa et al., 1995). Les kinines contribuent partiellement à l'effet antiprotéinurique des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) dans la néphropathie diabétique (Tschope et al., 2003). L'effet bénéfique des IEC est associé à des taux élevés de la bradykinine et contraste avec l'action des antagonistes des récepteurs B₂ des kinines qui diminuent l'excrétion rénale des protéines, nitrites et kallibréine chez la souris diabétique (diabète de type 1) (Zuccollo et al., 1996).

Les avancements récents dans le domaine de la génétique et de la biologie moléculaire permettent de définir de manière plus spécifique l'implication des kinines et de leurs récepteurs dans le diabète. Chez la souris dont le gène pour la kallibréine tissulaire a été invalidé, des niveaux diminués de kinines sont trouvés dans la majorité des tissus. L'animal développe des malformations cardio-vasculaires malgré une pression artérielle normale (Meneton et al., 2001; Trabold et al., 2002). Dans un même modèle de souris, une autre étude rapporte une augmentation de la pression artérielle (Kim et al., 1995). Chez le rat, dans un modèle d'hypertension génétique (SHR, *spontaneously hypertensive rat*), l'administration par voie i.v. ou i.c.v., *via* un vecteur viral, du gène de la kallibréine humaine diminue la pression artérielle systolique et améliore les dysfonctions cardiovasculaires et rénales associées à l'hypertension (Wang et al., 1995; Jin et al., 1997). La même thérapie génique réduit l'hypertension, l'insulino-résistance et l'hyperinsulinémie dans un modèle de diabète de type 2 (Zhao et al., 2003).

Chez des souris STZ diabétiques, une hyperalgésie thermique a été observée une semaine après l'induction du diabète (Gabra et Sirois, 2002). Cette hyperalgésie a été significativement améliorée après l'administration d'antagonistes sélectifs du récepteur B₁ (Gabra et Sirois, 2003). Plus récemment, une hyperalgésie a été documentée chez la souris diabétique non-obèse (NOD ; *Non-Obese Diabetic mice*) (Gabra et Sirois, 2005a) et chez le rat, dans 2 modèles de diabète de type 1 : le modèle STZ et le modèle BB/WOR (*BioBreeding/Worcester*), un modèle de diabète auto-immun qui ressemble à celui rencontré chez l'humain. Une réponse exagérée au test de la plaque chauffante (hot plate test), due à la sensibilisation des terminaisons nerveuses périphériques et à la facilitation de la transmission nociceptive au niveau central, témoigne de la présence de l'hyperalgésie. L'hyperalgésie reste stable pendant quatre semaines chez le modèle STZ et jusqu'à 24 semaines de vie chez l'animal BB/WOR. Cette hyperalgésie a été significativement atténuée chez les deux types de rats après l'administration s.c du R-954, un antagoniste sélectif du récepteur B₁ (Gabra et al., 2005b).

Le récepteur B₁ des kinines semble servir comme médiateur dans l'hyperalgésie thermique chez la souris diabétique. Tel que montré dans une étude effectuée par Gabra et al. (2005c), l'hyperalgésie ne se manifeste pas chez la souris STZ diabétique dont le gène du récepteur B₁ a été invalidé (B₁R-KO). Chez cet animal, l'injection i.p. d'un agoniste du récepteur B₁ n'a pas entraîné de réponses nociceptives, contrairement à son témoin diabétique qui a présenté une augmentation de l'activité hyperalgésique après l'injection de l'agoniste.

Dans la moelle épinière et le cerveau des rats STZ diabétiques, l'hybridation in situ et l'autoradiographie des récepteurs (sites de liaison) ont montré une induction précoce du

récepteur B₁, 2 à 21 jours après l'induction du diabète (Ongali et al., 2004; Campos et al., 2005a; b). Le récepteur B₁ est distribué sur des sites responsables de la régulation cardiovasculaire et nociceptive (substance grise, corne dorsale et colonne intermédiolatérale, couche X) ce qui peut expliquer les réponses fonctionnelles observées in vivo.

L'activation du récepteur B₁ par un agoniste injecté par voie intrathécale produit une réponse vasopressive (Cloutier et Couture, 2000) et une hyperalgésie à une minute suivie d'une hypoalgésie à six minutes post-injection (Couture et al., 2001). Cette réponse nociceptive biphasique est présente 24 h après l'induction du diabète et reste stable pendant 21 jours. Le seuil nociceptif n'est pas modifié par l'agoniste B₁ chez les rats témoins (Couture et al., 2001). La réponse hyperalgésique de l'agoniste B₁ est bloquée par un antagoniste du récepteur B₁ (des-Arg¹⁰-Hoe 140), par un antagoniste du récepteur NK-1 de la substance P (LY 306740), par un inhibiteur de la NO synthase (L-NNA) et par un inhibiteur sélectif COX-2 (L745337), ce qui permet de retracer son mécanisme d'action. La réponse hyperalgésique de l'agoniste B₁ pourrait être due à l'activation des récepteurs B₁ situés sur les terminaisons nerveuses des fibres C, dans la corne dorsale de la moelle épinière. L'activation de ces récepteurs provoque la libération de la substance P dans la fente synaptique qui agit sur son récepteur, NK-1, avec une production subséquente du NO et des prostaglandines via COX-2. Ce mécanisme, schématisé dans la figure 5 produit la facilitation de la transmission nociceptive dans la moelle épinière des rats STZ-diabétiques.

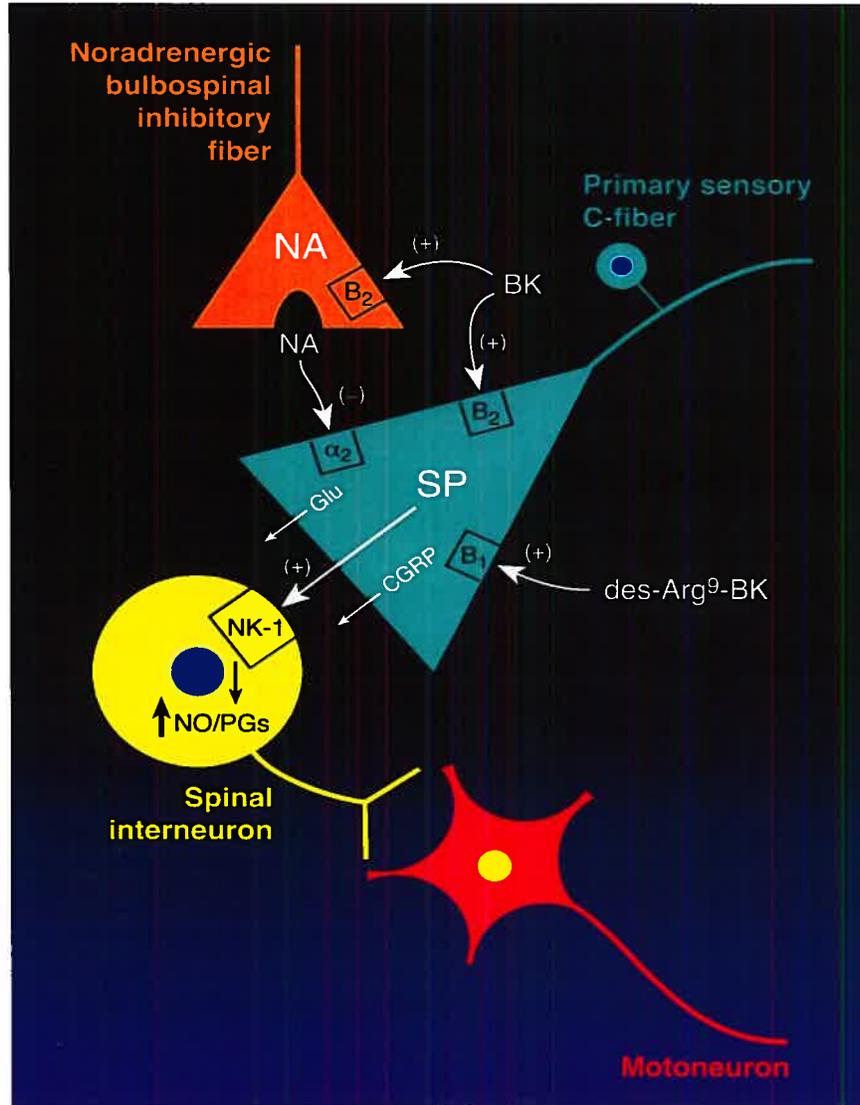


Figure 5. Représentation schématisée des mécanismes d'action de la bradykinine (BK) et de la des-Arg⁹-BK dans la nociception thermique chez le rat STZ-diabétique.

Abréviations : Glu, glutamate; CGRP, calcitonin gene related peptide; SP, substance P; NO, monoxyde d'azote; PGs, prostaglandines; NA, noradrénaline; (+), stimulation; (-), inhibition.

Tiré de : Couture et al., 2001

Une augmentation de l'expression du récepteur B₂ des kinines a été observée dans la moelle épinière du rat insulino-dépendant (Bascands et al., 2003; Campos et al., 2005b). L'activation directe de ce récepteur par voie intrathécale induit l'activation du système nerveux sympathique, elle-même responsable de l'augmentation de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque (Cloutier et Couture, 2000).

Chez les rats traités au glucose pendant 4 semaines une augmentation de la densité des récepteurs B₂ a été notée dans plusieurs couches de la moelle épinière (El Midaoui et al., 2005). Le stress oxydant n'était pas un facteur important dans l'induction de ce récepteur car une diète contenant de l'acide α -lipoïque n'a pas prévenu l'augmentation de l'expression du récepteur B₂ dans ce modèle (El Midaoui et al., 2005). Une expression augmentée du récepteur B₂ a été également retrouvée dans les cellules musculaires lisses en culture, en présence d'une concentration élevée du glucose (Christopher et al., 2001), dans l'hypothalamus et dans la glande hypophyse des rats Zucker diabétiques (Qadri et al., 2004). L'augmentation du récepteur B₂ peut refléter un changement dans la production locale de la bradykinine.

Au niveau central, le récepteur B₂ des kinines a été impliqué dans l'hyperalgésie. L'administration de l'endotoxine bactérienne chez le rat produit une fièvre ainsi qu'une hyperalgésie thermique et mécanique qui ont été atténuées ou abolies par l'administration i.c.v. de HOE 140, un antagoniste sélectif du récepteur B₂ (Dray, 1997).

9. Relation entre les kinines et l'insuline

L'insuline est un peptide de 6 kDa sécrété par les cellules β du pancréas dont la fonction principale est la régulation de l'homéostasie du glucose. Elle exerce ses effets via le récepteur de l'insuline, enclenchant ainsi une cascade de signaux intracellulaires qui culmineront par une augmentation de la captation du glucose par les muscles squelettiques et le tissu adipeux et une inhibition de la production de glucose par le foie. De plus, l'insuline stimule le stockage du glucose nouvellement entré dans les tissus périphériques sous forme de glycogène et de triglycérides ou encore favorise son oxydation via la glycolyse.

La BK stimule la libération de l'insuline par les cellules β pancréatique *via* l'augmentation du calcium intracellulaire en réponse à l'hyperglycémie (Yang et Hsu, 1997; Damas et al., 1999) et stimule la captation du glucose dans les adipocytes en culture (Isami et al., 1996) et le muscle squelettique chez l'humain (Dietze et al., 1996). Chez le rat Zucker, un modèle d'insulino-résistance et d'intolérance au glucose, la BK améliore la tolérance au glucose dans tous les tissus (Henriksen et al., 1998), suggérant ainsi que dans les tissus cibles, la BK locale peut réguler la captation et la disponibilité du glucose, indépendamment de la libération de l'insuline (Rett et al., 1990).

Le captopril (un IEC) et la BK renversent la résistance à l'insuline chez les vieux rats par la modulation des étapes précoces de la voie de signalisation de l'insuline dans le foie et le muscle (Carvalho et al., 1997). D'autres travaux montrent que les antagonistes sélectifs du récepteur B_2 de la BK diminuent la captation du glucose et la sensibilité à l'insuline et abolissent l'effet bénéfique des IEC sur la sensibilité à l'insuline (Tomiyama et al., 1994; Uehara et al., 1994; Kohlman et al., 1995; Henriksen et al., 1996; 1999).

L'effet bénéfique de la BK sur la captation du glucose induit par l'insuline se produit *via* l'activation du récepteur B₂ dont la présence sur le muscle strié a été démontrée par immunohistochimie, par des études de liaison et par RT-PCR (*reverse transcription-polymerase chain reaction*) (Figuroa et al., 1996; Rabito et al., 1996; Miyata et al., 1998).

Au niveau cellulaire, l'activation du récepteur B₂ stimule la phosphorylation du récepteur de l'insuline et de son substrat cytosolique (IRS-1; *insulin receptor substrate*) qui potentialise la translocation du transporteur GLUT-4 dans le muscle squelettique (Miyata et al., 1998) et les adipocytes (Isami et al., 1996; McCarty, 2003). La BK peut aussi stimuler directement la translocation du GLUT-4 et l'augmentation de la captation du glucose par une voie insulino-indépendante dans le muscle squelettique et cardiaque (Rett et al., 1996; Kishi et al., 1998). Ceci revêt une importance pendant l'exercice physique car la BK, relâchée localement suite à la contraction musculaire, peut faciliter le transport du glucose dans le muscle squelettique.

Ainsi, l'effet bénéfique de la BK et des IEC dans le diabète est dû à l'amélioration de la résistance à l'insuline par augmentation de la captation du glucose, principalement dans le muscle squelettique et à la prévention de la production du stress oxydant et de la matrice extracellulaire dans les cellules sensibles au glucose (rétine, neurones et reins).

10. Hypothèses de travail :

(1) Les kinines et le stress oxydant sont impliqués dans l'hypertension artérielle et les neuropathies mesurées dans un modèle expérimental de diabète de type 2.

(2) L'inhibition des récepteurs centraux et/ou périphériques des kinines aura un effet bénéfique sur la pression artérielle et les neuropathies sensorielles dans ce modèle.

11. Buts de l'étude

L'hypertension artérielle et les neuropathies sensorielles sont des complications souvent rencontrées dans le diabète de type 2. Nous avons voulu, dans un premier temps, les reproduire sur des rats rendus diabétiques suite à un traitement au glucose pendant 12-14 semaines (10% glucose dans l'eau à boire). Nous avons mesuré la pression artérielle, la sensibilité tactile et au froid et l'hyperalgésie thermique chez des rats témoins et diabétiques, à l'aide de la méthode du brassard et l'utilisation de stimuli non nociceptif mécanique (filaments von Frey) et froid (application d'acétone à la surface plantaire) ou nociceptif chaud (mesure du retrait de la queue).

Il est connu que le stress oxydant contribue à l'hypertension artérielle et à la résistance à l'insuline chez les rats nourris au glucose pendant 4 semaines (El Midaoui et de Champlain, 2002). Ainsi, dans ce modèle (adapté à des rats nourris au glucose pendant 12-14 semaines), nous avons visé à déterminer l'impact d'un traitement anti-oxydant (acide α -lipoïque) sur les anomalies sensorielles, l'hypertension artérielle et l'expression des récepteurs des kinines (ARNm par RT-PCR et sites de liaison par autoradiographie).

L'augmentation des sites de liaison des récepteurs B₁ et B₂ des kinines dans la moelle épinière des rats diabétiques traités au glucose pendant 4 semaines (El Midaoui et al., 2005) suggère un rôle possible des récepteurs centraux des kinines à l'initiation ou au maintien de l'hypertension artérielle associée à l'insulino-résistance. Ainsi, dans notre modèle de rats traités au glucose pendant 12-14 semaines, nous avons bloqué les récepteurs B₁ et B₂ des kinines au niveau central à l'aide de deux antagonistes non-peptidiques, capables de traverser la barrière hémato-encéphalique : LF 22-0542 pour le récepteur B₁ et LF16-0687 pour le récepteur B₂. Après administration, nous avons enregistré leurs effets sur la pression artérielle et les anomalies sensorielles. De plus, un antagoniste peptidique qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique (R-715) a été utilisé pour déterminer la participation du récepteur B₁ périphérique dans les réponses anti-hypertensive et anti-allodynique observées avec l'antagoniste LF 22-0542. Ces travaux mettent en relief les effets opposés des kinines au niveau central et périphérique dans le contrôle du diabète et de ses complications.

DEUXIÈME CHAPITRE

Article: Involvement of kinin B₁ receptor and oxidative stress in pain neuropathy and arterial hypertension in an experimental rat model of type 2 diabetes

Article soumis pour publication dans "Diabetologia" (janvier 2007)

Involvement of kinin B₁ receptor and oxidative stress in pain neuropathy and arterial hypertension in an experimental rat model of type 2 diabetes

C. Lungu¹, J. P. Dias¹, C. Estevão de França¹, B. Ongali¹, D. Regoli², F. Moldovan³, R. Couture^{1*}

¹ Department of Physiology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montreal, Quebec, Canada H3C 3J7

² Dept of Pharmacology, University of Ferrara, Via Fossato di Mortara 19, 44100 Ferrara, Italy

³ Faculty of Medical Dentistry, Research Centre of St-Justine Hospital, Université de Montréal, 3175 Côte Sainte-Catherine, Montreal, Quebec, Canada H3T 1C5

Word count in Abstract: 243

Word count in main text: 3958

***Corresponding author**

E-mail address: [REDACTED]

Tel.: + 1 514 343 7060; fax: + 1 514 343 2111

Abstract

Aims/hypothesis: Diabetes causes neuropathy and cardiovascular complications which are resistant to most current therapy. This study aims at defining the contribution of kinin B₁ receptor and the oxidative stress in a rat model of type 2 diabetes.

Methods: Rats were fed with 10% D-glucose for a chronic period of 12-14 weeks and the impact of a diet supplemented with alpha-lipoic acid, a potent antioxidant, was determined on tactile and cold allodynia, arterial hypertension and the expression of kinin B₁R (real-time PCR and autoradiography) in several tissues. Acute effects of brain penetrant (LF22-0542) and peripherally acting (R-715) B₁R antagonists were also assessed.

Results: Glucose-fed rats exhibited tactile and cold allodynia along with increases in systolic blood pressure between 4 and 12 weeks; these alterations were alleviated by alpha-lipoic acid. B₁R mRNA was virtually absent in liver, aorta, lung, kidney and spinal cord isolated from control rats, yet B₁R mRNA was markedly increased in all tissues in glucose-fed rats. Up-regulated B₁R mRNA and B₁R binding sites (spinal cord) were significantly reduced by alpha-lipoic acid in glucose-fed rats. LF22-0542 reduced tactile and cold allodynia (3 h) and reversed arterial hypertension (4-48 h) in glucose-fed rats. R-715 abolished tactile and cold allodynia but had not effect on blood pressure.

Conclusions/interpretation: Data provide molecular evidence that the oxidative stress is involved in the overexpression of B₁R in this rat model of type 2 diabetes. The inducible B₁R contributes centrally to arterial hypertension and in the periphery to pain neuropathy.

Keywords: Bradykinin; B₁ receptor; diabetes mellitus; allodynia; neuropathy; arterial hypertension; oxidative stress; alpha-lipoic acid

Abbreviations

B ₁ R	kinin B ₁ receptor
B ₂ R	kinin B ₂ receptor
BK	bradykinin
IML	intermediolateral cell column
IMM	intermediomedial cell column
L	lamina
LA	alpha-lipoic acid
NF-κB	transcription factor nuclear factor kappa B
PKC	protein kinase C
Real-time PCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
STZ	streptozotocin

Introduction

Kinins are traditionally known as vasoactive peptides promoting pain and inflammation, yet they are also believed to participate centrally to somatosympathetic cardiovascular reflexes triggered by noxious stimuli [1, 2]. These peptides signal through the activation of two transmembrane G-protein-coupled receptors named B₁ and B₂ receptors. Bradykinin (BK) and kallidin are the natural agonists for the prevailing B₂ receptor (B₂R), while the B₁ receptor (B₁R) is preferentially activated by des-Arg⁹-BK and des-Arg¹⁰-kallidin [3]. Whereas the B₂R is constitutive, the B₁R is generally absent or underexpressed in healthy tissues and animals. The latter receptor is induced and up-regulated during tissue injury and by exposure to bacterial endotoxins or cytokines [4, 5]. In the acute rodent model of type 1 diabetes induced by streptozotocin (STZ), B₁R is induced and over expressed in the spinal cord [6], the brain [7] and peripheral tissues where it mediates microvascular, inflammatory and hyperalgesic effects [8-13]. The overproduction of cytokines and hyperglycaemia-induced oxidative stress in type 1 diabetes are thought to represent the stimuli responsible for the induction of B₁R which requires the activation of the transcription factor nuclear factor kappa B (NF-κB) [14].

A role for B₁R in thermal hyperalgesia is also suggested in genetic models of type 2 diabetes [15]. Recently, we reported that B₁R binding sites are increased in the spinal cord of rats treated for 4 weeks with glucose, an experimental model of type 2 diabetes which developed insulin resistance, arterial hypertension and increased vascular and cardiac oxidative stress [16-18]. Alpha-lipoic acid (thioctic acid), a powerful endogenous scavenger of reactive oxygen species acting as a cofactor of key mitochondrial enzymes [19], prevented or attenuated all these symptoms [16, 18, 20], suggesting an association

between the oxidative stress, the induction of B₁R and cardiovascular complications in diabetes. The function of B₁R in this model remains, however, unknown.

The present study aims at testing, in a recently developed experimental model of insulin resistance and type 2 diabetes, the hypothesis that kinin B₁R is induced and contributes to pain neuropathy and arterial hypertension. Signs of pain neuropathy (tactile and cold allodynia), arterial hypertension and tissue B₁R expression were measured in rats fed with glucose for a chronic period of 12-14 weeks. The impact of the oxidative stress on these alterations was determined with a diet supplemented with alpha-lipoic acid. The relative contribution of central and peripheral B₁R in pain neuropathy and arterial hypertension were assessed by determining the inhibitory effects of non-peptide (LF22-0542) and peptide (R-715) B₁R antagonists.

Materials and Methods

Animals and protocols

Young male Sprague-Dawley rats (50-75g, Charles River, St-Constant, Que., Canada) bought a few days prior to experiments were housed two per cage, under controlled conditions of temperature (23°C) and humidity (50 %), on a 12h light-dark cycle and allowed free access to food and drinking fluid. All research procedures and the care of the animals were in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by NIH and the Canadian Council on Animal Care and were approved by the Animal Care Committee of our University.

Rats were randomly divided in 4 groups as follows: normal chow diet (Charles River Rodent) and tap water (Control; n=8), alpha-lipoic acid diet (1 g/kg feed) and tap water (Control + LA; n=8), normal chow diet plus 10 % D-glucose in the drinking water (Glucose; n=16), alpha-lipoic acid diet plus 10 % D-glucose in the drinking water (Glucose +LA; n=16) for 12-14 weeks. Alpha-lipoic acid (Ren's Feed Supplies Limited) was incorporated in the standard laboratory diet by Purina Canada (Mississauga, Ont., Canada).

Body weight and arterial blood pressure were measured weekly. Effects of LF22-0542 and R-715 on systolic arterial blood pressure were measured by tail-cuff photoplethysmography (Harvard Apparatus Ltd.) and registered using MacLab/8 system [18, 20]. For each measurement, four individual readings were averaged.

Tactile allodynia

Tactile allodynia was assessed by measuring weekly the hindpaw withdrawal threshold to von Frey filaments (bending forces ranging from 2g to 15g). Starting with the

filament that has the lowest force (2g), the filament was applied perpendicularly to the plantar surface with sufficient force to bend for 1-2 s. Brisk withdrawal or paw flinching was considered as positive response. Care was taken to stimulate random locations on the plantar surface. Each filament was applied five times to each paw (6-8 s per stimulation, with an inter stimulus interval of 1-2 min). Minimum recording of 5 positive responses (50%) out of 10 stimulations for both paws were considered as a positive response (threshold in grams). Absence of a response (less than 5 withdrawals) prompted use of the next filament of increasing weight. Control rat withdrawal threshold was between 12-15 g.

Cold allodynia

Cold allodynia was assessed weekly using the acetone drop method at the plantar surface of the hindpaws [21]. Acetone was applied five times to each paw at intervals of 4-5 min. Normal rats either ignored the stimulus or occasionally responded with a small and brief withdrawal. Allodynic rats responded with a prompt and intense paw withdrawal to acetone application. The frequency of paw withdrawal was expressed as a percentage (the number of paw withdrawals \div number of trials \times 100).

Thermal hyperalgesia

The nociceptive thermal threshold was measured weekly in awake rats placed in a plastic restraining cage and allowed to acclimatize for 15 min. It was taken as the reaction time to remove the tail by a brief vigorous movement from above a source of noxious radiant heat [22]. The intensity of the heat stimulus applied to the tip of the tail was set to produce the tail withdrawal within 9-12s for a normal rat. A 25s cut-off time was used to

prevent skin damage. Tail-flick was measured at 5-min intervals until a stable latency was obtained over four consecutive trials.

Kinin receptor antagonists

A novel non-peptide B₁R antagonist LF22-0542 [23] was tested in 12-13 weeks glucose-fed rats. The dose of LF22-0542 (10 mg/kg, s.c.) was chosen on the basis of its antinociceptive actions in diverse nociceptive tests and rat neuropathic pain [23]. Sensory testing was made prior to the administration of antagonist and 1 and 3 h later which corresponded to its maximal brain penetration and inhibition of hyperalgesia in the sciatic nerve ligation model of neuropathic pain (unpublished personal observation). Systolic blood pressure was recorded prior to the administration of antagonists and at 3 h, 1, 2, 4 and 7 days later. After recording the effects of LF22-0542 on blood pressure and allodynia on the testing day, the animals were returned to their home cages and given access to the same drinking solution of glucose.

In an additional group of 21 rats fed with 10% glucose for a period of 12-13 weeks, a stable peptide B₁R antagonist R-715 (3-10 mg/kg) [24] was administered intraperitoneally to assess its effect on blood pressure and allodynia up to 48h post-injection. This protocol aims at comparing the effects of a peripherally (R-715) and centrally (LF22-0542) acting B₁R antagonist.

Measurement of plasma glucose and insulin concentration

Glucose concentration from fasting animals was measured at 8 and 11 weeks after beginning of treatment, in a blood sample obtained from the tail by pinprick, with a glucose

oxidase-impregnated test strip and a reflectance meter (Accu-Check III, Boehringer Mannheim, Germany). After 14 weeks, overnight-fasted rats were anaesthetized with CO₂ inhalation and blood was rapidly collected from sectioned carotids and immediately transferred into a chilled tube containing 0.63 mg/ml heparin. The plasma was separated from blood cells by centrifugation and kept frozen at – 20°C for the later measurement of glucose with a glucometer (Elite, Bayer Inc., Toronto, Canada) and insulin by radioimmunoassay (rat insulin RIA kit, Linco Research, St. Charles, MO) using 100 µl of plasma [16, 18].

Tissue preparation for B₁R binding and mRNA expression

Spinal cord segments (T8-T11) were removed and immediately frozen in 2-methyl butane cooled at -45 to -55°C with liquid nitrogen and kept at -80°C for autoradiography. Other tissues (liver, thoracic aorta, lungs, kidneys) and a piece of thoracic spinal cord were removed and put in polyethylene microtubes containing TRIzol reagent (Life Technologies, Burlington, Ont., Canada) and then frozen with liquid nitrogen and stored at – 80°C until extraction of total RNA and measurement by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR).

In vitro receptor autoradiography

Spinal cord segments (T9-T10) of 4 rats per group were mounted in a gelatine block and serially cut into 20 µm thick coronal sections on a cryostat. A total of 5 slides (120 sections) were obtained for each group. Three slides were taken for the total binding and two slides (adjacent sections) for the non-specific binding and kept at -80°C until use.

Sections were thawed at room temperature, pre-incubated for 30 seconds in 25 mM piperazine-*N,N'*-bis[2-ethanesulphonic-acid] (PIPES) buffer (pH 7.4; 4°C) and incubated at room temperature for 90 min in the same buffer containing peptidase inhibitors and 150 pM [¹²⁵I]HPP-desArg¹⁰-Hoe 140 (specific activity: 2,000 cpm/fmol or 1,212 Ci/mmol) as described earlier [25, 26]. The non-specific binding was determined in the presence of 1 μM of unlabelled HPP-desArg¹⁰-Hoe140. Kodak Scientific Imaging Films BIOMAX™ MS (Amersham Pharmacia Biotech Canada) were juxtaposed onto the slides, exposed at room temperature for 3 days, developed in D-19 (Kodak developer) and fixed in Kodak Ektaflo. Autoradiograms were quantified by densitometry using an MCID™ image analysis system (Imaging Research, St. Catharines, Ont, Canada). A standard curve from [¹²⁵I]-microscales were used to convert density levels into femtomoles per milligram of tissue (fmol/mg tissue).

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

Total RNA was extracted from tissue (5 mg) samples using TRIzol reagent [27], and processed according to the manufacturer's instructions with an extra Dnase I digestion step in order to eliminate genomic DNA contamination. Total extracted RNA was reverse transcribed by using random hexamers. The resulting cDNA (2ng) was then mixed with 0.25 μM of each primer and 4 μM of the master mix QuantiTect™ SYBR^R Green PCR kit (QIAGEN, Canada) in 50 μl reactions volume. Real-time quantitative PCR was performed using a Rotor Gene 6000 series (Corbett Life Science). The system automatically monitors the binding of a fluorescent dye SYBR^R Green to double-stranded DNA by real-time detection of the fluorescence during each cycle of PCR amplification. After 2 min at 50 °C

for UNG incubation and 10 min at 95 °C for polymerase activation, 40 cycles of 15 s at 95 °C (denaturation) and 1 min at 60 °C (annealing and extension) were run. Only those reactions which gave a well defined amplification product both by melting curve analysis and agarose gel electrophoresis were included in the quantitative analysis.

All the PCR primers were designed by using Prime Express 2.0 software (Applied Biosystem, USA) and synthesized by MEDICORP Inc. (Montreal, Canada). The sequences are:

Bradykinin B₁R

Forward: 5'- CCA TCA GTC AGG ACC GCT ACA-3'

Reverse: 5'-CGA CTT TGA CGG AAC GCA GAA-3'

β-actin

Forward: 5'-AAC CCT AAG GCC AAC CGT GAA- 3'

Reverse: 5'-GCG CGT AAC CCT CAT AGA TG-3'

The $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [28] was employed to calculate relative changes in gene expression for B₁R between treatments. The threshold cycle (C_T) for housekeeping gene β-actin was used as reference to normalize a relative amount of mRNA for B₁R in the same sample. The ΔC_T was calculated for each treatment (C_T B₁R – C_T β-actin) and the value of untreated control (C_T B₁R – C_T β-actin) was subtracted to yield $\Delta\Delta C_T$. Real-time PCR was made on three replicates for each sample and a blank control (no template) was included in all the experiments for negative controls.

Chemicals and drugs

HPP-desArg¹⁰ Hoe 140 (3-(4 hydroxyphenyl)propionyl-desArg⁹-D-Arg⁰[Hyp³, Thi⁵, D-Tic⁷, Oic⁸]BK), developed from the selective B₁R antagonist des Arg¹⁰Hoe 140 [29], was kindly provided by Dr Witold Neugebauer (Dept Pharmacology, University of Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada). Iodination of HPP-desArg¹⁰Hoe 140 was performed with the chloramine T method as described earlier [25]. The selective non-peptide B₁R antagonist LF22-0542 (N-[[4-(4,5-dihydro-1*H*-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[[(4-methoxy-2,6dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methyl-acetamide, fumarate) was kindly provided by Fournier Laboratories, Daix, France. The selective peptide B₁R antagonist R-715 (AcLys[D-βNal⁷, Ile⁸]des-Arg⁹-BK) was developed in the laboratory of Dr Domenico Regoli. Antagonists were freshly prepared with sterile saline (0.9%). D-Glucose and other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Canada.

Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SEM of values obtained from (n) rats in each experimental protocol. Statistical analysis of data was performed with Graph-Pad Prism software. Statistical differences were evaluated with Student's *t*-test on unpaired (between groups) or paired (within the same group) samples. Multiple comparisons were analyzed using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Bonferroni or Dunnett post-test accordingly. Only probability values (*P*) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Effects of glucose and alpha-lipoic acid on basal parameters

As shown in Figure 1, rats fed with 10% glucose had their body weight slightly but not significantly reduced when compared to control rats during the protocol of 14 weeks. However, the diet enriched with alpha-lipoic acid decreased significantly the gain in body weight in both glucose-fed rats (6 to 14 weeks) and control rats (8 to 14 weeks). Plasma levels of glucose were significantly increased in glucose-fed rats at 8, 11 and 14 weeks when compared to age-matched control rats. The diet containing alpha-lipoic acid reduced significantly hyperglycaemia in glucose-fed rats but had no effect on plasma levels of glucose in control rats (Table 1). Plasma insulin concentration (ng/ml) at the time of sacrifice at 14 weeks (Control: 1.2 ± 0.2 ; Control + LA: 0.9 ± 0.2 ; Glucose: 4.9 ± 1.4 , $P < 0.05$; Glucose + LA: 1.8 ± 0.5 , $P < 0.05$) was increased by 4-fold in glucose-treated rats when compared to age-matched control rats and was normalized by alpha-lipoic acid. Systolic blood pressure was significantly higher in glucose-fed rats at 4 weeks and increased further at 8 and 12 weeks. Treatment with alpha-lipoic acid prevented the increase in systolic blood pressure in glucose-fed rats to values which were not significantly different from control values. Whereas alpha-lipoic acid had no significant effect on resting blood pressure in control rats, it did prevent the 10 mmHg increase that occurred during the aging period of 12 weeks (Fig. 2).

Effects of glucose and alpha-lipoic acid on the nociceptive threshold

Glucose-fed rats displayed significant tactile allodynia from 4 to 12 weeks when compared to age-matched control values (Fig. 3A). A positive response to the tactile von

Frey stimulus resulted in shaking, biting, licking and guarding the neuropathic paw. Paw withdrawal threshold in glucose treated rats remained stable until the end of the protocol in face of a gradual increase of baseline values in control rats. The antioxidant diet containing alpha-lipoic acid reduced tactile allodynia in glucose-fed rats whose values reached significance at 8 and 12 weeks. The latter values were not significantly different from those obtained in control rats treated with the same diet. Paw withdrawal threshold to the tactile stimulus was not significantly affected by the diet enriched with alpha-lipoic acid in control rats even though a descending trend was noted at 8 and 12 weeks (Fig. 3A).

Response frequency to acetone stimulation was significantly higher in glucose-fed rats than in control rats at 4 weeks and was maintained until 12 weeks. The diet containing alpha-lipoic acid reversed cold allodynia that occurred at 8 and 12 weeks in glucose-fed rats. The same diet, however, had no significant effect on the response frequency to cold stimulation in control rats and therefore failed to prevent the decline of cold sensitivity in aging rats (Fig. 3B).

The thermal nociceptive threshold as determined by the tail-flick test was not significantly different between glucose-fed rats and control rats throughout the 12 weeks protocol. The tail-flick reaction time had a tendency to increase in aging rats but remained similar and not significantly different in glucose-fed and control rats whatever the diet (Fig. 3C).

Effects of kinin B₁ receptor antagonists on allodynia

Two B₁R antagonists were administered to rats treated with glucose for 12-13 weeks. Doses of 3 and 6 mg/kg R-715, injected intraperitoneally, had no significant effect

on maximal values of tactile and cold allodynia in chronically glucose-fed rats, yet the dose of 10 mg/kg R-715 showed full blockade of tactile allodynia and cold allodynia in a time-dependent manner between 3 and 24 h post-injection (Fig. 4A-B). While the inhibitory effect of R-715 was over at 48 h on tactile allodynia, it was still significant on cold allodynia at this end-point.

The B₁R antagonist LF22-0542 (10 mg/kg), injected subcutaneously, partially inhibited tactile allodynia at 3 h post-injection in glucose-fed rats (Fig. 4A). The same treatment with LF22-0542 significantly reduced the response frequency to acetone stimulation after 3h (Fig. 4B).

Effects of kinin B₁ receptor antagonists on blood pressure

Treatment of glucose-fed rats (12 weeks) with intraperitoneal R-715 had no significant impact on high systolic blood pressure from 1 to 48h post-injection at doses of 3 and 6 mg/kg (data not shown) and 10 mg/kg (Fig. 5). However, subcutaneous injection of LF22-0542 (10 mg/ kg) reduced with a slow onset systolic blood pressure in glucose-fed rats (Fig. 5). When compared to pre-antagonist values, the depressor response peaked at 24h post-injection and returned gradually to pre-antagonist values during the following 6 days. The values after 3, 24 and 48 h post-injection were not significantly different from control values (125.4 ± 4.7 mmHg). The injection of vehicle had no significant effect on resting blood pressure values during the same period of 7 days in glucose-fed rats.

Effects of glucose and alpha-lipoic acid on kinin B₁R mRNA expression in various tissues

Levels of B₁R mRNA were not detectable in the thoracic spinal cord and peripheral tissues (aorta, liver, lung, kidney) in control rats treated either with a normal chow diet or a diet enriched with alpha-lipoic acid for a period of 14 weeks. However, treatment of rats with glucose for a period of 14 weeks led to a marked induction and over expression of B₁R mRNA in all tissues. The up-regulation of B₁R mRNA was significantly reduced in all examined tissues in glucose-fed rats treated with the diet enriched with alpha-lipoic acid (Fig. 6).

Effects of glucose and alpha-lipoic acid on kinin B₁R binding sites in the spinal cord

Quantitative autoradiography showed a significant increase of specific density of B₁R binding sites throughout the grey matter of the thoracic spinal cord in glucose-fed rats (14 weeks) when compared to age-matched control spinal cords. The diet containing alpha-lipoic acid reduced the density of B₁R binding sites in the various spinal cord regions of glucose-fed rats, notably in the dorsal and ventral horns, the intermediolateral (IML) and intermediomedial (IMM) cell columns (Fig. 7).

Discussion

The present study strongly suggests that the oxidative stress is directly responsible for the induction of arterial hypertension, pain neuropathy and the induction of B₁R in several tissues in chronically glucose-treated rats. The inducible B₁R appears to contribute substantially to these diabetic complications.

Arterial hypertension

Our data in glucose-fed rats are consistent with the values of arterial hypertension generally measured in patients and animal models of types 2 diabetes [30-33]. A likely causal factor involved in the increase of arterial pressure in glucose-fed rats is the generation of free radicals following high glucose intake. It was shown that a high carbohydrate diet is associated with the generation of reactive oxygen species [34]. Exposure of human aortic endothelial cells to high glucose increases the generation of highly reactive pro-oxidants such as peroxynitrite and superoxide anion [35]. Elevated plasma levels of superoxide and hydrogen peroxide have been reported in hypertensive patients [36, 37] and in the vasculature of hypertensive animals [38]. A positive correlation was shown between the degree of basal aortic superoxide production and the level of systolic blood pressure [18]. The diet enriched of alpha-lipoic acid in rats treated with glucose for a period of 4 weeks had an anti-hypertensive effect that was associated with a reduction of the production of vascular superoxide anion [16]. The present study confirms the anti-hypertensive effect of alpha-lipoic acid in glucose-fed rats treated for a much longer period (12 weeks).

Pain neuropathy

Tactile and cold allodynia occurred 4 weeks after the initiation of glucose treatment and persisted up to the end of the protocol. The sensitivity to tactile and cold stimulation was higher at the beginning of the experiment in young rats and declined in control aging rats. The identification of the mechanism of this phenomenon was beyond the scope of this study and may result from maturation changes in the neural circuitry. Most studies on neuropathic pain are performed in adult rats and comparison is rarely reported between young and adult rats, yet it is known that young rats show increased sensitivity to noxious thermal stimuli [39, 40, 41]. Importantly, the decrease sensitivity to tactile and cold stimulation with aging was not observed in glucose-fed rats which stress the development of allodynia.

Our data with a diet supplemented with alpha-lipoic acid indicates that the oxidative stress is also involved in pain neuropathy occurring in glucose-fed rats. In clinical studies, alpha-lipoic acid markedly reduced diabetic polyneuropathy and symptoms of pain perception [19, 42, 43]. Hence, glucose-fed rats represent a suitable model for studying diabetic neuropathy and the contribution of the oxidative stress.

Kinin B₁ receptor expression and function

The up-regulation of B₁R binding sites was mirrored by a marked increased of B₁R mRNA in the spinal cord of rats treated with glucose for a chronic period of 14 weeks. This means that B₁R are synthesized in the spinal cord. The distribution of B₁R was widespread all over the gray matter, overlapping the intermediolateral horn, lamina X and dorsal horn implicated in cardiovascular regulation and nociception [1]. It is worth noting that the

induction and overexpression of B₁R also occurred in the other examined tissues, namely liver, thoracic aorta, lung and kidney, and therefore they were not restricted to the spinal cord. The diet enriched with alpha-lipoic acid reduced B₁R gene expression in all tissues examined in glucose-fed rats, suggesting that the oxidative stress takes part to its induction and over expression.

The involvement of B₁R in the development of arterial hypertension and pain neuropathy in glucose-fed rats is directly supported by the pharmacological evidence with the selective B₁R antagonist LF22-0542 [23]. The anti-hypertensive effect of LF22-0542 seems to be centrally mediated because it was not mimicked by R-715, a peptide B₁R antagonist whose action is limited to the periphery. However, the same treatment with R-715 had a more rigorous inhibitory effect on tactile and cold allodynia, suggesting that pain neuropathy is peripherally mediated. This is congruent with the acute and chronic blockade of thermal hyperalgesia with R-715 in rodent models of diabetes [13, 44]. It is worth mentioning, however, that thermal hyperalgesia did not occur in our model of type 2 diabetes. This is based on the lack of changes on the thermal nociceptive threshold in the tail-flick test (present study) and in the paw-withdrawal test after plantar stimulation (unpublished observation). This would indicate that the glucose model of insulin resistance causes specific sensory abnormalities which are not shared by the genetic or immunological models of diabetes.

Hyperinsulinemia measured in glucose-fed rats is unlikely the stimulus for B₁R induction since the latter was also induced in STZ-diabetic rats, a model with insulin deficit [6, 7, 45]. The present study strongly suggests that hyperglycemia and the resulting

oxidative stress is the proposed mechanism which can activate PKC and the NF- κ B pathway involved in the induction of B₁R [4, 14].

In conclusion, the present findings provide molecular evidence that the oxidative stress is involved in the induction and up-regulation of B₁R in type 2 diabetes using an experimental rat model. The inducible B₁R contributes centrally to arterial hypertension and in the periphery to pain neuropathy. These diabetic complications could be inhibited and dissociated by centrally and peripherally acting B₁R antagonists. Hence, B₁R may represent valuable therapeutic targets for the treatment of pain neuropathy and arterial hypertension in type 2 diabetes.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant to R.C. from the Canadian Diabetes Association. Camilla Estevão de França held a Scholarship from the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico of Brazil (CNPq). The expert assistance of Dr. Jose Joao Mansure (Dept Microbiology and Immunology, Université de Montréal) with the real-time PCR is gratefully acknowledged.

Duality of interest. The authors declare that they have no duality of interest.

References

1. Couture R, Lindsey CJ (2000) Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neuronal pathways and physiological functions. In: Quirion R, Björklund A, Hökfelt Th (eds) Handbook of Chemical Neuroanatomy, Peptide Receptors, Part 1, vol. 16, Elsevier Science BV, Amsterdam, pp 241-300
2. Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001) Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161-176
3. Regoli D, Rizzi A, Perron SI, Gobeil F (2001) Classification of kinin receptors. *Biol Chem* 382: 31-35
4. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR (1998) The B₁ receptors for kinins. *Pharmacol Rev* 50: 357-386
5. DeBlois D, Horlick RA (2001) Endotoxin sensitization to kinin B₁ receptor agonist in a non-human primate model: haemodynamic and pro-inflammatory effects. *Br J Pharmacol* 132: 327-335
6. Ongali B, Campos MM, Petcu M et al (2004) Expression of kinin B₁ receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport* 15: 2463-2466
7. Campos MM, Ongali B, De Souza Buck H et al (2005) Expression and distribution of kinin B₁ receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse* 57: 29-37
8. Campos MM, Cabrini DA, Cardozo AHM, Rae GA, Toro J-PH, Calixto JB (2001) Changes in paw oedema triggered via bradykinin B₁ and B₂ receptors in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Pharmacol* 416: 169-177

9. Simard B, Gabra BH, Sirois P (2002) Inhibitory effect of a novel bradykinin B₁ receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 1203-1207
10. Mage M, Pécher C, Neau E et al (2002) Induction of B₁ receptors in streptozotocin diabetic rats: possible involvement in the control of hyperglycemia-induced glomerular Erk 1 and 2 phosphorylation. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 328-333
11. Vianna RM, Ongali B, Regoli D, Calixto JB, Couture R (2003) Up-regulation of kinin B₁ receptor in the lung of streptozotocin-diabetic rat: autoradiographic and functional evidence. *Br J Pharmacol* 138: 13-22
12. Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hassessian HM (2003) Early upregulation of kinin B₁ receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol* 140: 33-40
13. Gabra BH, Sirois P (2003) Kinin B₁ receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides* 37: 36-44
14. Couture R, Girolami J-P (2004) Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol* 500: 467-485
15. Gabra BH, Berthiaume N, Sirois P, Nantel F, Battistini B (2006) The kinin system mediates hyperalgesia through the inducible B₁ receptor subtype: evidence in various experimental animal models of type 1 and type 2 diabetic neuropathy. *Biol Chem* 387: 127-143
16. El Midaoui A, Ongali B, Petcu M et al (2005) Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides* 26: 1323-1330

17. El Midaoui A, de Champlain J (2005) Effects of glucose and insulin on the development of oxidative stress and hypertension in animal models of type 1 and type 2 diabetes. *J Hypertens* 23: 581-588
18. El Midaoui A, de Champlain J (2002) Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension* 39: 303-307
19. Packer L, Kraemer K, Rimbach G (2001) Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetes complications. *Nutrition* 17: 888-895
20. El Midaoui A, Elimadi A, Wu L, Haddad PS, de Champlain J (2003) Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens* 16: 173-179
21. Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung JM (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59: 369-376
22. Laneuville O, Reader TA, Couture R (1989) Intrathecal bradykinin acts presynaptically on spinal noradrenergic terminals to produce antinociception in the rat. *Eur J Pharmacol* 159: 273-283
23. Porreca F, Vanderah TW, Guo W et al (2006) Antinociceptive Pharmacology of LF22-0542, A Novel Non-Peptidic Bradykinin B₁ Receptor Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 318: 195-205
24. Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil F (1998) Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol* 348: 1-10
25. Ongali B, Buck HS, Cloutier F et al (2003) Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1949-H1958

26. Ongali B, Hellal F, Rodi D et al (2006) Autoradiographic analysis of mouse brain kinin B₁ and B₂ receptors after closed head trauma and ability of anitabant mesylate to cross the blood-brain barrier. *J Neurotrauma* 23: 696-707
27. Chomczynski, P.A (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-4, 536-7
28. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25: 402-408
29. Wirth K, Breipohl G, Stechl J et al (1991) DesArg⁹-D-Arg[Hyp³,Thi⁵,D-Tic⁷,Oic⁸]bradykinin (desArg¹⁰-[Hoe140]) is a potent bradykinin B₁ receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 205: 217-218
30. Hwang IS, Ho H, Hoffman BB, Reaven GM (1987) Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10: 512-516
31. Dai S, McNeill JH (1995) Fructose-induced hypertension in rats is concentration- and duration-dependent. *J Pharmacol Toxicol Methods* 33: 101-107
32. Schrier RW, Estacio RO, Jeffers B (1996) Appropriate Blood Pressure Control in NIDDM (ABCD) Trial. *Diabetologia* 39: 1646-1654
33. Song D, Hutchings S, Pang CCY (2005) Chronic N-acetylcysteine prevents fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Eur J Pharmacol* 508: 205-210
34. Brownlee M (2005) The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 54: 1615-1625
35. Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002) High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion

- molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* 51: 198-203
36. Lacy F, O'Connor DT, Schmid-Schonbein GW (1998) Plasma hydrogen peroxide production in hypertensives and normotensive subjects at genetic risk of hypertension. *J Hypertens* 16: 291-303
37. Dixon LJ, Hughes SM, Rooney K et al (2005) Increased superoxide production in hypertensive patients with diabetes mellitus: role of nitric oxide synthase. *Am J Hypert* 18: 839-843
38. Wu R, Millette E, Wu L, de Champlain J (2001) Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens* 19: 741-748
39. Falcon M, Guendellman D, Stolberg A, Frenk H, Urca G (1996) Development of thermal nociception in rats. *Pain* 67: 203-208
40. Hu D, Hu R, Berde CB (1997) Neurologic evaluation of infant and adult rats before and after sciatic nerve blockade. *Anesthesiology* 86: 957-965
41. Conway CM, Martinez J, Lytle LD (1998) Maturation changes in the thermal nociceptive responses of developing rats. *Dev Psychobiol* 33: 47-60
42. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23: 599-622
43. Ziegler D, Hanefeld M, Ruhnau KJ et al (1995) Treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy with the anti-oxidant alpha-lipoic acid. A 3-week multicentre randomized controlled trial (ALADIN Study). *Diabetologia* 38: 1425-1433

44. Gabra BH, Sirois P (2005) Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B₁ receptor. *Eur J Pharmacol* 514: 61-67
45. Cloutier F, Couture R (2000) Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B₁ and B₂ receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol* 130: 375-385

Figure Legends

Figure 1

Effects of chronic treatment with glucose (10 % in drinking water) under normal chow diet (●, n = 16) or a diet containing alpha-lipoic acid (○, n = 16) on body weight (grams). Control rats received normal chow diet (■, n = 8) or a diet containing alpha-lipoic acid (□, n = 8) and tap water. Data are means ± SEM of (n) rats in each group. Statistical comparison with control (*) or glucose-fed rats (†) is indicated by * † P < 0.05; †† P < 0.01; *** P < 0.001.

Figure 2

Effects of chronic treatment with glucose (10 % in drinking water) under normal chow diet (●, n = 16) or a diet containing alpha-lipoic acid (○, n = 16) on systolic blood pressure (mmHg). Control rats received normal chow diet (■, n = 8) or a diet containing alpha-lipoic acid (□, n = 8) and tap water. Data are means ± SEM of (n) rats in each group. Statistical comparison with control (*) or glucose-fed rats (†) is indicated by † P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001.

Figure 3

Effects of chronic treatment with glucose (10 % in drinking water) under normal chow diet (●, n = 16) or a diet containing alpha-lipoic acid (○, n = 16) on tactile allodynia (A), cold allodynia (B) and thermal hyperalgesia (C). Control rats received normal chow diet (■, n = 8) or the diet containing alpha-lipoic acid (□, n = 8) and tap water. Data are means ± SEM of (n) rats in each group. Statistical comparison with control (*) or glucose-fed rats (†) is indicated by * † P < 0.05; ** †† P < 0.01; *** P < 0.001. In (C), no statistical significance was found among groups.

Figure 4

Post-injection effects (hours) of two B₁R antagonists, R-715 (3, 6 and 10 mg/kg, i.p.; n = 6-9) and LF22-0542 (10 mg/kg, s.c.; n = 11), on tactile allodynia (A) and cold allodynia (B) in rats fed with glucose for 12-13 weeks. Data are means \pm SEM of (n) rats. Statistical comparison with untreated control (C) rats (*) or glucose-fed rats prior to antagonist (time 0) (†) is indicated by * † P < 0.05; ** †† P < 0.01.

Figure 5

Post-injection effects (hours) of two B₁R antagonists, LF22-0542 (10 mg/kg, s.c.; n = 11) and R-715 (10 mg/kg, i.p.; n = 8) on systolic blood pressure (mmHg) in rats fed with glucose for 12-13 weeks. Data are means \pm SEM of (n) rats. Statistical comparison with untreated control (C) rats (*) or glucose-fed rats prior to antagonist (time 0) (†) is indicated by * † P < 0.05; ** P < 0.01; ††† P < 0.001.

Figure 6

Histograms depicting fold-change in gene expression for B₁R measured by real-time quantitative RT-PCR in several tissues from glucose-fed rats treated with a normal chow diet (1st column) or a diet containing alpha-lipoic acid (2nd column) for 14 weeks. Values represent the mean \pm SEM of (8-11) rats in each group. Statistical comparison with control (*) or glucose-fed rats (†) is indicated by *** †††P < 0.001.

Figure 7

Effect of a treatment of 14 weeks with glucose in rats receiving normal chow diet or a diet supplemented with alpha-lipoic acid (LA) on the distribution of B₁R binding sites in the thoracic spinal cord (upper panel). The non-specific binding (NS) was obtained in the presence of 1 μ M of HPP-desArg¹⁰-Hoe 140. Quantitative specific density values are shown in various spinal cord laminae (L) (lower panel). Bars represent control rats

receiving normal chow diet (1st columns) or a diet supplemented with alpha-lipoic acid (2nd columns), glucose-fed rats receiving normal chow diet (3rd columns) or a diet with alpha-lipoic acid (4th columns). Data are means \pm SEM of 4 rats in each group. Statistical comparison with controls (*) or glucose-fed rats (†) is indicated by * † P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. Abbreviations: LI + LII + LIII + LIV, dorsal horn laminae; LV + LVII + LX, lateral horn laminae; LVIII + LIX, ventral horn laminae; IML, intermediolateral cell column; IMM, intermediomedial cell column.

Table 1. Plasma glucose concentration in overnight-fasted rats (mmol/L)

	Control (n=8)	Control + LA (n=8)	Glucose (n=16)	Glucose + LA (n=16)
8 weeks	4.4 ± 0.1	4.0 ± 0.1	7.0 ± 0.3 ***	5.6 ± 0.1 ††
11 weeks	4.5 ± 0.1	4.3 ± 0.1	6.9 ± 0.3 ***	5.8 ± 0.2 †
14 weeks	5.6 ± 0.2	5.2 ± 0.2	6.9 ± 0.3 *	5.1 ± 0.4 †††

Values are means ± SEM of (n) rats in each group. Statistical comparison with control (*) or glucose (†) is indicated by * † P < 0.05; †† P < 0.01; ***†††P < 0.001.

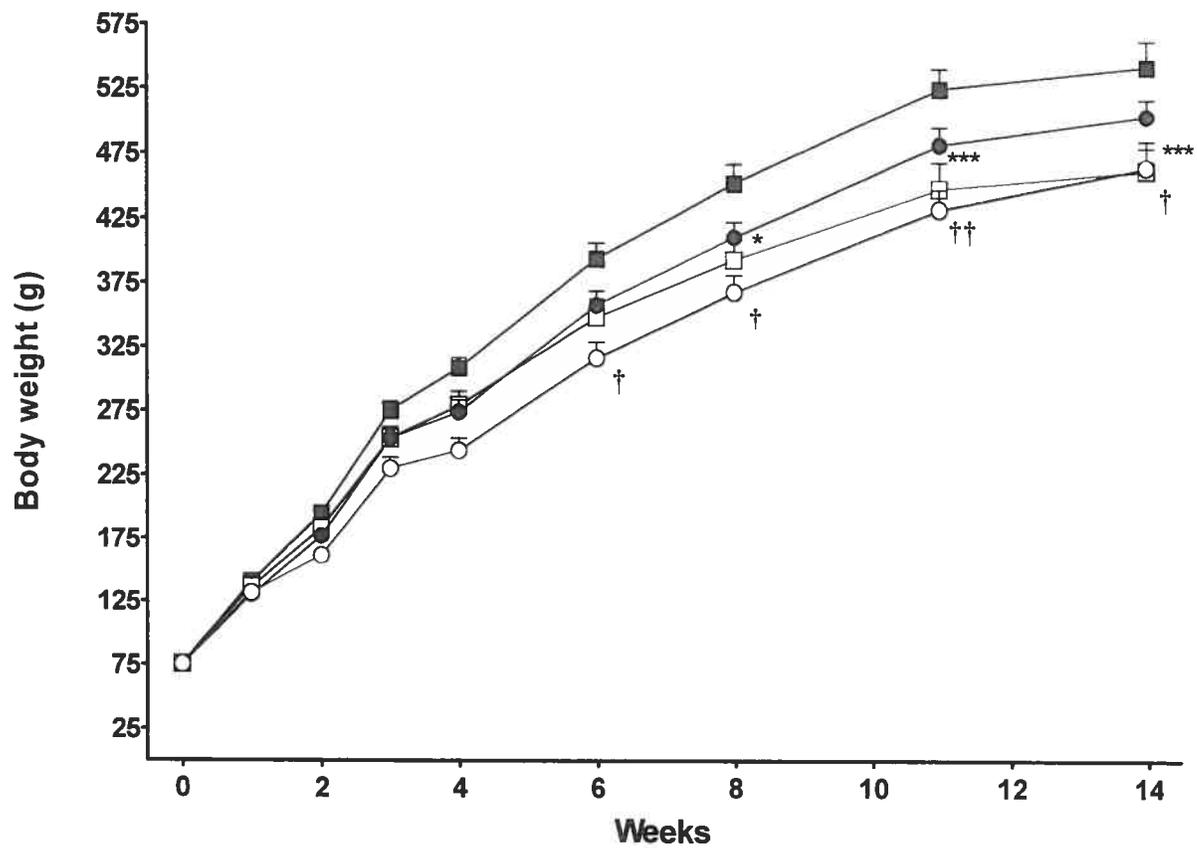


Fig. 1 Lungu et al.

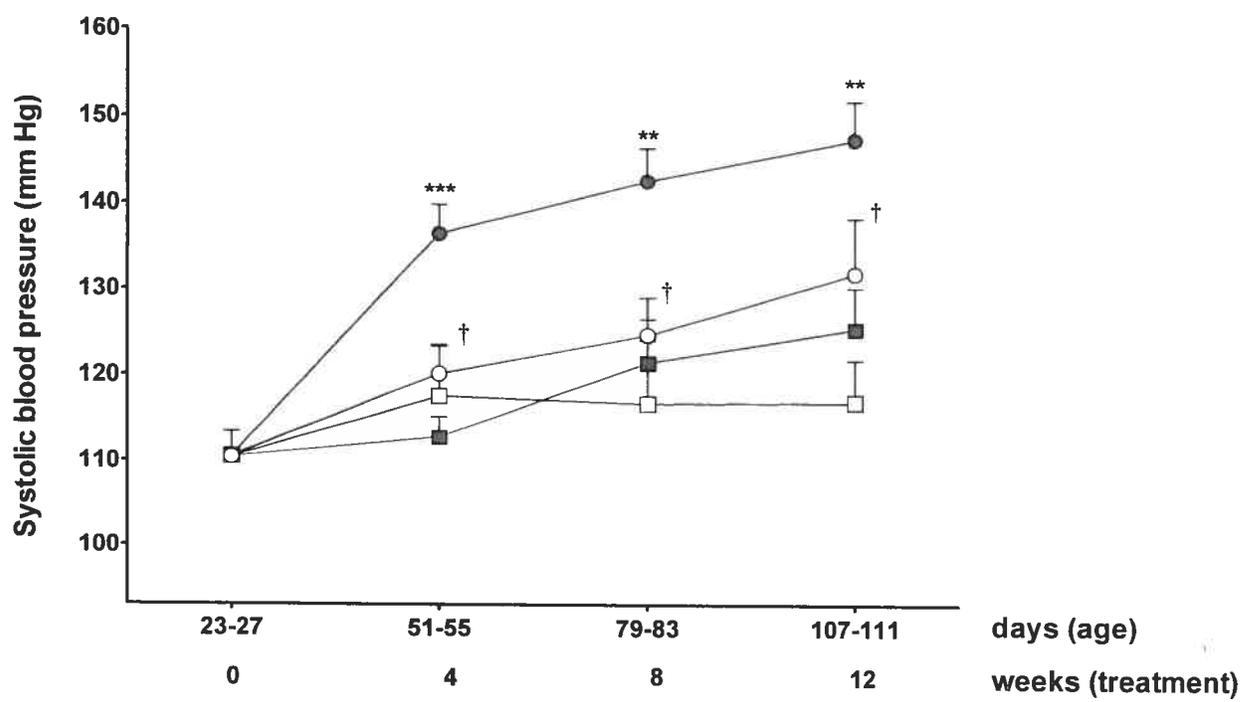


Fig. 2 Lungu et al.

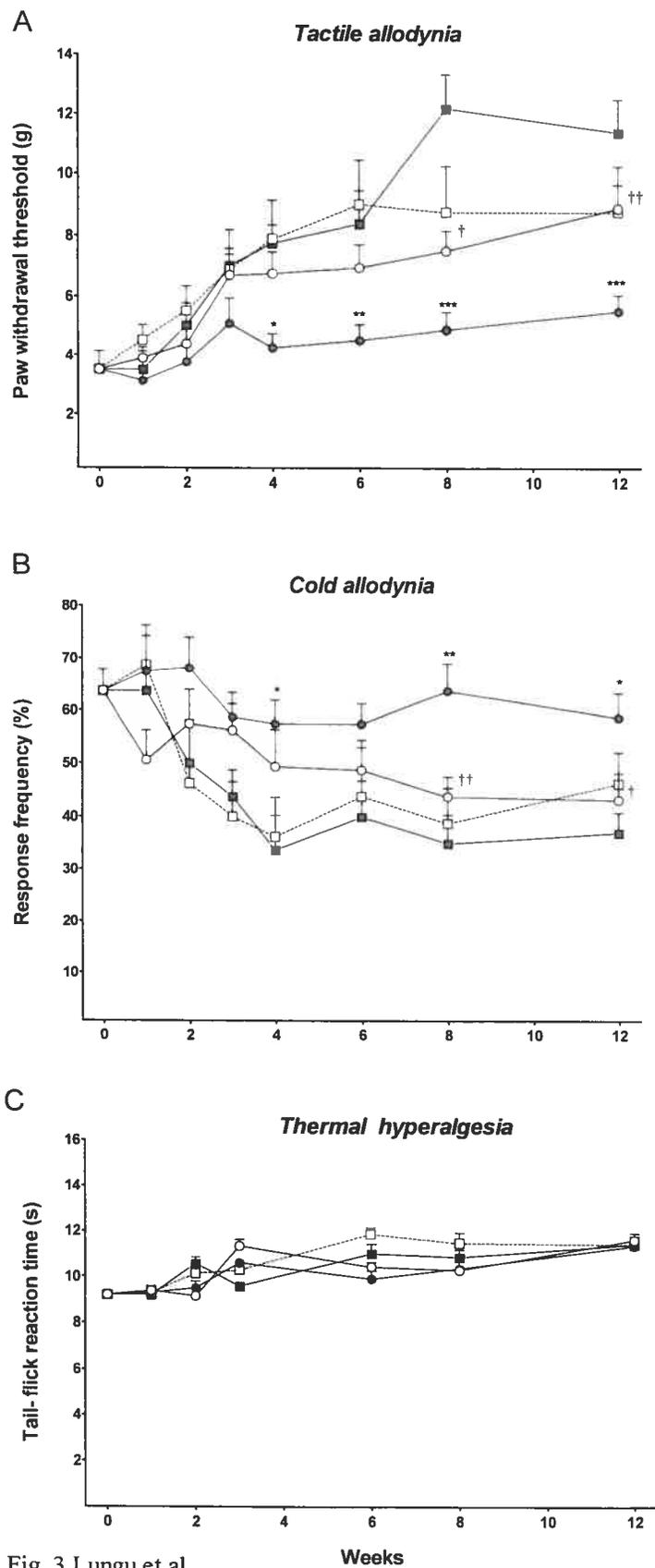


Fig. 3 Lungu et al.

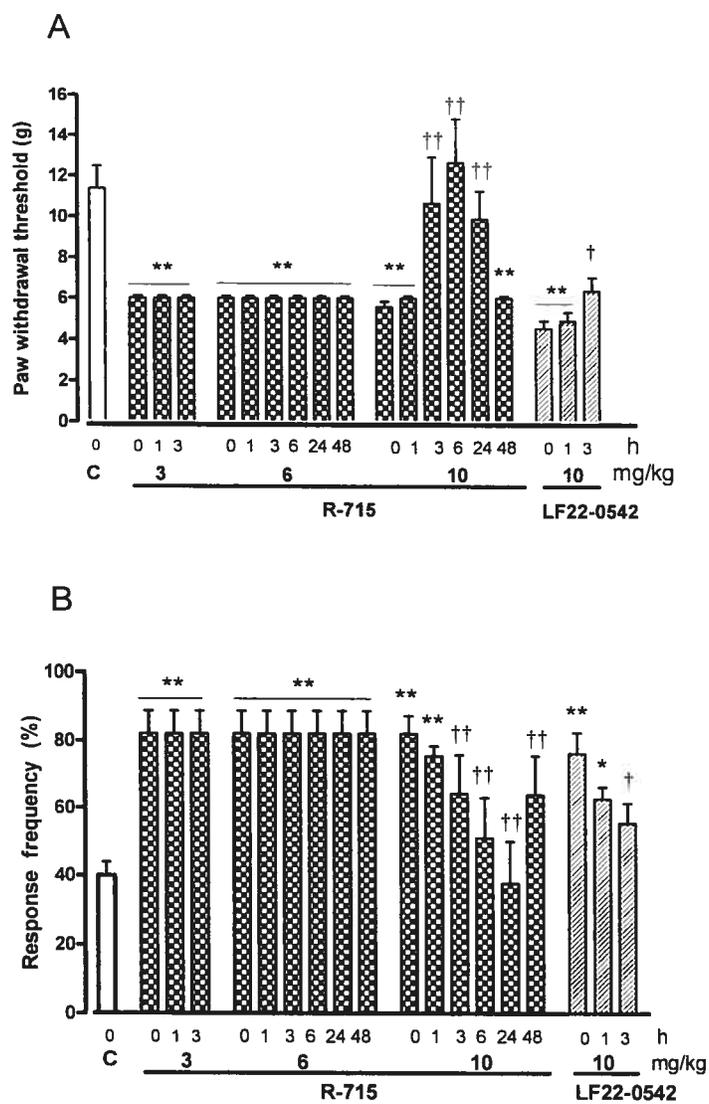


Fig. 4 Lungu et al.

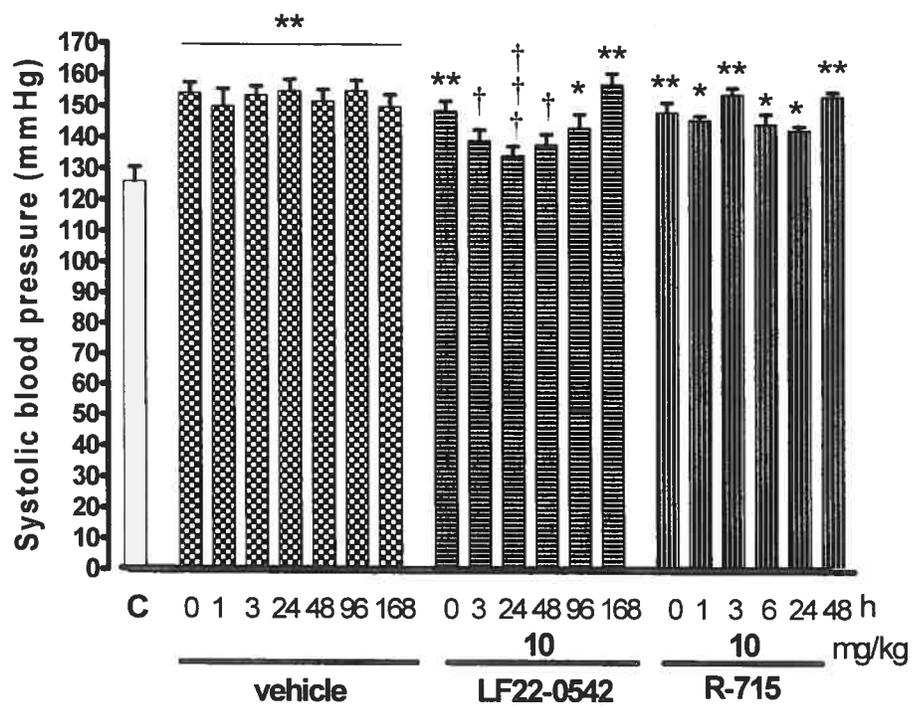


Fig. 5 Lungu et al.

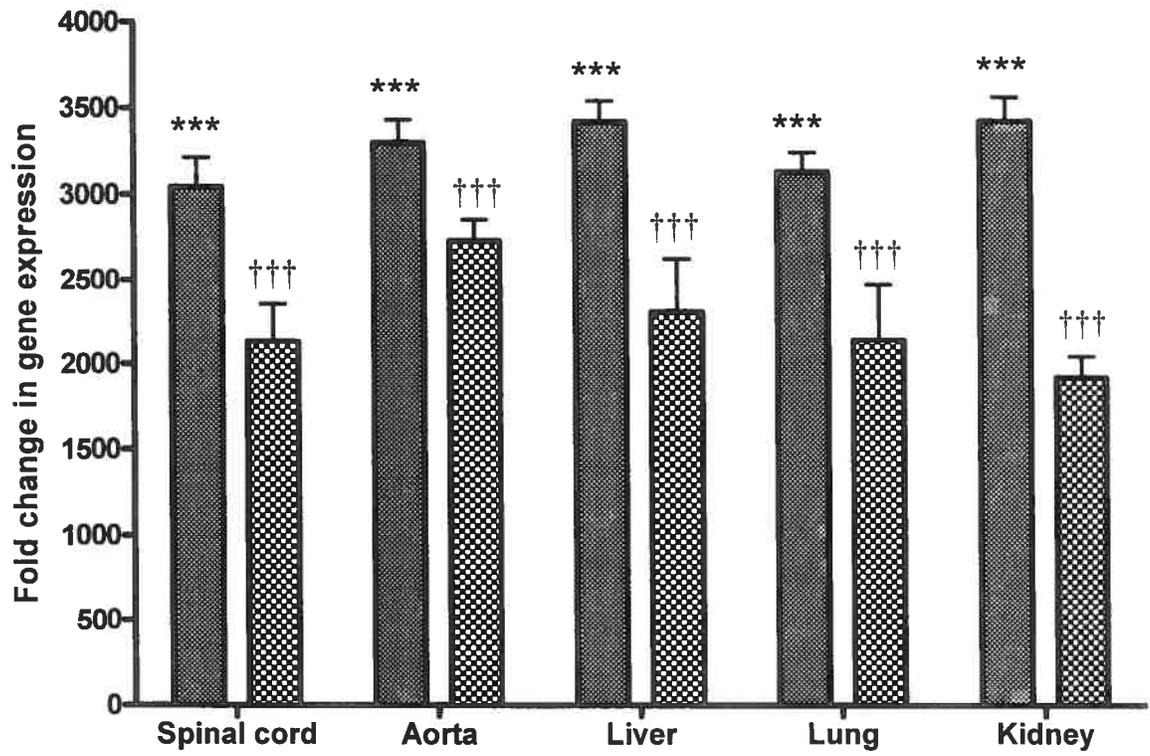


Fig. 6 Lungu et al.

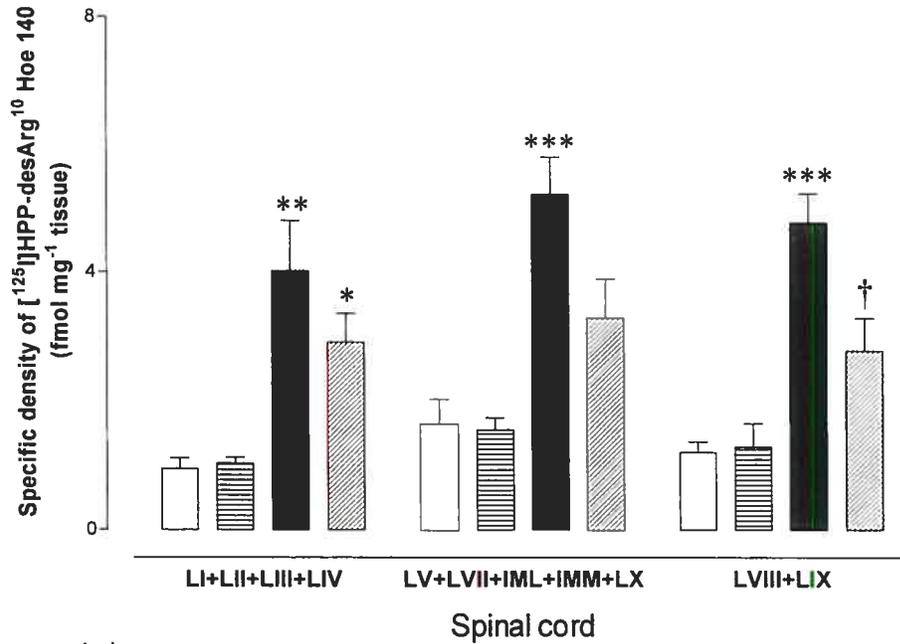
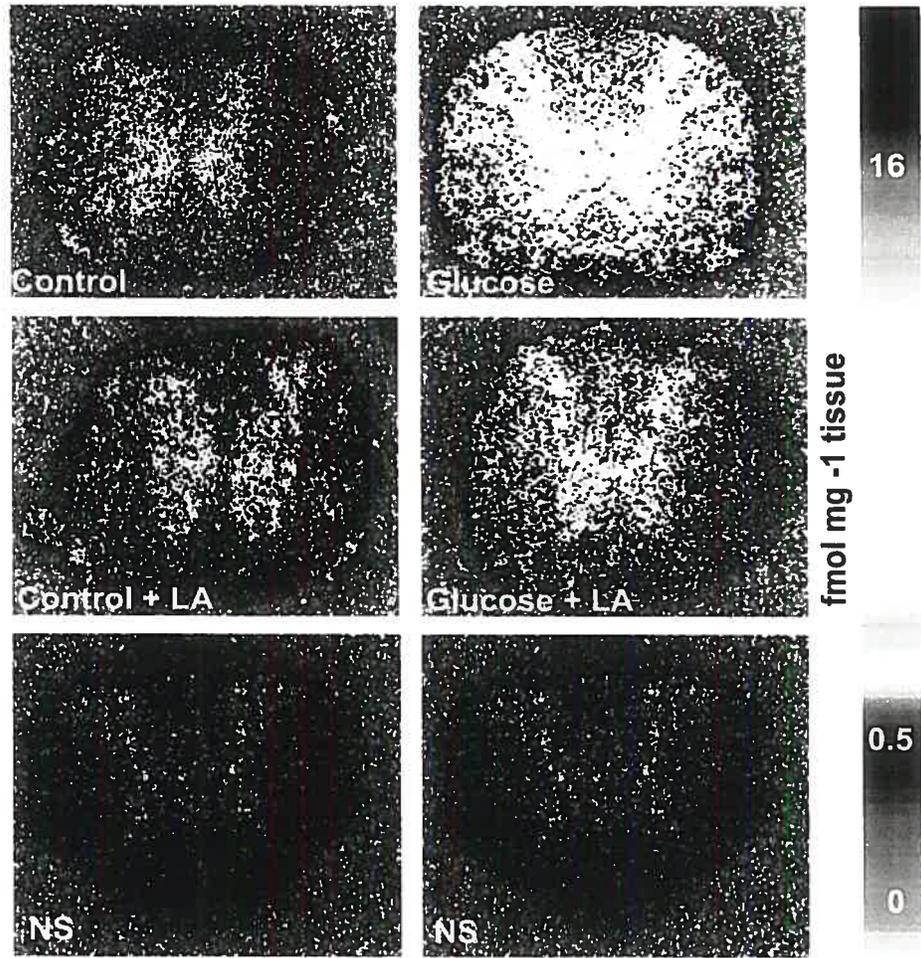


Fig. 7 Lungu et al.

TROISIÈME CHAPITRE

DISCUSSION GÉNÉRALE

1. Le stress oxydant et le modèle de diabète de type 2

L'administration chronique du glucose chez le rat (10% dans l'eau à boire) augmente la glycémie, l'insulinémie et la pression artérielle et détermine l'apparition de l'insulino-résistance. Les effets induits par une diète riche en glucose ressemblent à ceux rencontrés chez les rats nourris au fructose, un modèle classique d'insulino-résistance et de diabète de type 2 (Hwang et al., 1987; Reaven et al., 1988; Catena et al., 2003).

Un facteur initiateur possible de ces complications est la génération des radicaux libres et l'incapacité des mécanismes de défense de les neutraliser. El Midaoui et de Champlain (2002) ont montré chez les rats nourris au glucose pendant 4 semaines une augmentation de 52% de la production de l'anion superoxyde dans l'aorte et une diminution de l'activité du glutathion peroxidase (enzyme antioxydante) dans le plasma. Des corrélations positives ont été retrouvées entre la production de l'anion superoxyde dans l'aorte, la pression artérielle systolique et l'indice de résistance à l'insuline (HOMA), ce qui suggère que le stress oxydant est impliqué dans ces complications diabétiques. Un supplément antioxydant (acide alpha-lipoïque) ajouté dans la diète a prévenu l'apparition d'un déséquilibre de la balance oxydante, l'augmentation de la pression artérielle et l'apparition de l'insulino-résistance (El Midaoui et de Champlain, 2002).

Notre choix pour le régime au glucose 10% dans l'eau à boire a été déterminé par la reproductibilité chez les rongeurs des effets de la diète moderne, riche en carbohydrates, que l'humain utilise de nos jours. Au niveau mondial, les cas de diabète de type 2 sont plus fréquemment rapportés dans la population générale que les cas de diabète de type 1 (Gadsby, 2002). Nous avons aussi considéré comme critères : la simplicité du modèle et le coût associé au traitement. Nos observations ont commencé chez des rats jeunes, âgés d'un

mois et suivis jusqu'à l'âge adulte, à 14 semaines. Des études montrent en effet que le syndrome métabolique (syndrome de résistance à l'insuline), qui est un précurseur du diabète, peut s'établir tôt dans la vie sur un terrain prédisposant et entraîne à l'âge adulte le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires (Bao et al., 1996; Freedman et al., 2001).

Dans notre étude, le poids des animaux traités au glucose était légèrement diminué par rapport à celui du groupe témoin. Cette diminution pourrait s'expliquer en partie par une baisse de l'appétit chez les rats traités au glucose. Une étude a montré que les aliments à index glycémique (IG) élevé, comme c'est le cas du glucose (IG= 100), ont des effets plus rapides sur la satiété que les aliments à index glycémique bas (exemple : fructose; IG= 20) (Truswell, 1992; Anderson et Woodend, 2003). Miller et al. (2002) ont d'ailleurs montré chez le rat que l'injection par voie i.c.v. du fructose stimulait l'appétit mais que l'injection du glucose dans la même concentration réduisait la consommation de la nourriture. Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans une étude ultérieure en mesurant la quantité de nourriture consommée par les rats traités au glucose.

La diète avec l'acide alpha-lipoïque prévient la prise de poids chez le groupe glucose ainsi que chez le groupe témoin, respectivement à partir de 6 et 8 semaines. Ces résultats sont confirmés par une étude récente (Kim et al., 2004) qui montre que l'administration pendant 2 semaines d'acide alpha-lipoïque chez des rats Sprague-Dawley diminue l'appétit et le poids corporel par un mécanisme central. De plus, une diète de 14 semaines avec l'acide alpha-lipoïque réduit le poids chez les rats génétiquement obèses Otsuka Long-Evans Tokushima (Kim et al., 2004). Cet effet a été accompagné par une réduction de la glycémie, de l'insulinémie et des acides gras libres. Selon la même étude,

l'effet anorexique de l'acide alpha-lipoïque n'est pas dû à une toxicité systémique ou à une maladie induite par cette substance, mais plutôt à une diminution de l'activité de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans l'hypothalamus.

Les valeurs de la glycémie sont significativement augmentées après 8, 11 et 14 semaines de traitement chez les rats du groupe glucose lorsque comparées à celles des rats du groupe témoin. Toutefois, les valeurs de la glycémie n'augmentent pas de façon aussi spectaculaire comme c'est le cas chez les rats STZ-diabétiques (modèle de diabète de type 1). Ces augmentations plus modérées s'expliquent par l'hyperinsulinémie alors que les rats traités à la STZ sont déficients en insuline. La diète antioxydante réduit l'hyperglycémie chez les rats traités au glucose.

Les acides gras libres (AGL) mesurés chez les animaux utilisés dans l'article ci-joint restent dans les limites normales après traitement au glucose (El Midaoui et al., 2006, article en préparation) ce qui ressemble aux résultats obtenus chez les rats traités au fructose, lesquels ont des niveaux plasmatiques d'AGL similaires aux témoins (Huang et al., 1997; Wu et al., 2004). Un niveau élevé d'AGL devrait être accompagné d'une forte augmentation de la glycémie après le traitement au glucose, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. L'acide alpha-lipoïque diminue le niveau d'AGL tant chez les rats témoins que chez les rats traités au glucose (article en préparation). Cet effet pourrait être dû à l'augmentation hépatique de l'expression du récepteur PPAR- α par l'acide alpha-lipoïque tel que suggéré dans cet article. Il a été montré dans un modèle de diabète de type 2 que les niveaux plasmatiques d'AGL sont améliorés après l'administration d'un agoniste PPAR- α (Kim et al., 2003).

L'accès ininterrompu à une solution de glucose pendant 14 semaines produit une allodynie tactile et au froid mais pas d'hyperalgésie thermique chez nos rats. À notre connaissance, c'est la première étude dans la littérature qui montre l'évolution temporelle de l'allodynie tactile et au froid chez des rats nourris au glucose.

La présence d'une allodynie tactile qui n'est pas accompagnée d'une l'hyperalgésie thermique intrigue mais la situation n'est pas unique dans la littérature. Dans un modèle de douleur neuropathique chez le rat, l'allodynie tactile n'est pas concomitante avec l'hyperalgésie thermique (Willenbring et al., 1994). Chez l'humain, la diminution du temps de réaction en réponse à un stimulus thermique douloureux n'est pas une caractéristique typique de la douleur neuropathique (Koltzenburg, 1998) quoiqu'elle soit un paramètre très utilisé dans les modèles animaux. Elle indique un changement localisé de la sensibilité des terminaisons nerveuses périphériques plutôt qu'un changement au niveau global de l'excitabilité du système somato-sensoriel (Decosterd et Woolf, 2000).

Une réorganisation des grosses fibres myélinisées de type A β au niveau des neurones de la couche II de la moelle épinière, qui normalement reçoivent des stimuli des fibres de type C et A δ (Woolf et al., 1992; Mannion et al., 1996), peut expliquer la présence de l'allodynie tactile et l'absence de l'hyperalgésie thermique chez les rats traités au glucose. Une sensibilisation des mécanorécepteurs périphériques (Simone, 1992) ou la perte des interneurons inhibiteurs (Coderre et al., 1993; Woolf et Doubell, 1994) peut expliquer la sensibilité augmentée des rats diabétiques aux stimulations tactiles, mais cela n'exclut pas la possibilité que différents types de fibres nerveuses périphériques soient lésées dans ce modèle. De plus, il est connu que la stimulation thermique induit moins de stimuli sensoriels que la stimulation mécanique (Besson et Chaouch, 1987).

Une expérience similaire à la nôtre a montré qu'un traitement chronique chez des rats jeunes avec une solution de sucrose (20% dans l'eau à boire) pendant 13 semaines produit une réponse hyperalgésique dans le test au formol pour la douleur tonique et dans les tests électriques et thermiques pour la douleur phasique (Mukherjee et al., 2002). Cette réponse nociceptive est modulée par le noyau ventro-médial de l'hypothalamus (VMH). L'infusion à ce niveau d'un antimétabolite du glucose (2-déoxy-D-glucose), un produit capable d'inhiber le métabolisme du glucose, produit une hypoalgésie qui est atténuée après ingestion du sucrose (Mukherjee et al., 2001). De plus, la lésion expérimentale du VMH produit l'hyperalgésie aux stimuli nociceptifs toniques et phasiques et une préférence accrue pour le sucrose (Mukherjee et al., 2000).

La présence au niveau du VMH des neurones répondant au glucose (Fukuda et al., 1984) ayant une préférence pour les carbohydrates (Milano et al., 1988) et jouant un rôle dans le comportement alimentaire (King, 2006) interpelle une investigation plus approfondie de cette structure dans notre modèle. De plus, ces neurones, sensibles aux opioïdes (Ono et al., 1980), sont impliqués dans la nociception (Sikdar et Oomura, 1985; Mukherjee et al., 2001).

L'allodynie au froid qui se traduit par une sensibilité augmentée aux températures basses non-nociceptives, est une caractéristique de la douleur neuropathique. Dans notre étude, les rats diabétiques répondent plus que les rats témoins aux stimulations à l'acétone. Ces réponses sont probablement dues à l'activation de récepteurs thermosensibles de la famille TRP (*transient receptor potential*), récepteurs-canaux sélectifs pour les cations : les récepteurs TRPM8 and TRPA1 (McKemy et al., 2002; Peier et al., 2002).

Nos données avec la diète antioxydante contenant de l'acide alpha-lipoïque indiquent que le stress oxydant est impliqué dans les anomalies sensorielles chez les rats nourris au glucose. La diète corrige significativement l'allodynie tactile et au froid après 8 et 12 semaines de traitement sans avoir des effets sur la sensibilité des rats témoins.

Il a été démontré dans la littérature que le stress oxydant est impliqué dans le développement de la neuropathie diabétique (Garrett et al., 1997; Low et al., 1997; Brownlee, 2001). Très peu d'études ont toutefois évalué l'efficacité d'une thérapie antioxydante dans la neuropathie diabétique dans un modèle de diabète de type 2. Li et al. (2006) ont été les premiers à montrer qu'un antioxydant (taurine) renverse la neuropathie diabétique chez les rats ZDF (*Zucker diabetic fatty rats*). Le traitement avec la taurine corrige l'hyperalgésie thermique et mécanique, les déficits du flux sanguin neuronal et améliore la vitesse de conduction dans les fibres sensorielles et motrices, probablement via un mécanisme qui implique le système antioxydant de l'ascorbate (Obrosova et al., 2001).

Comparativement au modèle plus connu de neuropathie dans le diabète de type 1 (modèle STZ), on sait peu de choses sur le développement de la neuropathie dans le diabète de type 2. Un rôle important de la voie des sorbitols est proposé; cette voie est normalement peu impliquée dans le métabolisme du glucose mais sa contribution augmente dans le diabète (Schmidt et al., 2005). La voie du sorbitol augmente le stress oxydant par plusieurs mécanismes comprenant une diminution de l'activité de la superoxyde dismutase (Obrosova, 2002) et la déplétion des antioxydants majeurs comme : le glutathion (Cameron et al., 2001a; b; Obrosova, 2002), l'ascorbate (Obrosova et al., 2002) et la taurine (Stevens et al., 1993; Obrosova et al., 2001). L'inhibition de cette voie chez le rat Zucker, par un

inhibiteur de l'aldose réductase, améliore la neuropathie diabétique (Shimoshige et al., 2000).

L'acide alpha-lipoïque peut interférer lui aussi avec la voie du sorbitol. Dans sa forme réduite, l'acide alpha-lipoïque régénère ou induit la synthèse de glutathion, le plus important antioxydant des cellules humaines (Pop-Busui et al., 2006). Son rôle bénéfique sur la microcirculation et le stress oxydant au niveau cellulaire a été documenté chez le rat, dans la neuropathie du diabète de type 1 (Stevens et al., 2000; Coppey et al., 2001).

L'augmentation de la pression artérielle systolique chez les rats traités au glucose pendant 12 semaines a été prévenue par la diète antioxydante, contenant de l'acide alpha-lipoïque. Cette diète a eu des effets anti-hypertenseurs dans d'autres modèles animaux (SHR, Dahl) dont les valeurs de pression sont plus élevées comparativement au modèle au glucose (Vasdev et al., 2000; 2005). Dans certains de ces modèles d'hypertension, une augmentation de l'anion superoxyde a été rapportée dans l'aorte via une activité accrue de la NADH oxydase (Wu et al., 2001). Un résultat similaire a été trouvé chez les rats traités au glucose où l'augmentation de l'anion superoxyde a été positivement corrélée avec la hausse de la pression artérielle (El Midaoui et de Champlain, 2002). Ces données suggèrent l'implication du stress oxydant vasculaire dans l'augmentation de la pression artérielle et montrent le potentiel thérapeutique de l'acide alpha-lipoïque dans le traitement de l'hypertension chez l'humain.

2. Rôle du récepteur B₁ des kinines dans le diabète

Notre étude suggère que le récepteur B₁ des kinines est impliqué dans les anomalies sensorielles et l'hypertension artérielle observées chez les rats traités au glucose.

L'administration d'un antagoniste stable du récepteur B₁ (LF22-0542), capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, réduit l'allodynie tactile et au froid et réduit la pression artérielle, respectivement à 3 h et 24 h après son administration. L'efficacité analgésique et anti-hyperalgésique de cet antagoniste a été démontrée chez la souris et chez le rat dans des modèles de douleur inflammatoire et neuropathique (Porreca et al., 2006). Un autre antagoniste non peptidique du récepteur B₁ (NVP-SAA164) a bloqué l'hyperalgésie mécanique chez des souris transgéniques exprimant le récepteur B₁ humain (Fox et al., 2005).

On a montré que l'effet anti-allodynique du LF22-0542 est dû à son action périphérique alors que son effet anti-hypertenseur est dû à une action centrale. Ainsi, l'administration chez les rats traités au glucose d'un antagoniste du récepteur B₁ (R-715), qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique et qui agit uniquement en périphérie, a diminué l'allodynie tactile et au froid mais n'a pas eu d'effet sur la pression artérielle. Dans le même modèle, l'administration par voie intraveineuse d'un agoniste stable du récepteur B₁, le Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, qui ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique, n'affecte pas la pression artérielle tant chez les rats traités au glucose que chez les rats témoins (résultats non publiés).

D'autre part, la stimulation spinale directe du récepteur B₁ avec l'agoniste Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK, injecté par voie intrathécale, produit une réponse hyperalgésique dans un test nociceptif thermique (test de retrait de la queue; *tail-flick test*) chez les rats traités au glucose. Cette réponse hyperalgésique transitoire est semblable à celle observée après la stimulation du récepteur B₁ dans la moelle épinière du rat diabétique STZ (Couture et al., 2001). Elle est complètement inhibée par l'antagoniste du récepteur B₁ (LF22-0542) pré-

injecté par la même voie, 15 minutes plus tôt (figure 6A). Ces résultats concordent avec les études en autoradiographie qui montrent une augmentation significative des sites de liaison du récepteur B₁ dans les cornes dorsale, ventrale et latérale de la moelle épinière thoracique chez les rats traités au glucose pendant 14 semaines (article ci-joint) et 4 semaines (El Midaoui et al., 2005).

Il est intéressant de noter qu'après un arrêt de 2 semaines du traitement au glucose, l'injection par voie intrathécale du Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK reproduit la réponse hyperalgésique (figure 6B). Ce résultat est conforme avec la persistance d'une augmentation des récepteurs B₁ dans la moelle épinière thoracique chez ces rats (résultats non publiés). Il semble alors que le récepteur B₁ demeure exprimé et fonctionnel dans le système nerveux après arrêt du traitement au glucose.

Bien que l'ensemble de nos résultats indiquent que les rats traités au glucose ne manifestent pas d'hyperalgésie thermique dans les conditions basales, la stimulation du récepteur B₁ qui a été induit et surexprimé dans la moelle épinière de ces animaux cause une hyperalgésie thermique. La signification physiopathologique de cette observation dans le contexte des neuropathies diabétiques demeure pour le moment nébuleuse. Il est possible que les rats traités au glucose manifestent une hyperalgésie thermique dans des situations particulières lorsque le récepteur B₁ est activé par la libération endogène de l'agoniste des-Arg⁹-BK. Tout au moins, ces animaux qui surexpriment le récepteur B₁ dans la moelle épinière présentent un plus grand risque à connaître l'hyperalgésie thermique au cours de leur vie.

3. Rôle du récepteur B₂ des kinines dans le diabète

Une étude récente montre également une augmentation de la densité des récepteurs B₂ des kinines dans la moelle épinière chez les rats traités au glucose pendant 4 semaines (El Midaoui et al., 2005). Une relation a été suggérée entre le diabète, l'hyperglycémie, l'hypertension artérielle et la surexpression des récepteurs B₂. En effet, une densité élevée des récepteurs B₂ a été trouvée dans le cerveau et la moelle épinière des rats spontanément hypertendus (SHR) (Cloutier et al., 2002; Ongali et al., 2003) ou rendus hypertendus par une infusion d'angiotensine II, pendant 2 semaines (Petcu et al., 2005). Son expression est aussi augmentée dans l'hypothalamus et l'hypophyse chez les rats Zucker, un modèle de diabète de type 2 (Qadri et al., 2004). Chez les rats STZ, une augmentation de la densité des sites de liaison du récepteur B₂ a été notée dans la couche I de la moelle épinière, le noyau du paratrimé et le noyau du tractus solitaire (Campos et al., 2005b), des régions impliquées dans la régulation cardio-vasculaire et la nociception.

Le récepteur B₂ joue un rôle important dans l'inflammation et la nociception; plusieurs antagonistes du récepteur B₂ ont déjà été testés avec succès sur des modèles animaux de douleur inflammatoire (Calixto et al., 2000). Dans notre modèle de rats traités au glucose, on a testé un antagoniste non-peptidique du récepteur B₂, le LF16-0687 (Anatibant), qui traverse la barrière hémato-encéphalique et qui est capable d'agir autant au niveau périphérique qu'au niveau central (Ongali et al., 2006). L'administration s.c. de cet antagoniste diminue la pression artérielle chez les rats traités au glucose pendant 12 semaines, avec un maximum d'effet à 48h (figure 7). De plus, l'antagoniste B₂ inhibe l'allodynie tactile et au froid respectivement à 3h et 1h après son administration (figure 8). L'antagoniste B₂ s'est avéré aussi puissant que l'antagoniste B₁ pour bloquer les anomalies

sensorielles et cardio-vasculaires dans notre modèle. L'effet anti-allodynique de cet antagoniste du récepteur B₂ n'a pas été observé dans un modèle de douleur neuropathique, après constriction partielle du nerf sciatique bien qu'il ait bloqué l'hyperalgésie thermique dans ce modèle (Petcu et al., article en révision). Ainsi l'origine de la neuropathie (diabétique vs. traumatisme d'un nerf) semble avoir des conséquences différentes sur la modalité nociceptive et la contribution des récepteurs des kinines.

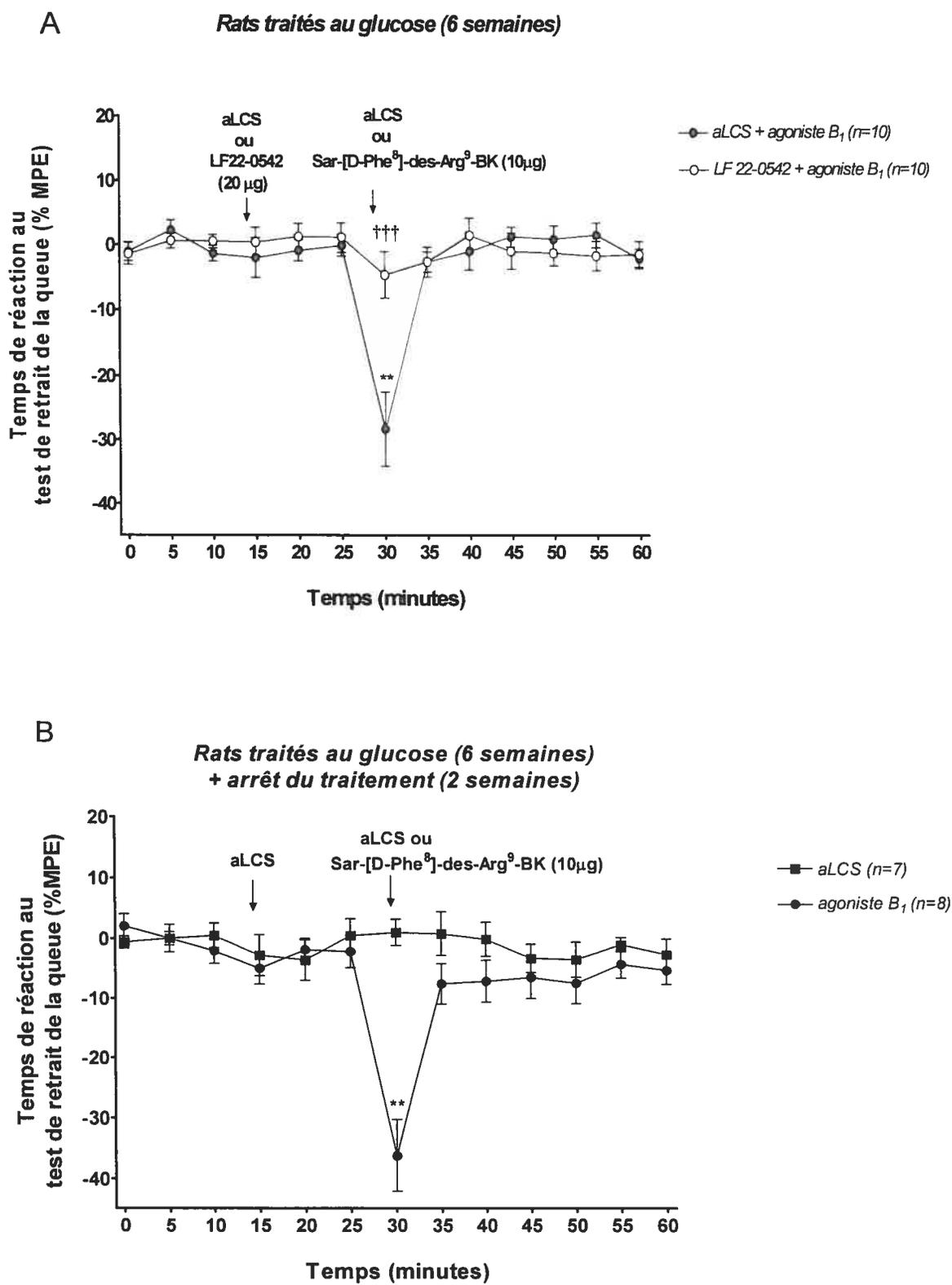


Figure 6

Hypertension artérielle

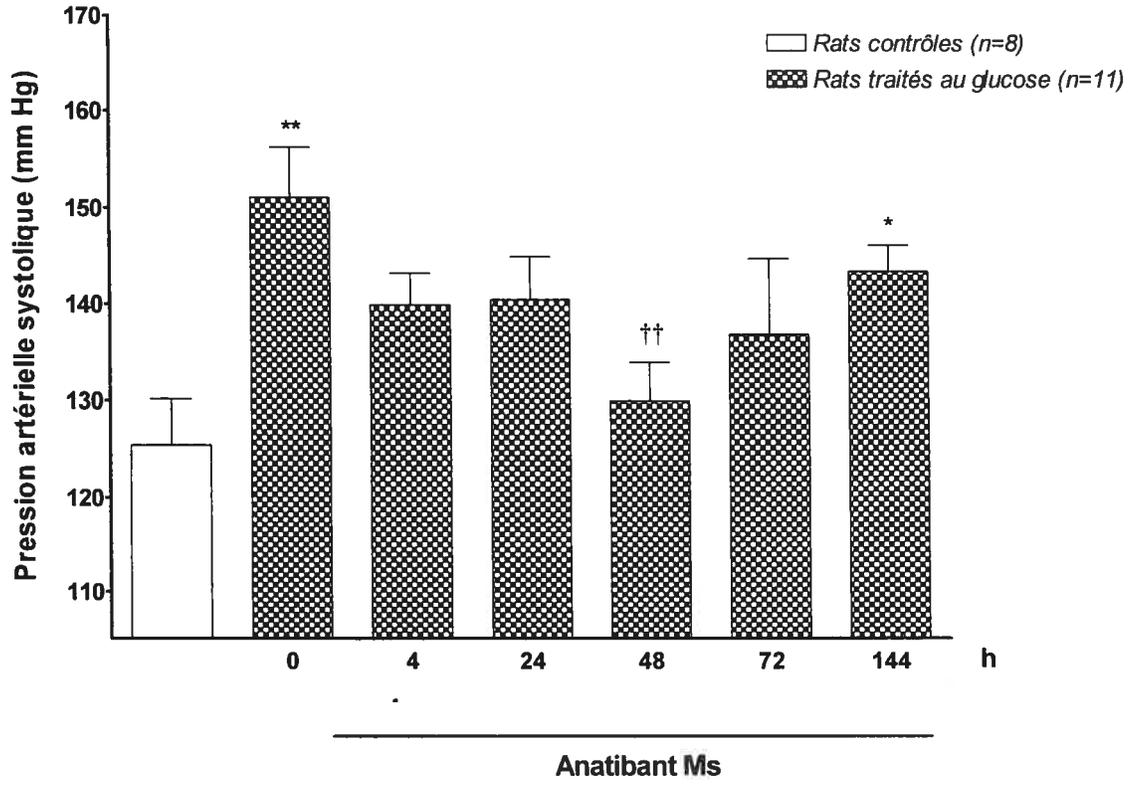
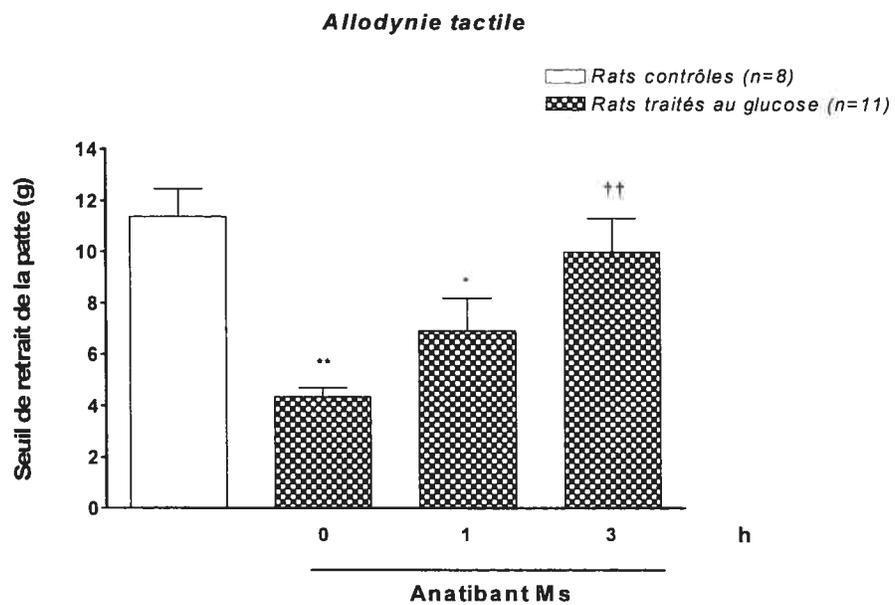


Figure 7

A



B

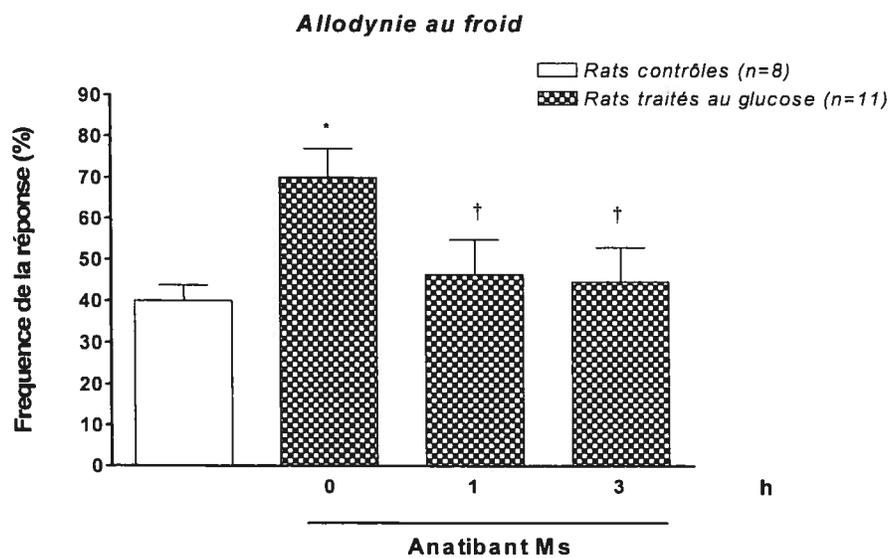


Figure 8

Légende des figures

Figure 6

(A) Réponse hyperalgésique induite par l'injection intrathécale de l'agoniste B₁, Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK (10µg) chez des rats nourris au glucose pendant 6 semaines. L'effet de l'agoniste a été mesuré 15 min après l'injection intrathécale de liquide cébrospinal artificiel ou aLCS (●) ou de l'antagoniste B₁, LF22-0542 (20 µg) (○). Les données représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne du temps de réaction du retrait de la queue à un stimulus thermique nociceptif, exprimé en % de l'effet maximal possible (MPE) chez 10 rats. Les comparaisons statistiques avec les valeurs de base (de 0 à 15 min) (*) ou avec l'agoniste en absence d'antagoniste (†) sont indiquées par : ** P ≤ 0.01; ††† P ≤ 0.001.

(B) Réponse hyperalgésique induite par l'agoniste B₁, Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK (10µg), mesurée chez les rats montrés en (A) après 2 sem d'arrêt de traitement au glucose. L'effet du véhicule (aLCS) est aussi montré sur le temps de réaction. Les données représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne obtenue chez 8 rats. La comparaison statistique avec les valeurs de base (de 0 à 15 min) (*) est indiquée par : ** P ≤ 0.01.

Figure 7

Effet anti-hypertenseur de l'Anatibant (3 mgkg⁻¹; s.c), antagoniste des récepteurs B₂ des kinines, chez des rats traités au glucose pendant 12 semaines. Les données représentent la moyenne ± l'écart-type de la moyenne de la pression artérielle systolique (mmHg) mesurée avec un brassard chez 11 rats. Les comparaisons statistiques avec les rats témoins (*) ou les rats traités au glucose avant l'antagoniste (temps 0) (†) sont indiquées par * P ≤ 0.05; **†† P ≤ 0.01.

Figure 8

Effet de l'Anatibant (3 mgkg⁻¹; s.c), antagoniste des récepteurs B₂ des kinines, sur l'allodynie tactile (A) et l'allodynie au froid (B) chez des rats traités au glucose pendant 12 semaines. Les données représentent les moyennes ± l'écart-type de la moyenne chez 8-11 rats. Les comparaisons statistiques avec les rats témoins (*) ou les rats traités au glucose avant l'antagoniste (temps 0) (†) sont indiquées par * †P ≤ 0.05; **†† P ≤ 0.01.

Conclusion

Nos données démontrent qu'un traitement au glucose pendant 12-14 semaines induit chez les rats Sprague-Dawley une hyperglycémie, une insulino-résistance, une augmentation de la pression artérielle systolique et des désordres sensoriels, complications retrouvées aussi chez l'humain dans le diabète de type 2. Le stress oxydatif joue un rôle critique dans le développement de ces complications diabétiques. L'apport chronique d'une diète riche en acide alpha-lipoïque a prévenu l'apparition de ces complications, vraisemblablement grâce à ses propriétés anti-oxydantes.

Notre étude démontre aussi que le récepteur B₁ des kinines est surexprimé dans la moelle épinière et plusieurs tissus périphériques des rats traités au glucose et demeure fonctionnel après le sevrage au glucose. Ce récepteur semble impliqué au niveau central dans les augmentations de la pression artérielle et au niveau périphérique dans les neuropathies sensorielles. Des antagonistes sélectifs des récepteurs des kinines ont été testés dans ce modèle contre l'hypertension artérielle et l'allodynie tactile et au froid. Nos résultats ont montré une diminution de la pression artérielle et des effets anti-allodyniens après l'administration des antagonistes du récepteur B₁. Un antagoniste du récepteur B₂ des kinines (Anatibant) a eu aussi un rôle bénéfique dans notre modèle, en bloquant les anomalies sensorielles et l'hypertension artérielle.

Les récepteurs des kinines peuvent représenter des cibles thérapeutiques potentielles pour traiter la neuropathie et l'hypertension diabétique. Des études ultérieures sur des modèles animaux de diabète de type 2 (rats Zucker, souris diabétiques KK-Ay) permettront de valider nos résultats et d'évaluer les effets de l'inhibition des récepteurs des kinines sur des paramètres métaboliques.

Bibliographie

- Ahlgren S. C., Levine J. D.** Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience*. 52(4): 1049-1055, 1993.
- Alric C., Pecher C., Bascands J. L., Girolami J. P.** Effect of bradykinin on tyrosine kinase and phosphatase activities and cell proliferation in mesangial cells. *Immunopharmacology*. 45(1-3): 57-62, 1999.
- Anderson G. H., Woodend D.** Effect of glycemc carbohydrates on short-term satiety and food intake. *Nutr Rev*. 61(5 Pt 2): S17-26, 2003.
- Armstrong D. G., Lavery L. A., Harkless L. B.** Validation of a diabetic wound classification system. The contribution of depth, infection, and ischemia to risk of amputation. *Diabetes Care*. 21(5): 855-859, 1998.
- Baba T., Murabayashi S., Ishizaki T., Ido Y., Aoyagi K., Takebe K.** Renal kallikrein in diabetic patients with hypertension accompanied by nephropathy. *Diabetologia*. 29(3): 162-7, 1986.
- Bachvarov D. R., Hess J. F., Menke J. G., Larrivee J. F., Marceau F.** Structure and genomic organization of the human B1 receptor gene for kinins (BDKRB1). *Genomics*. 33(3): 374-81, 1996.
- Baldwin A. S., Jr.** The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*. 14:649-83, 1996.
- Bao W., Srinivasan S. R., Berenson G. S.** Persistent elevation of plasma insulin levels is associated with increased cardiovascular risk in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. *Circulation*. 93(1): 54-9, 1996.
- Bascands J. L., Schanstra J. P., Couture R., Girolami J. P.** [Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles]. *Med Sci (Paris)*. 19(11): 1093-100, 2003.
- Basciano H., Federico L., Adeli K.** Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia. *Nutr Metab (Lond)*. 2(1): 5, 2005.
- Beckman K. B., Ames B. N.** The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiol. Rev*. 78(2): 547-581, 1998.
- Besson J. M., Chaouch A.** Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiol Rev*. 67(1): 67-186, 1987.

- Bhoola K. D., Figueroa C. D., Worthy K.** Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev.* 44(1): 1-80, 1992.
- Boulton A. J. M., Vinik A. I., Arezzo J. C., Bril V., Feldman E. L., Freeman R., Malik R. A., Maser R. E., Sosenko J. M., Ziegler D.** Diabetic Neuropathies: A statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care.* 28(4): 956-962, 2005.
- Brown M. J., Asbury A. K.** Diabetic neuropathy. *Ann Neurol.* 15(1): 2-12, 1984.
- Brownlee M.** Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.* 414(6865): 813-820, 2001.
- Buchanan T. A., Youn J. H., Campese V. M., Sipos G. F.** Enhanced glucose tolerance in spontaneously hypertensive rats. Pancreatic beta-cell hyperfunction with normal insulin sensitivity. *Diabetes.* 41(7): 872-878, 1992.
- Burchiel K. J., Russell L. C., Lee R. P., Sima A. A.** Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes.* 34(11): 1210-3, 1985.
- Calcutt N. A., Jorge M. C., Yaksh T. L., Chaplan S. R.** Tactile allodynia and formalin hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin, aldose reductase inhibition and lidocaine. *Pain.* 68(2-3): 293-9, 1996.
- Calcutt N. A., Li L., Yaksh T. L., Malmberg A. B.** Different effects of two aldose reductase inhibitors on nociception and prostaglandin E. *European Journal of Pharmacology.* 285(2): 189-197, 1995.
- Calixto J. B., Cabrini D. A., Ferreira J., Campos M. M.** Kinins in pain and inflammation. *Pain.* 87(1): 1-5, 2000.
- Cameron N. E., Cotter M. A., Horrobin D. H., Tritschler H. J.** Effects of α -lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats: interaction with essential fatty acids. *Diabetologia.* 41(4): 390-399, 1998.
- Cameron N. E., Eaton S. E., Cotter M. A., Tesfaye S.** Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia.* 44(11): 1973-1988, 2001a.
- Cameron N. E., Jack A. M., Cotter M. A.** Effect of $[\alpha]$ -lipoic acid on vascular responses and nociception in diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine.* 31(1): 125-135, 2001b.

- Campbell D. J.** Towards understanding the kallikrein-kinin system: insights from measurement of kinin peptides. *Braz J Med Biol Res.* 33(6): 665-77, 2000.
- Campos M. M., Ongali B., De Souza Buck H., Schanstra J. P., Girolami J. P., Chabot J. G., Couture R.** Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin. *Synapse.* 57(1): 29-37, 2005a.
- Campos M. M., Ongali B., Thibault G., Neugebauer W., Couture R.** Autoradiographic distribution and alterations of kinin B(2) receptors in the brain and spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Synapse.* 58(3): 184-92, 2005b.
- Carvalho C. R., Thirone A. C., Gontijo J. A., Velloso L. A., Saad M. J.** Effect of captopril, losartan, and bradykinin on early steps of insulin action. *Diabetes.* 46(12): 1950-7, 1997.
- Catena C., Giacchetti G., Novello M., Colussi G., Cavarape A., Sechi L. A.** Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with Fructose-Induced hypertension. *American Journal of Hypertension.* 16(11): 973-978, 2003.
- CDCP.** Centers for Disease Control and Prevention NCFHS, Division of Health Interview Statistics. Census of the population and population estimates. Hyattsville, MD: Centers for Disease Control and Prevention, 1997.
- Cellier E., Mage M., Duchene J., Pecher C., Couture R., Bascands J.-L., Girolami J.-P.** Bradykinin reduces growth factor-induced glomerular ERK1/2 phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol.* 284(2): F282-292, 2003.
- Chen X., Levine J. D.** Hyper-responsivity in a subset of C-fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Neuroscience.* 102(1): 185-92, 2001.
- Christopher J., Velarde V., Zhang D., Mayfield D., Mayfield R. K., Jaffa A. A.** Regulation of B(2)-kinin receptors by glucose in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 280(4): H1537-46, 2001.
- Clark C. M., Jr., Lee D. A.** Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 332(18): 1210-7, 1995.
- Cloutier F., Couture R.** Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 130(2): 375-85, 2000.

- Cloutier F., de Sousa Buck H., Ongali B., Couture R.** Pharmacologic and autoradiographic evidence for an up-regulation of kinin B(2) receptors in the spinal cord of spontaneously hypertensive rats. *Br J Pharmacol.* 135(7): 1641-54, 2002.
- Coderre T. J., Katz J., Vaccarino A. L., Melzack R.** Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain.* 52(3): 259-85, 1993.
- Coppey L. J., Gellett J. S., Davidson E. P., Dunlap J. A., Lund D. D., Yorek M. A.** Effect of Antioxidant Treatment of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats on Endoneurial Blood Flow, Motor Nerve Conduction Velocity, and Vascular Reactivity of Epineurial Arterioles of the Sciatic Nerve. *Diabetes.* 50(8): 1927-1937, 2001.
- Courteix C., Eschalier A., Lavarenne J.** Streptozocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. *Pain.* 53(1): 81-88, 1993.
- Couture R., Girolami J. P.** Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus. *Eur J Pharmacol.* 500(1-3): 467-85, 2004.
- Couture R., Harrison M., Vianna R. M., Cloutier F.** Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol.* 429(1-3): 161-76, 2001.
- Couture R., Lindsey C. J.** Brain kallikrein-kinin system: from receptors to neural pathways and physiological functions in *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Peptide Receptors*, part 1, vol. 16. A. B. R. Quirion, and Th. Hökfelt. Amsterdam, The Netherlands, Elsevier Science B.V: 241-300, 2000.
- Dai S., McNeill J. H.** Myocardial performance of STZ-diabetic DOCA-hypertensive rats. *The American Journal Of Physiology.* 263(6, Part 2): H1798-H1805, 1992.
- Damas J., Bourdon V., Lefebvre P. J.** Insulin sensitivity, clearance and release in kininogen-deficient rats. *Exp Physiol.* 84(3): 549-57, 1999.
- DCCT.** Factors in development of diabetic neuropathy. Baseline analysis of neuropathy in feasibility phase of Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). The DCCT Research Group. *Diabetes.* 37(4): 476-81, 1988.

- de Cavanagh E. M., Ferder L., Carrasquedo F., Scrivo D., Wassermann A., Fraga C. G., Inserra F.** Higher levels of antioxidant defenses in enalapril-treated versus non-enalapril-treated hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 34(3): 445-55, 1999.
- de Cavanagh E. M., Fraga C. G., Ferder L., Inserra F.** Enalapril and captopril enhance antioxidant defenses in mouse tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 272(2): R514-518, 1997.
- Decosterd I., Woolf C. J.** Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain.* 87(2): 149-158, 2000.
- DeFronzo R. A.** Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes.* 37(6): 667-87, 1988.
- DeLeo J. A., Yeziarski R. P.** The role of neuroinflammation and neuroimmune activation in persistent pain. *Pain.* 90(1-2): 1-6, 2001.
- Dietze G. J., Wicklmayr M., Rett K., Jacob S., Henriksen E. J.** Potential role of bradykinin in forearm muscle metabolism in humans. *Diabetes.* 45 Suppl 1S110-4, 1996.
- Dray A.** Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol.* 75(6): 704-12, 1997.
- Duby J. J., Campbell R. K., Setter S. M., White J. R., Rasmussen K. A.** Diabetic neuropathy: an intensive review. *Am J Health Syst Pharm.* 61(2): 160-173, 2004.
- Duchene J., Schanstra J., Cellier E., Bascands J. L., Girolami J. P.** [30 years: Happy birthday, GPCR. The bradykinin B2 receptor: an alternative and antiproliferative pathway]. *Nephrologie.* 23(1): 39-41, 2002a.
- Duchene J., Schanstra J. P., Pecher C., Pizard A., Susini C., Esteve J. P., Bascands J. L., Girolami J. P.** A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem.* 277(43): 40375-83, 2002b.
- Dyck P. J., Zimmerman B. R., Vilen T. H., Minnerath S. R., Karnes J. L., Yao J. K., Poduslo J. F.** Nerve glucose, fructose, sorbitol, myo-inositol, and fiber degeneration and regeneration in diabetic neuropathy. *N Engl J Med.* 319(9): 542-8, 1988.

- EDIC.** Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC). Design, implementation, and preliminary results of a long-term follow-up of the Diabetes Control and Complications Trial cohort. *Diabetes Care*. 22(1): 99-111, 1999.
- El Midaoui A., de Champlain J.** Prevention of hypertension, insulin resistance, and oxidative stress by alpha-lipoic acid. *Hypertension*. 39(2): 303-7, 2002.
- El Midaoui A., Ongali B., Petcu M., Rodi D., de Champlain J., Neugebauer W., Couture R.** Increases of spinal kinin receptor binding sites in two rat models of insulin resistance. *Peptides*. 26(8): 1323-30, 2005.
- Feldman E. L.** Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest*. 111(4): 431-3, 2003.
- Feskens E. J., Virtanen S. M., Rasanen L., Tuomilehto J., Stengard J., Pekkanen J., Nissinen A., Kromhout D.** Dietary factors determining diabetes and impaired glucose tolerance. A 20-year follow-up of the Finnish and Dutch cohorts of the Seven Countries Study. *Diabetes Care*. 18(8): 1104-12, 1995.
- Figuroa C. D., Dietze G., Muller-Esterl W.** Immunolocalization of bradykinin B2 receptors on skeletal muscle cells. *Diabetes*. 45 Suppl 1S24-8, 1996.
- Fox A., Eastwood C., Gentry C., Manning D., Urban L.** Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain*. 81(3): 307-316, 1999.
- Fox A., Kaur S., Li B., Panesar M., Saha U., Davis C., Dragoni I., Colley S., Ritchie T., Bevan S., Burgess G., McIntyre P.** Antihyperalgesic activity of a novel nonpeptide bradykinin B1 receptor antagonist in transgenic mice expressing the human B1 receptor. *Br J Pharmacol*. 144(7): 889-899, 2005.
- Freedman D. S., Khan L. K., Dietz W. H., Srinivasan S. R., Berenson G. S.** Relationship of childhood obesity to coronary heart disease risk factors in adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Pediatrics*. 108(3): 712-8, 2001.
- Fukuda M., Ono T., Nishino H., Sasaki K.** Independent glucose effects on rat hypothalamic neurons: an in vitro study. *J Auton Nerv Syst*. 10(3-4): 373-81, 1984.
- Gabra B. H., Benrezzak O., Pheng L. H., Duta D., Daull P., Sirois P., Nantel F., Battistini B.** Inhibition of type 1 diabetic hyperalgesia in streptozotocin-induced

- Wistar versus spontaneous gene-prone BB/Worcester rats: efficacy of a selective bradykinin B1 receptor antagonist. *J Neuropathol Exp Neurol.* 64(9): 782-9, 2005b.
- Gabra B. H., Merino V. F., Bader M., Pesquero J. B., Sirois P.** Absence of diabetic hyperalgesia in bradykinin B1 receptor-knockout mice. *Regul Pept.* 127(1-3): 245-8, 2005c.
- Gabra B. H., Sirois P.** Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol.* 457(2-3): 115-24, 2002.
- Gabra B. H., Sirois P.** Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides.* 37(1): 36-44, 2003.
- Gabra B. H., Sirois P.** Hyperalgesia in non-obese diabetic (NOD) mice: a role for the inducible bradykinin B1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 514(1): 61-7, 2005a.
- Gadsby R.** Epidemiology of diabetes. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 54(9): 1165-1172, 2002.
- Gallagher A. M., Yu H., Printz M. P.** Bradykinin-induced reductions in collagen gene expression involve prostacyclin. *Hypertension.* 32(1): 84-8, 1998.
- Garrett N. E., Malcangio M., Dewhurst M., Tomlinson D. R.** [alpha]-Lipoic acid corrects neuropeptide deficits in diabetic rats via induction of trophic support. *Neuroscience Letters.* 222(3): 191-194, 1997.
- Giannoukakis N., Rudert W. A., Robbins P. D., Trucco M.** Targeting autoimmune diabetes with gene therapy. *Diabetes.* 48(11): 2107-21, 1999.
- Ha H., Kim K. H.** Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Res Clin Pract.* 45(2-3): 147-51, 1999.
- Haberer J.** Dysautonomie neurovégétative et anesthésie. *Conférences d'actualisation,* Elsevier, Paris, 117-137, 1998.
- Hagen T. M., Ingersoll R. T., Lykkesfeldt J., Liu J., Wehr C. M., Vinarsky V., Bartholomew J. C., Ames A. B.** (R)-alpha-lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *Faseb J.* 13(2): 411-8, 1999.
- Harris M. B., Ju H., Venema V. J., Liang H., Zou R., Michell B. J., Chen Z. P., Kemp B. E., Venema R. C.** Reciprocal phosphorylation and regulation of endothelial

nitric-oxide synthase in response to bradykinin stimulation. *J Biol Chem.* 276(19): 16587-91, 2001.

- Heilig C. W., Brosius F. C., 3rd, Henry D. N.** Glucose transporters of the glomerulus and the implications for diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 60S91-9, 1997.
- Heilig C. W., Kreisberg J. I., Freytag S., Murakami T., Ebina Y., Guo L., Heilig K., Loberg R., Qu X., Jin Y., Henry D., Brosius F. C., III.** Antisense GLUT-1 protects mesangial cells from glucose induction of GLUT-1 and fibronectin expression. *Am J Physiol Renal Physiol.* 280(4): F657-666, 2001.
- Henriksen E. J., Jacob S., Augustin H. J., Dietze G. J.** Glucose transport activity in insulin-resistant rat muscle. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and bradykinin antagonism. *Diabetes.* 45 Suppl 1S125-8, 1996.
- Henriksen E. J., Jacob S., Fogt D. L., Dietze G. J.** Effect of chronic bradykinin administration on insulin action in an animal model of insulin resistance. *Am J Physiol.* 275(1 Pt 2): R40-5, 1998.
- Henriksen E. J., Jacob S., Kinnick T. R., Youngblood E. B., Schmit M. B., Dietze G. J.** ACE inhibition and glucose transport in insulinresistant muscle: roles of bradykinin and nitric oxide. *Am J Physiol.* 277(1 Pt 2): R332-6, 1999.
- Huang Y. J., Fang V. S., Juan C. C., Chou Y. C., Kwok C. F., Ho L. T.** Amelioration of insulin resistance and hypertension in a fructose-fed rat model with fish oil supplementation. *Metabolism.* 46(11): 1252-8, 1997.
- Hwang I. S., Ho H., Hoffman B. B., Reaven G. M.** Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension.* 10(5): 512-6, 1987.
- Hwang I. S., Huang W. C., Wu J. N., Shian L. R., Reaven G. M.** Effect of fructose-induced hypertension on the renin-angiotensin-aldosterone system and atrial natriuretic factor. *Am J Hypertens.* 2(6 Pt 1): 424-7, 1989.
- Isami S., Kishikawa H., Araki E., Uehara M., Kaneko K., Shirotani T., Todaka M., Ura S., Motoyoshi S., Matsumoto K., Miyamura N., Shichiri M.** Bradykinin enhances GLUT4 translocation through the increase of insulin receptor tyrosine kinase in primary adipocytes: evidence that bradykinin stimulates the insulin signalling pathway. *Diabetologia.* 39(4): 412-20, 1996.

- Jacob S., Streeper R. S., Fogt D. L., Hokama J. Y., Tritschler H. J., Dietze G. J., Henriksen E. J.** The antioxidant alpha-lipoic acid enhances insulin-stimulated glucose metabolism in insulin-resistant rat skeletal muscle. *Diabetes*. 45(8): 1024-9, 1996.
- Jaffa A. A., Durazo-Arvizu R., Zheng D., Lackland D. T., Srikanth S., Garvey W. T., Schmaier A. H.** Plasma prekallikrein: a risk marker for hypertension and nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 52(5): 1215-21, 2003.
- Jaffa A. A., Rust P. F., Mayfield R. K.** Kinin, a mediator of diabetes-induced glomerular hyperfiltration. *Diabetes*. 44(2): 156-60, 1995.
- Jaffa A. A., Vio C., Velarde V., LeRoith D., Mayfield R. K.** Induction of renal kallikrein and renin gene expression by insulin and IGF-I in the diabetic rat. *Diabetes*. 46(12): 2049-56, 1997.
- Jin L., Zhang J. J., Chao L., Chao J.** Gene therapy in hypertension: adenovirus-mediated kallikrein gene delivery in hypertensive rats. *Hum Gene Ther*. 8(15): 1753-61, 1997.
- Khan G. M., Chen S. R., Pan H. L.** Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience*. 114(2): 291-9, 2002.
- Kim H. S., Krege J. H., Kluckman K. D., Hagaman J. R., Hodgin J. B., Best C. F., Jennette J. C., Coffman T. M., Maeda N., Smithies O.** Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(7): 2735-9, 1995.
- Kim M.-S., Park J.-Y., Namkoong C., Jang P.-G., Ryu J.-W., Song H.-S., Yun J.-Y., Namgoong I.-S., Ha J., Park I.-S., Lee I.-K., Viollet B., Youn J. H., Lee H.-K., Lee K.-U.** Anti-obesity effects of [alpha]-lipoic acid mediated by suppression of hypothalamic AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 10(7): 727-733, 2004.
- Kim S. K., Zhao Z. S., Lee Y. J., Lee K. E., Kang S. M., Choi D., Lim S. K., Chung N., Lee H. C., Cha B. S.** Left-ventricular diastolic dysfunction may be prevented by chronic treatment with PPAR-alpha or -gamma agonists in a type 2 diabetic animal model. *Diabetes Metab Res Rev*. 19(6): 487-93, 2003.

- King B. M.** The rise, fall, and resurrection of the ventromedial hypothalamus in the regulation of feeding behavior and body weight. *Physiol Behav.* 87(2): 221-44, 2006.
- Kishi K., Muromoto N., Nakaya Y., Miyata I., Hagi A., Hayashi H., Ebina Y.** Bradykinin directly triggers GLUT4 translocation via an insulin-independent pathway. *Diabetes.* 47(4): 550-8, 1998.
- Kohlman O., Jr., Neves Fde A., Ginoza M., Tavares A., Cezaretti M. L., Zanella M. T., Ribeiro A. B., Gavras I., Gavras H.** Role of bradykinin in insulin sensitivity and blood pressure regulation during hyperinsulinemia. *Hypertension.* 25(5): 1003-7, 1995.
- Koltzenburg M.** Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol.* 11(5): 515-21, 1998.
- Kromhout D., Menotti A., Bloemberg B., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Dontas A. S., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., et al.** Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev Med.* 24(3): 308-15, 1995.
- Lagneux C., Godin-Ribuot D., Demenge P., Ribuot C.** Nitric oxide and its role in the induction of kinin B(1)-receptors after heat stress in the rat. *Immunopharmacology.* 48(1): 43-9, 2000.
- Laustsen G.** Symlin for adults with type 1 and type 2 diabetes. *Nurse Pract.* 30(7): 55-7, 2005.
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S. W.** Animal Models of Nociception. *Pharmacol Rev.* 53(4): 597-652, 2001.
- Lee C., Miura K., Liu X., Zweier J. L.** Biphasic regulation of leukocyte superoxide generation by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem.* 275(50): 38965-72, 2000a.
- Lee C. I., Liu X., Zweier J. L.** Regulation of xanthine oxidase by nitric oxide and peroxynitrite. *J Biol Chem.* 275(13): 9369-76, 2000b.
- Lee J. H., McCarty R.** Pain threshold in diabetic rats: effects of good versus poor diabetic control. *Pain.* 50(2): 231-236, 1992.

- Li F., Abatan O. I., Kim H., Burnett D., Larkin D., Obrosova I. G., Stevens M. J.** Taurine reverses neurological and neurovascular deficits in Zucker diabetic fatty rats. *Neurobiology of Disease*. In Press, Corrected Proof,
- Like A. A., Rossini A. A.** Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science*. 193(4251): 415-7, 1976.
- Low P. A., Nickander K. K., Tritschler H. J.** The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 46 Suppl 2S38-42, 1997.
- Lukic M. L., Stosic-Grujicic S., Shahin A.** Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Dev Immunol*. 6(1-2): 119-28, 1998.
- Malmberg A. B., Yaksh T. L., Calcutt N. A.** Anti-nociceptive effects of the GM1 ganglioside derivative AGF 44 on the formalin test in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Neurosci Lett*. 161(1): 45-8, 1993.
- Mannion R. J., Doubell T. P., Coggeshall R. E., Woolf C. J.** Collateral Sprouting of Uninjured Primary Afferent A-Fibers into the Superficial Dorsal Horn of the Adult Rat Spinal Cord after Topical Capsaicin Treatment to the Sciatic Nerve. *J. Neurosci*. 16(16): 5189-5195, 1996.
- Marceau F., Hess J. F., Bachvarov D. R.** The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*. 50(3): 357-86, 1998.
- Marceau F., Regoli D.** Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 3(10): 845-52, 2004.
- Maritim A. C., Sanders R. A., Watkins J. B., 3rd.** Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem*. 14(5): 288-94, 2003.
- Mayfield R. K., Margolius H. S., Levine J. H., Wohltmann H. J., Loadholt C. B., Colwell J. A.** Urinary kallikrein excretion in insulin-dependent diabetes mellitus and its relationship to glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab*. 59(2): 278-86, 1984.
- McCarty M. F.** ACE inhibition may decrease diabetes risk by boosting the impact of bradykinin on adipocytes. *Med Hypotheses*. 60(6): 779-83, 2003.

- McKemy D. D., Neuhausser W. M., Julius D.** Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*. 416(6876): 52-58, 2002.
- Meneton P., Bloch-Faure M., Hagege A. A., Ruetten H., Huang W., Bergaya S., Ceiler D., Gehring D., Martins I., Salmon G., Boulanger C. M., Nussberger J., Crozatier B., Gasc J. M., Heudes D., Bruneval P., Doetschman T., Menard J., Alhenc-Gelas F.** Cardiovascular abnormalities with normal blood pressure in tissue kallikrein-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(5): 2634-9, 2001.
- Midaoui A. E., Elimadi A., Wu L., Haddad P. S., de Champlain J.** Lipoic acid prevents hypertension, hyperglycemia, and the increase in heart mitochondrial superoxide production. *Am J Hypertens*. 16(3): 173-9, 2003.
- Milano W. C., Wild K. D., Hui Y., Hubbell C. L., Reid L. D.** PCP, THC, ethanol, and morphine and consumption of palatable solutions. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 31(4): 893-897, 1988.
- Miller C. C., Martin R. J., Whitney M. L., Edwards G. L.** Intracerebroventricular injection of fructose stimulates feeding in rats. *Nutr Neurosci*. 5(5): 359-62, 2002.
- Miyata T., Taguchi T., Uehara M., Isami S., Kishikawa H., Kaneko K., Araki E., Shichiri M.** Bradykinin potentiates insulin-stimulated glucose uptake and enhances insulin signal through the bradykinin B2 receptor in dog skeletal muscle and rat L6 myoblasts. *Eur J Endocrinol*. 138(3): 344-52, 1998.
- Mukherjee K., Mathur R., Nayar U.** Effect of VMH lesion on sucrose-Fed nociceptive responses. *Jpn J Physiol*. 50(4): 395-404, 2000.
- Mukherjee K., Mathur R., Nayar U.** Ventromedial hypothalamic mediation of sucrose feeding induced pain modulation. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 68(1): 43-48, 2001.
- Mukherjee K., Mathur R., Nayar U.** Hyperalgesic response in rats fed sucrose from weaning to adulthood: : Role of VMH. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 73(3): 601-610, 2002.
- Nagamatsu M., Nickander K. K., Schmelzer J. D., Raya A., Wittrock D. A., Tritschler H., Low P. A.** Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and

improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 18(8): 1160-7, 1995.

- Nishikawa T., Edelstein D., Du X. L., Yamagishi S., Matsumura T., Kaneda Y., Yorek M. A., Beebe D., Oates P. J., Hammes H. P., Giardino I., Brownlee M.** Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*. 404(6779): 787-90, 2000.
- Obrosova I. G.** How does glucose generate oxidative stress in peripheral nerve? *International Review Of Neurobiology*. 503-35, 2002.
- Obrosova I. G., Fathallah L., Stevens M. J.** Taurine Counteracts Oxidative Stress and Nerve Growth Factor Deficit in Early Experimental Diabetic Neuropathy. *Experimental Neurology*. 172(1): 211-219, 2001.
- Obrosova I. G., Van Huysen C., Fathallah L., Cao X. C., Greene D. A., Stevens M. J.** An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *The FASEB Journal: Official Publication Of The Federation Of American Societies For Experimental Biology*. 16(1): 123-125, 2002.
- Ongali B., Buck Hde S., Cloutier F., Legault F., Regoli D., Lambert C., Thibault G., Couture R.** Chronic effects of angiotensin-converting enzyme inhibition on kinin receptor binding sites in the rat spinal cord. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 284(6): H1949-58, 2003.
- Ongali B., Campos M. M., Petcu M., Rodi D., Cloutier F., Chabot J. G., Thibault G., Couture R.** Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport*. 15(16): 2463-6, 2004.
- Ongali B., Hellal F., Rodi D., Plotkine M., Marchand-Verrecchia C., Pruneau D., Couture R.** Autoradiographic analysis of mouse brain kinin B1 and B2 receptors after closed head trauma and ability of anatibant mesylate to cross the blood-brain barrier. *Journal of Neurotrauma*. 23(5): 696-707, 2006.
- Ono T., Oomura Y., Nishino H., Sasaki K., Muramoto K., Yano I.** Morphine and enkephalin effects on hypothalamic glucoresponsive neurons. *Brain Research*. 185(1): 208-212, 1980.

- Peier A. M., Moqrich A., Hergarden A. C., Reeve A. J., Andersson D. A., Story G. M., Earley T. J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., Patapoutian A.** A TRP Channel that Senses Cold Stimuli and Menthol. *Cell*. 108(5): 705-715, 2002.
- Pelikanova T., Pinsker P., Smrkova I., Stribrna L., Dryakova M.** Decreased Urinary Kallikrein with Hyperglycemia in Patients with Short-Term Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*. 12(5): 264-272, 1998.
- Petcu M., Ongali B., Dias J. P., Pruneau D., Couture R.** Role of kinin B₁ and B₂ receptors in a rat model of neuropathic pain, article en revision.
- Petcu M., Ongali B., El Midaoui A., de Champlain J., Couture R.** Effects of alpha-lipoic acid on kinin B₁ and B₂ receptor binding sites in the spinal cord of chronically angiotensin-treated rats. *Peptides*. 26(8): 1331-8, 2005.
- Pop-Busui R., Sima A., Stevens M.** Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev*, 2006.
- Porreca F., Vanderah T. W., Guo W., Barth M., Dodey P., Peyrou V., Luccarini J. M., Junien J. L., Pruneau D.** Antinociceptive Pharmacology of LF22-0542, A Novel Non-Peptidic Bradykinin B₁ Receptor Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006.
- Qadri F., Stark E., Hauser W., Johren O., Dendorfer A., Dominiak P.** Expression of kinin receptor mRNA in the HPA axis of type 1 and type 2 diabetic rats. *Int Immunopharmacol*. 4(4): 571-6, 2004.
- Rabito S. F., Minshall R. D., Nakamura F., Wang L. X.** Bradykinin B₂ receptors on skeletal muscle are coupled to inositol 1,4,5-trisphosphate formation. *Diabetes*. 45 Suppl 1S29-33, 1996.
- Reaven G. M., Ho H., Hoffman B. B.** Attenuation of fructose-induced hypertension in rats by exercise training. *Hypertension*. 12(2): 129-32, 1988.
- Reaven G. M., Ho H., Hoffmann B. B.** Somatostatin inhibition of fructose-induced hypertension. *Hypertension*. 14(2): 117-20, 1989.
- Rett K., Wicklmayr M., Dietze G. J.** Metabolic effects of kinins: historical and recent developments. *J Cardiovasc Pharmacol*. 15 Suppl 6S57-9, 1990.
- Rett K., Wicklmayr M., Dietze G. J., Haring H. U.** Insulin-induced glucose transporter (GLUT1 and GLUT4) translocation in cardiac muscle tissue is mimicked by bradykinin. *Diabetes*. 45 Suppl 1S66-9, 1996.

- Rodrigues B., McNeill J. H.** Cardiac function in spontaneously hypertensive diabetic rats. *The American Journal Of Physiology*. 251(3, Part 2): H571-H580, 1986.
- Romieu I., Willett W. C., Stampfer M. J., Colditz G. A., Sampson L., Rosner B., Hennekens C. H., Speizer F. E.** Energy intake and other determinants of relative weight. *Am J Clin Nutr*. 47(3): 406-12, 1988.
- Rothschild A. M., Melo V. L., Reis M. L., Foss M. C., Gallo L., Jr.** Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 360(2): 217-20, 1999.
- Sardi S. P., Daray F. M., Errasti A. E., Pelorosso F. G., Pujol-Lereis V. A., Rey-Ares V., Rogines-Velo M. P., Rothlin R. P.** Further pharmacological characterization of bradykinin B1 receptor up-regulation in human umbilical vein. *J Pharmacol Exp Ther*. 290(3): 1019-25, 1999.
- Schanstra J. P., Bataille E., Marin Castano M. E., Barascud Y., Hirtz C., Pesquero J. B., Pecher C., Gauthier F., Girolami J. P., Bascands J. L.** The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest*. 101(10): 2080-91, 1998.
- Schmidt R. E., Dorsey D. A., Beaudet L. N., Parvin C. A., Yarasheski K. E., Smith S. R., Williamson J. R., Peterson R. G., Oates P. J.** A potent sorbitol dehydrogenase inhibitor exacerbates sympathetic autonomic neuropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Experimental Neurology*. 192(2): 407-419, 2005.
- Schnedl W. J., Ferber S., Johnson J. H., Newgard C. B.** STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes*. 43(11): 1326-33, 1994.
- Shepherd P. R., Kahn B. B.** Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 341(4): 248-57, 1999.
- Shimoshige Y., Ikuma K., Yamamoto T., Takakura S., Kawamura I., Seki J., Mutoh S., Goto T.** The effects of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on peripheral neuropathy in Zucker diabetic fatty rats. *Metabolism*. 49(11): 1395-1399, 2000.

- Sikdar S. K., Oomura Y.** Selective inhibition of glucose-sensitive neurons in rat lateral hypothalamus by noxious stimuli and morphine. *Journal Of Neurophysiology*. 53(1): 17-31, 1985.
- Simmons Z., Feldman E. L.** Update on diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 15(5): 595-603, 2002.
- Simone D. A.** Neural mechanisms of hyperalgesia. *Curr Opin Neurobiol*. 2(4): 479-83, 1992.
- Stevens M. J., Lattimer S. A., Kamijo M., Van Huysen C., Sima A. A. F., Greene D. A.** Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia*. 36(7): 608-614, 1993.
- Stevens M. J., Obrosova I., Cao X., Van Huysen C., Greene D. A.** Effects of DL-alpha-lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 49(6): 1006-1015, 2000.
- Sullivan K. A., Feldman E. L.** New developments in diabetic neuropathy. *Curr Opin Neurol*. 18(5): 586-90, 2005.
- Thomas P. K., Tomlinson D. R.** Diabetic and hypoglycemic neuropathy. In: P.J. Dyck and P.K. Thomas (Eds.), *Peripheral Neuropathy*, W.B. Saunders, Philadelphia. pp. 1219-1250, 1993.
- Tobey T. A., Mondon C. E., Zavaroni I., Reaven G. M.** Mechanism of insulin resistance in fructose-fed rats. *Metabolism*. 31(6): 608-12, 1982.
- Tomiyama H., Kushiro T., Abeta H., Ishii T., Takahashi A., Furukawa L., Asagami T., Hino T., Saito F., Otsuka Y., et al.** Kinins contribute to the improvement of insulin sensitivity during treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor. *Hypertension*. 23(4): 450-5, 1994.
- Trabold F., Pons S., Hagege A. A., Bloch-Faure M., Alhenc-Gelas F., Giudicelli J. F., Richer-Giudicelli C., Meneton P.** Cardiovascular phenotypes of kinin B2 receptor- and tissue kallikrein-deficient mice. *Hypertension*. 40(1): 90-5, 2002.
- Truswell A. S.** Glycaemic index of foods. *Eur J Clin Nutr*. 46 Suppl 2S91-101, 1992.

- Tschope C., Seidl U., Reinecke A., Riester U., Graf K., Schultheiss H. P., Hilgenfeldt U., Unger T.** Kinins are involved in the antiproteinuric effect of angiotensin-converting enzyme inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Int Immunopharmacol.* 3(3): 335-44, 2003.
- Tschope C., Walther T., Yu M., Reinecke A., Koch M., Seligmann C., Heringer S. B., Pesquero J. B., Bader M., Schultheiss H., Unger T.** Myocardial expression of rat bradykinin receptors and two tissue kallikrein genes in experimental diabetes. *Immunopharmacology.* 44(1-2): 35-42, 1999.
- Uehara M., Kishikawa H., Isami S., Kisanuki K., Ohkubo Y., Miyamura N., Miyata T., Yano T., Shichiri M.** Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulphydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. *Diabetologia.* 37(3): 300-7, 1994.
- Vasdev S., Ford C. A., Parai S., Longerich L., Gadag V.** Dietary alpha-lipoic acid supplementation lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 18(5): 567-73, 2000.
- Vasdev S., Gill V., Parai S., Gadag V.** Dietary lipoic acid supplementation attenuates hypertension in Dahl salt sensitive rats. *Mol Cell Biochem.* 275(1-2): 135-41, 2005.
- Vinik A. I., Maser R. E., Mitchell B. D., Freeman R.** Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes Care.* 26(5): 1553-79, 2003.
- Vinik A. I., Mehrabyan A.** Diabetic neuropathies. *Medical Clinics of North America, Saunders.* 88(4): 947-999, 2004.
- Vinik A. I., Park T. S., Stansberry K. B., Pittenger G. L.** Diabetic neuropathies. *Diabetologia.* 43(8): 957-73, 2000.
- Wang C., Chao L., Chao J.** Direct gene delivery of human tissue kallikrein reduces blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Clin Invest.* 95(4): 1710-6, 1995.
- Willenbring S., DeLeo J. A., Coombs D. W.** Differential behavioral outcomes in the sciatic cryoneurolysis model of neuropathic pain in rats. *Pain.* 58(2): 135-140, 1994.
- Willett W. C.** Dietary fat plays a major role in obesity: no. *Obes Rev.* 3(2): 59-68, 2002.

- Wilson G. L., Hartig P. C., Patton N. J., LeDoux S. P.** Mechanisms of nitrosourea-induced beta-cell damage. Activation of poly (ADP-ribose) synthetase and cellular distribution. *Diabetes*. 37(2): 213-6, 1988.
- Woolf C. J., Doubell T. P.** The pathophysiology of chronic pain--increased sensitivity to low threshold A beta-fibre inputs. *Curr Opin Neurobiol*. 4(4): 525-34, 1994.
- Woolf C. J., Shortland P., Coggeshall R. E.** Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature*. 355(6355): 75-78, 1992.
- Wu L. Y., Juan C. C., Hwang L. S., Hsu Y. P., Ho P. H., Ho L. T.** Green tea supplementation ameliorates insulin resistance and increases glucose transporter IV content in a fructose-fed rat model. *Eur J Nutr*. 43(2): 116-24, 2004.
- Wu R., Millette E., Wu L., de Champlain J.** Enhanced superoxide anion formation in vascular tissues from spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J Hypertens*. 19(4): 741-8, 2001.
- Yamasaki S., Sawada S., Komatsu S., Kawahara T., Tsuda Y., Sato T., Toratani A., Kono Y., Higaki T., Imamura H., Tada Y., Akamatsu N., Tamagaki T., Tsuji H., Nakagawa M.** Effects of bradykinin on prostaglandin I(2) synthesis in human vascular endothelial cells. *Hypertension*. 36(2): 201-7, 2000.
- Yang C., Hsu W. H.** Glucose-dependency of bradykinin-induced insulin secretion from the perfused rat pancreas. *Regulatory Peptides*. 71(1): 23-28, 1997.
- Yerneni K. K., Bai W., Khan B. V., Medford R. M., Natarajan R.** Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*. 48(4): 855-64, 1999.
- Zavaroni I., Sander S., Scott S., Reaven G. M.** Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. *Metabolism*. 29(10): 970-3, 1980.
- Zhao C., Wang P., Xiao X., Chao J., Chao L., Wang D. W., Zeldin D. C.** Gene therapy with human tissue kallikrein reduces hypertension and hyperinsulinemia in fructose-induced hypertensive rats. *Hypertension*. 42(5): 1026-33, 2003.
- Ziegler D.** Thioctic acid for patients with symptomatic diabetic polyneuropathy: a critical review. *Treat Endocrinol*. 3(3): 173-89, 2004.
- Zimmet P.** The burden of type 2 diabetes: are we doing enough? *Diabetes Metab*. 29(4 Pt 2): 6S9-18, 2003.

Zuccollo A., Navarro M., Prendes G. M., Dominguez A., Catanzaro O. L. Effects of HOE 140 on some renal functions in type I diabetic mice. *Arch Physiol Biochem.* 104(2): 252-4, 1996.

Annexe

ARTICLES

1. Calin Lungu, Jenny Pena Dias, Camilla Estevão de França, Brice Ongali, Domenico Regoli, Florina Moldovan, Réjean Couture: Involvement of kinin B₁ receptor and oxidative stress in pain neuropathy and arterial hypertension in an experimental rat model of type 2 diabetes (*soumis*)

PRESENTATIONS ORALES

1. Calin Lungu, Adil El Midaoui, Jacques de Champlain, Réjean Couture : Implication des récepteurs des kinines et du stress oxydatif dans les anomalies nociceptives et l'hypertension artérielle associées au diabète de type 2.

Congrès ABCD, Hôpital Notre-Dame du CHUM, Montréal QC, 30 septembre 2005.

2. Calin Lungu, Adil El Midaoui, Jacques de Champlain, Réjean Couture : Implication des récepteurs des kinines et du stress oxydatif dans les anomalies nociceptives et l'hypertension artérielle associées au diabète de type 2.

16^{ième} Journée scientifique du GRSNA, Université de Montréal, 22 avril 2005.

3. Mécanisme d'induction du récepteur B1 des kinines dans la moelle épinière du rat diabétique et sa relation avec la thermonociception.

Seminaire de maîtrise en physiologie (PSL 6051), Université de Montréal, 29 janvier 2004

BOURSES

1. Bourse d'étude GRSNA – Bayer (septembre 2003- août 2004). Valeur : 10 000 \$

ATTN: Dr. [Redacted]
Brice Ongali

Déclaration des coauteurs d'un article

1. Identification de l'étudiant et du programme

Lungu Calin Andrei
M.Sc. physiologie (2-525-1-0)

2. Description de Particule

Involvement of kinin B₁ receptor and oxidative stress in pain neuropathy and arterial hypertension in an experimental rat model of type 2 diabetes.
C. Lungu, J. P. Dias, C. Estevão de França, B. Ongali, D. Regoli, F. Moldovan, R. Couture

Article soumis pour la publication en décembre 2006 à Diabetologia

3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Calin Andrei Lungu inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre « Étude des récepteurs des kinines dans les complications diabétiques chez le rat »

Jenny Peña Dias [Redacted Signature] 24/01/2007
Coauteur Signature Date

Camila Estevão de França [Redacted Signature] 02.03.2007
Coauteur Signature Date

BRICE ONGALI [Redacted Signature] 21/03/07
Coauteur Signature Date

Domenico Regoli [Redacted Signature] 25/1/07
Coauteur Signature Date

MOLDOVAN FLORINA [Redacted Signature] 28.02.07
Coauteur Signature Date

REJEAN COUTURE [Redacted Signature] 26 Janv '07
Coauteur Signature Date

