

Sylvain Bédard

**RÔLE DE L'OXYDE NITRIQUE DANS LE DÉVELOPPEMENT
DE LA RÉSISTANCE À L'INSULINE INDUITE PAR LES
CYTOKINES DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE**

Mémoire
présenté
à la faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès science (M.Sc.)

Programme de physiologie
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL

SEPTEMBRE 1998



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-38011-4

RÉSUMÉ

La résistance cellulaire aux actions métaboliques de l'insuline est un désordre primordial dans le diabète et la septicémie. Il a été suggéré que le développement de la résistance à l'insuline dans ces pathologies est associé à une surproduction de certaines cytokines pro-inflammatoires. Le mécanisme d'action via lequel les cytokines peuvent causer la résistance à l'insuline a été peu étudié, particulièrement dans le muscle squelettique.

Récemment, des études ont démontré que le muscle squelettique exprime les trois isoformes de l'enzyme responsable de la synthèse de l'oxyde nitrique (NO) soit la NO synthétase. Il a également été démontré qu'un traitement aux cytokines permet d'induire l'expression de l'isoforme inducible (iNOS) dans le muscle squelettique. La première étude visait à déterminer le rôle de iNOS dans le développement de la résistance à l'insuline induite par les cytokines dans le muscle squelettique.

Nos résultats démontrent qu'un traitement chronique avec des cytokines et l'endotoxine lipopolysaccharide (LPS) induit l'expression de iNOS dans les cellules musculaires L6 en culture. Nous avons également démontré que la production de NO par iNOS est responsable de l'augmentation du transport de glucose de base. Cependant, l'induction de iNOS par les cytokines cause une diminution de l'action de l'insuline sur le transport du glucose dans le muscle squelettique.

Par ailleurs, une seconde étude a permis de mettre en évidence que l'insuline module l'expression de iNOS par un mécanisme post-transcriptionnel. Ces résultats suggèrent que le manque d'insuline ou le manque d'action de cette hormone pourrait expliquer l'augmentation de l'activité de iNOS observée au niveau musculaire dans certaines pathologies comme le diabète et la septicémie. Ces deux études nous ont permis de mettre en évidence les mécanismes de régulation et le rôle de iNOS dans la modulation du transport du glucose dans le muscle squelettique.

AVANT-PROPOS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr. André Marette pour m'avoir permis de réaliser mes études graduées dans son laboratoire. Il m'a fait bénéficier de son expérience ainsi que de son enthousiasme pour la recherche. Je tiens également à le remercier pour sa patience mais aussi pour ses multiples encouragements tout au long de ma maîtrise. Je tiens à lui exprimer ma reconnaissance pour tous ses bons conseils que ce soit au niveau scientifique ou bien dans la réalisation de sauts acrobatiques en ski alpin (la scène du Rambo).

Je tiens à saluer l'assistant de recherche Bruno Marcotte pour son support technique mais également tous les étudiants du laboratoire soit Luce, Sonia, Kathleen pour son sens de l'humour, Mylène pour son aide durant les clamps et pour les expériences d'activité NOS, Charles Lavigne pour les cannulations, et tous les autres étudiants. J'aimerais remercier notre bon voisin c'est-à-dire le Dr. Claude H. Côté pour m'avoir permis d'acquérir plusieurs connaissances concernant la physiologie du muscle squelettique mais également pour ses bons conseils concernant le vélo de montagne.

Je veux également remercier le Dr. Patrick Couture ainsi que toutes les personnes qui travaillent au C.R.M.L, Bernard, Doris, Sylvie, Michelle, Louise et tous les autres.

Je tiens finalement à remercier ma famille et mes amis pour leur support inconditionnel durant mes études graduées.

Cette étude a été rendue possible grâce au support du fond FCAR-FRSQ.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	ii
AVANT-PROPOS.....	iii
LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	ix

INTRODUCTION

1. La résistance à l'insuline.....	1
2. Fonctions et mécanismes d'action de l'insuline.....	2
2.1 Les rôles de l'insuline.....	2
2.2 Le récepteur de l'insuline.....	2
2.3 Le système de signalisation.....	3
3. Le transport du glucose.....	5
3.1 GLUT1.....	7
3.2 GLUT3.....	7
3.3 GLUT4.....	7
4. Causes de la résistance à l'insuline.....	8
4.1 Les antagonistes hormonaux	9
4.2 Les antagonistes non hormonaux.....	9
4.2.1 Les acides gras libres.....	9
4.2.2 La leptine.....	10
4.2.3 Le TNF- α	11
4.2.3.1 Effet du TNF- α dans le tissu adipeux.....	11
4.2.3.2 Effet du TNF- α dans le muscle squelettique....	12
5. Controverse.....	12
6. Les mécanismes d'action du TNF- α	13
6.1 La voie de la sphingomyéline.....	13
7. L'Oxyde Nitrique.....	14
7.1 Introduction.....	14
7.2 La chimie du NO.....	15
7.3 L'oxyde nitrique synthétase.....	16

8. Les isoformes.....	17
8.1 Les isoformes calcium dépendants: nNOS et eNOS.....	18
8.1.1 L'enzyme nNOS.....	18
8.1.1.1 nNOS dans le muscle squelettique.....	18
8.1.2 L'enzyme eNOS.....	20
8.1.2.1 eNOS dans le muscle squelettique.....	20
8.1.3 L'isoforme calcium indépendant: iNOS.....	21
9. L'induction de iNOS.....	21
9.1 Le TNF- α	22
9.2 L'IFN- γ	23
9.3 Les interleukines.....	23
9.4 La Lipopolysaccharide (LPS).....	24
10. iNOS dans le muscle squelettique.....	24
11. Régulation transcriptionnelle de iNOS.....	25
12. But de l'étude.....	26

CHAPITRE I

LES CYTOKINES MODULENT LE TRANSPORT DU GLUCOSE DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE EN INDUISANT L'EXPRESSION DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHÉTASE INDUCTIBLE.....	28
RÉSUMÉ.....	29
Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase.....	30
ABSTRACT.....	31
INTRODUCTION.....	33
MATERIALS & METHODS.....	34
RESULTS.....	39
DISCUSSION.....	42
REFERENCES.....	48

CHAPITRE II

L'INSULINE INHIBE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHÉTASE INDUCTIBLE DANS LES CELLULES DE MUSCLE SQUELETTIQUE.....	61
RÉSUMÉ.....	62
Insulin inhibits inducible nitric oxide synthase in skeletal muscle cells.....	63
ABSTRACT.....	64
INTRODUCTION.....	65
MATERIALS & METHODS.....	66
RESULTS.....	67
DISCUSSION.....	69
REFERENCES.....	73
CONCLUSION.....	83
REFERENCES.....	87

LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1 Système de signalisation de l'insuline.....4

Figure 2 Représentation schématique de l'orientation d'un transporteur de glucose dans la membrane plasmique.....6

Tableau 1 Fonctions et distribution des transporteurs de glucose.....6

Figure 3 Réaction de formation du NO à partir de la conversion de la L-arginine en L-citrulline.....16

Figure 4 Rôle de la calmoduline (CaM) dans l'alignement des domaines oxygénase et réductase de l'enzyme NOS.....17

CONCLUSION

Figure 5 Gels représentatifs des effets des cytokines et de la LPS sur la phosphorylation de IRS-1 (A) et du récepteur à l'insuline (IR) (B) dans les myocytes L6.....84

CHAPITRE I

Table 1 Effect of TNF- α , IFN- γ , LPS and L-NAME on nitrite production by L6 myocytes.....51

Table 2 Effects of chronic cytokines/LPS exposure on basal and insulin-stimulated glucose transport in L6 myocytes.....52

Table 3 Effects of chronic cytokines/LPS exposure on lactate and glucose concentrations in the culture medium of L6 myocytes.....	53
Figure 1 Effect of TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (200 units/ml) and LPS (10 μ g/ml) on the expression of iNOS mRNA in L6 myocytes.....	54
Figure 2 Effect of TNF- α (10 ng/ml), IFN- γ (200 units/ml) and LPS (10 μ g/ml) on the expression of iNOS protein in L6 myocytes.....	55
Figure 3 Histochemical detection of NOS in control (A) and cytokines/LPS-treated (B) L6 myocytes.....	56
Figure 4 Dose-response curves of insulin-stimulated glucose transport in control and cytokines (cyto)/LPS-treated L6 myocytes.....	57
Figure 5 Effects of cytokines/LPS and L-NAME on the expression of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 glucose transporter proteins in L6 myocytes.....	58

CHAPITRE II

Figure 1 Effects of cytokines and LPS on iNOS mRNA expression and nitrite production in L6 myocytes.....	79
Figure 2 Effects of insulin and/or dexamethasone on cytokines/LPS-induced NO production in L6 myocytes.....	80
Figure 3 Dose-response relationships for the effects of insulin and/or dexamethasone on cytokines/LPS-induced NO production in L6 myocytes.....	81
Figure 4 Effect of insulin and/or dexamethasone on cytokines/LPS-induced iNOS expression in L6 myocytes.....	82

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BH₄ : Tétrahydrobioptérine
CaM : Calmoduline
CAPK : Ceramide-activated protein kinase
CAT : Cationic amino acid transporter
EDL : extensor digitorum longus
eNOS : Endothelial nitric oxide synthase
FABPs : Fatty acids binding proteins
FAD : Flavine-adénine-dinucléotide
FMN : Flavine mononucléotide
GLUT : Glucose transporter
GMPc : Guanydyl monophosphate cyclique
IFN- γ : Interféron gamma
IL-1 β : Interleukine-1 β
IL-6 : Interleukine-6
i- κ B α : Inhibiteur de NF- κ B
iNOS : Inducible nitric oxide synthase
IRS : Insulin receptor substrate
JAKs : Janus Kinases
LBP : Lipopolysaccharide binding protein
L-NAME : N^G-nitro-L-arginine-methyl ester
L-NMMA : N^G-monomethyl-L-arginine
LPS : Lipopolysaccharide
MAP kinase : Mitogen-activated protein kinase
NADPH : β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NF- κ B : Nuclear factor kappa B
NIDDM: Non insulin dependent diabetes mellitus
NK : Natural killer
nNOS : Neuronal nitric oxide synthase
NO : Nitric oxide
NOS : Nitric oxide synthase
PI 3-kinase : Phosphatidylinositol 3-kinase
PIP2-PIP3 : Phosphatidylinositol bis et triphosphate
PKB : Protéine kinase B
PKC : Protéine kinase C
STAT : Signal transducers and activators of transcription
TGF- β 1 : Transforming growth factor bêta 1
Th : Cellules T helper
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

INTRODUCTION

1. La résistance à l'insuline

L'obésité est très fréquemment retrouvée dans les sociétés industrialisées. En effet plus de 30 % de la population adulte des États-Unis souffre d'obésité (148). Cette maladie produit plusieurs changements importants au niveau du métabolisme et entraîne de nombreuses complications selon le degré d'obésité. L'obésité est associée à une forte prévalence des maladies cardiovasculaires comme l'hypertension, l'insuffisance coronarienne et les thromboses veineuses (157). Ce désordre métabolique est également associé au développement des affections pulmonaires, rénales (157) à l'athérosclérose et à la dyslipidémie (52, 142). De plus, cette maladie est un facteur de risque majeur dans le développement du diabète non insulino-dépendant (NIDDM). D'ailleurs, une étude a démontré que plus de 80 % des personnes obèses souffrent de diabète de type II (17). La résistance à l'insuline est considérée comme le lien pathophysiologique entre ces deux désordres métaboliques puisqu'elle est impliquée au niveau du développement des maladies associées à l'obésité et est considérée comme un facteur majeur dans le développement du diabète de type II. L'infection et les chocs septiques sont également associés à un état de résistance à l'insuline. En effet, ces désordres métaboliques provoquent une diminution de la tolérance au glucose, l'hyperinsulinémie et une réduction de l'action de l'insuline sur l'utilisation périphérique du glucose (170, 201). La résistance à l'insuline survient lorsqu'une dose supplémentaire d'insuline est nécessaire pour faire entrer dans la cellule une quantité de glucose donnée. L'inefficacité de l'insuline à stimuler le transport du glucose provoque une hyperglycémie ce qui entraîne une augmentation de la sécrétion d'insuline. Lorsque cette hyperinsulinémie compensatoire ne peut être maintenue, les sujets développent le diabète de type II.

Le diabète de type II ou non insulino dépendant est la forme de diabète la plus souvent retrouvée. En effet, environ 85 % de la population diabétique est de type II (95). Cette maladie survient généralement chez des personnes de plus de 40 ans qui démontrent un certain degré d'obésité (30). Le diabète de type II est caractérisé par une inefficacité de l'insuline à stimuler le transport du glucose dans le muscle et le tissu adipeux mais également par un manque d'action de l'insuline à

inhiber la production de glucose par le foie. La diminution de la sensibilité à l'insuline favorise l'hyperglycémie chronique et une intolérance au glucose, deux caractéristiques inhérentes au diabète de type II.

2. Fonctions et mécanismes d'action de l'insuline

2.1 Les rôles de l'insuline

L'insuline exerce plusieurs effets importants sur le métabolisme des glucides, lipides et des protéines. Un des rôles principaux de l'insuline consiste à maintenir l'homéostasie du glucose dans l'organisme. Cet effet survient principalement dans le foie, les muscles squelettique, cardiaque et dans le tissu adipeux.

Dans le foie, l'insuline stimule le stockage de glycogène et inhibe la production de glucose en diminuant la gluconéogénèse et la glycogénolyse. Dans le muscle, deux conditions provoquent l'augmentation de l'utilisation du glucose : l'exercice et la prise alimentaire. L'augmentation du transport du glucose durant l'exercice ne requiert aucune augmentation de la sécrétion d'insuline puisque le processus de contraction augmente, par des mécanismes encore mal définis, le transport du glucose (136, 149). Contrairement à l'exercice, l'augmentation du transport du glucose suite à la prise alimentaire résulte d'une augmentation de la sécrétion d'insuline. Le glucose transporté dans le muscle suite à la prise alimentaire est rapidement transformé et stocké sous forme de glycogène.

L'insuline joue également un rôle très important dans le métabolisme des lipides. L'insuline inhibe la lipolyse et stimule le transport du glucose à travers la membrane des adipocytes. Le glucose transporté est utilisé pour la synthèse d'acides gras qui sont par la suite entreposés sous forme de triglycérides. Plusieurs autres rôles peuvent être attribués à l'insuline. Il a été démontré que l'insuline a un effet stimulateur sur le transport des acides aminés ainsi que sur la synthèse des protéines (101).

2.2 Le récepteur de l'insuline

L'interaction de l'insuline avec son récepteur permet la réalisation des différents effets de cette hormone. Le récepteur à l'insuline est un tétramère

d'environ 300 KDa qui est formé de deux sous unités α et de deux sous unités β reliées par des ponts disulfures (figure 1). Le domaine transmembranaire du récepteur dirige le signal de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule tandis que le domaine extracellulaire du récepteur confère l'affinité nécessaire à la liaison de l'insuline. En effet, des études de mutagenèse dirigée ont démontré que le domaine de la sous-unité α encodée par l'exon 2 est très important pour la liaison de l'insuline (49).

2.3 Le système de signalisation

Plusieurs étapes importantes dans le système de signalisation de l'insuline ont été rapportées (figure 1). Premièrement, la liaison de l'insuline à son récepteur provoque l'internalisation du complexe hormone-récepteur dans des vésicules membranaires. Cette étape n'est toutefois pas essentielle à la signalisation puisqu'une étude a récemment démontré que l'inhibition de l'internalisation du récepteur n'affecte pas les effets à court terme de l'insuline (29). La liaison de l'insuline à son récepteur provoque l'autophosphorylation du récepteur à l'insuline sur des résidus tyrosines de la sous unité β . Cette phosphorylation stimule l'activité intrinsèque tyrosine kinase du récepteur et entraîne la phosphorylation d'une protéine appelée IRS (insulin receptor substrate). Quatre isoformes de la protéine IRS ont jusqu'à maintenant été découverts. Dans le muscle squelettique le système de signalisation de l'insuline fonctionne principalement via la phosphorylation de la protéine IRS-1 (203). Toutefois des études ont rapporté que l'inhibition de IRS-1 par des anticorps spécifiques n'affecte pas la translocation du transporteur GLUT4 (84). Ces études suggèrent que d'autres protéines semblent être impliquées dans la signalisation de l'insuline. Les protéines IRS-3 et IRS-4 ne peuvent participer à cette réaction étant donné que IRS-3 est uniquement exprimé dans le tissu adipeux (167) et que IRS-4 est exprimé seulement dans les reins (116). Toutefois, la protéine IRS-2 semble jouer un rôle très important dans le système de signalisation à l'insuline. En effet, il a été démontré que chez la souris déficiente en IRS-1, IRS-2 peut remplacer la protéine IRS-1 de façon à permettre l'activation du transport de glucose (84). Une étude récente a également rapporté que l'ablation de l'expression de IRS-2 dans les souris transgéniques mène au développement du diabète de type II (208).

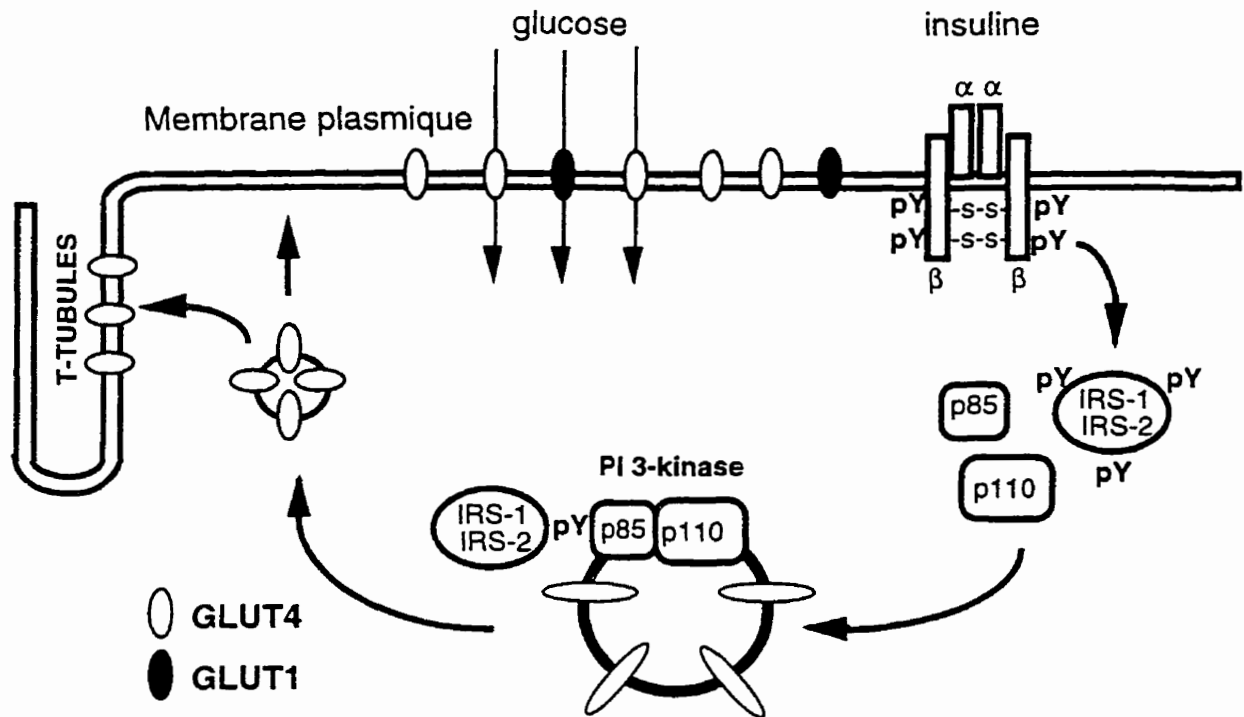


Figure 1 : Système de signalisation de l'insuline dans le muscle squelettique. La liaison de l'insuline à son récepteur entraîne l'autophosphorylation du récepteur. L'activité tyrosine kinase du récepteur permet la phosphorylation des protéines IRS et mène à l'activation de la PI 3-kinase. L'activation de cette enzyme permet la translocation du transporteur de glucose insulino-sensible GLUT4.

Le récepteur à l'insuline phosphoryle les protéines IRS au niveau des résidus tyrosines. Cette phosphorylation permet la liaison de la sous-unité p85 de la phosphatidylinositol (PI) 3-kinase aux protéines IRS. La sous-unité régulatrice p85, lorsque associée aux protéines IRS, est considérée comme un adaptateur nécessaire à la liaison de la sous unité catalytique p110. L'association des sous unités p85 et p110 permet l'activation de la PI 3-kinase. La PI 3-kinase joue un rôle important au niveau de la phosphorylation des résidus inositols membranaires. Plusieurs études ont démontré l'importance de la PI 3-kinase dans la signalisation de l'insuline. En effet, l'inhibition de l'activité de la PI 3-kinase par un inhibiteur spécifique tel que la wortmannin entraîne une diminution de la stimulation à l'insuline sur le transport du glucose et une réduction de la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique. Ces effets ont été démontrés dans les adipocytes (33, 140), dans les myocytes en culture (102, 193) et dans les muscles de rat (119, 212). Les étapes suivant l'activation de la PI 3-kinase sont encore mal définies toutefois il a été démontré que

les produits de la réaction de la PI 3-kinase tels les phosphatidylinositol bis et triphosphate (PIP2 et PIP3) interagissent avec la protéine kinase B (PKB ou Akt) (59). La PKB semble jouer un rôle important dans le système de signalisation puisque l'activation de cet enzyme est stimulée par l'insuline (111) et est aussi inhibée par la wortmannin (27).

3. Le transport du glucose

Le glucose est la principale source d'énergie utilisée par les cellules. Le glucose possède un poids moléculaire très élevé ce qui rend impossible la diffusion de cette molécule à travers la membrane plasmique. L'utilisation du glucose par la cellule est possible grâce à deux systèmes de transport : le transport actif et le transport par diffusion facilitée.

Le transport actif survient principalement à la barrière gastrointestinale et au niveau des reins (16). L'énergie utilisée par ce type de transport provient des gradients électrochimiques causés par différentes concentrations intracellulaires et extracellulaires de sodium. Ce système de co-transport permet au glucose d'être transporté selon un gradient de concentrations.

Le transport par diffusion facilitée survient dans tous les autres types de cellules. Ce processus est possible grâce aux transporteurs de glucose (GLUT) qui sont ancrés dans la membrane plasmique. Les transporteurs sont formés de 12 domaines transmembranaires dont les extrémités NH_2 et COOH sont situées à l'intérieur de la cellule (figure 2).

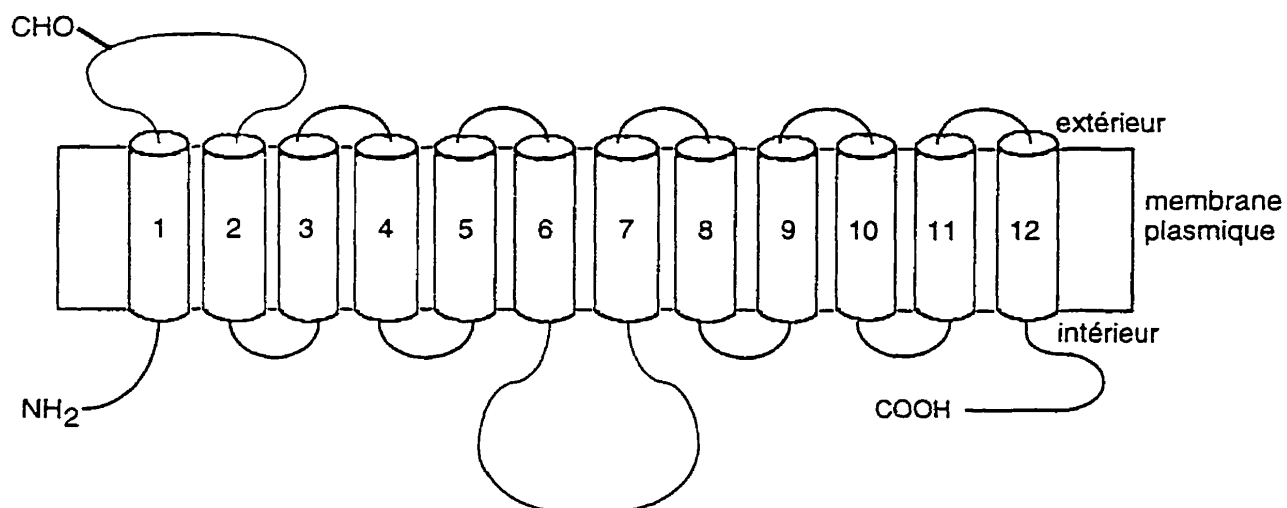


Figure 2 : Représentation schématique de l'orientation d'un transporteur de glucose dans la membrane plasmique. Les douze cylindres représentent les portions transmembranaires en forme d'hélice α du transporteur. Le groupement CHO représente le site de glycosylation situé sur une asparagine de la première boucle extracellulaire.

Cinq transporteurs, numérotés dans l'ordre de leur découverte ainsi qu'un pseudo-gène ont jusqu'à maintenant été rapportés. Les différentes fonctions et localisations des transporteurs ont permis leur classification (95).

Tableau 1: Fonctions et distribution des transporteurs de glucose.

Isoformes	Tissu majeur d'expression	Fonctions
GLUT-1	Cellules endothéliales du cerveau, placenta, reins, colon, érythrocytes	Transport de glucose de base
GLUT-2	Foie, reins, intestin, cellules β	Transport bidirectionnel
GLUT-3	Neurones, placenta, cerveau	Transport dans le système nerveux central
GLUT-4	Muscle squelettique, coeur, tissu adipeux blanc et brun	Transport de glucose insulino-sensible
GLUT-5	Spermatozoïdes, muscle, intestin, reins,	Transporteur de fructose
GLUT-6	Pseudo-gène	

Il existe 39 % à 65 % d'identité ainsi que 50 % à 76 % de similarité entre les séquences en acides aminés des différents transporteurs (16). De plus, les séquences des transporteurs GLUT1 et GLUT4 humains sont à 97,6 % et à 95,3 % identiques aux séquences chez le rat (16). Ce haut niveau de conservation suggère que les différentes régions de GLUT1 et de GLUT4 sont très importantes dans le fonctionnement et la régulation de ces protéines. Les principaux transporteurs retrouvés dans le muscle squelettique sont GLUT1 et GLUT4. Le transporteur GLUT3 est également abondant dans le muscle fœtal et dans les cultures de cellules musculaires tel que les myocytes, L6 le modèle expérimental du présent mémoire.

3.1 GLUT1

GLUT1 est exprimé dans le placenta, le cœur, les reins, les fibroblastes et le tissu adipeux. De plus, il a été démontré que GLUT1 est exprimé de façon très importante dans les capillaires du cerveau ce qui suggère un rôle au niveau de la barrière sang-cerveau (189). Dans le muscle squelettique, GLUT1 est exprimé au niveau de la membrane plasmique et est responsable du transport de glucose de base (95).

3.2 GLUT3

L'utilisation d'une sonde dirigée contre l'ADNc de GLUT1 a permis la découverte de GLUT3 (104). GLUT3 possède respectivement 64 % et 52 % d'identité avec GLUT1 et GLUT2 (172). L'ARN de cet isoforme est présent dans tous les tissus mais il est plus abondant dans le cerveau, les reins, le placenta et dans le muscle fœtal. L'expression de cette protéine diminue dans le temps étant donné que dans le muscle squelettique adulte on observe une diminution du niveau d'expression de l'ARN comparativement aux niveaux d'expression chez le fœtus.

3.3 GLUT4

GLUT4 a été découvert dans les adipocytes de rats (94). Ce transporteur représente environ 90 % des transporteurs de glucose de l'adipocyte (139, 217). GLUT4 est une protéine de 509 acides aminés dont 65 % et 58 % des séquences sont identiques à celles de GLUT1 et de GLUT3. Il a été démontré que GLUT4 est

responsable du transport du glucose stimulé par l'insuline (16). D'ailleurs on retrouve l'ARN de GLUT4 dans les tissus insulino-sensibles comme le muscle cardiaque, le muscle squelettique et les tissus adipeux blanc et brun (96, 100).

Le mécanisme par lequel l'insuline stimule le transport du glucose a été démontré pour la première fois par des études de fractionnement membranaire dans les cellules adipeuses. L'isolation des différents compartiments membranaires a démontré que la stimulation à l'insuline provoque une augmentation des niveaux de GLUT4 à la membrane plasmique (47, 184, 191). Le processus par lequel le transporteur de glucose GLUT4 migre d'un pool membranaire interne jusqu'à la membrane plasmique est appelé la translocation. Toutefois, la nature de ce pool membranaire reste à déterminer.

4. Causes de la résistance à l'insuline

Les principaux facteurs responsables du développement de la résistance à l'insuline ont été classés sous deux catégories. La première catégorie représente les défauts génétiques. Il a été démontré qu'une mutation au niveau du gène de l'insuline provoque une structure anormale de la protéine et entraîne une perte d'activité de l'insuline (24). D'autres études ont démontré que certains patients insulino-résistants ont des niveaux trop élevés de proinsuline en circulation (20). Ces résultats suggèrent la présence d'une anomalie structurale au niveau des sites de clivage de la proinsuline. Ce défaut d'action de l'insuline peut toutefois être compensé par l'utilisation d'une source exogène d'insuline.

Cette catégorie représente également les défauts associés à la signalisation de l'insuline dans les tissus cibles. La liaison de l'insuline à son récepteur est l'étape critique qui permet de déclencher la cascade de réactions. Certains défauts d'action de l'insuline peuvent être attribués à la présence de mutations au niveau du récepteur à l'insuline (131). En effet, ces mutations entraînent plusieurs changements importants au niveau de l'expression et du fonctionnement du récepteur à l'insuline. Des études ont démontré que ces mutations diminuent l'expression du récepteur à la membrane (1, 99), augmentent le taux de dégradation du récepteur (98), et entraînent une transformation défectueuse du prorécepteur en ses sous unités α et β (213). Il a également été démontré que les mutations retrouvées aux sites d'autophosphorylation du récepteur sont associées à

une diminution de son activité tyrosine kinase (171, 185). Toutefois, les mutations génétiques ne représentent qu'un faible pourcentage des patients atteints de la résistance à l'insuline. La majorité des patients développent la résistance à l'insuline en raison des différents facteurs environnementaux. D'ailleurs, plusieurs facteurs en circulation contribuent au développement de la résistance à l'insuline. La seconde catégorie est représenté par les antagonistes de l'insuline.

4.1 Les antagonistes hormonaux

Il a été démontré que les glucocorticoïdes augmentent la production de glucose en stimulant l'activité des enzymes responsables de la gluconeogénèse dans le foie (56) et en stimulant le relâchement de substrats comme les acides aminés et le lactate par les tissus périphériques (48, 51, 174). Les glucocorticoïdes diminuent l'affinité et le nombre de récepteurs à l'insuline et inhibent la translocation des transporteurs de glucose dans le muscle squelettique (53, 63, 199). Les catécholamines ont également un rôle à jouer dans le développement de la résistance à l'insuline. Ces hormones favorisent la sécrétion de glucagon et augmentent la production de glucose hépatique en stimulant la glycogénolyse et la gluconéogénèse. Ces actions provoquent une augmentation de la glycémie qui, à long terme, peut diminuer l'action de l'insuline. De plus, des études ont démontré que dans les adipocytes et dans le muscle, les catécholamines ont un effet inhibiteur sur le transport du glucose stimulé par l'insuline (18, 80).

4.2 Les antagonistes non hormonaux

4.2.1 Les acides gras libres

Une étude a démontré que les acides gras libres sécrétés par le tissu adipeux sont responsables du développement de la résistance à l'insuline dans l'obésité (153). Des études ont rapporté que les acides gras libres inhibent l'effet de l'insuline sur le transport du glucose (21) et augmentent la production hépatique de glucose (22). Lorsque la résistance à l'insuline est déjà établie, l'hyperglycémie et l'hyperinsulinémie contribuent davantage au développement de la résistance à l'insuline. Les acides gras libres sont impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline puisqu'une réduction de leurs niveaux plasmatiques via une diminution du poids corporel entraîne une augmentation de la sensibilité à l'insuline

(146, 175). Les travaux d'Hotamisligil ont récemment démontré l'implication des acides gras libres dans le développement de cette maladie (87). En effet, ce groupe a généré des souris déficientes en aP2, gène codant pour les fatty acids binding proteins (FABPs). Les FABPs sont impliquées dans la liaison des acides gras libres comme l'acide oléique et rétinoïque. Ces études ont montré que la mutation du gène aP2 protège les souris du développement de la résistance à l'insuline et du diabète.

4.2.2 La leptine

La leptine est une cytokine de 16 kDa qui est produite par le gène OB et qui est sécrétée par le tissu adipeux. La leptine a plusieurs effets importants sur le métabolisme dont un effet inhibiteur sur la prise alimentaire et le poids et un effet stimulateur sur la thermogénèse. Il a été démontré que le manque d'action de la leptine est impliqué dans le développement de l'obésité (130) et de la résistance à l'insuline. Le manque d'action de la leptine peut provenir d'un défaut de production ou d'un état de résistance à la leptine. Par exemple, le développement de l'obésité chez la souris *ob/ob* provient d'un défaut génétique. En effet, des études ont démontré que la souris *ob/ob* possède une mutation au niveau du gène ce qui entraîne l'expression d'une protéine non fonctionnelle (71).

Dans d'autres modèles animaux d'obésité et chez la grande majorité des individus obèses, on retrouve cependant une élévation des niveaux de leptine en circulation (60, 79, 128). En effet, des études ont démontré que la majorité des cas d'obésité sont associés à une résistance à la leptine étant donné que le gène OB permet l'expression d'une protéine fonctionnelle (41, 42). Il a été démontré que la résistance à la leptine observée dans l'obésité est associée à une diminution du transport de cette cytokine dans le cerveau (28, 166). Il a récemment été rapporté qu'une mutation au niveau du récepteur à la leptine chez l'humain est responsable du développement de plusieurs désordres métaboliques importants dont la dyslipidémie et l'obésité (37). Une mutation a d'ailleurs été identifiée au niveau du récepteur à la leptine chez les rats Zucker obèses (46).

L'élévation chronique de leptine circulante dans l'obésité pourrait être impliquée dans le développement de la résistance à l'insuline. En effet, des études ont rapporté que dans le foie, la leptine inhibe la lipogénèse (6), la phosphorylation

de IRS-1 et l'expression de gène codant pour des enzymes responsables de la gluconéogénèse dans le foie (40). Un effet inhibiteur de la leptine a été observé sur les différentes actions métaboliques de l'insuline comme la stimulation du transport de glucose, la lipogénèse et la synthèse protéique dans le tissu adipeux (132). Dans les cellules musculaires, il a été démontré que la leptine a un effet stimulateur sur le transport de glucose et sur la synthèse de glycogène (19). Ces effets sont très controversés puisque plusieurs groupes ont rapporté que la leptine n'a aucun effet dans le muscle (65, 154, 216).

4.2.3 Le TNF- α

4.2.3.1 Effet du TNF- α dans le tissu adipeux

Plusieurs études suggèrent un rôle important pour le TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline dans l'obésité. Des études réalisées chez l'humain et chez l'animal ont démontré que les niveaux de TNF- α sont plus élevés dans le tissu adipeux des sujets obèses comparativement aux sujets contrôles (90). De plus, une réduction du poids corporel entraîne une diminution des niveaux de TNF- α et une augmentation de la sensibilité à l'insuline chez les sujets obèses (85). Des incubations à long terme ont permis de démontrer un effet stimulateur du TNF- α sur le transport de glucose de base et un effet inhibiteur sur l'action de l'insuline (14, 178).

Le TNF- α induit la résistance à l'insuline en diminuant l'efficacité du système de signalisation de l'insuline dans les adipocytes. Des études réalisées chez les rats obèses ont rapporté que l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline est diminuée par le TNF- α (86). En effet, dans le muscle et dans le tissu adipeux, le TNF- α produit une légère diminution de la phosphorylation du récepteur à l'insuline et une diminution plus importante au niveau de IRS-1. Il a également été démontré que le TNF- α diminue l'expression de GLUT4 dans les adipocytes (45, 89, 179). D'autres défauts cellulaires sont causés par le TNF- α puisque dans les adipocytes l'action de l'insuline sur le transport du glucose peut être inhibée par le TNF- α sans que l'expression de GLUT4 ne soit modifiée (88).

4.2.3.2 Effet du TNF- α dans le muscle squelettique

Le rôle de TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique reste à être vérifié. En effet, les travaux de Ranganathan et al. (155) ont démontré que dans les cellules musculaires en culture, le TNF- α stimule le transport de glucose de base mais n'a aucun effet inhibiteur sur l'action de l'insuline. Ces résultats ont été appuyés par les études de Furnsinn et al. (66) qui ont démontré que dans le muscle isolé, le TNF- α n'a aucun effet inhibiteur sur le transport du glucose stimulé par l'insuline. Ces résultats suggèrent que dans le muscle *in vivo*, l'inhibition de l'effet de l'insuline par le TNF- α peut être causée par un effet indirect de cette cytokine sur d'autres tissus qui affectent ensuite l'action de l'insuline au niveau musculaire. Ces effets inhibiteurs peuvent également être causés par l'interaction du TNF- α avec d'autres molécules qui agissent en concert pour causer une insulino-résistance dans les myocytes.

5. Controverse

Plusieurs groupes ont choisi de montrer le rôle du TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline par la neutralisation de cette cytokine. Les travaux d'Hotamisligil et al. ont rapporté que l'utilisation d'un récepteur soluble permet le retour à la normale des niveaux de phosphorylation du récepteur à l'insuline et de IRS-1 chez les rats obèses (86). La neutralisation du TNF- α permet également d'améliorer la sensibilité à l'insuline chez les rats obèses (89). Ces études font toutefois l'objet d'une importante controverse puisque la neutralisation du TNF- α n'a pas eu un effet bénéfique sur la sensibilité à l'insuline chez les patients obèses souffrant de NIDDM (138).

L'implication du TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline a récemment été rapportée par les travaux d'Hotamisligil et collaborateurs (187). Cette étude a été réalisée à l'aide de souris obèses qui possèdent une mutation au niveau du gène codant pour le TNF- α ou de ses récepteurs. Ces résultats démontrent que les souris qui possèdent la mutation dans le gène du TNF- α ou de ses récepteurs sont partiellement protégées du développement de la résistance à l'insuline dans l'obésité génétique ou induite par une diète hypercalorique.

Les effets du TNF- α sur le système de signalisation de l'insuline ont également été rapportés dans cette étude. Les effets inhibiteurs du TNF- α sur l'action de l'insuline proviennent de la diminution de la phosphorylation du récepteur à l'insuline dans muscle squelettique et dans le tissu adipeux. En effet, les souris qui possèdent la mutation du gène codant pour le TNF- α expriment des niveaux de phosphorylation semblables aux souris contrôles tandis que les souris normales possèdent des niveaux inférieurs de phosphorylation. Toutefois, il est important de noter que la protection partielle de ces paramètres suggère que d'autres facteurs sont également impliqués dans le développement de la résistance à l'insuline.

6. Les mécanismes d'action du TNF- α

Le mécanisme par lequel le TNF- α provoque une régulation négative du système de signalisation de l'insuline est peu connu. Les prochaines sections traitent des différents effecteurs cellulaires proposés comme étant responsables des effets délétères du TNF- α sur l'action de l'insuline.

6.1 La voie de la sphingomyéline

Récemment, il a été suggéré que la voie de la sphingomyéline est impliquée dans la médiation des effets du TNF- α . La sphingomyéline est une protéine de structure principalement concentrée dans la membrane plasmique des cellules. La liaison du TNF- α à son récepteur membranaire entraîne la dégradation de la sphingomyéline en céramides par l'action de la sphingomyélinase. Les céramides sont des effecteurs secondaires qui permettent entre autres, l'activation d'une sérine/thréonine kinase liée à la membrane plasmique. La protéine kinase activée par les céramides (CAPK) reconnaît les substrats qui contiennent la séquence X-Ser/Thr-Pro-X (113). Cette enzyme phosphoryle la protéine IRS-1 sur les résidus sérine/thréonine. Cette réaction empêche la phosphorylation des résidus tyrosine et cause une diminution de 60 % à 80 % de l'affinité de IRS-1 pour le récepteur à l'insuline (147). La diminution de la phosphorylation de IRS-1 sur les résidus tyrosines provoque également une réduction de l'interaction de IRS-1 avec la PI 3-kinase. Des études récentes ont démontré qu'un traitement aux céramides et à la sphingomyélinase provoque les mêmes effets inhibiteurs sur le système de signalisation à l'insuline que le TNF- α (125, 148).

Des études portant sur le rôle possible de la voie de la sphingomyéline dans la résistance à l'insuline induite par le TNF- α ont surtout été réalisées dans les adipocytes étant donné que ces cellules sont une importante source de production de TNF- α dans l'obésité (90). Les effets inhibiteurs du TNF- α ont également été étudiés dans le muscle squelettique (14) tissu majoritairement responsable (~80 %) du métabolisme de glucose à l'état post-prandial (11). Contrairement aux études chez les adipocytes, Turinsky et al. (194) ont démontré que dans le muscle isolé, le traitement à la sphingomyélinase augmente le transport de glucose de base de 90 % et le transport du glucose stimulé à l'insuline de 30 %. Ces effets ne semblent pas être liés à une altération du système de signalisation à l'insuline puisque l'activité tyrosine kinase du récepteur à l'insuline et l'activité de la PI-3 kinase demeurent inchangées par le traitement à la sphingomyélinase. Ces études supportent le concept que le TNF- α et la voie de la sphingomyéline ne causent pas la résistance à l'insuline dans le muscle.

Dans le muscle squelettique, les mécanismes impliqués dans la régulation du métabolisme du glucose par les cytokines sont encore mal définis. En effet, les cytokines activent de nombreux effecteurs cellulaires et influencent l'expression de plusieurs protéines. Un de ces effecteurs est l'oxyde nitrique synthétase inducible (iNOS), une enzyme principalement retrouvée dans les macrophages et qui est responsable de la production de l'oxyde nitrique (NO). Des études récentes ont démontré que iNOS peut être induit par les cytokines et l'endotoxine LPS dans plusieurs types de cellules incluant les cellules musculaires (141, 207). D'autres études ont démontré la présence d'un isoforme de la protéine NOS au niveau du cerveau soit nNOS (108), et au niveau du tissu endothélial soit eNOS (2, 156). Puisque le présent mémoire traite du NO, la prochaine section sera consacrée à cette molécule et aux enzymes qui catalysent sa formation, les NOS.

7. L'Oxyde Nitrique

7.1 Introduction

L'oxyde nitrique (NO) est un second messager impliqué dans de nombreuses réactions de signalisation. Dans l'organisme, le NO se retrouve sous forme de gaz. Cette propriété physique permet au NO de diffuser à travers les membranes cellulaires et d'atteindre plusieurs cibles intracellulaires (76). La demi-

vie du NO est de quelques secondes ce qui en fait une molécule très instable. D'ailleurs, en solution aqueuse, le NO réagit très rapidement avec l'oxygène (O_2) pour former du nitrite (NO_2) et du nitrate (NO_3). La quantification de ces deux métabolites dans les modèles expérimentaux représente un indice de la production de NO.

La régulation de la production de NO est très importante dans l'organisme. Lorsque produit de façon appropriée, le NO joue un rôle très important dans la modulation de plusieurs processus physiologiques comme la défense cellulaire, la régulation du système vasculaire et la neurotransmission. Cependant, une synthèse non contrôlée de NO contribue au développement de plusieurs maladies comme le diabète, l'arthrite, l'inflammation chronique, l'hypertension et la neurodégénération (81).

7.2 La chimie du NO

Les différents effets du NO peuvent être expliqués par la structure chimique particulière de cette molécule. En effet, le NO possède un électron non-apparié ce qui confère à cette molécule une très grande réactivité. Dans l'organisme, il existe trois formes chimiques sous lesquelles on peut retrouver le NO: l'ion nitrosonium (NO^+) la forme oxydée, l'oxyde nitrique (NO^\bullet) la forme neutre et l'anion nitroxyl (NO^-) la forme réduite (122). Les différents états d'oxydo-réduction que peut prendre le NO permettent la réalisation de diverses réactions. En effet, le NO joue un rôle très important dans les réactions de cytotoxicité et dans les réactions de protection.

Les effets cytotoxiques sont causés par la forme neutre du NO. Ces effets sont causés par la réactions du NO^\bullet avec un intermédiaire radicalaire de l'oxygène, le superoxyde (O_2^\bullet). Cette réaction mène à la formation d'un oxydant très puissant appelé le peroxyde nitrite ($ONOO^-$). Cette molécule peut diffuser à travers les membranes de façon à atteindre plusieurs cibles intracellulaires. Les effets toxiques du peroxyde nitrite ont été identifiés dans plusieurs processus physiologiques (13, 61, 150). D'autres études ont démontré que le peroxyde nitrite cause la mort de neurones en cultures (121). Cette action cytotoxique a également été rapportée dans le système immunitaire où il a été démontré que le peroxyde nitrite est un bactéricide puissant et qu'il est responsable de l'activité cytotoxique des macrophages (93, 215).

Les réactions de protection sont effectuées par la forme oxydée du NO. La présence de la charge positive indique que l'ion nitrosonium possède un électron en moins comparativement à la forme neutre. Cette caractéristique permet d'éviter la réaction avec le superoxyde et empêche la formation de peroxy-nitrite. Les effets protecteurs du NO^+ ont été étudiés par le groupe de Stamler sur des neurones en cultures (121, 122). Ces études ont démontré que l'ion nitrosonium prévient la neurotoxicité et augmente la viabilité de ce type de cellules.

7.3 L'oxyde nitrique synthétase

La NO synthétase (NOS) est l'enzyme responsable de la production de NO. Cette enzyme catalyse l'oxydation de la L-arginine pour former de la L-citrulline et une molécule de NO (Figure 3).

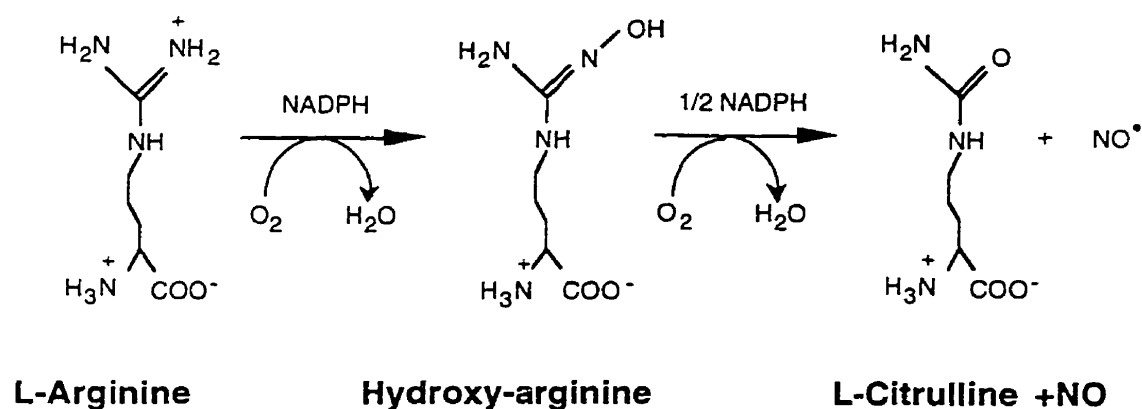


Figure 3 : Réaction de formation du NO à partir de la conversion de la L-arginine en L-citrulline.

Plusieurs cofacteurs dont le β -nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH), le flavine-adénine-dinucléotide (FAD), le flavine mononucléotide (FMN), la calmoduline et la tétrahydrobioptérine (BH_4) sont essentiels à la réalisation de cette réaction d'oxydation. Le NADPH est utilisé comme donneur d'électron. Ces électrons sont rapidement transférés au groupement hème de la protéine par le FMN et le FAD. Ce transfert d'électron est possible uniquement par la présence de la calmoduline puisque ce cofacteur provoque un changement conformationnel de l'enzyme de façon à ce que les domaines oxygénase (n-terminal) et réductase (c-

terminal) entrent en contact (figure 4). Les électrons transférés servent à l'activation d'une molécule d'oxygène qui est utilisée pour l'oxydation de l'arginine.

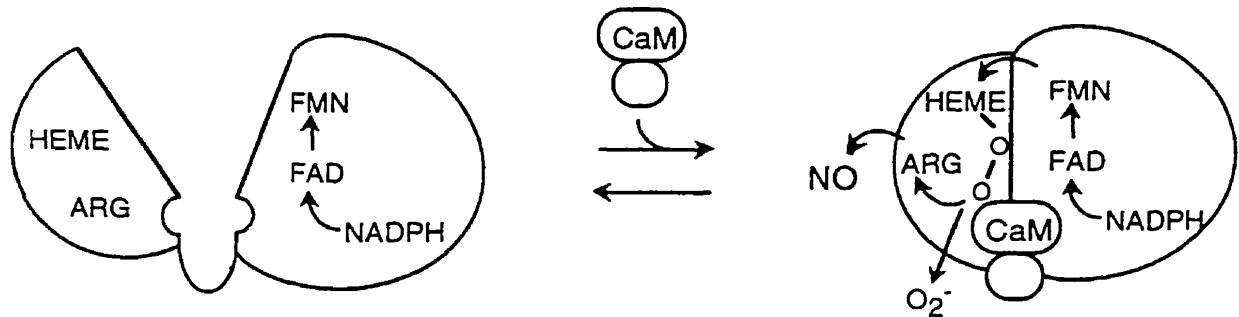


Figure 4 : Rôle de la calmoduline (CaM) dans l'alignement des domaines oxygénase et réductase de l'enzyme NOS. Les flèches représentent le mouvement des électrons. La liaison de la calmoduline provoque un changement conformationnel et permet le transfert des électrons du FMN au groupement heme (adapté de Griffith O. W. et al. ,(73)).

Le rôle du BH_4 dans cette réaction d'oxydo-réduction est encore mal défini. Toutefois, l'importance de ce cofacteur a été démontrée dans plusieurs études. En effet, dans plusieurs types de cellules, la production de NO dépend de la synthèse intracellulaire de BH_4 (75, 200). D'ailleurs, l'inhibition de la synthèse de ce cofacteur entraîne une diminution de l'activité de l'enzyme NOS dans plusieurs types de cellules (161, 163).

8. Les isoformes

Les cellules des mammifères peuvent exprimer jusqu'à trois isoformes de l'enzyme NOS. Les différents isoformes sont distribués dans l'organisme selon leurs diverses fonctions. L'isolation du premier isoforme des NOS est survenue dans le cerveau puisque le cerveau est le tissu qui présente le plus haut niveau d'expression de cette protéine. Ces études ont permis l'isolation et le clonage (36) de l'isoforme présent dans les neurones (nNOS). L'utilisation d'anticorps fabriqués à partir de la séquence de nNOS a permis la découverte d'un nouvel isoforme dans les cellules endothéliales (eNOS) humaines (97) et bovines (114, 169). Ces études ont également permis la découverte d'un isoforme inducible de la NOS (iNOS) dans plusieurs types de cellules (73).

Les trois isoformes de la NOS sont encodés par des gènes différents. Toutefois, on retrouve de 50 % à 60 % d'identité entre ces isoformes. Ce niveau de conservation est augmenté lorsque l'on compare les séquences d'un même isoforme à travers les espèces (80 à 94 % d'identité) (168). Les différents isoformes de la NOS peuvent être classés selon deux catégories: les isoformes calcium-dépendants et calcium-indépendants.

8.1 Les isoformes calcium dépendants: nNOS et eNOS

8.1.1 L'enzyme nNOS

Des études ont démontré qu'une substance chimique aux propriétés du NO est synthétisée lors de la stimulation de cellules neuronales en culture (68). La présence du NO dans le cerveau a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques au NOS. En effet, l'inhibition de la synthèse de NO par ces inhibiteurs empêche la production de GMP cyclique et prévient les différents effets du NO (25, 69).

L'isoforme nNOS est principalement exprimé au niveau des neurones étant donné que le NO produit par nNOS joue un rôle dans la neurotransmission de plusieurs processus physiologiques. Par exemple, dans le système nerveux périphérique, le NO agit comme neurotransmetteur dans la régulation de la motilité gastrointestinale, du débit sanguin et des fonctions neuroendocrines (36). Dans le cerveau, le NO est impliqué au niveau de la mémorisation, de l'apprentissage et dans l'augmentation de l'intensité des réponses à la douleur (36). La régulation de la production de NO est très importante puisqu'il a été démontré qu'une surproduction de NO cause la neurodégénération observée dans plusieurs maladies comme le Parkinson et la maladie d'Huntington (36).

8.1.1.1 nNOS dans le muscle squelettique

Nakane et al. (135) ont été les premiers à identifier l'ARNm, la protéine et l'activité de l'isoforme nNOS dans le muscle squelettique. L'enzyme nNOS est localisé au niveau du sarcolemme des fibres musculaires de type IIb et est particulièrement enrichi dans les jonctions neuro-musculaires (31). Le NO produit par nNOS semble jouer un rôle important dans la régulation de certaines fonctions

physiologiques du muscle. Dans le muscle de rat adulte, le NO module la contraction musculaire et favorise la relaxation (109). De plus, Murrant et al. ont démontré que les donneurs de NO préservent la fonction contractile dans les fibres à contraction lente et rapide (133, 134). Il est aussi intéressant de noter que nNOS est complexé à la dystrophine dans les cellules musculaires, ce qui suggère que le NO joue un rôle important dans le développement neuromusculaire (26).

Plusieurs observations suggèrent que le NO est impliqué dans la médiation du transport de glucose stimulé par la contraction. Premièrement, il a été démontré que la stimulation électrique du muscle extensor digitorum longus (EDL) stimule la production de NO (9). Il a également été rapporté que des agents donneurs de NO augmentent le transport de glucose de base dans le muscle squelettique *in vitro* (8, 103). De plus, l'inhibition des NOS par le N^G-monométhyl-L-arginine (L-NMMA) diminue le transport du glucose dans l'EDL stimulé par la contraction *in vivo* mais également le transport de glucose stimulé par l'exercice à travers les vésicules de membranes plasmiques isolés (8, 158).

Plusieurs points doivent toutefois être clarifiés avant de pouvoir affirmer que le NO module les effets de la contraction sur le transport du glucose dans le muscle. En effet, la contraction augmente le transport de glucose dans tous les types de fibres musculaires mais l'activité NOS varie énormément entre les différents types de fibres. En effet, les fibres glycolytiques à contraction rapide (IIb), possèdent une grande activité comparativement aux fibres oxydatives à contraction lente (I) qui en sont pratiquement dépourvues (103, 109). L'effet de la contraction sur l'activité NOS dans les différents types de fibres reste donc à être étudié. Des études ont également démontré que le NO et l'insuline n'ont pas d'effet additif sur le transport du glucose. Ces résultats soulèvent bien des questions puisque la contraction et l'insuline ont généralement des effets additifs sur le transport du glucose. Les études récentes de Gibbs et collaborateurs (55) ont d'ailleurs démontré que l'inhibition des NOS n'affecte pas l'augmentation du transport du glucose causé par la contraction musculaire stimulé *in vitro* dans les muscles isolés. Le rôle du NO dans la médiation des effets de l'exercice sur le transport du glucose reste donc à clarifier.

8.1.2 L'enzyme eNOS

Plusieurs études antérieures suggéraient qu'une substance chimique libérée par les cellules endothéliales était nécessaire à la relaxation des vaisseaux sanguins. Ce facteur vasorelaxant a été identifié par les travaux de Furchgott & Zawadzki (64) qui ont démontré que l'endothélium synthétise le NO. La synthèse de NO dans le système vasculaire est principalement stimulée par le calcium. Dans l'organisme, plusieurs facteurs circulants comme l'acétylcholine et la bradykinine stimulent l'entrée de calcium dans la cellule ce qui favorise la synthèse de NO. Le NO produit par eNOS diffuse à travers la cellule et active la guanylate cyclase. Il a été démontré que l'augmentation des niveaux de GMP cyclique est responsable de la vasorelaxation (57, 78).

L'insuline joue également un rôle important dans la relaxation des vaisseaux sanguins. En effet, plusieurs études ont démontré que l'insuline augmente le diamètre des artérioles et le débit sanguin dans le muscle squelettique (34, 177). Cet effet est dépendant de la production de NO puisqu'un traitement à l'insuline en présence d'inhibiteurs des NOS empêche la relaxation des vaisseaux sanguins. L'augmentation du débit sanguin par l'insuline entraîne une augmentation de la distribution de l'insuline et du glucose au niveau des lits capillaires. Cet effet hémodynamique de l'insuline est très important puisque qu'il contribue à amplifier l'effet de l'insuline sur l'utilisation musculaire du glucose.

En plus de son rôle dans le contrôle du débit sanguin, le NO produit par eNOS est impliqué dans la régulation de la pression artérielle et au niveau de la captation de l'oxygène par les globules rouges. La régulation de la production de NO par eNOS est très importante puisqu'une surproduction de NO entraîne l'hypotension tandis qu'un manque de production de NO cause la vasoconstriction et favorise le développement de l'hypertension (144).

8.1.2.1 eNOS dans le muscle squelettique

Les études de Kobzik et al. suggèrent que la protéine eNOS est exprimée dans les myocytes du tissu squelettique (110). D'après ces auteurs, eNOS est majoritairement exprimé dans les fibres riches en mitochondries et le NO produit par eNOS est responsable de l'inhibition de la respiration mitochondriale. Ces résultats

suggèrent que le NO module la contraction musculaire via l'inhibition du métabolisme oxydatif du muscle. Les mécanismes par lesquels le NO module la respiration mitochondriale sont cependant inconnus.

8.1.3 L'isoforme calcium indépendant: iNOS

L'isoforme inductible des NOS a été isolé (82, 182) et séquencé (127, 211) à partir de macrophages étant donné que ces cellules possèdent un très haut niveau d'expression de cette protéine. La structure de iNOS est similaire à celle des isoformes calcium dépendants toutefois, contrairement à eNOS et à nNOS, iNOS est constamment liée à la calmoduline. De plus, cet isoforme possède une très grande affinité pour le calcium ce qui permet à iNOS d'avoir une activité complète à des niveaux intracellulaires normaux de calcium (35).

L'induction de la protéine iNOS peut survenir dans une grande variété de tissus et de cellules. En effet, iNOS a été localisé au niveau du foie (70), des cellules endothéliales (105), du myocarde (165), et des chondrocytes (32). L'expression de iNOS est augmentée lorsque des parasites, virus et bactéries entrent en contact avec l'organisme. La présence de corps étrangers active le système immunitaire et stimule la sécrétion de plusieurs cytokines. La sécrétion de cytokines induit l'expression de iNOS dans le but de subvenir à la défense de l'organisme. Le NO joue un rôle très important au niveau de l'activité cytotoxique et bactéricide des macrophages (137, 143, 183).

9. L'induction de iNOS

L'expression de iNOS survient en réponse aux nombreuses cytokines et autres molécules libérées durant les réactions d'inflammation. Des études ont démontré que le tumor necrosis factor (TNF- α) et l'interféron gamma (IFN- γ) induisent l'expression de iNOS dans les cellules musculaires en culture (141, 207). Il a également été rapporté que la lipopolysaccharide (LPS), la composante majeure de la coque des bactéries gram-négatif, participe de façon synergique à l'induction de l'expression de cette protéine (206). Ces molécules interviennent à différents niveaux dans les cellules de l'organisme.

9.1 Le TNF- α

Le TNF- α est une protéine de 17 kDa qui est exprimée sous forme de trimère et sécrétée par plusieurs types de cellules (197). En effet, cette cytokine est principalement produite par les macrophages et les monocytes mais peut également être sécrétée par d'autres types de cellules comme les cellules T, les fibroblastes et les cellules adipeuses et musculaires. Dans l'organisme, le TNF- α joue un rôle important au niveau de la différenciation et de la croissance de plusieurs types de cellules. De plus, le TNF- α est un médiateur important des stimulations paracrines et endocrines observées dans l'inflammation et dans les réactions immunes.

Les nombreux effets du TNF- α sont expliqués par la présence de deux récepteurs qui ont été identifiés et clonés soit p55 et p75. Ces deux protéines de 55 et 75 kDa possèdent un domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un domaine intracellulaire. La comparaison des séquences en acides aminés a permis de déterminer que les domaines extracellulaires ne possèdent que 28 % d'homologie tandis que les régions intracellulaires n'en possèdent aucune (197). Ces observations suggèrent que les deux récepteurs ont des systèmes de signalisation et des fonctions distinctes.

La liaison du TNF- α au récepteur p55 est responsable de plusieurs effets importants comme l'activité antivirale, la cytotoxicité, l'activation de iNOS (186) et de la sphingomyélinase (15, 205). L'activation du récepteur p75 est responsable de l'apoptose, de la prolifération cellulaire et de la cytotoxicité (197). Les effets médiés par l'activation du récepteur p75 surviennent dans les cellules qui possèdent une très grande densité du récepteur ce qui suggère que l'affinité du TNF- α pour les deux types de récepteurs est différente. En effet, il a été démontré que les effets transmis par p75 sont également effectués par l'activation du récepteur p55 mais à une densité beaucoup plus faible de récepteur. De plus, il a été démontré que le TNF- α humain se lie uniquement au récepteur p55 et non au récepteur p75 chez la souris (197).

9.2 L'IFN- γ

L'IFN- γ a été identifié grâce à sa très grande activité antivirale (202). L'IFN- γ est produit principalement par les natural killer (NK) et les cellules T helper (Th). La production d'IFN- γ par les cellules NK est stimulée par la présence de cytokines sécrétées par les macrophages comme le TNF- α , l'IL-12 (192) mais également par la présence d'IFN- γ (10). L'IFN- γ est encodé par un seul gène de façon à former un homodimère de 34 kDa (58, 72). Cette cytokine joue un rôle très important dans le système immunitaire. En effet, des études ont démontré qu'une mutation au niveau du gène provoque une diminution des fonctions immunes (91).

L'IFN- γ (23) ainsi que plusieurs autres cytokines (92) utilisent la voie de signalisation des JAK-STAT pour produire leurs effets. Deux familles de protéine sont impliquées dans ce système: les Janus Kinases (JAKs) et les seconds messagers activateurs de la transcription (STATs). Le signal est déclenché par la liaison de l'IFN- γ avec un récepteur spécifique. Ce récepteur est formé de deux chaînes α et β qui sont constamment associées aux protéines Janus Kinase. La liaison de l'IFN- γ à son récepteur permet d'activer les JAKs et provoque la phosphorylation du récepteur et de certaines protéines STATs. Les STATs phosphorylés migrent vers le noyau et activent la transcription de plusieurs gènes importants dont iNOS (23).

9.3 Les Interleukines

L'interleukine-1 β (IL-1 β) et l'interleukine-6 (IL-6) semblent également participer à l'amplification de la réponse immunitaire. La sécrétion de ces deux cytokines survient immédiatement après la stimulation à la LPS ce qui suggère que l'IL-1 β et l'IL-6 ont un rôle important à jouer dans l'induction de l'expression de iNOS (76). L'IL-1 β est produit par les macrophages tandis que l'IL-6 est synthétisé par les cellules T. De plus, il a été démontré que le traitement à la LPS stimule l'expression de l'IL-1 β et de l'IL-6 dans les cellules de foie en culture (3). Les effets de l'IL-6 semblent survenir via la voie des JAKs-STATs (83). La voie de signalisation empruntée par l'IL-1 β est encore peu connue, toutefois l'IL-1 β semble activer des protéines kinase de façon à induire l'activation de certains facteurs de transcription dont NF- κ B. L'IL-1 β semble responsable de la synthèse de l'IL-6 étant donné que l'IL-1 β active également le facteur de transcription de l'IL-6, NF-IL-6 (129).

9.4 La LPS

Les bactéries gram-négatives sont responsables de plus de la moitié des chocs septiques retrouvés aux États-Unis (145, 181). Ce syndrome est caractérisé par une hypotension et par une perfusion inadéquate de plusieurs tissus. De plus, la septicémie est responsable de plusieurs dommages causés au foie, au reins, et au poumons. L'endotoxine LPS est retrouvée dans la membrane externe des bactéries gram-négatif et est considérée comme un facteur important dans le développement des chocs septiques (195).

La LPS est un glycolipide formé d'une région hydrophile composée de plusieurs chaînes de polysaccharides et un domaine hydrophobe appelé le lipide A. Cette région de la LPS est très importante puisqu'elle constitue un site de liaison pour la lipopolysaccharide binding protein (LBP) (190). La LBP est une glycoprotéine de 60 kDa (77, 152) qui est sécrétée dans le sang par les hépatocytes et dont la synthèse est sous le contrôle de plusieurs cytokines (77). Il a été démontré que la principale fonction de la LBP est de permettre à la LPS de se lier à son récepteur, le CD14 (67).

Le récepteur CD14 est principalement exprimé par les monocytes et les macrophages (117, 209). Le CD14 peut être exprimé sous deux formes différentes : Dans les monocytes et les macrophages le CD14 se retrouve sous forme de glycoprotéine membranaire tandis que dans les cellules endothéliales et épithéliales les effets de la LPS sont transmis par un récepteur soluble (62, 151). Le système de signalisation de la LPS est encore mal défini. Toutefois, le système MAP kinase semble être activé par la LPS. En effet, dans les macrophages, la liaison de la LPS au récepteur CD14 provoque l'activation de plusieurs protéine tyrosine kinases (12, 54). Plusieurs autres protéines dont ras, raf-1, ERK semblent avoir un rôle important à jouer dans la médiation de ce signal. Certains types de protéines kinases C (PKC) sont également impliqués dans l'activation de certains facteurs de transcription (voir section 11) (126).

10. iNOS dans le muscle squelettique

Au moment où les études de ce mémoire ont débuté, la présence de iNOS dans le muscle squelettique était toujours controversée. Plusieurs études récentes

ont toutefois démontré que l'IFN- γ , le TNF- α et la LPS peuvent induire l'expression de la protéine iNOS dans le muscle squelettique (141, 188, 207). La protéine iNOS a également été détectée dans le muscle squelettique au repos chez le cobaye et chez l'humain mais cette expression est faible et n'est présente que dans certaines espèces seulement. Le rôle de iNOS dans le muscle squelettique est encore peu connu toutefois trois conditions peuvent augmenter l'expression de iNOS dans ce tissu. Il a été démontré que la septicémie induite par un traitement à la LPS chez le rat augmente l'expression de iNOS dans le muscle (124, 162). L'expression de iNOS est également augmentée dans ce tissu suite à un protocole de dommage musculaire (159). Les muscles endommagés montrent une extrême vasodilatation ce qui suggère que l'augmentation de la production de NO est responsable du choc hémodynamique observé lors des blessures musculaires. Les effets dommageables de iNOS ont également été rapportés dans certains modèles d'ischémie/reperfusion puisque l'inhibition de la production de NO augmente de façon significative la viabilité du muscle chez la souris (107).

11. Régulation transcriptionnelle de iNOS

Contrairement aux isoformes eNOS et nNOS dont l'activité est principalement régulée par le calcium intracellulaire, l'activité de iNOS est contrôlée au niveau transcriptionnelle. L'activation transcriptionnelle de iNOS est principalement régulée par les produits des bactéries gram-positives et gram-négatives, par l'interféron γ et le TNF- α . Le clonage et le séquençage de iNOS ont révélé la présence de plusieurs séquences importantes sur le gène. Ces séquences représentent des sites de liaison pour les facteurs de transcription comme les éléments de réponse à l'interféron γ , au TNF- α , à la LPS et au facteur de transcription NF- κ B (76).

L'activation de la transcription du gène iNOS est dépendante de la présence du facteur NF- κ B (74, 210). A l'état non stimulé, NF- κ B est situé dans le cytoplasme et est lié à son inhibiteur i- κ B α . La stimulation par les cytokines provoque la séparation de i- κ B α ce qui permet la translocation de NF- κ B au noyau de la cellule et l'activation de la transcription. Il a également été rapporté que la production de NO stimule la translocation de NF- κ B (115) ce qui suggère que le NO module sa propre synthèse via l'activation transcriptionnelle du gène iNOS.

L'expression de iNOS peut également être modulée par des facteurs en circulation. Il a récemment été démontré que l'expression de iNOS est régulée par les glucocorticoïdes (50, 123, 173). Une étude réalisée chez les hépatocytes a rapporté que le dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, inhibe la transcription de gène iNOS (50). Le mécanisme d'action du dexaméthasone consiste à inhiber la translocation de NF- κ B via l'augmentation de l'expression de l'inhibiteur i- κ B α (50). D'autres facteurs circulants tels que le glucagon peuvent inhiber l'expression de iNOS dans les hépatocytes (176).

Le développement de certaines maladies autoimmunes comme le diabète de type I résulte de l'infiltration et de la destruction par les macrophages des cellules β du pancréas. Plusieurs études ont récemment rapporté que le diabète de type I est associé à une augmentation de l'expression de iNOS dans les macrophages (4, 5, 44, 180). D'ailleurs, il a été démontré que le NO produit par iNOS joue un rôle important dans le développement de cette maladie (43, 112). De plus, l'injection d'insuline *in vivo* chez le rat diabétique permet de rétablir les niveaux d'expression de l'ARNm de iNOS dans les macrophages (180). Les mécanismes d'inhibition de iNOS par l'insuline sont encore mal définis. Toutefois d'après cette étude, l'insuline semble inhiber iNOS via l'augmentation de la production de TGF- β 1, un inhibiteur puissant de l'expression de iNOS dans les macrophages (180). Cependant, un effet direct de l'insuline sur l'expression et l'activité de iNOS dans les macrophages reste à être démontré.

12. Buts de l'étude

L'obésité est fortement associée au diabète de type II. Ce désordre métabolique se développe suite à un état prolongé de résistance à l'insuline. L'obésité est caractérisée par une surproduction de cytokines comme le TNF- α par le tissu adipeux. La sécrétion de TNF- α est en partie responsable, *in vivo*, du développement de la résistance à l'insuline dans les adipocytes (89) et dans le muscle squelettique (160). Le mécanisme d'action du TNF- α dans les adipocytes semble impliquer la voie de la sphingomyéline cependant dans le muscle squelettique aucun mécanisme n'a été identifié. Le but de la première étude était de déterminer le mécanisme par lequel les cytokines modulent le métabolisme du glucose dans le muscle squelettique. Notre hypothèse consistait à vérifier l'effet des cytokines sur l'induction de l'expression de iNOS et l'implication du NO dans la

modulation du transport du glucose.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé des cellules musculaires L6 en culture étant donné que l'utilisation de cellules immortalisées présente plusieurs avantages importants. En seulement 7 jours, les myoblastes se multiplient et se différencient en myotubes. De plus il est possible d'effectuer des incubations à long terme sur ce type de cellules contrairement aux muscles isolés. Les cellules en culture permettent également d'éliminer certains facteurs comme l'implication du système vasculaire et la présence d'hormones qui, *in vivo*, pourraient affecter les paramètres mesurés. Ce modèle permet d'étudier l'action de l'insuline puisque ce type de cellule contient les éléments du système de signalisation de l'insuline.

Dans un premier temps, nous avons vérifié l'induction de iNOS dans les myocytes L6. L'utilisation de plusieurs cytokines est nécessaire puisque *in vivo* l'induction de iNOS survient grâce à la présence des macrophages qui sont responsables de la sécrétion d'un bon nombre de cytokines. Dans cette étude, nous avons utilisé le TNF- α , l'INF- γ et l'endotoxine LPS étant donné que ces molécules participent *in vivo* à l'induction de iNOS. Nous avons par la suite vérifié l'effet de la production de NO sur le transport du glucose de base et stimulé par l'insuline ainsi que sur l'expression des différents transporteurs de glucose.

Dans une deuxième étude, nous avons étudié la régulation de l'expression de l'enzyme iNOS. Il a été démontré que le dexaméthasone inhibe l'expression de iNOS dans les hépatocytes. Nous avons vérifié la présence de cet effet dans les cellules musculaires mais également évalué l'effet de l'insuline sur l'expression de iNOS. En effet les diabètes insulino-dépendants et non insulino-dépendants sont caractérisés par une réduction des niveaux d'insuline ou de son action. De plus, il est bien connu que la septicémie et l'endotoxémie sont associées à une résistance à l'insuline dans le muscle squelettique (118, 120, 214). Il est donc important de vérifier si l'insuline module l'expression et l'activité de iNOS. En effet, une modulation altérée de iNOS par l'insuline pourrait mener à une expression augmentée de iNOS dans le muscle squelettique d'individus diabétiques ou septicémiques.

LES CYTOKINES MODULENT LE TRANSPORT DU GLUCOSE
DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE EN INDUISANT
L'EXPRESSION DE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHÉTAZE
INDUCTIBLE

CHAPITRE I

RÉSUMÉ

Le principal objectif de cette étude était de vérifier l'hypothèse que les cytokines modulent le transport de glucose dans le muscle squelettique en augmentant la production de l'oxyde nitrique. Les cellules musculaires L6 en culture ont été incubées en présence de tumor necrosis factor- α , d'interféron- γ , ou de la lipopolysaccharide (LPS) seule et en combinaison durant 24 h. Ni les cytokines ni la LPS seules induisent la production de NO, mesuré par les concentrations de nitrite dans le milieu de culture. Toutefois, lorsqu'utilisées en combinaison, les deux cytokines stimulent la production de NO de façon significative et cet effet est augmenté de façon synergique par la présence de la LPS. L'analyse par RT-PCR a révélé que le relâchement de NO est associé avec l'induction de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS). L'augmentation de l'expression de iNOS a été confirmée au niveau de la protéine par des analyses d'immuno-buvardage ainsi que par la coloration histochimique de la NADPH/diaphorase. Les cytokines augmentent de façon prononcée le transport de glucose de base dans les myocytes L6. L'insuline stimule également le transport de glucose de base, mais significativement moins dans les cellules chroniquement exposées aux cytokines/LPS. La sensibilité à l'insuline des cellules musculaires L6 est également diminuée de façon significative par le traitement aux cytokines/LPS. L'inhibiteur des NOS, le N^o-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), inhibe la production de nitrite dans les cellules traitées aux cytokines/LPS. Ce traitement prévient également l'augmentation du transport de glucose de base et permet de rétablir la réponse à l'insuline des cellules musculaires. L'exposition aux cytokines/LPS augmente de façon significative les niveaux de la protéine GLUT1 mais diminue l'expression de GLUT4 dans les cellules L6. Le traitement au L-NAME prévient l'augmentation de la protéine GLUT1 sans toutefois rétablir les niveaux du transporteur GLUT4. Ces résultats démontrent que les cytokines et la LPS affectent le transport du glucose et l'action de l'insuline en induisant l'expression de iNOS et la production de NO dans les cellules musculaires. Les résultats indiquent également que les cytokines et la LPS augmentent l'expression du transporteur GLUT1 par un mécanisme dépendant du NO.

**Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing
the expression of inducible nitric oxide synthase**

Sylvain Bédard, Bruno Marcotte, and André Marette*

Department of Physiology and Lipid Research Unit, Laval University Hospital
Research Center, Québec, G1V 4G2, Canada.

Short title: Cytokines and glucose uptake in skeletal muscle.

* To whom all correspondence should be addressed at:

Department of Physiology & Lipid Research Unit
Laval University Hospital Research Center
Ste-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada
Fax: (418) 654-2277
E-mail: andre.marette@crchul.ulaval.ca

ABSTRACT

The principal goal of the present study was to test the hypothesis that cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by increasing nitric oxide (NO) production. Cultured L6 skeletal muscle cells were incubated in the presence of tumour necrosis factor- α , interferon- γ , or lipopolysaccharide (LPS) alone or in combination for 24 hrs. Neither cytokines nor LPS alone induced NO production, as measured by medium nitrite concentrations. However, when used in combination, the two cytokines significantly stimulated NO production and this effect was synergistically enhanced by the presence of LPS. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis revealed that NO release was associated with the induction of inducible (macrophage-type) NOS (iNOS). The increase iNOS expression was confirmed at the protein level by Western blot analysis and NADPH/diaphorase histochemical staining. Cytokines and LPS markedly increased basal glucose transport in L6 myocytes. Insulin also stimulated basal glucose transport but significantly less in cells chronically exposed to cytokines/LPS. The sensitivity of L6 muscle cells to insulin-stimulated glucose transport was also significantly decreased by cytokines/LPS treatment. The NOS inhibitor *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) inhibited nitrite production in cytokine/LPS-treated cells, and this prevented the increased in basal glucose transport and restored muscle cell responsiveness to insulin. Cytokines/LPS exposure significantly increased GLUT1 transporter protein levels but reduced GLUT4 expression in L6 cells. L-NAME treatment prevented the increase in GLUT1 protein content but failed to restore GLUT4 transporter levels. These results demonstrate that cytokines and LPS affect glucose transport and insulin action by inducing iNOS expression and NO production in skeletal muscle cells. The data further indicate that cytokines and LPS increase the expression of the GLUT1 transporter protein by a NO-dependent mechanism.

LIST OF ABBREVIATIONS

NO: nitric oxide

NOS: nitric oxide synthase

nNOS: neuronal-type NOS

eNOS: endothelial-type NOS

iNOS: inducible NOS

TNF- α : tumor necrosis factor- α

IF- γ : interferon- γ

LPS: lipopolysaccharide

RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction

L-NAME: *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester

α -MEM: α -minimum essential medium

PVDF: polyvinylidene difluoride

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

GAPDH: glyceraldehyde phosphate dehydrogenase

INTRODUCTION

It is well documented that septicaemia elicits profound changes in host metabolism, including increased energy expenditure and impaired whole-body glucose homeostasis in both animals and humans [1]. Septic patients have an accelerated rate of glucose clearance in the basal state [2]. On the other hand, acute infection is also associated with a state of insulin resistance, as evidenced by diminished glucose tolerance, hyperinsulinemia, and impaired insulin action on peripheral glucose disposal [3, 4]. Previous studies have focused on the role of cytokines in mediating the effects of infection on metabolism. Indeed, administration of the cytokines TNF- α and interleukin-1 to experimental animals has been reported to mimic the metabolic response to acute infection [5-7]. Sakurai et al. [6] have recently provided evidence that TNF- α directly stimulates glucose uptake in peripheral tissues of dogs. Conversely, in vivo infusion of endotoxin and cytokines have also been found to reduce insulin-stimulated glucose uptake by skeletal muscles, the main site of glucose disposal in the post-prandial state [7]. Other studies have shown that cytokines affect glucose metabolism in isolated muscles or cultured myocytes [8-10]. Thus, cytokines appear to modulate glucose homeostasis by a direct action on skeletal muscle cells.

The precise cellular mechanisms responsible for the action of cytokines on muscle glucose metabolism are not known. It has been recently shown that skeletal muscle expresses nitric oxide synthase (NOS), the enzyme that catalyses the formation of nitric oxide (NO) from L-arginine [11-14]. In resting muscle, both the constitutive neuronal-type (nNOS) and endothelial-type (eNOS) isozymes are expressed [11, 13]. Whereas nNOS localization is restricted to type IIb fast-twitch glycolytic fibres, eNOS can be found both in the endothelial cells and within

mitochondria-enriched (oxidative) fibres [11, 13]. Moreover, experimental septicaemia induced by endotoxin treatment of rats has been reported to increase the expression of an inducible, calcium-independent NOS (iNOS) in skeletal muscle of rats [15, 16]. iNOS expression and NO production has also been reported in cultured C2C12 myocytes challenged with cytokines and LPS [17]. Recent studies in our laboratory have shown that increasing NO concentrations with NO donors inhibit insulin-stimulated glucose transport in isolated rat soleus and extensor digitorum longus muscles [11]. This effect could be reproduced in cultured L6 myocytes, strongly suggesting that NO exerted its action by a direct action and not by diffusion to the muscle vasculature. Thus, one possible mechanism by which cytokines and endotoxin could affect glucose metabolism in muscle cells is by induction of iNOS expression and exaggerated NO production. This hypothesis was directly tested in the present study using cultured L6 skeletal muscle cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Alpha-minimum essential medium (α -MEM), foetal bovine serum and other tissue culture products were obtained from Gibco BRL. Human insulin (Humulin R) was purchased from Eli Lilly (Indianapolis, IN). 2-deoxy-D-glucose, cytochalasin B, lipopolysaccharide (from *E. coli*) and NADPH were obtained from Sigma (St-Louis, MO). 2-deoxy-D-[3 H]glucose was purchased from NEN Dupont (St Laurent, Qc). N^G-Nitro-L-arginine-methylester (L-NAME) was obtained from Alexis (San Diego, CA). Recombinant murine and human TNF- α were purchased from R&D systems and Boehringer Mannheim, respectively. Murine IF- γ was kindly supplied by Dr. Martin Olivier (CHUL research center, Qc). An antibody directed against a C-terminal peptide (1131-1144) of mouse macrophage (iNOS) was

purchased from Cedarlane Laboratories (Mississauga, ON, Canada). Polyclonal antibodies directed against rat GLUT1 and GLUT4, or mouse GLUT3, were from East Acres Biologicals, (Southbridge, MA). Monoclonal α 1-Na/K-ATPase was a kind gift from Dr. K. Sweadner, (Massachusetts General Hospital).

Cell culture: A line of L6 skeletal muscle cells (kind gift of Dr. A. Klip, Hospital for Sick Children, Toronto) clonally selected for high fusion potential was used in the present study. The L6 cell line was derived from neonatal rat thigh skeletal muscle cells and retains many morphological, biochemical and metabolic characteristics of skeletal muscle [18]. Fully differentiated L6 myotubes express several muscle-specific proteins such as myosin ATPase, the SR Ca^{2+} -ATPase, and the dihydropyridine receptor [19]. Cells were grown and maintained in monolayer culture in α -MEM containing 2 % (v/v) foetal bovine serum and 1 % (v/v) antibiotic/antimycotic solution (10 000 units/ml penicillin, 10 000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin and 25 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B) in an atmosphere of 5 % CO_2 at 37°C. L6 myoblasts were plated in 24-well plates, 6 well plates, or 10 cm dishes at 20,000 cells/ml and were used after complete differentiation to myotubes (7 days post-plating).

Cell incubations and glucose transport assay: L6 myotubes were incubated with or without TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml) and LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 hrs, followed by addition of insulin (0.6 μM) (or medium alone) for an additional 45 min. When present, the NOS inhibitor L-NAME was used at a concentration of 2 mM. Cells were rinsed once with glucose-free HEPES-buffered saline solution pH 7.4 (140 mM NaCl, 20 mM HEPES-Na, 5 mM KCl, 2.5 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2) and subsequently incubated for 8 min with 10 μM 2-deoxy-D-glucose containing 0.3 $\mu\text{Ci/ml}$ 2-deoxy-D- ^3H glucose in the same buffer. After the incubation in transport medium, cells were rinsed three times with ice-cold saline solution, and then disrupted by adding 50 mM

NaOH. Cell associated-radioactivity was determined by scintillation counting. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method (BCA, Pierce) and results were expressed in pmol/mg/min. Glucose uptake values were corrected for non-carrier-mediated transport by measuring hexose uptake in the presence of 10 μ M cytochalasin B (~ 5-10 % of total uptake).

Measurements of NO, glucose, and lactate concentrations: The accumulation of nitrite in the incubation medium was used as an index of NO production. Nitrite was determined spectrophotometrically as previously described [20]. The Griess reagent (1.0% Sulphanilamide/ 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride) was added to samples of the incubation medium and the absorption was read at 540 nm. Medium glucose and lactate levels were measured using a YSI type 2300 STAT Plus automatic glucose and lactate analyser (Yellow Springs, OH), which use the glucose oxidase and lactate dehydrogenase reactions.

RNA extraction and RT-PCR: Total cellular RNA was isolated using guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction with the TRIzol Reagent (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) based on the method developed by Chomczynski and Sacchi [21]. cDNA synthesis was performed with 200 units of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Gibco BRL) using 1 μ g of total RNA in 20 μ l of reverse transcriptase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂ and 10 mM DTT) containing 1 mM each dNTP and 8 pmol of iNOS or GAPDH antisense primers. The reaction was performed at 42°C during 1 hour and the enzyme was then denatured at 95°C for 10 min. Samples were then supplemented with 3 μ l of 10x PCR buffer (1x PCR buffer is 33.3 mM KCl and 3 mM MgCl₂), 8 pmol of iNOS, or GAPDH sense primers and water to 30 μ l. cDNAs were denatured for 5 min at 94°C, cooled to 72°C and then 1 unit of *Thermophilus*

aquaticus DNA polymerase (Boehringer Mannheim) was added to each sample. Amplification was performed as follows: 30 cycles of temperature (94°C, 30 sec; 60°C, 1 min; 72°C, 1min) in temperature cycler (DNA Thermal Cycler, Perkin-Elmer). Sequences of the antisense and sense oligonucleotides (based on rat iNOS and GAPDH see [15]) were as follows; iNOS: 5'-TGGAACCACTCGTACTTGGGA-3' and 5'-CAAGAGTTTGACCAGAGGACC-3', GAPDH: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' and 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'. The expected sizes of amplification products were 653 base pairs for iNOS, and 331 base pairs for GAPDH. Amplification products were run in 8% acrylamide gels, stained in ethidium bromide and fluorescence associated with DNA bands was measured using a scanner BiImage-Visage 110S from Millipore Corp. (Ann Harbor-Michigan).

Isolation of cellular proteins and membranes: Total cellular proteins were isolated from the same cells used for RNA isolation. The proteins were extracted from the phenol-ethanol supernatant obtained after precipitation of DNA with ethanol, as described by the manufacturer instructions (TRIzol reagent, Life technologies). These protein samples were used for determination of iNOS protein content by Western blotting (see below). For membrane isolation, fully differentiated L6 myotubes were washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (pH 7.4) (PBS), scraped with a rubber policeman, collected and centrifuged at 700 x g for 10 min. The 700 x g cell pellet was resuspended in homogenising buffer containing 250 mM sucrose, 2 mM EGTA, 5 mM NaN₃, 20 mM HEPES (pH 7.4), 200 µM PMSF, 1 µM leupeptin, 1 µM pepstatin A and 10 µM E-64. Cells were homogenised using a Wheaton A (tight-fit) glass homogenizer (20 strokes), followed by centrifugation at 2000 x g for 15 min. The resulting supernatant was centrifuged at 186 000 x g for 1 hour at 4°C. The pellet (total membranes) was resuspended in homogenising buffer and protein concentrations were determined by the bicinconinic acid (BCA) assay

(Pierce), using bovine serum albumin as standard. Membrane proteins were used for Western blot analysis of glucose transporters (see below).

Western blot analysis: Total or membrane protein samples (50 μ g) were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) on 7.5% polyacrylamide gels as described by Laemmli [22] and electrophoretically transferred (100 V, 2 hrs) to polyvinylidene difluoride (PVDF) filter membranes for 2 h. Immunoblotting was performed as previously described [23]. Briefly, PVDF membranes were incubated for 1 h at room temperature with buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) containing 0.04% NP-40 and 0.02% Tween-20 and 3% bovine serum albumin (fatty acid free BSA), followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies. Dilutions of antibodies were : polyclonal iNOS (1 : 2500), GLUT1 (1 : 2000), GLUT3 (1 : 1000), GLUT4 (1 : 2000) polyclonal antibodies, and monoclonal α 1-Na/K-ATPase (1 : 200). PVDF membranes were then washed for 30 min, followed by a 1 h incubation with either anti-mouse or anti-rabbit immunoglobulin G (1 : 10,000 dilution) conjugated to horseradish peroxidase (Amersham) in buffer I containing 1% BSA. The PVDF membranes were washed for 30 min in Buffer I, and the immunoreactive bands detected by the enhanced chemiluminescence method.

NOS histochemistry: NOS was selectively stained by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-diaphorase histochemistry [24]. L6 myotubes grown on cover slips in 6-well plates were incubated with or without cytokines + LPS for 24 hrs, washed 3 times in Tris buffer (0.1 M Tris-HCL, pH 8), and fixed in 4% paraformaldehyde followed by a 30 min incubation at 37°C in 0.1 M Tris-HCL buffer containing 1 mM NADPH, 0.2 mM nitro blue tetrazolium and 0.3 % Triton X-100. Sections were rinsed in PBS (2 x 10 min) and mount on slides for histochemistry.

Cells were viewed using a high-power microscope (Nikon, optiphot). No staining was observed when NADPH was omitted from the reaction mixture (data not shown).

Statistical Analysis: Values are means \pm SE. The effect of cytokines/LPS and insulin on glucose transport were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA). The effects of different concentrations of insulin on glucose transport were analysed by ANOVA. The level of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

The effects of individual cytokines and their combination on NOS activity in L6 myocytes were determined by measurements of medium nitrite levels as shown in Table 1. Neither TNF- α nor IF- γ alone stimulated NO production over basal values. However, a significant increase in nitrite levels was observed when cells were incubated with both cytokines. Moreover, the addition of LPS synergistically enhanced the effects of the cytokines to promote NO production. LPS alone did not increase nitrite levels (data not shown). Addition of the NOS inhibitor L-NAME (2 mM) totally abrogated the effects of the cytokines and LPS on NO production.

We next investigated whether the increased production of NO was related to the induction of iNOS. L6 myocytes treated as above were used for extraction of RNA and iNOS mRNA detection by RT-PCR analysis (Figure 1). GAPDH mRNA levels assessed in the same samples were used as internal controls for the RT-PCR assay. iNOS and GAPDH were both amplified as single gene products migrating at

the expected molecular size (iNOS: 653 bp, GAPDH: 331 bp) on agarose gels. iNOS mRNA was not detectable in control myocytes or in cells treated with either cytokines or LPS alone but was observed in cells treated with the combination of TNF- α and IF- γ . As for nitrite levels, the combination of both cytokines and LPS markedly induced iNOS expression. The expression of GAPDH mRNA was not different among treatment groups. Moreover, neither the neuronal-type (nNOS) or the endothelial-type (eNOS) NOS isoforms could be detected in control or cytokine/LPS-treated L6 cells (data not shown)

The close parallelism between the action of cytokines and LPS to increase nitrite levels and iNOS mRNA strongly suggested that iNOS was responsible for the enhanced NOS activity. To establish that point, we also determined iNOS protein levels in these cells using both immunoblotting and histochemical detection techniques. Using a specific polyclonal antibody against macrophage-type iNOS, we could detect iNOS induction at the protein level only in cells chronically treated with both cytokines and LPS (Figure 2). In contrast, the α 1-Na/K-ATPase, used here as a control protein, was present in all samples. Moreover, this treatment did not affect total cellular proteins (μ g per well) under the same conditions (data not shown). The lack of detection of iNOS protein in muscle cells treated with both cytokines in the absence of LPS may be related to the limited sensitivity of Western blotting as compared to RT-PCR analysis of iNOS mRNA. This is supported by the observation that nitrite production was observed in cells treated with both cytokines (Table 1). Induction of iNOS was further confirmed by diaphorase staining (Figure 3B). Thus, these results demonstrate that the induction of iNOS mRNA expression in cytokines/LPS-treated cells resulted in the synthesis of more iNOS protein and NO production.

We next investigated the effects of cytokines and LPS on basal and insulin-stimulated glucose transport in L6 myocytes (Table 2). As expected, acute insulin stimulation (45 min) significantly stimulated glucose transport in these cells. Chronic exposure (24 hrs) of L6 cells to the cytokines/LPS mixture markedly increased basal glucose uptake above that seen with insulin alone. As shown in Table 3, this treatment also induced a significant release of lactate in the medium. Lactate concentrations in the medium were not increased during the acute (45 min) stimulation with insulin (data not shown). In cells previously treated with cytokines/LPS, insulin produced a much smaller increase in glucose transport above that seen with cytokines/LPS treatment (Table 2). This stimulation (in pmoles/min/mg protein) was about half that seen in control untreated myocytes. Cells treated with TNF- α and IF- γ either alone or in combination failed to affect basal or insulin-stimulated glucose transport in the same conditions (data not shown). Noticeably, preventing NO production by addition of L-NAME to the incubation medium of cells treated with cytokines and LPS blocked the stimulation of basal glucose uptake and lactate release, and restored the responsiveness of L6 myocytes to insulin (Tables 2 and 3). Similar results were obtained when NO production was abolished by L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine (0.1 mM), a more selective inhibitor of iNOS [25] (data not shown).

We also determined the effects of cytokines/LPS on insulin sensitivity by measuring glucose uptake at different concentrations of insulin (Figure 4). Cells chronically exposed to the cytokines/LPS mixture were more resistant to the action of insulin as reflected by the lack of significant effect of lower doses (up to 60 nM) of the hormone to activate glucose transport in cytokines/LPS-treated cells (see EC₅₀ in legend to Figure 4). L-NAME improved insulin sensitivity in cytokines/LPS-treated myocytes as shown by the restored ability of lower concentrations to stimulate

glucose transport. The NOS inhibitor alone slightly reduced absolute glucose transport rates in L6 cells. However, both basal and insulin-stimulated glucose transport were similarly affected, and thus, L6 cell insulin responsiveness and sensitivity were not significantly different than control myocytes.

Glucose transport is mediated by the GLUT1, GLUT3, and GLUT4 transporters in L6 muscle cells and insulin has been shown to stimulate glucose transport by inducing the translocation of these transporter proteins to the plasma membrane [26]. The effect of cytokines/LPS treatment on the cellular expression of these glucose transporter isoforms is shown in Figure 5. The cytokines/LPS mixture significantly increased (by ~60%) the expression of the GLUT1 transporter protein. In marked contrast, the expression of the GLUT4 glucose transporter was markedly decreased in the same cells. Inhibition of NO production by L-NAME treatment reversed the increasing effect of cytokines/LPS on GLUT1 protein expression but failed to restore GLUT4 protein levels. The NOS inhibitor did not alter GLUT1 or GLUT4 expression *per se*. On the other hand, the expression of the GLUT3 transporter protein was not affected by these treatments (Figure 5). As expected, acute exposure (45 min) of the cells to insulin did not affect the total levels of any GLUT isoforms (data not shown).

DISCUSSION

The present study shows that chronic exposure of L6 myocytes to cytokines induced iNOS expression and NO production in these cells. Moreover, the cytokine effect was markedly enhanced by the presence of LPS. These results in L6 cells are in good agreement with previous studies showing iNOS mRNA induction in skeletal muscle of endotoxin-treated rats and in C2C12 mouse myocytes exposed to

cytokines [15, 17]. Our findings further demonstrate that iNOS expression is increased at the protein level as determined by immunoblotting and histochemical techniques.

This induction of iNOS expression was associated with important changes in glucose transport in muscle cells. First, cytokines and LPS markedly increased basal glucose transport activity in L6 myocytes. This metabolic effect has been recently observed in another study with muscle cells [27], and the present study suggests that the extra glucose taken up by the cells was mainly used for glycolysis since lactate concentrations significantly rose in the medium. These results are in good agreement with the known effects of cytokines such as TNF- α in vivo. Indeed, TNF- α has been reported to increase skeletal muscle glucose disposal in rats and even cause hypoglycaemia at high doses [28, 29]. The increase in glucose utilisation was more easily observed at high concentrations of the cytokine [29]. It has been suggested that this metabolic response is not readily observed at lower doses of TNF- α because of the concomitant elevation of counterregulatory hormones (glucagon, catecholamines, cortisol). Indeed, the hypoglycaemic effect of TNF- α are observed at lower doses of the cytokine in adrenalectomised rats [29]. More recently, Sakurai et al. [6] have provided evidence that TNF- α directly stimulates peripheral glucose uptake in peripheral tissues by preventing any changes in insulin and glucagon during TNF- α infusion.

Another finding of the present study is that cytokines/LPS treatment impaired insulin stimulation of glucose transport in L6 muscle cells. This impairment was observed despite the elevation of basal glucose transport by cytokines/LPS exposure. These results are consistent with previous reports that septic patients are insulin-resistant [3] and that exogenous challenge with cytokines impairs insulin-

mediated glucose uptake in skeletal muscle [7]. It is likely that the insulin-resistant effects of cytokines are better appreciated *in vivo* since, as mentioned above, the direct action of TNF- α to enhance muscle glucose disposal is overruled by counterregulatory hormones such as glucagon. Importantly, in the conditions used in the present study (24 hrs), TNF- α alone was not able to influence muscle cell glucose uptake, thus suggesting that it interacts with other cytokines and/or endotoxin during infection *in vivo*. These results are in accordance with the recent work of Ranganathan and Davidson [27] who also found that insulin action on glucose transport is not affected by TNF- α alone. However, these data are at odds with another study in which the same concentration of TNF- α was found to inhibit insulin-stimulated glucose uptake within minutes and up to 12 hrs in L6 cells [30]. The reasons for these discrepant findings are not known. It cannot be attributed to the type (murine vs human) of TNF- α used and thus, the type of TNF- α receptors activated (murine TNF- α binds to both p55 vs p75 receptors but human TNF- α only binds to p55 [31]), as we found similar effects of murine or human TNF- α on iNOS expression and glucose transport in this study (data not shown).

An important goal of the present study was to determine the cellular mechanism by which cytokines and endotoxin affect glucose transport in muscle cells. The fact that cytokines/LPS increased NO production and modulate glucose transport in the same cells suggest that these effects are related but a causal relationship remained to be shown. Our findings that the NOS inhibitor L-NAME inhibited NO production and fully prevented the effects of the cytokines/LPS challenge on basal and insulin-stimulated glucose transport provide convincing evidence that both the stimulatory and insulin-resistant actions of cytokines are linked to the induction of iNOS and the production of NO by muscle cells.

Since chronic alterations in glucose transport activity may be linked to changes in the expression of glucose transporters, we have determined the cellular protein levels of the three transporter isoforms known to be present in L6 muscle cells. Our results strongly suggest that cytokines/LPS increase basal glucose transport at least in part by augmenting the expression of the GLUT1 glucose transporter. It should be noted that the effect of cytokines/LPS on GLUT1 expression (~60%) was smaller than their enhancing action on basal glucose transport (~120%). However, it is possible that most of the biosynthesised GLUT1 proteins are localised in the plasma membrane (where glucose transport takes place) in cytokine-treated cells, thus explaining the greater increases in basal glucose transport. Another possibility is that GLUT1 intrinsic activity is activated by cytokines. Whatever the mechanism, it was found that GLUT1 overexpression is blocked by L-NAME treatment, indicating that NO production was responsible for the effects of cytokines and LPS on both basal glucose transport and GLUT1 protein levels.

In contrast to their effects on GLUT1 expression, cytokines and LPS markedly reduced GLUT4 protein levels in L6 muscle cells. These findings suggest that the impaired insulin action in cytokine-treated L6 cells is may be associated with a decreased expression of GLUT4, an hypothesis that is in accordance with previous studies in which chronic treatment with cytokines was found to reduce GLUT4 expression in adipocytes [32-34]. However, the finding that NOS blockade with L-NAME re-established insulin action without restoring GLUT4 content indicate that the cytokine-effect is not only related to the cellular expression of the GLUT4 protein. Insulin stimulates glucose transport in L6 myocytes by translocation of glucose transporters (GLUT1-3) to the plasma membrane [26]. Thus, it is possible that cytokines and LPS reduce insulin action by impairing the translocation of glucose transporters and that this effect is NO-dependent as it can be reversed by L-NAME

treatment. This hypothesis is consistent with our recent observations that NO inhibits insulin-stimulated glucose transport in isolated rat skeletal muscles and in L6 myocytes [11].

In summary, the present study demonstrates that the cytokines TNF- α and IF- γ , when added in combination, induce iNOS expression and stimulate nitrite production in L6 myocytes, and that LPS synergistically enhances these effects. Moreover, cytokines and LPS markedly increase basal glucose transport but reduce insulin action to stimulate glucose uptake and these effects are mediated by induction of iNOS and NO production. Our results further show that cytokines and endotoxin increase GLUT1 expression by a NO-dependent mechanism.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association, the Canadian Medical Research Council, and the "Association du diabète du Québec". A. Marette is a Canadian Medical Research Council scholar.

We wish to thank Dr. Pascale Mauriège for her help with the measurements of medium lactate and glucose concentrations and Dr. Guy Drolet for help with microscopy techniques. We also thank Dr. Martin Olivier for gift of interferon- γ .

REFERENCES

- 1 Frayn, K. N. (1986) *Clin Endocrinol* **24**, 577-599
- 2 Wolfe, R. R. (1986) In: *The scientific basis for the care of the critically ill*. Eds: K. N. Frayn and R. A. Little. Manchester, U. K.: Manchester Univ. Press, p123-151
- 3 Shangraw, R. E., Jahoor, F., Miyoshi, H., Neff, W. A., Stuart, C. A., Herndon, D. N. and Wolfe, R. R. (1989) *Metab Clin Exp* **38**, 983-989
- 4 Westfall, M. V. and Sayeed, M. M. (1988) *Am J Physiol* **254**, R673-R679
- 5 Sakurai, Y., Zhang, X. and Wolfe, R. R. (1993) *J Clin Invest* **91**, 2437-2445
- 6 Sakurai, Y., Zhang, X.-J. and Wolfe, R. R. (1996) *Am J Physiol* **270** (**Endocrinol. Metab.** **33**), E864-E872
- 7 Ling, P. R., Bistran, B. R., Mendez, B. and Istfan, N. W. (1994) *Metabolism* **43**, 279-284
- 8 Zentella, A., Manogue, K. and Cerami, A. (1993) *Cytokine* **5**, 436-447
- 9 Lee, M. D., Zentella, A., Pekala, P. H. and Cerami, A. (1987) *proc Natl Acad Sci USA* **84**, 2590-2594
- 10 Cornelius, P., Lee, M. D., Marlowe, M. and Pekala, P. H. (1986) *Biochem Biophys Res Comm* **165**, 429-436
- 11 Kapur, S., Bédard, S., Côté, C. and Marette, A. (1996) *Diabetes* **45** (**Suppl. 2**), p. 157A
- 12 Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S. and Stamler, J. S. (1994) *Nature* **372**, 546-548
- 13 Kobzik, L., Stringer, B., Balligand, J. L., Reid, M. B. and Stamler, J. S. (1995) *Biochem and biophys res commu* **211**, 375-381
- 14 Nakane, M., Schmidt, H. H. H. W., Pollock, J. S., U., F. and Murad, F. (1993) *FEBS Lett* **316**, 175-180
- 15 Liu, S., Adcock, I. M., Old, R. W., Barnes, P. J. and Evans, T. W. (1993) *Biochem Biophys Res Comm* **196**, 1208-1213

- 16 Salter, M., Knowles, R. G. and Moncada, S. (1991) *FEBS Lett* **291**, 145-149
- 17 Williams, G., Brown, T., Becker, L., Prager, M. and Giroir, B. P. (1994) *Am-J-Physiol* **267**, R1020-1025
- 18 Yaffe, D. (1968) *Proc Natl Acad Sci USA* **61**, 477-483
- 19 Mitsumoto, Y., Burdett, E., Grant, A. and Klip, A. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **175**, 652-9
- 20 Verdon, C. P., Burton, B. A. and Prior, R. L. (1995) *Anal Biochem* **224**, 502-508
- 21 Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) *Anal Biochem* **162**, 156-159
- 22 Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680-685
- 23 Dombrowski, L., Roy, D., Marcotte, B. and Marette, A. (1996) *Amer J Physiol* **270 (Endo. Metab. 33)**, E667-E676
- 24 Hope, B. T., Michael, G. J., Knigge, K. M. and Vincent, S. R. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 2811-2814
- 25 Moore, W. M., Webber, R. K., Jerome, G. M., Tjoeng, F. S., Misko, T. P. and Currie, M. G. (1994) *J Med Chem* **37**, 3886-3888
- 26 Tsakiridis, T., McDowell, H., Walker, T., Downes, P., Hundal, H. S., Vranic, M. and Klip, A. (1995) *Endocrinology* **136**, 4315-4322
- 27 Ranganathan, S. and Davidson, M. B. (1996) *Metabolism-clinical and experimental* **45**, 1089-1094
- 28 Evans, D. A., Jacobs, D. O. and Wilmore, D. W. (1989) *Am J Physiol* **257**, R1182-R1189
- 29 Chajek-Shaul, T., Barash, V., Weidenfeld, G., Friedman, E., Ziv, E., Shohami, E. and Shiloni, E. (1990) *Metab Clin Exp* **39**, 242-250
- 30 Begum, N., Ragolia, L. and Srinivasan, M. (1996) *Eur J Biochem* **238**, 214-220
- 31 Vandenabeele, P., Declercq, W., Beyaert, R. and Fiers, W. (1995) *Trends Cell Biol* **5**, 392-399
- 32 Stephens, J. M. and Pekala, P. H. (1991) *J Biol Chem* **266**, 21839-21845

- 33 Stephens, J. M. and Pekala, P. H. (1992) *J Biol Chem* **267**, 13580-4
- 34 Hotamisligil, G. S., Murray, D. L., Choy, L. N. and Spiegelman, B. M. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 4854-4858

Table 1. Effect of TNF- α , IF- γ , LPS, and L-NAME on nitrite production by L6 myocytes.

Conditions	Nitrite (μ M)	
	- L-NAME	+ L-NAME (2mM)
Control	0.27 \pm 0.04	0.49 \pm 0.14
TNF- α	0.09 \pm 0.10	0.36 \pm 0.26
IF- γ	0.22 \pm 0.11	0.14 \pm 0.10
TNF- α + IF- γ	1.60 \pm 0.87	0.25 \pm 0.07 *
TNF- α + IF- γ + LPS	9.57 \pm 0.85	0.93 \pm 0.17 **

L6 cells were treated or not with TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml), LPS (10 μ g/ml) and L-NAME (2 mM) for 24 hrs and nitrite levels were measured in the incubation medium as indicated in Materials & Methods. Bars represent mean \pm SE from at least 3 independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared to control values.

Table 2. Effects of chronic cytokines/LPS exposure on basal and insulin-stimulated glucose transport in L6 myocytes.

Conditions	2-Deoxy-glucose uptake (pmol/min/mg)	
	- L-NAME	+ L-NAME (2mM)
Control	31.45 ± 1.93 a	27.85 ± 1.90 a
Insulin	53.10 ± 2.53 b	46.98 ± 3.67 b
Cyto + LPS	70.66 ± 3.31 c	26.78 ± 0.81 a
Cyto+LPS+Insulin	82.14 ± 1.35 d	43.56 ± 3.81 b

	Insulin-mediated 2-deoxy-glucose uptake (Insulin minus basal)	
Control	20.77 ± 3.47 a	19.13 ± 2.54 a
Cyto + LPS	11.08 ± 2.46 b	16.78 ± 3.28 a

Cells were treated or not with a combination of TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml) and LPS (10 μ g/ml), with or without L-NAME (2 mM), for 24 hrs, followed by insulin (or medium) for an additional 45 min incubation with 0.6 μ M insulin before glucose uptake measurements. Values represent mean \pm SE of 4 individual experiments performed in triplicate. Insulin-mediated 2-deoxy-glucose uptake were calculated from the difference between insulin and noninsulin-stimulated values for each experimental conditions. Mean values not sharing a common superscript are significantly different at $p < 0.05$.

Table 3: Effects of chronic cytokines/LPS exposure on lactate and glucose concentrations in culture medium of L6 myocytes.

Conditions	Lactate (mM)	Glucose (mM)
Control	2.08±0.24	4.16±0.26
Cytokines/LPS	3.34±0.42*	3.75±0.14
L-NAME	1.79±0.20	4.45±0.22
Cytokines/LPS + L-NAME	2.21±0.30	4.34±0.25

Cells were treated or not with a combination of TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml) and LPS (10 μ g/ml), with or without L-NAME (2 mM), for 24 hrs. Medium was collected and used for measurements of lactate and glucose concentrations as described in Material and Methods. * $p < 0.05$ as compared to control values.

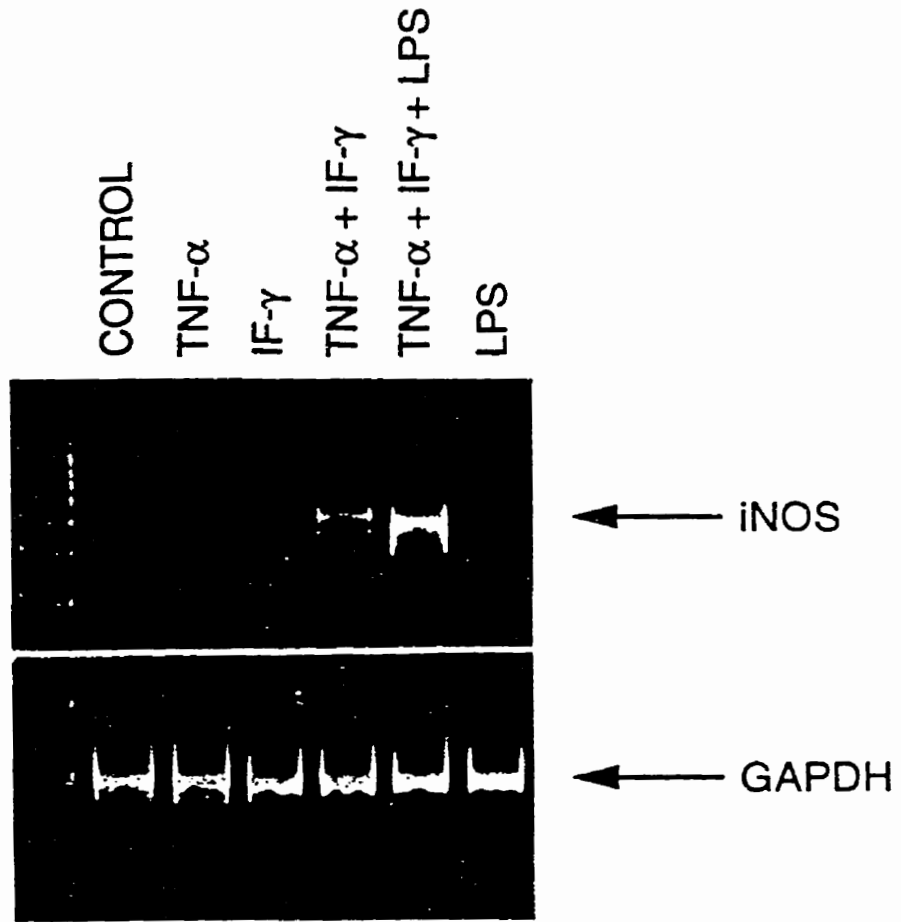


Figure 1

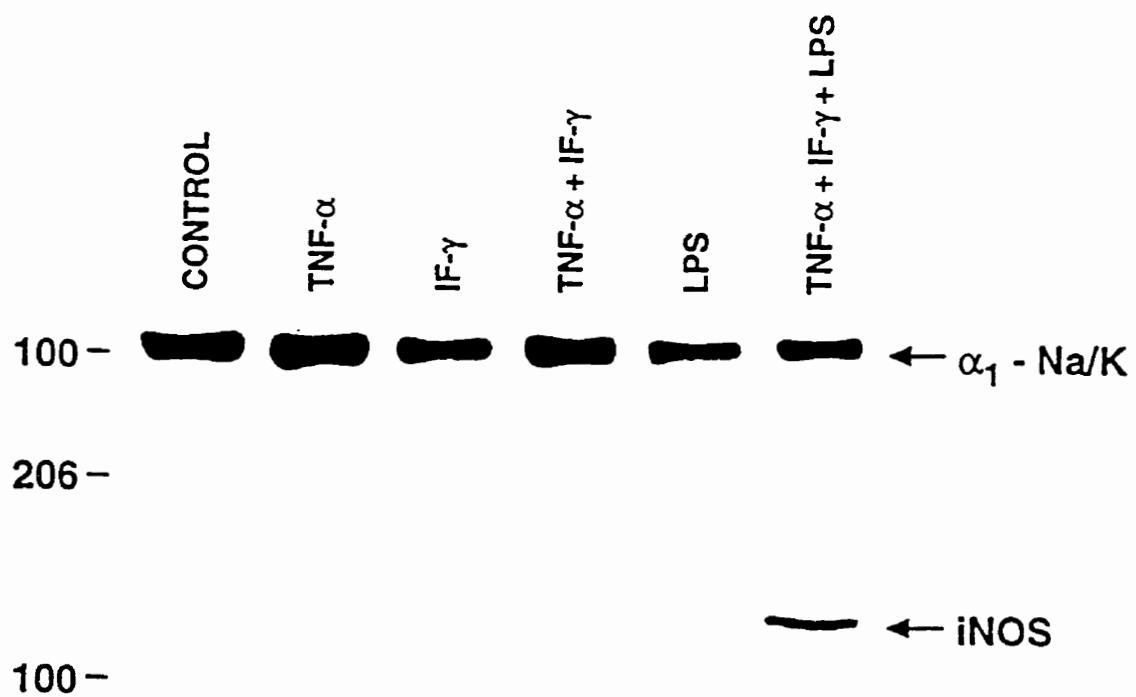


Figure 2

A



B



Figure 3

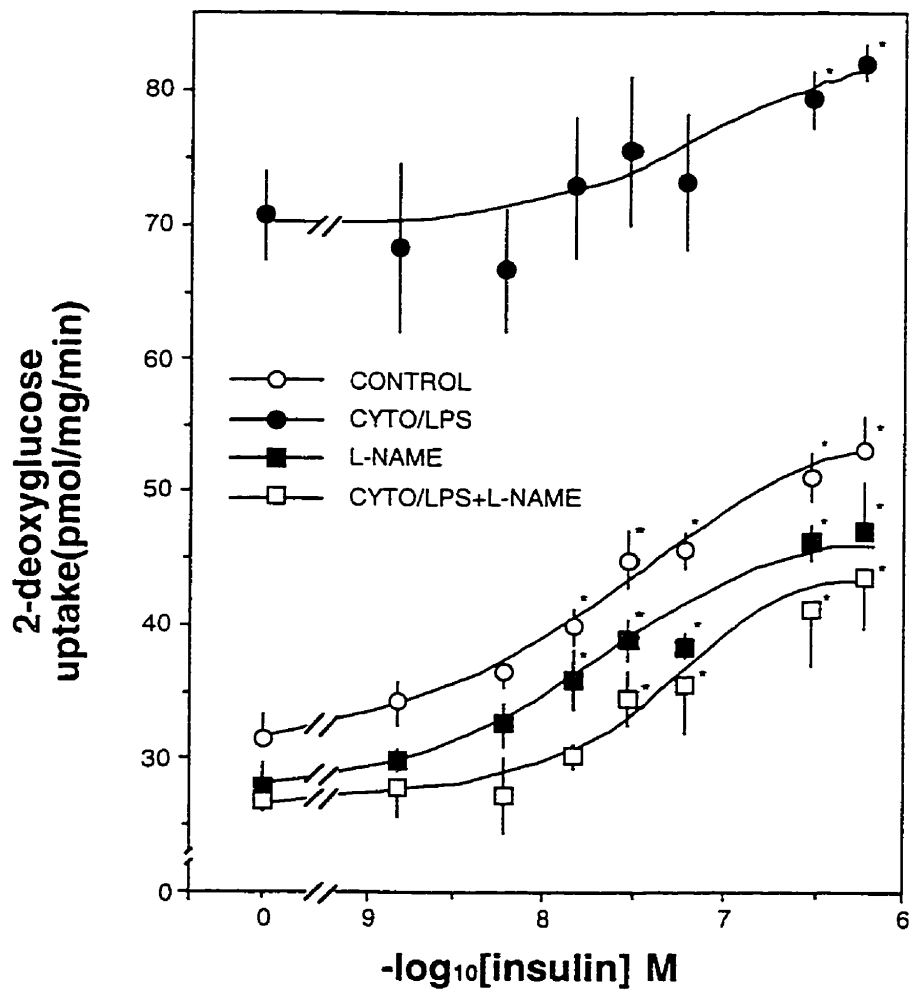


Figure 4

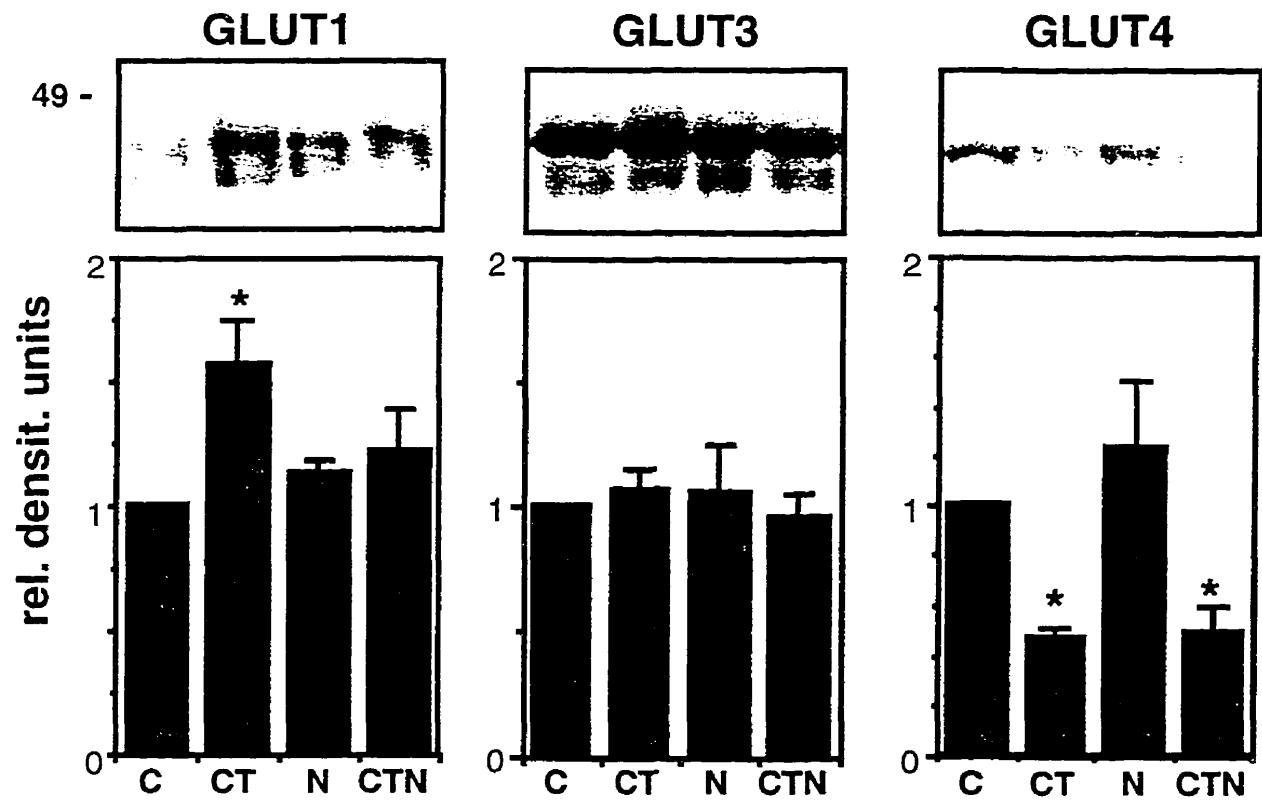


Figure 5

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Effect of TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml) and LPS (10 μ g/ml) on the expression of iNOS mRNA in L6 myocytes. L6 cells were treated or not with cytokines and LPS for 24 hrs before RNA isolation and RT-PCR analysis of iNOS mRNA. GAPDH mRNA levels were also evaluated in the same RNA samples. The sizes of the amplification products were, as expected, 653 base pairs for iNOS and 331 base pairs for GAPDH. The experiment shown is representative of 3 individual determinations with different cells.

Figure 2. Effect of TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml) and LPS (10 μ g/ml) on the expression of iNOS protein in L6 myocytes. L6 cells were treated or not with cytokines and LPS for 24 hrs before protein extraction and Western blot analysis with specific antibodies against iNOS and the α 1-subunit of the Na/K-ATPase. The migration of molecular weight standards (in kDa) are shown on the left. The experiment shown is representative of 3 individual determinations with different cells.

Figure 3. Histochemical detection of NOS in control (A) and cytokines/LPS-treated (B) L6 myocytes. Cells grown on coverslips were incubated in the presence or not of the cytokines/LPS mixture for 24 hrs and NOS was visualized by histochemical diaphorase staining as described in Material & Methods. Arrows point to intense labeling located throughout the cytoplasm of multinucleated myotubes. Magnification : x 50. The experiment shown is representative of 2 separated experiments.

Figure 4. Dose-response curves of insulin-stimulated glucose transport in control and cytokines/LPS-treated L6 myocytes. Cells were treated as described in Table 3, followed by addition of indicated concentrations of insulin before glucose uptake measurements. When present, L-NAME was used at a concentration of 2 mM. Half-effective concentrations (EC_{50}) for the dose response curves were as follows: control: 22 nM, cytokines/LPS: 70 nM, L-NAME: 20 nM; Cytokines/LPS + L-NAME: 40 nM. Points represent mean \pm SE of 3 individual experiments performed in triplicate. * $p < 0.05$ vs unstimulated (basal) 2-deoxyglucose uptake values.

Figure 5. Effects of cytokines/LPS and L-NAME on the expression of (A) GLUT1, (B) GLUT3, and (C) GLUT4 glucose transporter proteins in L6 myocytes. Cells were treated or not with a combination of TNF- α (10 ng/ml), IF- γ (200 U/ml) and LPS (10 μ g/ml), with or without L-NAME (2 mM), for 24 hrs. Total cell membranes were isolated and equivalent amounts (50 μ g) of proteins were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting with isoform-specific antibodies against GLUT1, GLUT3, and GLUT4 as described in Materials & Methods. C: control, CT: cytokines/LPS, N: L-NAME, CTN: cytokines/LPS + L-NAME. Results are expressed as relative changes in the amounts of transporter proteins relative to control values. The migration of the 49 kDa molecular weight standard is indicated on the left. Points represent mean \pm SE of 3-4 individual determinations with different batches of cells. * $p < 0.05$ vs control.

CHAPITRE II

**L'INSULINE INHIBE L'OXYDE NITRIQUE SYNTHÉTASE
INDUCTIBLE DANS LES CELLULES DE MUSCLE
SQUELETTIQUE**

RÉSUMÉ

De récentes études ont démontré que les cytokines et les endotoxines diminuent le transport de glucose stimulé par l'insuline en induisant l'expression de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) et la production de NO dans les cellules musculaires. Dans cette étude, nous avons déterminé si l'induction de iNOS est modulée par l'insuline dans les myocytes L6. L'exposition chronique des cellules musculaires en présence de tumor necrosis factor (TNF- α), d'interféron- γ et de lipopolysaccharide (LPS) augmente de façon importante l'ARNm de iNOS ainsi que la production de NO. L'addition d'insuline aux cellules musculaires traitées aux cytokines et à la LPS réduit de façon significative (~40 %) la production de NO. Cette inhibition était similaire à celle observée en présence du glucocorticoïde synthétique, le dexaméthasone, un inhibiteur de l'enzyme iNOS dans plusieurs types de cellules. La combinaison de l'insuline et du dexaméthasone était plus efficace à réduire la production de NO que ces deux agents seuls. Le dexaméthasone inhibe l'effet des cytokines/LPS dans l'induction de l'expression de l'ARNm de iNOS. L'insuline toutefois n'a aucun effet inhibiteur sur les niveaux d'expression de l'ARNm de iNOS dans les mêmes conditions. Ces résultats démontrent que l'insuline est un nouvel inhibiteur de la production de NO causée par iNOS dans les cellules musculaires. De plus, nos résultats indiquent que contrairement aux glucocorticoïdes, l'insuline n'inhibe pas la production de NO en diminuant l'expression de la transcription du gène iNOS.

**INSULIN INHIBITS INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN
SKELETAL MUSCLE CELLS**

Sylvain Bédard, Bruno Marcotte, and André Marette*.

Department of Physiology & Lipid Research Unit, Laval University Hospital
Research Center, Ste-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada

Short title: Insulin inhibits iNOS in skeletal muscle

* Corresponding author: Dr. André Marette, Lipid Research Unit, Laval University Hospital Research Center, Ste-Foy, Québec, G1V 4G2, Canada, Tel: (418) 654-2133, Fax (418) 654-2176, e-mail: andre.marette@crchul.ulaval.ca

SUMMARY

Recent studies have shown that cytokines and endotoxins impair insulin-stimulated glucose transport by activating the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO production in skeletal muscle cells. In the present study, we have investigated whether iNOS induction is modulated by insulin in L6 myocytes. Chronic exposure of muscle cells to tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS) markedly increased iNOS mRNA levels and NO production. Addition of insulin to the cytokine/LPS-treated muscle cells significantly reduced (by ~40%) NO production. This inhibition was similar to that observed with the synthetic glucocorticoid dexamethasone, a known inhibitor of iNOS in several cell types. The combination of insulin and dexamethasone was more effective than either agent alone in reducing NO production. Dexamethasone markedly inhibited the effect of cytokines/LPS to induce cellular iNOS mRNA expression. In marked contrast, insulin failed to reduce iNOS mRNA levels under similar conditions. These results demonstrate that insulin is a novel inhibitor of iNOS-mediated NO production in skeletal muscle cells. Furthermore, our data indicate that unlike glucocorticoids, insulin does not inhibit NO production by suppression of iNOS gene transcription.

Key words: insulin, nitric oxide, nitric oxide synthase, skeletal muscle, glucocorticoids, cytokines, lipopolysaccharide.

Abbreviations: Nitric oxide (NO)
Nitric oxide synthase (NOS)
Inducible nitric oxide synthase (iNOS)
Lipopolysaccharide (LPS)
N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)
Tumor necrosis factor- α (TNF- α)
Interferon- γ (IFN- γ)
Half-inhibitory concentration (IC₅₀)
Tetrahydrobiopterin (BH₄)
Alpha minimum essential medium (α -MEM)
Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH)

INTRODUCTION

Bacterial endotoxins and inflammatory cytokines are potent inducers of iNOS activity and cellular expression. Such stimulation has been reported in macrophages, where NO production is primary responsible for their antimicrobial action, but also in various cell types including skeletal muscle cells (1). iNOS is detected at rather low levels in intact skeletal muscle but its expression is markedly increased following in vivo treatment with LPS (1-4), or in vitro exposure of skeletal muscle cells to cytokines and/or LPS (5-7). We have recently shown that iNOS induction is associated with impaired insulin-stimulated glucose transport in skeletal muscle (2, 5). Moreover, iNOS inhibition by *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) restored insulin action in cytokine-treated muscle cells (5). These studies indicate that iNOS-mediated NO production reduces insulin action in skeletal muscle cells. iNOS induction has also been shown to be responsible for the impairment in muscle contractility that is observed in endotoxin shock (3, 8). A role for iNOS has also been proposed in causing muscle injury following ischemia-reperfusion (9).

It has been previously shown that iNOS expression is modulated by glucocorticoids in several cell types (1, 10-12). Recent studies further indicated that peptidic hormones such as glucagon can also inhibit iNOS expression in hepatocytes (13). Insulin was found to have no effect on liver iNOS expression in the same study. On the other hand, the hormonal modulation of skeletal muscle iNOS still remains poorly understood. The aim of the present study was to determine whether insulin modulates iNOS expression in skeletal muscle cells and to compare this effect with that of the synthetic glucocorticoid dexamethasone.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and treatment

A line of L6 skeletal muscle cells (kind gift of Dr. A. Klip, Hospital for Sick Children, Toronto) clonally selected for high fusion potential was used in the present study. Cells were grown and maintained in monolayer culture in α -MEM containing 2 % (v/v) foetal bovine serum and 1 % (v/v) antibiotic/antimycotic solution (10 000 units/ml penicillin, 10 000 μ g/ml streptomycin and 25 μ g/ml amphotericin B) in an atmosphere of 5 % CO₂ at 37°C. L6 myoblasts were plated in 10 cm dishes at 10⁵ cells/ml and were used after complete differentiation to myotubes (7 days post-plating), as previously described (5). L6 myotubes were incubated for 24 hrs with or without TNF- α (10 ng/ml, 0.6 nM), IF- γ (200 U/ml, 1 nM) and LPS (10 μ g/ml), and in the absence or presence of insulin (human Humulin R) and/or dexamethasone (concentrations indicated in figure legends). In some experiments, the NOS inhibitor L-NAME (2 mM) was also added with cytokines and LPS. The incubation medium was then removed for analysis of nitrite and cells were immediately used for RNA extraction and RT-PCR, as described below.

Nitrite production: The accumulation of nitrite in the incubation medium was used as an index of NO production by iNOS. Nitrite production was fully inhibited in the presence of 2 mM L-NAME. Furthermore, only iNOS can produce NO in the L6 myocytes since neither control nor cytokine/LPS-treated cells express the other NOS isoforms eNOS and nNOS (2, 5). Nitrite was determined spectrophotometrically using the Griess reagent as previously described (5). Briefly, 100 μ l of the Griess reagent (1.0% Sulphanilamide/ 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride) was added to 100 μ l samples of the

incubation medium in 96-well plates. The absorption was read at 540 nm against standard curves of sodium nitrite.

RNA extraction and RT-PCR: Total cellular RNA was isolated using guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction with the TRIzol Reagent (Life Technologies, Burlington, Ontario, Canada) based on the method developed by Chomczynski and Sacchi (14). cDNA synthesis and amplification were performed exactly as previously described (5). Sequences of the antisense and sense oligonucleotides (based on rat iNOS and GAPDH) were as follows; iNOS: 5'-TGGAACCACTCGTACTTGGGA-3' and 5'-CAAGAGTTTGACCAGAGGACC-3', GAPDH: 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3' and 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'. The expected sizes of amplification products were 653 base pairs for iNOS, and 331 base pairs for GAPDH. Amplification products were run in 8% acrylamide gels, stained in ethidium bromide, and fluorescence associated with DNA bands was analysed by laser scanning densitometry using a tabletop Agfa scanner (Arcus II) and quantitated with the NIH *Image* program.

Statistical Analysis: Values are means \pm SE. The effects of insulin and/or dexamethasone on NO production were compared by a two-way analysis of variance (ANOVA). The level of significance was $p < 0.05$.

RESULTS

The effects of cytokines and LPS on iNOS expression and NO production by L6 myocytes are shown in Figure 1. The cytokine/LPS mixture markedly induced iNOS expression as reflected both by an increase in iNOS mRNA levels (Fig. 1A) and nitrite accumulation in the incubation medium (Fig. 1B). These effects were

specific for iNOS since the expression of the house-keeping GAPDH gene was not affected in the same cells. Furthermore, nitrite accumulation was prevented when cells were incubated with cytokines/LPS and the NOS inhibitor L-NAME, confirming that iNOS activity was responsible for the production of nitrite. Indeed, other NOS isoforms are not expressed in these cells (5).

Addition of insulin to cytokine/LPS-exposed muscle cells significantly blunted NO production (to 63 ± 8 % of control) (Figure 2). As previously reported for other cell types, dexamethasone also inhibited NO release by myocytes (to 56 ± 3 % of control). The combination of insulin and dexamethasone treatments was more effective in blocking NO production (to 40 ± 7 % of control) than either treatment alone. Figure 3 shows that insulin was more potent than glucocorticoids at inhibiting NO production. Insulin's ability to reduce NO production was already detectable at 0.1 nM and was almost maximal at 10 nM, whereas dexamethasone inhibition of cytokine-induced NO release was barely detectable at 10 nM and clearly observed at doses of > 100 nM.

The effects of insulin and/or dexamethasone on iNOS gene expression in L6 myocytes are shown in Figure 4A and the mean data from 6 individual experiments are depicted in Figure 4B. Insulin failed to affect iNOS mRNA induction in cytokine/LPS-treated cells. In marked contrast, dexamethasone significantly reduced iNOS gene expression in the same cells (to 58 ± 8 % of control). The effect of both agents were identical to that of dexamethasone alone. GAPDH mRNA levels were not affected in any of those experimental conditions.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, the present results show for the first time that insulin can directly modulate iNOS activity in myocytes. In this regard, direct modulation of iNOS activity by insulin has not been reported for other cell types. In a recent study, Smith et al (13) found that glucagon inhibits cytokine-induced NO production in hepatocytes but that insulin is without effect. Thus, our results suggest that iNOS modulation by insulin is specific to muscle cells and not a characteristic of all insulin-sensitive cells. Interestingly, insulin has been shown to directly increase endothelium NO production in isolated arterioles and in human umbilical vein endothelial cells in culture, suggesting that the hormone activates the endothelial type NOS isoform (eNOS) in these cells (15, 16). Thus, insulin regulation of NOS activity appears to be isoform-specific. It will be important to determine the molecular basis of this NOS type-specific modulation of NO production.

The effect of insulin on NO production was similar to that of dexamethasone but the mechanisms implicated are clearly different. Indeed, both treatments reduced iNOS-mediated NO production by about a half, but only dexamethasone caused a decrease in iNOS mRNA levels. In fact, the blunting effect of dexamethasone on myocyte NO production could be entirely explained by the suppression of iNOS expression. The partial additivity of insulin and dexamethasone effects on NO production is also consistent with the proposition that two different mechanisms are implicated. Further studies will be needed to identify potential post-transcriptional mechanisms by which insulin inhibits NO production. These include (but are not limited to) alterations in translation efficiency and/or changes in protein stability, and/or direct modulation of the enzyme activity through reductions in the availability of the substrate L-arginine or cofactors such as tetrahydrobiopterin (BH₄) [see (10, 12)].

Insulin's ability to inhibit iNOS activity in skeletal muscle may be relevant to the pathogenesis of diabetes. Indeed, we have recently reported that cytokines induce iNOS expression and that LPS synergistically enhances this effect in L6 myocytes (5). iNOS induction in cytokine-treated muscle cells was associated with a reduced ability of insulin to increase glucose transport in these cells but basal glucose transport activity was augmented in the same condition. These effects could be totally reversed by NOS blockade with L-NAME, implicating that iNOS-mediated NO production was responsible for the alterations in glucose transport activity. Furthermore, LPS challenge in rats also induced muscle iNOS expression (1-4, 6, 17) and NO production by isolated muscles (2), which were associated with an impaired insulin-mediated glucose utilization in the same muscles (2). Increasing NO concentrations to the levels seen in cytokine/LPS-treated cells by exogenous addition of NO donor drugs to isolated rat muscles or cultured L6 myocytes also blunted insulin action on glucose transport and amino acid uptake (2). On the other hand, the present data demonstrate that insulin is a potent modulator of iNOS in skeletal muscle cells as shown by its ability to inhibit the action of cytokines to increase iNOS-mediated NO production. More studies are needed to confirm the effect of insulin on iNOS activity in skeletal muscle tissue *in vivo*. Nevertheless, the present data suggest that under normal physiological conditions, muscle iNOS activity is inhibited by circulating insulin levels. Interestingly, iNOS induction in various disease states is associated with both an increased in inflammatory mediators but also in a reduction in insulin levels or action. Thus, the lack of insulin in type I diabetes (autoimmune or induced by streptozotocin) is associated with increased macrophage iNOS activity (18). Moreover, we have recently observed that skeletal muscle from streptozotocin-induced diabetic rats have increased iNOS (Ca²⁺-independent) activity (unpublished data). Increased muscle iNOS expression

in sepsis is also associated with a relative insulin resistance (i. e. lack of insulin action) at the cellular level. Thus, iNOS activity in the above pathological states may be induced by the combination of increased levels of inflammatory cytokines and diminished insulin concentrations or action. It is interesting to note that obesity-linked diabetes is also associated with increased levels of TNF- α and impaired insulin action in both muscle and adipose cells (19, 20). It will be interesting to investigate whether muscle and adipose cells from obese subjects have increased iNOS activity, and if insulin's ability to inhibit the enzyme is impaired in these cells.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Medical Research Council of Canada and the Canadian Diabetes Association. S. Bédard was supported by a FCAR-FRSQ studentship. A. Marette holds a scholarship from the Canadian Medical Research Council.

REFERENCES

1. Liu, S., Adcock, I. M., Old, R. W., Barnes, P. J., and Evans, T. W. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA *Biochem Biophys Res Commun.* 196(3): 1208-13, 1993.
2. Kapur, S., Bédard, S., Marcotte, B., Coté, C. H., and Marette, A. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action *Diabetes.* 46(11): 1691-700, 1997.
3. Boczkowski, J., Lanone, S., Ungureanu-Longrois, D., Danialou, G., Fournier, T., and Aubier, M. Induction of diaphragmatic nitric oxide synthase after endotoxin administration in rats: role on diaphragmatic contractile dysfunction *J Clin Invest.* 98(7): 1550-9, 1996.
4. Gath, I., Godtel-Armbrust, U., and Forstermann, U. Expressional downregulation of neuronal-type NO synthase I in guinea pig skeletal muscle in response to bacterial lipopolysaccharide *FEBS Lett.* 410(2-3): 319-23, 1997.
5. Bédard, S., Marcotte, B., and Marette, A. Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase *Biochem J.* 325(Pt 2): 487-93, 1997.
6. Williams, G., Brown, T., Becker, L., Prager, M., and Giroir, B. P. Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes *Am J Physiol.* 267(4 Pt 2): R1020-5, 1994.

7. Okuda, S., Kanda, F., Kawahara, Y., and Chihara, K. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells *Am J Physiol.* 272(1 Pt 1): C35-40, 1997.
8. Gath, I., Closs, E. I., Godtel-Armbrust, U., Schmitt, S., Nakane, M., Wessler, I., and Forstermann, U. Inducible NO synthase II and neuronal NO synthase I are constitutively expressed in different structures of guinea pig skeletal muscle: implications for contractile function *Faseb J.* 10(14): 1614-20, 1996.
9. Knight, K. R., Zhang, B., Morrison, W. A., and Stewart, A. G. Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone *Eur J Pharmacol.* 332(3): 273-8, 1997.
10. Simmons, W. W., Ungureanu-Longrois, D., Smith, G. K., Smith, T. W., and Kelly, R. A. Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport *J Biol Chem.* 271(39): 23928-37, 1996.
11. De Vera, M. E., Taylor, B. S., Wang, Q., Shapiro, R. A., Billiar, T. R., and Geller, D. A. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kappa B alpha and inhibiting NF-kappa B *Am J Physiol.* 273(6 Pt 1): G1290-6, 1997.
12. Hattori, Y., Akimoto, K., Nakanishi, N., and Kasai, K. Glucocorticoid regulation of nitric oxide and tetrahydrobiopterin in a rat model of endotoxic shock *Biochem Biophys Res Commun.* 240(2): 298-303, 1997.

13. Smith, F. S., Ceppi, E. D., and Titheradge, M. A. Inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression by glucagon and cAMP in cultured hepatocytes *Biochem J.* 326(1): 187-92, 1997.
14. Chomczynski, P., and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acidic guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction *Anal Biochem.* 162: 156-159, 1987.
15. Zeng, G., and Quon, M. J. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells *J Clin Invest.* 98(4): 894-8, 1996.
16. Chen, Y. L., and Messina, E. J. Dilatation of isolated skeletal muscle arterioles by insulin is endothelium dependent and nitric oxide mediated *Am J Physiol.* 270(6 Pt 2): H2120-4, 1996.
17. el-Dwairi, Q., Comtois, A., Guo, Y., and Hussain, S. N. Endotoxin-induced skeletal muscle contractile dysfunction: contribution of nitric oxide synthases *Am J Physiol.* 274(3 Pt 1): C770-9, 1998.
18. Stevens, R., Sutherland, D., Ansite, J., Saxena, M., Rossini, T., LevayYoung, B., Hering, B., and Mills, C. Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: Nitric oxide as cause and effect of diabetes? *J Immunol.* 159(11): 5329 - 5335, 1997.

19. Hotamisligil, G. S., and Spiegelman, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance *Science*. 259: 87-91, 1993.

20. Hotamisligil, G. S., and Spiegelman, B. M. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity -diabetes link *Diabetes*. 43: 1271-1278, 1994.

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1 : Effect of cytokines and LPS on iNOS mRNA expression and nitrite production in L6 myocytes. L6 cells were treated (CYTO) or not (CONT) with TNF- α (10 ng/ml, 0.6 nM), IFN- γ (200 units/ml, 1 nM), LPS (10 μ g/ml) for 24 h, followed by (A) RNA isolation and RT-PCR analysis of iNOS mRNA levels. GAPDH mRNA levels were also measured in the same samples. The sizes of amplification products were, as expected, 653 bp for iNOS and 331 bp for GAPDH, and (B) Measurement of nitrite production in the incubation medium. In some experiments, the NOS inhibitor L-NAME was also added to the cells (CYTO + L-NAME). Results are representative of 6 individual experiments.

Figure 2: Effects of insulin and/or dexamethasone on cytokines/LPS-induced NO production in L6 myocytes. L6 cells were treated with cytokines/LPS for 24 h as described in Figure 1. Cells were incubated with cytokines/LPS in the absence (C) or presence of insulin (INS) 0.6 μ M and/or dexamethasone (DEX) 1 μ M before measurement of nitrite. The bars represent mean \pm SE of 6 individual experiments performed in triplicate. Nitrite production in cytokines/LPS-treated cells was 8.8 ± 0.7 μ M. Bars not sharing a common superscript are different at $p < 0.05$.

Figure 3: Dose-response relationships for the effects of insulin or dexamethasone on cytokines/LPS-induced NO production in L6 myocytes. L6 cells were treated with cytokines/LPS with or without different concentrations of insulin (INS) or dexamethasone (DEX) for 24 h before measurement of nitrite levels in the incubation medium. Results are expressed relative to the maximal inhibition observed at 1 μ M of insulin or dexamethasone. Nitrite production in cytokines/LPS-treated cells was 8.8 ± 0.7 μ M. The points represent the mean \pm SE of 2 individual experiments performed in triplicate.

Figure 4: Effect of insulin and/or dexamethasone on cytokines/LPS-induced iNOS expression in L6 myocytes. L6 cells were treated with or without cytokines/LPS, insulin 0.6 μ M and/or dexamethasone 1 μ M for 24 h before RNA isolation and RT-PCR analysis of iNOS and GAPDH mRNAs as in Figure 1. (A) Representative gels showing iNOS and GAPDH amplified products. (B) Mean \pm SE of 6 individual experiments. Bars not sharing a common superscript are different at $p < 0.05$.

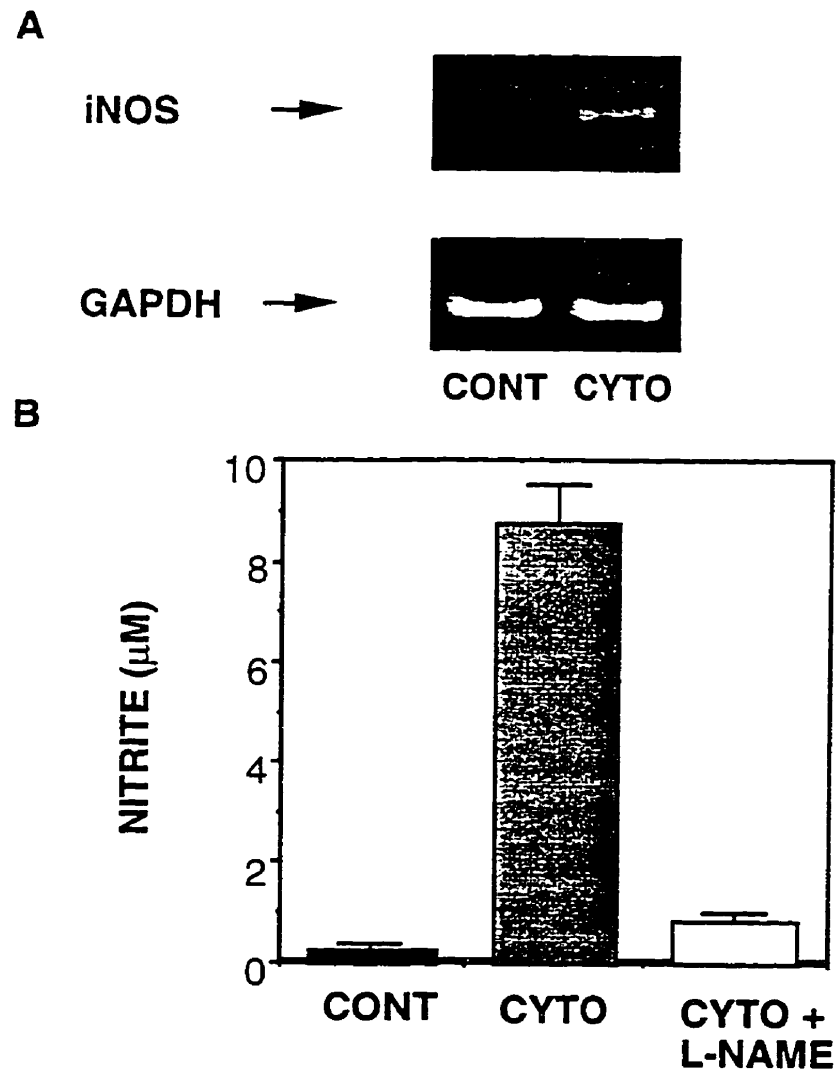


Figure 1

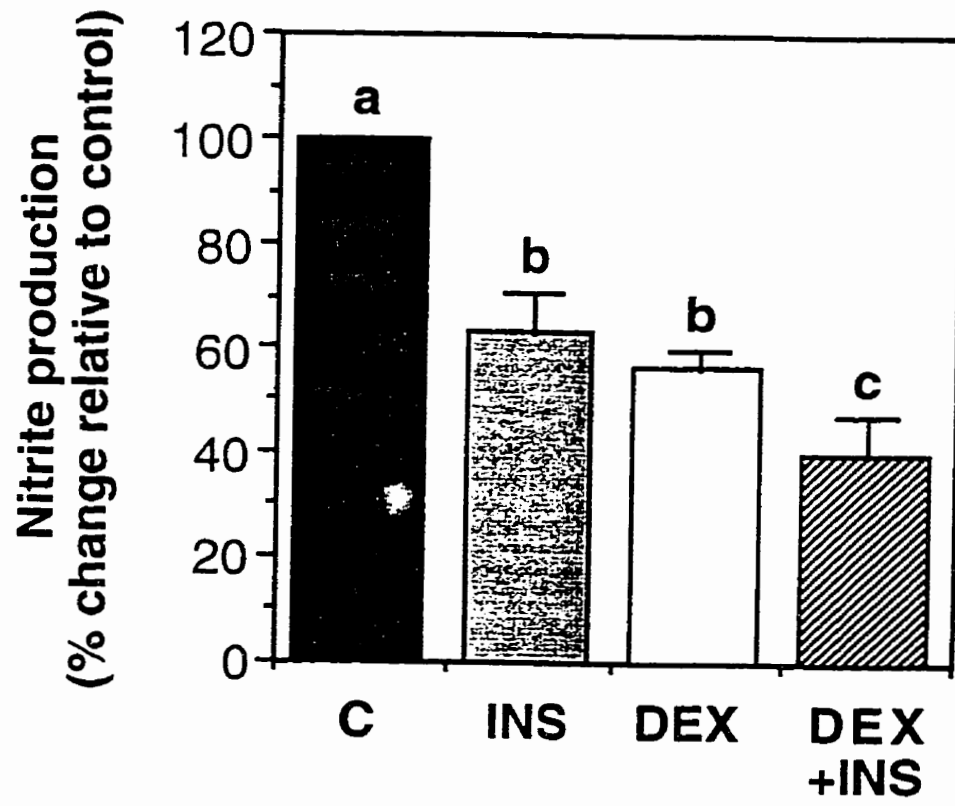


Figure 2

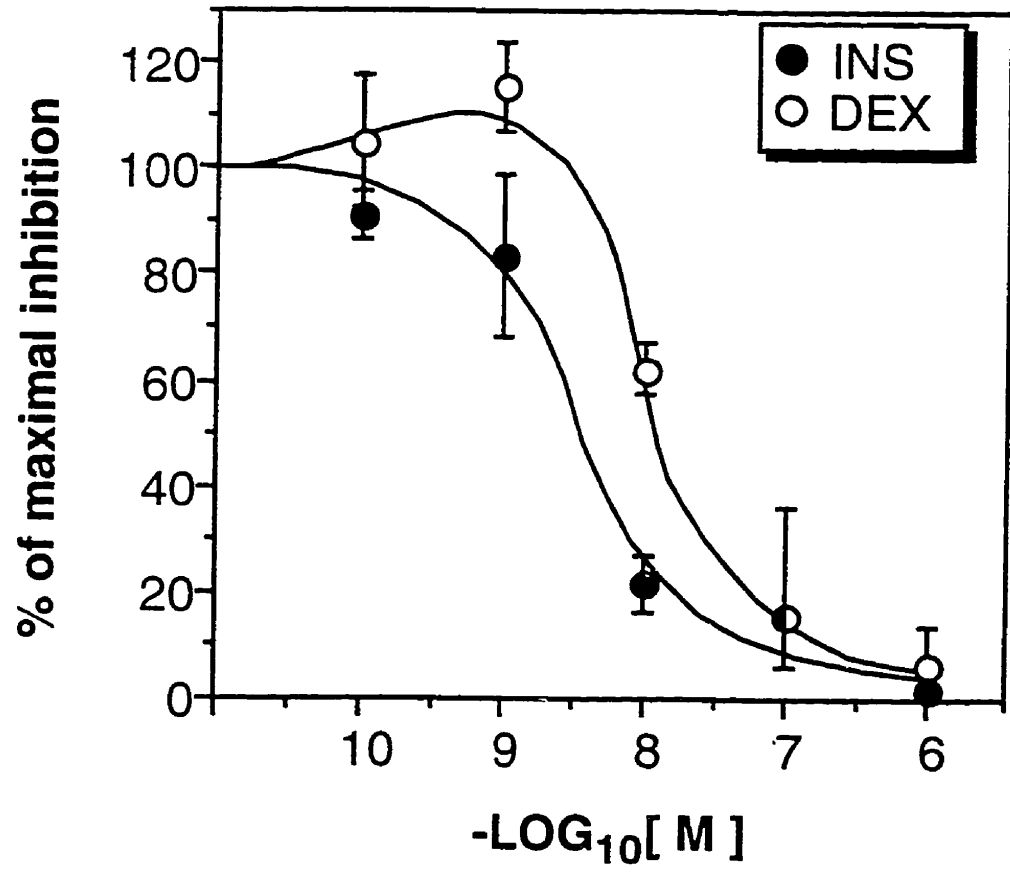


Figure 3

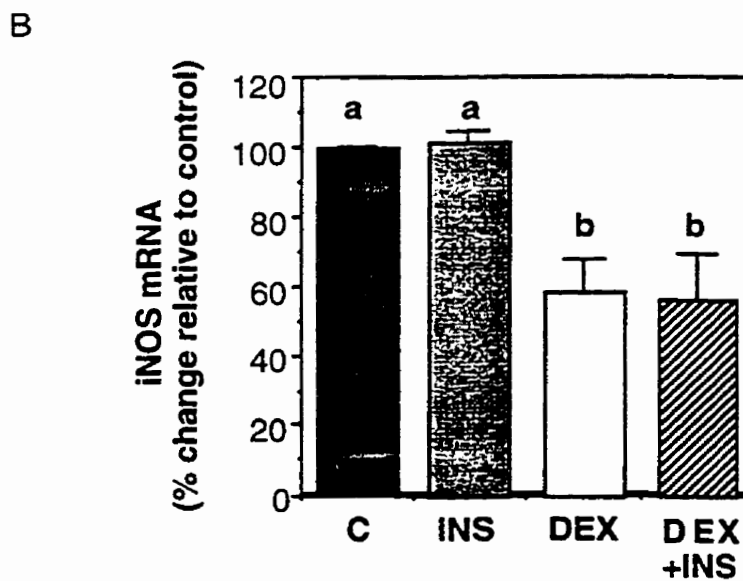
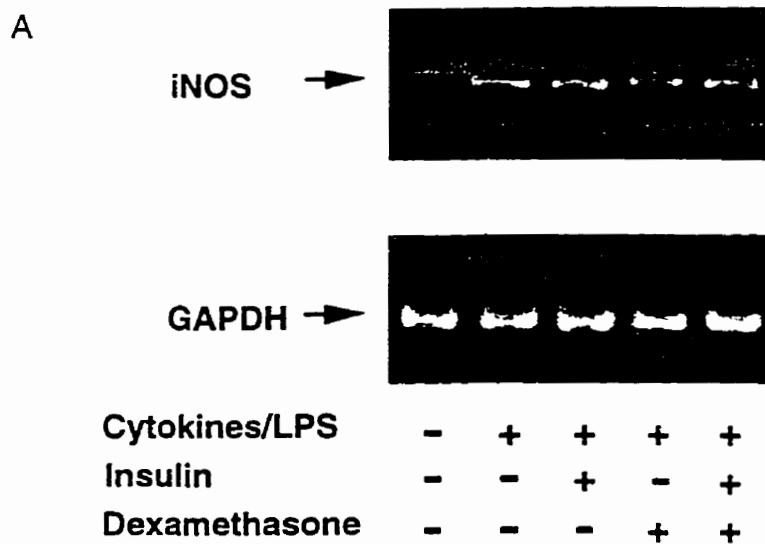


Figure 4

CONCLUSION

L'obésité est associée à un état de résistance à l'insuline et à une élévation des niveaux de cytokines comme le TNF- α . Plusieurs études ont démontré un rôle important du TNF- α dans le développement de la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique et dans le tissu adipeux. Certains mécanismes ont été proposés dans le but d'expliquer les effets du TNF- α dans les cellules adipeuses. Toutefois, ces mécanismes ne semblent pas impliqués dans la médiation des effets du TNF- α dans les cellules musculaires.

La première partie de cette étude visait à déterminer le mécanisme par lequel les cytokines causent la résistance à l'insuline dans le muscle squelettique. Notre hypothèse consistait à vérifier l'implication du NO dans la médiation des effets des cytokines. Le traitement au TNF- α , à l'INF- γ et à la LPS induit l'expression de iNOS. Cette induction a été vérifiée par l'augmentation des concentrations de nitrite et par l'augmentation des niveaux de l'ARNm et de la protéine iNOS. L'implication du NO dans le développement de la résistance à l'insuline a été démontrée par des études de transport de glucose. Nos résultats indiquent que les cytokines et la LPS diminuent la sensibilité et l'effet maximal de l'insuline sur le transport de glucose. Ces effets sont causés par la production de NO puisque le traitement des cellules en présence de L-NAME a bloqué la production de nitrite et a permis de rétablir l'effet stimulateur de l'insuline. Nos résultats démontrent également que l'augmentation du transport de glucose de base est causée par une surexpression de GLUT1 puisque le traitement au L-NAME empêche la surexpression de ce transporteur et prévient l'augmentation du transport de glucose de base.

Lors d'études préliminaires, les mécanismes d'inhibition de l'action de l'insuline par le NO ont également été étudiés. Il est possible que les effets inhibiteurs du NO proviennent d'une altération du système de signalisation de l'insuline. D'ailleurs, des études antérieures effectuées chez les adipocytes ont montré que les cytokines diminuent la phosphorylation sur les résidus tyrosine de IRS-1 et du récepteur à l'insuline (86, 88, 196). L'effet des cytokines et de la LPS sur la phosphorylation de ces protéines a également été vérifié dans les cellules musculaires L6 (figure 5). Nos résultats préliminaires indiquent que l'activation de iNOS par les cytokines et la LPS n'affecte pas les niveaux de phosphorylation de

ces deux protéines. Dans des études ultérieures, il sera intéressant de vérifier l'effet des cytokines et de la LPS sur IRS-2 ainsi que sur les molécules de signalisation de l'insuline situées en aval des protéines IRS tels que la PI 3-kinase et la protéine PKB/Akt.

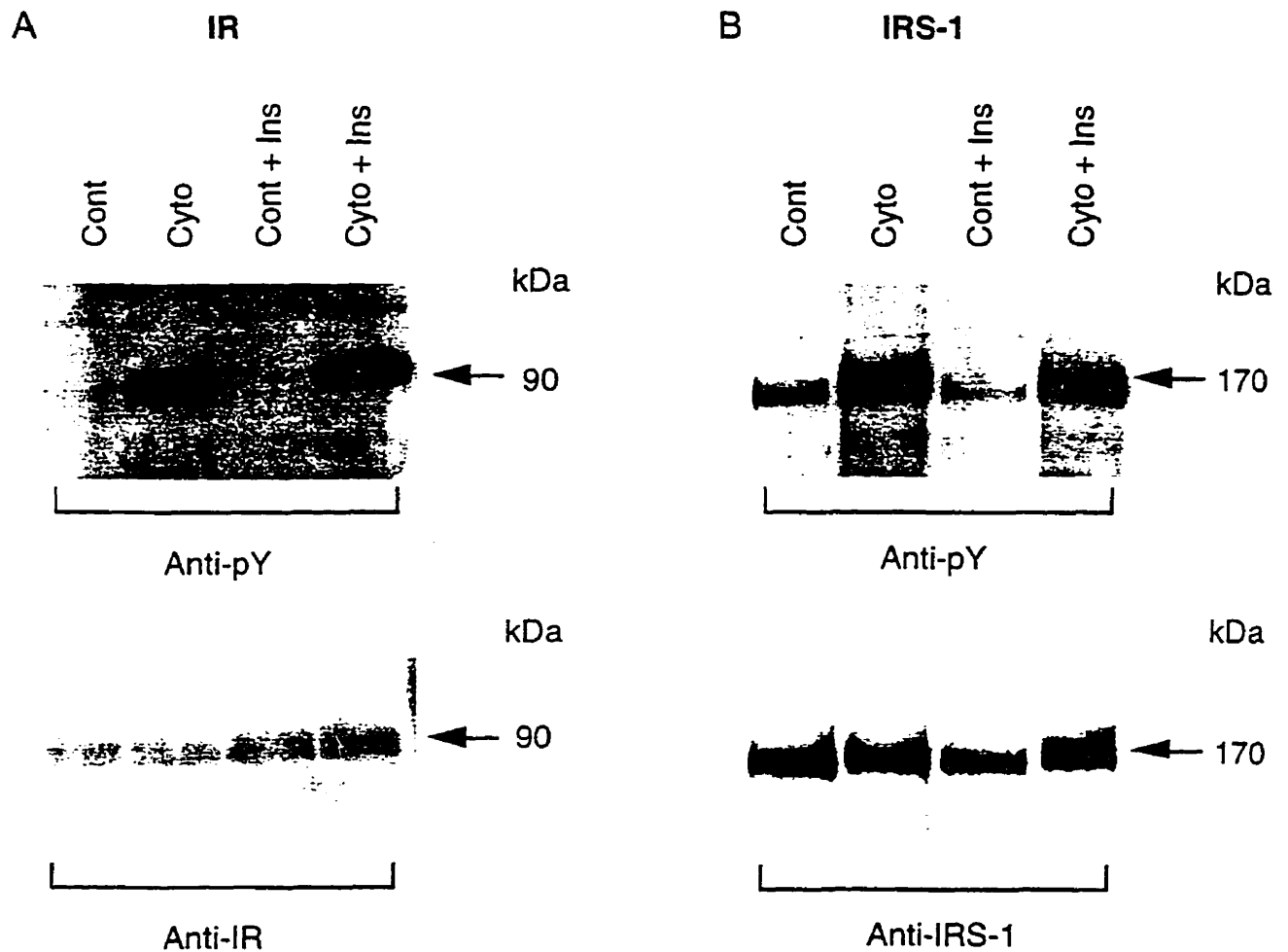


Figure 5 : Gels représentatifs des effets des cytokines et de la LPS sur la phosphorylation du récepteur à l'insuline (IR) (A) et de IRS-1 (B) dans les myocytes L6. Suite à un traitement de 24 h. en présence de cytokines/LPS, les cellules ont été lysées et les protéines IRS-1 et IR ont été immunoprécipitées à l'aide d'anticorps spécifiques. Les niveaux de protéines ainsi que leur degré de phosphorylation ont ensuite été mesurés par immunobuvardage avec les anticorps dirigés contre ces molécules ou contre les phosphotyrosines.

Nos résultats démontrent aussi que les cytokines et la LPS causent une diminution de l'expression de GLUT4 et que cet effet est associé à une réduction de l'effet de l'insuline sur le transport de glucose. Cependant, le traitement au L-NAME a permis de rétablir l'action de l'insuline *sans toutefois* rétablir à la normale les niveaux d'expression de GLUT4. Ces résultats suggèrent que les cytokines et la LPS diminuent la translocation de GLUT4 à la membrane plasmique puisque que le L-NAME permet de ramener l'action de l'insuline malgré les niveaux diminués de protéines GLUT4. Des études de fractionnement membranaire seront toutefois nécessaires afin de vérifier l'effet des cytokines sur la translocation de GLUT4. Par cette technique, nous pourrions déterminer la concentration de transporteur de glucose dans les membranes plasmiques et les membranes internes à partir desquelles GLUT4 est recruté.

Les résultats de la deuxième étude démontrent que l'insuline inhibe la production de NO par un mécanisme post-transcriptionnel. Plusieurs études devront toutefois être effectuées afin de déterminer si le taux de dégradation de la protéine, l'efficacité de la transcription de l'ARNm ou l'activité de iNOS est modulé par l'insuline. D'autres mécanismes tels qu'une diminution de la synthèse de BH₄ ou du transport de L-arginine, pourraient également contribuer à expliquer l'effet inhibiteur de l'insuline sur l'activité de iNOS (173).

Le rôle du BH₄ est encore peu connu toutefois il a été démontré que ce co-facteur est essentiel à l'activité maximale des trois isoformes des NOS (161, 164). L'enzyme responsable de la synthèse de BH₄ est la GTP-cyclohydrolase I. Il a été démontré que les cytokines stimulent l'activité de cette enzyme dans plusieurs types de cellules (7, 200). Les résultats d'une récente étude suggèrent que le dexaméthasone inhibe la production de NO en diminuant la synthèse de BH₄. En effet, le dexaméthasone diminue l'expression de la GTP-cyclohydrolase I en réduisant la stabilité de l'ARNm de cet enzyme. Ces effets peuvent toutefois être renversés par l'addition de BH₄ exogène ce qui démontre l'importance de ce co-facteur au niveau de la régulation de l'activité de iNOS. Des études sont nécessaires afin de déterminer si l'insuline module l'activité de iNOS en diminuant la synthèse de BH₄.

Le transport de L-arginine constitue également un autre élément important dans la régulation de la production de NO étant donné que la L-arginine est utilisée

comme substrat dans la réaction de formation du NO. La L-arginine extracellulaire traverse la membrane plasmique à l'aide du système de transport des acides aminés cationiques appelé le système γ^+ (204). Ce système de transport est caractérisé par la grande affinité des transporteurs pour les acides aminés cationiques situés à l'extérieur de la membrane plasmique (204). Trois transporteurs ont été clonés chez la souris soit les transporteurs des acides aminés cationiques-1 et 2B (CAT-1 et CAT-2B) (106, 198). Le transporteur CAT-1 est distribué dans une grande variété de tissus (106) tandis que CAT-2B a été identifié seulement dans les macrophages et dans les lymphocytes (39, 198). Le troisième membre de cette famille, le transporteur CAT-2A, a été identifié dans les hépatocytes (38). Ce transporteur se distingue toutefois des autres membres puisqu'il possède une faible affinité pour les acides aminés cationiques. Il a été démontré que les cytokines stimulent le transport de L-arginine et que cette stimulation provient d'une augmentation de l'expression des trois transporteurs de L-arginine (173). Le traitement au dexaméthasone cause une réduction significative du transport de L-arginine ainsi que des niveaux d'expression des différents transporteurs. Plusieurs études sont donc requises afin de vérifier si l'insuline module l'activité de iNOS en diminuant le transport de L-arginine et l'expression des différents transporteurs.

En guise de conclusion, ces études ont permis de démontrer que l'augmentation du transport de glucose de base, induite par les cytokines, est causée par un mécanisme dépendant du NO. Cependant, le mécanisme par lequel les cytokines causent une diminution de l'action de l'insuline reste à être identifié. Nous avons également démontré le rôle de l'insuline dans la modulation de l'activité de iNOS. Les résultats de ces deux études permettent de mieux comprendre les rôles et les mécanismes de régulation de iNOS. Ces études nous ont permis de mettre en évidence le rôle de iNOS dans la modulation du transport du glucose dans le muscle squelettique.

RÉFÉRENCES

1. Accili, D., C. Frapier, and L. Mosthaf. A mutation in the insulin receptor gene that impairs transport of the receptor to the plasma membrane and causes insulin-resistant diabetes. *EMBO J* 8: 2509-2517, 1989.
2. Aisaka, K., S. S. Gross, O. W. Griffith, and R. Levi. Ng-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: Does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem Biophys Res Commun* 160: 881-886, 1989.
3. Aono, K., K. Isobe, K. Kiuchi, Z. Fan, M. Ito, A. Takeuchi, M. Miyachi, I. Nakashima, and Y. Nimura. In vitro and in vivo expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: Involvement of other cytokines. *J Cell Biochem* 65: 349-358, 1997.
4. Arnush, M., M. R. Heitmeier, A. L. Scarim, M. H. Marino, P. T. Manning, and J. A. Corbett. IL-1 produced and released endogenously within human islets inhibits beta cell function. *J Clin Invest* 102: 516-26, 1998.
5. Arnush, M., A. L. Scarim, M. R. Heitmeier, C. B. Kelly, and J. A. Corbett. Potential role of resident islet macrophage activation in the initiation of autoimmune diabetes. *J Immunol* 160: 2684-2691, 1998.
6. Bai, Y., S. Zhang, K. S. Kim, J. K. Lee, and K. H. Kim. Obese gene expression alters the ability of 30A5 preadipocytes to respond to lipogenic hormones. *J Biol Chem* 271: 13939-13942, 1996.
7. Balligand, J. L., D. Ungureanulongois, W. W. Simmons, D. Pimental, T. A. Malinski, M. Kapturczak, Z. Taha, C. J. Lowenstein, A. J. Davidoff, R. A. Kelly, T. W. Smith, and T. Michel. Cytokine-inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes - characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J Biol Chem* 269: 27580-27588, 1994.

8. Balon, T. W., and J. L. Nadler. Evidence that nitric oxide increases glucose transport in skeletal muscle. *J Appl Physiol* 82: 359-363, 1997.
9. Balon, T. W., and J. L. Nadler. Nitric oxide release is present from incubated skeletal muscle preparations. *J Appl Physiol* 77: 2519-2521, 1994.
10. Bancroft, G. J., R. D. Schreiber, and E. R. Unanue. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 124: 5-24, 1991.
11. Baron, A. D., P. Brechtel, and S. V. Edlman. Rates and tissue sites of non-insulin and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol* 255: E769-E774, 1988.
12. Beaty, C. D., T. L. Franklin, Y. Uehara, and C. B. Wilson. Lipopolysaccharide-induced cytokine production in human monocytes: Role of tyrosine phosphorylation in transmembrane signal transduction. *Eur J Immunol* 24: 1278-1284, 1994.
13. Beckman, J. S., and W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437, 1996.
14. Begum, N., and L. Ragolia. Effect of tumor necrosis factor- α on insulin action in cultured rat skeletal muscle cells. *Endocrinology* 137: 2441-2446, 1996.
15. Belka, C. Tumor necrosis factor (TNF)- α activates c-raf-1 kinase via the p55 TNF receptor engaging neutral sphingomyelinase. *EMBO J* 14: 1156-1165, 1995.
16. Bell, G. I., T. Kayano, J. B. Buse, C. F. Burant, J. Takeda, D. Lin, H. Fukumoto, and S. Seino. Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 13: 198-208, 1990.

17. Bennet, P. H. Epidemiology of diabetes mellitus. *Diabetes Mellitus* : 357-377, 1990.
18. Berthoud, H. R., and B. Jeanrenaud. Acute hyperinsulinemia and its reversal by vagotomy after lesions of the ventromedial hypothalamus in anesthetized rats. *Endocrinology* 105: 146-51, 1979.
19. Berti, L., M. Kellerer, E. Capp, and H. U. Haring. Leptin stimulates glucose transport and glycogen synthesis in C2C12 myotubes: evidence for a P13-kinase mediated effect. *Diabetologia* 40: 606-9, 1997.
20. Bierman, E. L., J. D. Bagdade, and D. Porte, Jr. Obesity and diabetes: the odd couple. *Am J Clin Nutr* 21: 1434-7, 1968.
21. Boden, G., and X. Chen. Effects of fat on glucose uptake and utilization in patients with non-insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Invest* 96: 1261-1268, 1995.
22. Boden, G., and F. Jadali. Effects of lipid on basal carbohydrate metabolism in normal men. *Diabetes* 40: 686-692, 1991.
23. Boehm, U., T. Klamp, M. Groot, and J. C. Howard. Cellular response to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol* 15: 749-795, 1997.
24. Bray, G. A. Complications of obesity. *Ann Intern Med* 103: 1052-62, 1985.
25. Bredt, D. S., and S. H. Snyder. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci* 86: 9030-9033, 1989.
26. Brenman, J. E., D. S. Chao, H. H. Xia, K. Aldape, and D. S. Bredt. Nitric-oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal-muscle sarcolemma in duchenne muscular-dystrophy. *Cell* 82: 743-752, 1995.

27. Burgering, M., and P. Coffers. Protein kinase N (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376: 599-602, 1995.
28. Caro, J. F., J. W. Kolaczynski, and M. R. Nyce. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: A possible mechanism for leptin resistance. *Lancet* 348: 159-161, 1996.
29. Ceresa, B. P., A. W. Kao, S. R. Santeler, and J. E. Pessin. Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 18: 3862-70, 1998.
30. Chanson, P., P. Ferré, and J. Timsit. Physiopathologie du diabète non insulino-dépendant. *médecine/sciences* 7: 336-345, 1991.
31. Chao, D. S., F. Silvagno, H. Xia, T. L. Cornwell, T. M. Lincoln, and D. S. Bredt. Nitric oxide synthase and cyclic GMP-dependent protein kinase concentrated at the neuromuscular endplate. *Neuroscience* 76: 665-72, 1997.
32. Charles, I. G., R. M. J. Palmer, M. S. Hickery, M. T. Bayliss, A. P. Chubb, V. S. Hall, D. W. Moss, and S. Moncada. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11419-11423, 1993.
33. Cheatham, B., C. J. Vlahos, L. Cheatham, L. Wang, J. Blenis, and C. R. Kahn. Phosphatidylinositol 3-kinase activation is required for insulin stimulation of pp70 s6 kinase, DNA synthesis, and glucose transporter translocation. *Mol Cell Biol* 14: 4902-4911, 1994.
34. Chen, Y. L., and E. J. Messina. Dilatation of isolated skeletal-muscle arterioles by insulin is endothelium-dependent and nitric-oxide mediated. *Am J Physiol* 39: H2120-H2124, 1996.

35. Cho, H. J., Q. W. Xie, J. Calaycay, R. A. Mumford, and K. M. Swiderek. Calmoduline as a tightly bound subunit of calcium-, calmoduline-independent nitric oxide synthase. *J Exp Med* 176: 599-604, 1992.
36. Christopherson, K. S., and D. S. Bredt. Nitric oxide in excitable tissues: Physiological roles and disease. *J Clin Invest* 100: 2424-2429, 1997.
37. Clement, K., C. Vaisse, N. Lahlou, S. Cabrol, V. Pelloux, D. Cassuto, M. Gourmelen, C. Dina, J. Chambaz, J. M. Lacorte, A. Basdevant, P. Bougneres, Y. Lebouc, P. Froguel, and B. Guy-Grand. A mutation in the human leptin receptor gene causes obesity and pituitary dysfunction [see comments]. *Nature* 392: 398-401, 1998.
38. Closs, E. I., L. M. Albritton, J. W. Kim, and J. M. Cunningham. Identification of a low affinity, high capacity transporter of cationic amino acids in mouse liver. *J Biol Chem* 268: 7538-44, 1993.
39. Closs, E. I., C. R. Lyons, C. Kelly, and J. M. Cunningham. Characterization of the third member of the MCAT family of cationic amino acid transporters. Identification of a domain that determines the transport properties of the MCAT proteins. *J Biol Chem* 268: 20796-20800, 1991.
40. Cohen, B., D. Novick, and M. Rubinstein. Modulation of insulin activities by leptin. *Science* 274: 1185-1188, 1996.
41. Considine, R. V., E. L. Considine, and C. J. Williams. Evidence against either a premature stop codon or the absence of obese gene mRNA in human obesity. *J Clin Invest* 95: 2986-2988, 1995.
42. Considine, R. V., E. L. Considine, and C. J. Williams. Mutation screening and identification of a sequence variation in the human OB gene coding region. *Biochem Biophys Res Comm* 220: 735-739, 1996.

43. Corbett, J. A., and M. L. McDaniel. Does nitric oxide mediate autoimmune destruction of beta-cells? Possible therapeutic interventions in IDDM. *Diabetes* 41: 897, 1992.
44. Corbett, J. A., and M. L. McDaniel. The Use of Aminoguanidine, a Selective iNOS Inhibitor, to Evaluate the Role of Nitric Oxide in the Development of Autoimmune Diabetes. *Methods* 10: 21-30, 1996.
45. Cornelius, P., M. D. Lee, M. Marlowe, and P. H. Pekala. Monokine regulation of glucose transporter mRNA in L6 myotubes. *Biochem Biophys Res Comm* 165: 429-436, 1986.
46. Crouse, J. A., G. E. Elliott, T. L. Burgess, L. Chiu, L. Bennett, J. Moore, M. Nicolson, and R. E. Pacifici. Altered cell surface expression and signaling of leptin receptors containing the fatty mutation. *J Biol Chem* 273: 18365-73, 1998.
47. Cushman, S. W., and L. J. Wardzala. Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 255: 4748-4762, 1980.
48. Czech, M. P., D. K. Richardson, S. G. Becker, C. G. Walters, W. Gitomer, and J. Heinrich. Insulin response in skeletal muscle and fat cells of the genetically obese Zucker rat. *Metabolism* 27: 1967-81, 1978.
49. De Meyts, P., J. L. Gu, R. M. Shymko, B. E. Kaplan, G. I. Bell, and J. Whittaker. Identification of a ligand-binding region of the human insulin receptor encoded by the second exon of the gene. *Molecular Endocrinology* 4: 409-416, 1990.
50. De Vera, M. E., B. S. Taylor, Q. Wang, R. A. Shapiro, T. R. Billiar, and D. A. Geller. Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I-kBa and inhibiting NF-kB. *Am J Physiol* 97: G1290-G1296, 1997.

51. DeFronzo, R. A., E. Ferrannini, and V. Koivisto. New concepts in the pathogenesis and treatment of noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Med* 74: 52-81, 1983.
52. Després, J.-P., and A. Marette. Relation of components of insulin resistance syndrome to coronary disease risk. *Curr Opin Lipidol* 5: 274-289, 1994.
53. Dimitriadis, G., B. Leighton, M. Parry-Billings, S. Sasson, M. Young, U. Krause, S. Bevan, T. Piva, G. Wegener, and E. A. Newsholme. Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem J* 321: 707-12, 1997.
54. Dong, Z., C. A. O'Brian, and I. J. Fidler. Activation of tumoricidal properties in macrophages by lipopolysaccharide requires protein-tyrosine kinase activity. *J Leukoc Biol* 53: 53-60, 1993.
55. Etgen, G. J., Jr., D. A. Fryburg, and E. M. Gibbs. Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes* 46: 1915-9, 1997.
56. Exton, J. H. Regulation of gluconeogenesis by glucocorticoids. *Monogr Endocrinol* 12: 535-46, 1979.
57. Feelisch, M., and E. A. Noack. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol* 139: 19-30, 1987.
58. Fountoulakis, M., M. Zulauf, A. Lustig, and G. Garotta. Stoichiometry of interaction between interferon-gamma and its receptor. *Eur J Biochem* 209: 781-787, 1992.
59. Franke, T. F., S.-I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morisson, D. Kaplan, and P. N. Tsichlis. The protein kinase encoded by the AKT proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81: 727-736, 1995.

60. Frederich, R. C., A. Hamann, S. Anderson, B. Lollmann, B. B. Lowell, and J. S. Flier. Leptin levels reflect body lipid content in mice: Evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nature Medicine* 1: 1311-1314, 1995.
61. Freeman, B. Free radical chemistry of nitric oxide. *Chest* 105: 79S-84S, 1994.
62. Frey, E. A., D. S. Miller, T. G. Jahr, A. Sundan, V. Bazil, T. Espevik, B. B. Finlay, and S. D. Wright. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176: 1665-1671, 1992.
63. Fujioka, S., Y. Matsuzawa, K. Tokunaga, and S. Tarui. Contribution of intra-abdominal fat accumulation to the impairment of glucose and lipid metabolism in human obesity. *Metabolism* 36: 54-9, 1987.
64. Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376, 1980.
65. Furnsinn, C., B. Brunmair, R. Furtmuller, M. Roden, R. Englisch, and W. Waldhausl. Failure of leptin to affect basal and insulin-stimulated glucose metabolism of rat skeletal muscle in vitro. *Diabetologia* 41: 524-9, 1998.
66. Furnsinn, C., S. Neschen, O. Wagner, M. Roden, M. Bisschop, and W. Waldhausl. Acute and chronic exposure to tumor necrosis factor-alpha fails to affect insulin-stimulated glucose metabolism of isolated rat soleus muscle. *Endocrinology* 138: 2674-2679, 1997.
67. Gallay, P., D. Heumann, D. Le Roy, C. Baras, and M. P. Glauser. Lipopolysaccharide-binding protein as a major plasma protein responsible for endotoxemic shock. *Proc Natl Acad Sci* 90: 9935-9938, 1993.

68. Garthwaite, J., S. L. Charles, and R. Chess-Williams. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336: 385-388, 1988.
69. Garthwaite, J., G. Garthwaite, R. M. J. Palmer, and S. Moncada. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur J Pharmacol* 172: 413-416, 1989.
70. Geller, D. A., C. J. Lowenstein, R. A. Shapiro, A. K. Nussler, M. Di Silvio, S. C. Wang, D. K. Nakayama, R. L. Simmons, S. H. Snyder, and T. R. Billiar. Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 3491-3495, 1993.
71. Girard, J. Is leptin the link between obesity and insulin resistance. *Diabetes & Metabolism* 23: 16-24, 1997.
72. Greenlund, A. C., C. A. Wenner, and R. D. Schreiber. Analysis of IFN-gamma receptor binding to IFN-gamma. *J Interferon Res* 12: 103, 1992.
73. Griffith, O. W., and D. J. Stuehr. Nitric oxide synthases: Properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 57: 707-736, 1995.
74. Griscavage, J. M., S. Wilk, and L. J. Ignarro. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kB. *Proc Natl Acad Sci* 93: 3308-3312, 1996.
75. Gross, S. S., and R. Levi. Tetrahydrobiopterin synthesis: An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 257: 25722-25729, 1992.
76. Gross, S. S., and M. S. Wolin. Nitric oxide: Pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57: 737-769, 1995.

77. Grube, B. J., C. G. Cochrane, R. D. Ye, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. Cytokine and dexamethasone regulation of lipopolysaccharide binding protein (LBP) expression in human hepatoma. *J Biol Chem* 269: 8477-8482, 1994.
78. Gruetter, C. A., D. Y. Gruetter, J. E. Lyon, P. J. Kadowitz, and L. J. Ignarro. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 219: 181-186, 1981.
79. Halaas, J. L., K. S. Gajiwala, and M. Maffei. Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269: 543-546, 1995.
80. Han, X. X., and A. Bonen. Epinephrine translocates GLUT-4 but inhibits insulin-stimulated glucose transport in rat muscle. *Am J Physiol* 274: E700-7, 1998.
81. Harrison, D. G. Endothelial control of vasomotion and nitric oxide production. *Cardiol Clin* 14: 1-15, 1996.
82. Hevel, J. M., K. A. White, and M. A. Marletta. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266: 22789-22791, 1991.
83. Hirano, T., K. Nakajima, and M. Hibi. Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine Growth Factor Rev* 8: 241-52, 1997.
84. Holman, G. D., and M. Kasuga. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia* 40: 991-1003, 1997.
85. Hotamisligil, G. S., P. Arner, J. F. Caro, R. L. Atkinson, and B. M. Spiegelman. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95: 2409-2415, 1995.

86. Hotamisligil, G. S., A. Budavari, D. Murray, and B. M. Spiegelman. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity-diabetes. Central role of tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 94: 1543-9, 1994.
87. Hotamisligil, G. S., R. S. Johnson, R. J. Distel, R. Ellis, V. E. Papaioannou, and B. M. Spiegelman. Uncoupling of obesity from insulin resistance through a targeted mutation in aP2, the adipocyte fatty acid binding protein. *Science* 274: 1377-9, 1996.
88. Hotamisligil, G. S., D. L. Murray, L. N. Choy, and B. M. Spiegelman. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 4854-4858, 1994.
89. Hotamisligil, G. S., and B. M. Spiegelman. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259: 87-91, 1993.
90. Hotamisligil, G. S., and B. M. Spiegelman. Tumor necrosis factor alpha: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 43: 1271-1278, 1994.
91. Huang, S., W. Hendriks, A. Althage, S. Hemmi, H. Bluethmann, R. Kamijo, J. Vilcek, R. M. Zinkernagel, and M. Aguet. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* 259: 1742-1745, 1993.
92. Ihle, J. N. STATs: signal transducers and activators of transcription. *Cell* 84: 331-334, 1996.
93. Ischiropoulos, H., L. Zhu, and J. S. Beckman. Peroxynitrite formation from activated rat alveolar macrophages. *Arch Biochem Biophys* 298: 446-451, 1992.
94. James, D. E., R. Brown, J. Navarro, and P. F. Pilch. Insulin-regulatable tissues express a unique insulin-sensitive glucose transport protein. *Nature* 333: 183-5, 1988.

95. James, D. E., and R. C. Piper. Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. *J Cell Biol* 126: 1123-1126, 1994.
96. James, D. E., M. Strube, and M. Mueckler. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338: 83-7, 1989.
97. Janssens, S. P., A. Shimouchi, T. Quertermous, D. B. Bloch, and K. D. Bloch. Cloning and expression of cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 14519-14522, 1992.
98. Kadowaki, T., C. L. Bevens, and A. Cama. Two mutant alleles of the insulin receptor gene in a patient with extreme insulin resistance. *Science* 240: 787-790, 1988.
99. Kadowaki, T., H. Kadowak, and M. M. Rechler. Five mutant alleles of the insulin receptor gene in patients with genetic forms of insulin resistance. *J Clin Invest* 86: 254-264, 1990.
100. Kaestner, K. H., R. J. Christy, J. C. McLenithan, L. T. Braiterman, P. Cornelius, P. H. Pekala, and M. D. Lane. Sequence, tissue distribution, and differential expression of mRNA for a putative insulin-responsive glucose transporter in mouse 3T3-L1 adipocytes [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 Jul;86(13):4937]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3150-4, 1989.
101. Kahn, C. R. Diabetes - causes of insulin resistance. *Nature* 373: 384-385, 1995.
102. Kaliman, P., F. Vinalis, X. Testar, M. Palacin, and A. Zorzano. Disruption of GLUT1 glucose carrier trafficking in I6E9 and So18 myoblasts by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor wortmannin. *Biochem J* 312: 471-477, 1995.

103. Kapur, S., S. Bédard, C. Côté, and A. Marette. Expression of nitric oxide synthase in skeletal muscle: a novel role for nitric oxide as a modulator of insulin action. *Diabetes* 45 (Suppl. 2): p. 157A, 1996.
104. Kayano, T., H. Fukumoto, R. L. Eddy, Y. S. Fan, M. G. Byers, T. B. Shows, and G. I. Bell. Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. Sequence and gene localization of a protein expressed in fetal skeletal muscle and other tissues. *J Biol Chem* 263: 15245-8, 1988.
105. Kilbourn, R. G., and P. Belloni. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon gamma in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1 or endotoxin. *J Natl Canc Inst* 82: 772-776, 1990.
106. Kim, J. W., E. I. Closs, L. M. Albritton, and J. M. Cunningham. Transport of cationic amino acids by the mouse ecotropic retrovirus receptor. *Nature* 352: 725-728, 1991.
107. Knight, K. R., B. Zhang, W. A. Morrison, and A. G. Stewart. Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. *Eur J Pharmacol* 332: 273-8, 1997.
108. Knowles, R. G., M. Palacios, R. M. J. Palmer, and S. Moncada. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci* 89: 5159-5162, 1989.
109. Kobzik, L., M. B. Reid, D. S. Bredt, and J. S. Stamler. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 372: 546-548, 1994.
110. Kobzik, L., B. Stringer, J. L. Balligand, M. B. Reid, and J. S. Stamler. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers - mitochondrial relationships. *Biochem Biophys Res Com* 211: 375-381, 1995.

111. Kohn, A. D., K. Kovacina, and R. A. Roth. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. *EMBO J* 14: 4288-4295, 1995.
112. Kolb, H., and V. Kolb-Bachofen. Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol Today* 13: 157, 1992.
113. Kolesnick, R., and D. W. Golde. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *Cell* 77: 325-328, 1994.
114. Lamas, S., P. A. Marsden, G. K. Li, P. Tempst, and T. Michel. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6348-6352, 1992.
115. Lander, H. M., P. Sehajpal, D. M. Levine, and A. Novogrodsky. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. *J Immunol* 150: 1509-1516, 1993.
116. Lavan, B. E., V. R. Fantin, E. T. Chang, W. S. Lane, S. R. Keller, and G. E. Lienhard. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 272: 21403-7, 1997.
117. Lee, J. D., K. Kato, P. S. Tobias, T. N. Kirkland, and R. J. Ulevitch. Transfection of CD14 into 70Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J Exp Med* 175: 1697-1705, 1992.
118. Lee, M. D., A. Zentella, P. H. Pekala, and A. Cerami. Effects of endotoxin-induced monokines on glucose metabolism in the muscle cell line L6. *proc Natl Acad Sci USA* 84: 2590-2594, 1987.
119. LeMarchand-Brustel, Y., N. Gautier, M. Cormont, and E. VanObberghen. Wortmannin inhibits the action of insulin but not that of okadaic acid in skeletal muscle: Comparison with fat cells. *Endocrinology* 136: 3564-3570, 1995.

120. Ling, P. R., B. R. Bistran, B. Mendez, and N. W. Istfan. Effects of systemic infusions of endotoxin, tumor necrosis factor, and interleukin-1 on glucose metabolism in the rat - relationship to endogenous glucose production and peripheral tissue glucose uptake. *Metabolism* 43: 279-284, 1994.
121. Lipton, S. A., Y.-B. Choi, Z.-H. Pan, S. Z. Lei, H.-S. V. Chen, N. J. Sucher, J. Loscalzo, D. J. Singel, and J. S. Stamler. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitro-compounds. *Nature* 364: 626-632, 1993.
122. Lipton, S. A., D. J. Singel, and J. S. Stamler. Neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and redox congeners. *Ann N Y Acad Sci* 738: 382-387, 1994.
123. Liu, S., I. M. Adcock, R. W. Old, P. J. Barnes, and T. W. Evans. Lipopolysaccharide treatment *in vivo* induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Comm* 196: 1208-1213, 1993.
124. Liu, S., I. M. Adcock, R. W. Old, P. J. Barnes, and T. W. Evans. Lipopolysaccharide treatment *in vivo* induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA⁺. *Biochem Biophys Res Comm* 196: 1208-1213, 1993.
125. Long, S. D., and P. H. Pekala. Lipid mediators of insulin resistance: Ceramide signalling down-regulates GLUT4 gene transcription in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem J* 319: 179-184, 1996.
126. Lozano, J., E. Berra, M. M. Municio, M. M. Diaz, I. Dominguez, L. Sanz, and J. Moscat. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem* 269: 19200-19202, 1994.

127. Lyons, C. R., G. J. Orloff, and J. M. Cunningham. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J Biol Chem* 267: 6370-6374, 1992.
128. Maffei, M., J. Halaas, and E. Ravussin. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Medicine* 1: 1155-1161, 1995.
129. Mandrup-Poulsen, T. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of IDDM. *Diabetologia* 39: 1005-1029, 1996.
130. McGarry, J. D. Appetite control: Does leptin lighten the problem of obesity? *Current Biology* 5: 1342-1344, 1995.
131. Moller, D. E., and J. S. Flier. Insulin resistance-mechanisms, syndromes and implications. *The New England Journal of Medicine* 325: 938-948, 1991.
132. Muller, G., J. Ertl, M. Gerl, and G. Preibisch. Leptin impairs metabolic actions of insulin in isolated rat adipocytes. *J Biol Chem* 272: 10585-93, 1997.
133. Murrant, C. L., and J. K. Barclay. Endothelial-cell products alter mammalian skeletal-muscle function in-vitro. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 736-741, 1995.
134. Murrant, C. L., N. E. Woodley, and J. K. Barclay. Effect of nitroprusside and endothelium-derived products on slow-twitch skeletal muscle function in vitro. *Can J Physiol Pharmacol* 72: 1089-1093, 1994.
135. Nakane, M., H. H. H. W. Schmidt, J. S. Pollock, F. U., and F. Murad. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 316: 175-180, 1993.
136. Neshler, R., I. E. Karl, and D. M. Kipnis. Dissociation of effects of insulin and contraction on glucose transport in rat epitrochlearis muscle. *Am J Physiol* 249: C226-32, 1985.

137. Nussler, A., J. C. Drapier, and L. Renia. L-Arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin-6 stimulation. *Eur J Immunol* 21: 227-230, 1991.
138. Ofei, F., S. Hurel, J. Newkirk, M. Sopwith, and R. Taylor. Effects of an engineered human anti-TNF-alpha antibody (CDP571) on insulin sensitivity and glycemic control in patients with NIDDM. *Diabetes* 45: 881-5, 1996.
139. Oka, Y., T. Asano, Y. Shibasaki, M. Kasuga, Y. Kanazawa, and F. Takaku. Studies with antipeptide antibody suggest the presence of at least two types of glucose transporter in rat brain and adipocyte. *J Biol Chem* 263: 13432-9, 1988.
140. Okada, T., Y. Kawano, T. Sakakibara, O. Hazeki, and M. Ui. Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolysis in rat adipocytes - studies with a selective inhibitor wortmannin. *J Biol Chem* 269: 3568-3573, 1994.
141. Okuda, S., F. Kanda, Y. Kawahara, and K. Chihara. Regulation of inducible nitric oxide synthase expression in L6 rat skeletal muscle cells. *Am J Physiol* 272: C35-40, 1997.
142. Olefsky, J. M., and J. M. Molina. Insulin resistance in man. *Diabetes Mellitus* : 121-153, 1990.
143. Padgett, E. L., and S. B. Pruet. Evaluation of nitrite production by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 186: 775-781, 1992.
144. Panza, J. A., A. A. Quyyumi, J. E. Brush, and S. E. Epstein. Abnormal endothelium dependent relaxation in patients with essential hypertension. *N Engl J Med* 323: 22-27, 1990.

145. Parrillo, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. *New Engl J Med* 328: 1471-1477, 1993.
146. Pascoe, W. S., and L. H. Storlien. Inducement by fat feeding of basal hyperglycemia in rats with abnormal β cell function: model for study of etiology and pathogenesis of NIDDM. *Diabetes* 39: 226-233, 1990.
147. Paz, K., R. Hemi, D. LeRoith, A. Karasik, E. Elhanany, K. Hannah, and Y. Zick. A molecular basis for insulin resistance. *J Biol Chem* 272: 29911-29918, 1997.
148. Peraldi, P., G. S. Hotamisligil, W. A. Buurman, M. F. White, and B. M. Spiegelman. Tumor necrosis factor (TNF)- α inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 271: 13018-13022, 1996.
149. Ploug, T., H. Galbo, and E. A. Richter. Increased muscle glucose uptake during contractions: no need for insulin. *Am J Physiol* 247: E726-31, 1984.
150. Pryor, W. A., and L. S. Giuseppe. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268: L699-L722, 1995.
151. Pugin, J., C. C. Schurer-Maly, D. Leturcq, A. Moriarty, R. J. Ulevitch, and P. S. Tobias. Lipopolysaccharide (LPS) activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD14. *Proc Natl Acad Sci* 90: 2744-2748, 1993.
152. Ramadori, G., K. H. Meyer Zum Buschenfelde, P. S. Tobias, J. C. Mathison, and R. J. Ulevitch. Biosynthesis of lipopolysaccharide binding protein in rabbit hepatocytes. *Pathobiology* 58: 89-94, 1990.
153. Randle, P. J., P. B. Garland, C. N. Hales, and E. A. Newsholme. The glucose fatty-acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* i: 785-789, 1963.

154. Ranganathan, S., T. P. Ciaraldi, R. R. Henry, S. Mudaliar, and P. A. Kern. Lack of effect of leptin on glucose transport, lipoprotein lipase, and insulin action in adipose and muscle cells. *Endocrinology* 139: 2509-13, 1998.
155. Ranganathan, S., and M. B. Davidson. Effect of tumor necrosis factor-alpha on basal and insulin-stimulated glucose transport in cultured muscle and fat cells. *Metabolism* 45: 1089-1094, 1996.
156. Rees, D. D., R. M. J. Palmer, H. F. Hodson, and S. Moncada. A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium dependent relaxation. *Br J Pharmacol* 96: 418-424, 1989.
157. Ricquier, D. Obésité et recherche en 1994. *médecine/sciences* 10: 1079-1081, 1994.
158. Roberts, C. K., R. J. Barnard, S. H. Scheck, and T. W. Balon. Exercise-stimulated glucose transport in skeletal muscle is nitric oxide dependent. *Am J Physiol* 273: E220-5, 1997.
159. Rubinstein, I., Z. Abassi, R. Colman, F. Milman, J. Winaver, and O. S. Better. Involvement of nitric oxide system in experimental muscle crush injury. *J Clin Invest* 101: 1325-1333, 1998.
160. Saghizadeh, M., J. M. Ong, W. T. Garvey, R. R. Henry, and P. A. Kern. The expression of TNF- α by human muscle. Relationship to insulin resistance. *J Clin Invest* 97: 1111-1116, 1996.
161. Sakai, N., S. Kaufman, and S. Milstein. Tetrahydrobiopterin is required for cytokine-induced nitric oxide production in a murine macrophage cell line (RAW 264). *Mol Pharmacol* 43: 6-10, 1993.
162. Salter, M., R. G. Knowles, and S. Moncada. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca-dependent and Ca-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett* 291: 145-149, 1991.

163. Schmidt, H. H. H. W., J. S. Pollock, M. Nakane, U. Forstermann, and F. Murad. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthase. *Cell Calcium* 13: 427-434, 1992.
164. Schmidt, K., E. R. Werner, B. Mayer, H. Wächter, and M. Kukovetz. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells. *Biochem J* 281: 297-300, 1992.
165. Schulz, R., E. Nava, and S. Moncada. Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 105: 575-580, 1992.
166. Schwartz, M. W., E. Peskind, M. Raskind, E. J. Boyko, and D. J. Porte. Cerebrospinal fluid leptin levels: Relationship to plasma levels and to adiposity in humans. *Nature Medicine* 2: 589-593, 1996.
167. Sciacchitano, S., and S. I. Taylor. Cloning, tissue expression, and chromosomal localization of the mouse IRS-3 gene. *Endocrinology* 138: 4931-40, 1997.
168. Sessa, W. C. The nitric oxide synthase family of proteins. *J Vasc Res* 31: 131-143, 1994.
169. Sessa, W. C., J. K. Harrison, C. M. Barber, D. Zeng, M. E. Durieux, D. D'Angelo, K. R. Lynch, and M. J. Peach. Molecular cloning and expression of cDNA endothelial cell nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267: 15274-15276, 1992.
170. Shangraw, R. E., F. Jahoor, H. Miyoshi, W. A. Neff, C. A. Stuart, D. N. Herndon, and R. R. Wolfe. Differentiation between septic and postburn insulin resistance. *Metab Clin Exp* 38: 983-989, 1989.
171. Shimada, F., M. Taira, and Y. Suzuki. Insulin-resistant diabetes associated with partial deletion of insulin-receptor gene. *Lancet* 335: 1179-1181, 1990.

172. Silverman, M. Structure and function of hexose transporters. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 757-794, 1991.
173. Simmons, W. W., D. Ungureanu-Longrois, G. K. Smith, T. W. Smith, and R. A. Kelly. Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. *J Biol Chem* 271: 23928-37, 1996.
174. Sims, E. A., E. Danforth, Jr., E. S. Horton, G. A. Bray, J. A. Glennon, and L. B. Salans. Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Prog Horm Res* 29: 457-96, 1973.
175. Sims, E. A. H., E. J. Danforth, E. S. Horton, G. A. Bray, J. A. Glennon, and L. B. Salans. Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Rec Prog Horm Res* 29: 457-496, 1973.
176. Smith, F. S., E. D. Ceppi, and M. A. Titheradge. Inhibition of cytokine-induced inducible nitric oxide synthase expression by glucagon and cAMP in cultured hepatocytes. *Biochem J* 326: 187-92, 1997.
177. Steinberg, H. O., G. Brechtel, A. Johnson, N. Fineberg, and A. D. Baron. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent - a novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 94: 1172-1179, 1994.
178. Stephens, J. M., J. Lee, and P. F. Pilch. Tumor necrosis factor-alpha-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes is accompanied by a loss of insulin receptor substrate-1 and GLUT4 expression without a loss of insulin receptor-mediated signal transduction. *J Biol Chem* 272: 971-976, 1997.
179. Stephens, J. M., and P. H. Pekala. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumor necrosis factor- α . *J Biol Chem* 266: 21839-21845, 1991.

180. Stevens, R. B., D. E. R. Sutherland, J. D. Ansite, M. Saxena, T. J. Rossini, B. K. Levay-Young, B. J. Hering, and C. B. Mills. Insulin down-regulates the inducible nitric oxide synthase pathway: nitric oxide as cause and effect of diabetes? *J Immunol* 159: 5329-5335, 1997.
181. Stone, R. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. *Science* 64: 365-367, 1994.
182. Stuehr, D. J., H. J. Cho, N. S. Kwon, M. Weise, and C. F. Nathan. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: A FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci* 88: 7773-7777, 1991.
183. Stuehr, D. J., and C. F. Nathan. Nitric oxide, a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med* 169: 1543-1555, 1989.
184. Suzuki, K., and T. Kono. Evidence that insulin causes translocation of glucose transport activity to the plasma membrane from an intracellular storage site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 2542-5, 1980.
185. Taira, M., M. Taira, and N. Hasimoto. Human diabetes associated with a deletion of the tyrosine kinase domain of the insulin receptor. *Science* 245: 63-66, 1989.
186. Tartaglia, L. A., T. M. Ayres, G. H. W. Wong, and D. V. Goeddel. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *cell* 74: 845-853, 1993.
187. Teoman Uysal, K., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, and G. S. Hotamsligil. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF-alpha function. *Nature* 389: 610-614, 1997.
188. Thompson, M., L. Becker, D. Bryant, G. Williams, D. Levin, L. Margraf, and B. P. Giroir. Expression of the inducible nitric oxide synthase gene in diaphragm and skeletal muscle. *J Appl Physiol* 81: 2415-2420, 1996.

189. Thorens, B., M. J. Charron, and H. F. Lodish. Molecular physiology of glucose transporters. *Diabetes Care* 13: 209-18, 1990.
190. Tobias, P. S., K. Soldau, and R. J. Ulevitch. Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem* 264: 10867-10871, 1989.
191. Toolsie, R., S. Vivian, P. J. Bilan, and A. Klip. Insulin-mediated translocation of glucose transporters from intracellular membranes to plasma membranes: Sole mechanism of stimulation of glucose transport in L6 muscle cells. *BBRC* 157: 1329-1335, 1988.
192. Trinchieri, G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 13: 251-276, 1995.
193. Tsakiridis, T., H. McDowell, T. Walker, P. Downes, H. S. Hundal, M. Vranic, and A. Klip. Multiple roles of phosphatidylinositol 3-kinase in regulation of glucose transport, amino acid transport, and glucose transporters in L6 skeletal muscle cells. *Endocrinology* 136: 4315-4322, 1995.
194. Turinsky, J., G. W. Nagel, J. S. Elmendorf, A. Damrau Abney, and T. R. Smith. Sphingomyelinase stimulates 2-deoxyglucose uptake by skeletal muscle. *Biochem-J* 313: 215-222, 1996.
195. Ulevitch, R. J., and P. S. Tobias. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13: 437-457, 1995.
196. Uysal, K. T., S. M. Wiesbrock, M. W. Marino, and G. S. Hotamisligil. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 389: 610-4, 1997.

197. Vandenabeele, P., W. Declercq, R. Beyaert, and W. Fiers. Two tumour necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 5: 392-399, 1995.
198. Wang, H., M. P. Kavanaugh, R. A. North, and D. Kabat. Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352: 729-731, 1991.
199. Weinstein, S. P., C. M. Wilson, A. Pritsker, and S. W. Cushman. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of GLUT4 to the cell surface in rat skeletal muscle. *Metabolism* 47: 3-6, 1998.
200. Werner-Felmayer, G., E. R. Werner, D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger, and H. Wachter. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. *J Exp Med* 172: 1599-607, 1990.
201. Westfall, M. V., and M. M. Sayeed. Basal- and insulin-stimulated muscle glucose transport in endotoxin and bacteremia rats. *Am J Physiol* 254: R673-R679, 1988.
202. Wheelock, E. F. Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149: 310-311, 1965.
203. White, M. F. The insulin signalling system and the IRS proteins. *Diabetologia* 40: S2-S17, 1997.
204. White, M. F. The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 822: 355-374, 1985.
205. Wiegmann, K., S. Schutze, T. Machleidt, D. Witte, and M. Kronke. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell* 78: 1005-1015, 1994.

206. Wileman, S. M., G. E. Mann, and A. R. Baydoun. Induction of L-arginine transport and nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells: Synergistic actions of pro-inflammatory cytokines and bacterial lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol* 116: 3243-3250, 1995.
207. Williams, G., T. Brown, L. Becker, M. Prager, and B. P. Giroir. Cytokine-induced expression of nitric oxide synthase in C2C12 skeletal muscle myocytes. *Amer J Physiol-Regul Integr C* 36: R1020-R1025, 1994.
208. Withers, D. J., J. S. Gutierrez, H. Towery, D. J. Burks, J. M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G. I. Shulman, S. Bonner-Weir, and M. F. White. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391, 1998.
209. Wright, S. D., R. A. Ramos, P. S. Tobias, R. J. Ulevitch, and J. C. Mathison. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-1433, 1990.
210. Xie, Q.-W., Y. Kashiwabara, and C. Nathan. Role of transcription factor NF- κ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 269: 4705-4708, 1994.
211. Yamagata, K., K. I. Andreasson, W. E. Kaufmann, C. A. Barnes, and P. F. Worley. Expression of a mitogen-inductible cyclo-oxygenase in brain neurons: Regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11: 371-386, 1993.
212. Yeh, J. I., E. A. Gulve, L. Rameh, and M. J. Birnbaum. The effects of wortmannin on rat skeletal muscle - dissociation of signaling pathways for insulin- and contraction-activated hexose transport. *J Biol Chem* 270: 2107-2111, 1995.
213. Yoshimasa, Y., S. Seino, and J. Whittaker. Insulin-resistant diabetes due to a point mutation that prevents insulin proreceptor processing. *Science* 240: 784-787, 1988.

214. Zentella, A., K. Manogue, and A. Cerami. Cachectin/TNF-Mediated Lactate Production in Cultured Myocytes Is Linked to Activation of a Futile Substrate Cycle. *Cytokine* 5: 436-447, 1993.
215. Zhu, L., C. Gunn, and J. S. Beckman. Bactericidal activity of peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys* 298: 452-457, 1992.
216. Zierath, J. R., E. U. Frevert, J. W. Ryder, P. O. Berggren, and B. B. Kahn. Evidence against a direct effect of leptin on glucose transport in skeletal muscle and adipocytes. *Diabetes* 47: 1-4, 1998.
217. Zorzano, A., W. Wilkinson, N. Kotliar, G. Thoidis, B. E. Wadzinski, A. E. Ruoho, and P. F. Pilch. Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations. *J Biol Chem* 264: 12358-63, 1989.