

# STRESS OXYDATIF, INSULINOSECRETION, ET INSULINORESISTANCE

par

V. POITOUT<sup>1,2</sup>, Y. TANAKA\*, G. REACH<sup>3</sup> ET R. P. ROBERTSON\* \*\*

## INTRODUCTION

Le diabète de type 2 (non insulino-dépendant) est un syndrome bipolaire associant une résistance à l'insuline, liée en particulier à l'obésité, et une incapacité du pancréas à y faire face [1, 2]. Son apparition est déterminée par des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Par exemple, le taux de concordance pour le diabète entre jumeaux monozygotes est remarquablement élevé mais n'atteint pas 100 %. En cas de discordance, le jumeau diabétique est davantage obèse que le jumeau non atteint. Ceci pourrait signifier qu'on pourrait éviter l'apparition du diabète en empêchant l'apparition de l'obésité ou en développant la pratique de l'exercice physique [3].

Le défaut de l'insulinosécrétion, c'est-à-dire le caractère limité de son potentiel à répondre à une augmentation des besoins en insuline causée par l'insulinorésistance, pourrait être génétiquement déterminé (hypothèse du génotype d'épargne) ou être secondaire à une malnutrition pendant la période fœtale (hypothèse du phénotype d'épargne) [4]. Ce défaut s'aggrave avec le temps. Cette aggravation peut soit être programmée dans le cadre d'un phénomène d'apoptose des cellules bêta de l'îlot de Langerhans, qui pourrait expliquer que la masse des cellules bêta est réduite dans le diabète de type 2 (revue in [2]), soit être la conséquence de l'effet toxique de l'hyperglycémie (concept de glucotoxicité) [5] ou des acides gras libres circulants qui sont élevés dans l'obésité (concept de lipotoxicité) [6]. Comprendre la cause de cette aggravation représente un défi majeur de la diabétologie, car sa prévention permettrait d'éviter l'échec progressif des antidiabétiques oraux conduisant à l'insulinorequérance, voire l'apparition même du diabète de type 2.

Le but de ce texte est de présenter les arguments en faveur d'une hypothèse impliquant l'intervention du stress oxydatif dans ces phénomènes, qui pourrait être à la base d'une amélioration de la sensibilité à l'insuline et d'une prévention de la détérioration de la fonction insulaire dans le diabète de type 2 par un traitement par anti-oxydants.

## STRESS OXYDATIF : DÉFINITIONS ET MÉCANISMES

Le stress oxydatif correspond à une perturbation du statut oxydatif intracellulaire [7], induite soit par production excessive de radicaux libres, soit par diminution de la capacité de défense antioxydante. Les effets des radicaux libres sont proportionnels à l'intensité et à la durée de leur production :

- une production transitoire et modérée de radicaux libres correspond à un mécanisme de défense de la cellule lui permettant, par exemple, de détruire des cellules cancéreuses ou des microorganismes pathogènes ;
- lorsque cette production est récurrente ou chronique mais reste modérée dans son intensité, la balance entre production de radicaux libres et systèmes de détoxification de la cellule est perturbée de manière continue, et on parle alors de stress oxydatif ;
- si la production de radicaux libres est suffisamment importante pour altérer de manière irréversible des processus cellulaires vitaux, elle déclenche l'apoptose et la mort cellulaire. Lorsque les radicaux libres sont générés en quantités massives, ils entraînent la nécrose cellulaire [7].

De nombreux facteurs, tels que des perturbations métaboliques, l'inflammation, des agents physiques, des cytokines, la présence d'oxydants exogènes, peuvent conduire à la formation de radicaux libres [7]. Les radicaux libres réagissent avec des substrats oxydables (dont le glucose) et produisent des radicaux carbonyles. Ces derniers ont de multiples effets intracellulaires, dont la glycation de protéines, l'altération de la structure de l'ADN, la génération de produits de peroxydation des lipides, et la modulation de la transcription de nombreux gènes (fig. 1).

<sup>1</sup>Pacific Northwest Research Institute, Seattle, WA, USA.

<sup>2</sup>Department of Medicine, University of Washington, Seattle, WA, USA.

<sup>3</sup>INSERM U341, Hôtel-Dieu, Paris, France.

FIG. 1. — Représentation schématique des mécanismes et effets cellulaires du stress oxydatif. Les radicaux libres réagissent avec les substrats oxydables (glucose, protéines, acides gras) et génèrent des réactifs carbonyles, dont les effets cellulaires sont multiples : glycation de protéines, peroxydation de lipides, modification de l'expression de gènes, et modifications de l'ADN. Dans un contexte d'hyperglycémie chronique, la génération de radicaux libres est favorisée par l'autooxydation du glucose. Par ailleurs, les protéines glyquées et les produits de peroxydation des lipides participent à la production de radicaux libres.

Les mécanismes de défense contre la production de radicaux libres sont de 2 types : présence d'« éboueurs » de radicaux libres, et enzymes antioxydantes, les plus étudiées étant la glutathion peroxydase, la catalase, et la Cu/Zn superoxyde dismutase (fig. 2).

FIG. 2. — Enzymes impliquées dans les défenses antioxydantes de la cellule. SOD : superoxyde dismutase ; GPx : glutathion peroxydase.

## STRESS OXYDATIF ET CELLULE BÊTA

### Stress oxydatif et destruction insulaire

Les premières études concernant le rôle du stress oxydatif dans les lésions de la cellule bêta ont eu pour cadre la physiopathologie de la destruction insulaire. Les cellules bêta sont particulièrement vulnérables au stress oxydatif en raison d'une part de leur pauvreté en Cu/Zn superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase [8, 9], d'autre part de leur faible contenu en glutathion réduit [10]. Cette fragilité intervient dans les mécanismes qui conduisent à la destruction des cellules bêta sous l'effet d'agents diabétogènes comme l'alloxane et la streptozotocine [11, 12] ; la sensibilité à l'alloxane dépend, chez la souris où il existe des souches plus ou moins susceptibles à l'effet diabétogène de l'alloxane, de la force de mécanismes de défense vis-à-vis des radicaux libres [13]. Des cellules insulinosécrétrices surexprimant la glutathion peroxydase, la catalase ou la Cu/Zn superoxyde dismutase, sont protégées contre l'effet délétère d'agents oxydants [14, 15]. In vivo, la surexpression de la Cu/Zn superoxyde dismutase chez les souris transgéniques augmente la tolérance des cellules bêta au stress oxydatif induit par l'alloxane [16, 17]. La surexpression dans les cellules bêta, chez des souris transgéniques, de la thiorédoxine, une enzyme ayant des propriétés de défense vis-à-vis des radicaux libres et antiapoptotiques, diminue l'effet diabétogène de la streptozotocine [18]. Enfin, la surexpression de la catalase dans les îlots de souris protège contre les effets de l'alloxane sur la sécrétion d'insuline et diminue les effets diabétogènes de la streptozotocine in vivo [19].

Il existe également une abondante littérature montrant l'intervention des radicaux libres dans la destruction auto-immune des cellules bêta dans le diabète de type 1, les radicaux libres agissant en particulier comme second messager des interleukines [20-23]. Ainsi, il est possible d'empêcher la survenue d'une insulite dans des îlots greffés chez des souris NOD par un traitement par la superoxyde dismutase et la catalase [24]. Dans des modèles utilisant des lignées cellulaires bêta, l'expression stable de la Mn superoxyde dismutase prévient la cytotoxicité induite par l'IL-1 et réduit la production d'oxyde nitrique [25]. Dans les cellules RINm5f, la surexpression de la catalase, glutathion peroxydase, et Cu/Zn superoxyde dismutase protège les cellules contre la fragmentation de l'ADN induite par les cytokines [26]. Récemment, Moriscot et al. [27] ont montré que la surexpression de la Cu/Zn superoxyde dismutase par le biais d'un adénovirus protège les îlots humains et des cellules INS-1 des effets cytotoxiques de l'oxyde nitrique. Le même groupe a montré que la surexpression de la catalase dans les îlots humains les protège contre le stress oxydatif [28].

### Stress oxydatif et insulinosécrétion

#### EFFETS DES RADICAUX LIBRES SUR LA SECRETION D'INSULINE

Les radicaux libres inhibent la sécrétion d'insuline [29]. Ils interfèrent avec différentes étapes du couplage stimulus-sécrétion. Dans l'îlot de souris, ils provoquent une hyperpolarisation membranaire par activation des canaux potassiques dépendants de l'ATP [29, 30], par un mécanisme qui semble impliquer une diminution de la concentration en ATP sans modification des taux de calcium intracellulaires [31]. Ils inhibent l'activation du métabolisme

mitochondrial par le glucose [32]. De même, le 4-hydroxy-2-nonéal (4-HNE), un produit de la peroxydation des lipides, diminue la sécrétion d'insuline en réponse au glucose de manière dose-dépendante [33].

#### IMPLICATIONS DU STRESS OXYDATIF DANS LES MECANISMES DE GLUCOTOXICITE

La corrélation entre stress oxydatif et hyperglycémie est bien connue dans le domaine des complications secondaires du diabète (revue in [34]). Plus récemment, il a été proposé que le stress oxydatif puisse représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave le dysfonctionnement de la cellule bêta dans le diabète de type 2 (hypothèse de glucotoxicité) [5].

##### *Données in vitro*

L'aminoguanidine, agent bloquant la glycation des protéines, améliore la réponse insulinosécrétoire au glucose et l'expression de l'ARN messager de la pré- pro-insuline dans des îlots cultivés en présence d'une concentration élevée de glucose [35], et plusieurs publications récentes démontrent que l'aminoguanidine a un effet anti-oxydant [36-38], les radicaux libres étant d'ailleurs impliqués dans la formation des produits de glycation [39]. L'aminoguanidine, comme la N-acétyl-cystéine (NAC), un agent antioxydant, diminue l'apoptose de cellules insulinosécrétoires HIT-T15 induite par les sucres réducteurs [40], et la NAC prévient l'inhibition de l'expression du gène de l'insuline et de l'activité du facteur de transcription PDX-1 induite par le D-ribose [41]. Enfin, la culture de cellules HIT-T15 en présence d'aminoguanidine ou de NAC prévient les effets toxiques du glucose à long terme sur la sécrétion d'insuline, l'expression du gène de l'insuline, et l'activité des facteurs de transcription PDX-1 et RIPE3b1 [42] (fig. 3).

FIG. 3. — Effets de la N-acétyl-cystéine (NAC) et de l'aminoguanidine (AG) sur la glucotoxicité dans les cellules HIT-T15. L'activité du promoteur du gène de l'insuline a été mesurée dans des cellules HIT-T15 dans des expériences de transfection transitoire avec un gène rapporteur (INSCAT). Les groupes témoins (T) représentent des cellules jeunes (passage 73-76). Les cellules ont été cultivées pendant plusieurs mois dans une forte concentration de glucose, avec des concentrations croissantes de NAC ou d'AG (en mM). Les groupes traités représentent des cellules au passage 106-112, soit après 30 à 40 semaines de culture. La culture chronique dans une forte concentration de glucose entraîne une diminution de l'activité du promoteur INSCAT, qui est préservée en présence de NAC ou d'AG (\* :  $P < 0,01$  vs. NAC0 ; † :  $P < 0,01$  vs. AG0, n = 4 dans chaque groupe). D'après [42], avec permission.

##### *Données chez l'animal*

De nombreuses études dans différents modèles animaux de diabète de type 2 confortent l'hypothèse selon laquelle le stress oxydatif est impliqué dans les mécanismes de la glucotoxicité. Chez le rat Goto-Kakizaki, l'hyperglycémie entraîne une augmentation des marqueurs de la présence de radicaux libres [43]. Le traitement des rats GK par la vitamine E diminue la glycémie et les taux d'hémoglobine glyquée, et améliore sensiblement la sécrétion d'insuline [44]. Chez le rat obèse et diabétique OLETF, la troglitazone prévient l'augmentation des produits de peroxydation des lipides et de l'activité de la superoxyde dismutase [45]. Chez la souris C57BL/KsJ-db/db, la progression du diabète est associée à une diminution du contenu intracellulaire en insuline et de l'expression du gène de l'insuline. L'administration de NAC restaure le contenu en insuline et l'expression du gène de l'insuline de ces animaux [46].

Les arguments les plus forts en faveur du rôle de l'intervention des radicaux libres dans l'apparition d'un diabète de type 2 expérimental viennent des études réalisées dans la lignée de rats diabétiques ZDF, qui présentent une obésité et un diabète. Sreenan et al. [47] ont initialement montré que le traitement de rats ZDF par la metformine et la troglitazone, deux molécules ayant des propriétés antioxydantes, prévient l'apparition de l'hyperglycémie. Les acides gras *in vitro* entraînent sur des îlots isolés de rats ZDF la formation de NO, la formation d'ARN messager de la synthèse inductible de l'oxyde nitrique (iNOS) et diminuent la sécrétion d'insuline, ces effets étant atténués en présence d'aminoguanidine, qui diminue la production de NO ; *in vivo*, le traitement par l'aminoguanidine de rats prédiabétiques ZDF diminue l'expression de iNOS dans l'îlot et supprime la destruction des îlots, prévenant l'apparition du diabète [48]. L'administration d'aminoguanidine ou de NAC chez le rat ZDF supprime l'augmentation des marqueurs du stress oxydatif et améliore l'hyperglycémie, l'intolérance au glucose, la réponse insulinosécrétoire au glucose, la diminution du contenu des îlots en insuline, l'expression du gène de l'insuline, et la liaison du facteur de transcription PDX-1 au promoteur du gène de l'insuline [42] (fig. 4). Il est intéressant de remarquer que le traitement des rats ZDF par un inhibiteur de iNOS ne prévient pas les effets délétères de l'hyperglycémie (fig. 4), ce qui suggère que la glucotoxicité dans ce modèle met en jeu la génération de radicaux libres mais pas la synthèse de NO [42].

FIG. 4. — Effets d'un traitement par les antioxydants N-acétyl-cystéine (NAC) ou aminoguanidine (AG), ou par un inhibiteur de la synthase inductible de l'oxyde nitrique, la S-méthylisothiourée (SMT), sur la sécrétion d'insuline par des îlots isolés de rats " Zucker Diabetic Fatty " (ZDF) en incubations statiques. La sécrétion d'insuline en réponse au glucose est nettement diminuée dans les îlots de rats ZDF de 12 semaines par rapport à ceux de 6 semaines. L'administration de NAC ou d'AG prévient cette diminution, tandis que la SMT est sans effet (\*:  $P < 0,01$  vs. 6 semaines ; †:  $P < 0,001$  vs. 12 semaines non traités ; ‡:  $P < 0,05$  vs. 12 semaines non traités,  $n = 3$  dans chaque groupe). D'après [42], avec permission.

## STRESS OXYDATIF ET INSULINO-SENSIBILITÉ

La génération de radicaux libres est probablement un médiateur des effets du TNFalpha sur la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline, et pourrait être impliquée dans l'insulinorésistance liée à l'âge [49].

### Données in vitro

Plusieurs études sur des lignées cellulaires in vitro démontrent que le stress oxydatif inhibe la transduction du signal de l'insuline. Des concentrations micromolaires d'eau oxygénée inhibent l'autophosphorylation du récepteur de l'insuline, la phosphorylation de l'*insulin receptor substrate-1* (IRS-1), et les événements en aval de la phosphorylation d'IRS-1 tels que l'activation de la phosphatidylinositol 3-kinase, le transport du glucose, et l'activation des *mitogen-activated protein kinases* (MAP kinases) [50]. Le stress oxydatif inhibe la translocation du transporteur de glucose GLUT4 [51] et l'activation de la protéine kinase B [52, 53] stimulées par l'insuline dans les cellules adipeuses. Ces effets sont bloqués en présence d'un antioxydant [52].

### Données in vivo chez l'animal

Les marqueurs de stress oxydatif sont élevés chez le rat Zucker obèse et résistant à l'insuline, et sont diminués par l'administration de vitamine E, qui corrige en partie l'hyperinsulinémie [54]. À l'inverse, des rats Zucker traités par des pro- oxydants deviennent diabétiques, alors que le traitement n'a pas d'effet chez des rats témoins du même âge non insulinorésistants [55]. De même, chez le rat rendu insulinorésistant par un régime riche en fructose, l'administration de metformine améliore la sensibilité à l'insuline et les défenses antioxydantes [56].

## STRESS OXYDATIF ET DIABÈTE DE TYPE 2 HUMAIN

De nombreuses études montrent une augmentation des marqueurs de stress oxydatif dans le diabète de type 2 [57-61], ainsi qu'une diminution des mécanismes de défense vis-à-vis des radicaux libres [62-65], associée à une diminution du taux d'acide urique et d'acide ascorbique circulant [66-68]. On observe également une diminution de la superoxyde dismutase et de la catalase chez des patients ne présentant qu'une intolérance au glucose, chez qui une diminution de l'acide ascorbique et du glutathion réduit est également déjà présente [69]. Paolisso et al. [70] ont observé qu'il existait une corrélation positive entre les radicaux libres plasmatiques et l'insulinémie à jeun, et une corrélation négative avec l'utilisation du glucose, en particulier son utilisation non oxydative, dont la diminution est un élément essentiel de la physiopathologie du diabète de type 2. Il est possible que cette anomalie du statut oxydatif dans le diabète de type 2 soit secondaire à l'hyperglycémie (bien que comme on l'a vu, elle est déjà observée en cas de simple intolérance au glucose) : on trouve une corrélation négative entre le taux d'hémoglobine glyquée et l'activité de " scavenger " du plasma vis-à-vis des radicaux libres, le taux d'acide urique [71], et un traitement intensif du diabète améliore les taux circulants d'eau oxygénée et de malonyldialdéhyde [72]. À court terme, une simple hyperglycémie provoquée par voie orale diminue les défenses antioxydantes de l'organisme chez des sujets sains ou diabétiques non insulinodépendants [73].

Par ailleurs, plusieurs publications démontrent qu'un traitement anti-oxydant améliore la sensibilité des tissus à l'insuline dans le diabète de type 2 : Paolisso et al. [74] ont observé qu'un traitement par la vitamine E augmente l'utilisation globale du glucose, et en particulier son utilisation non oxydative. Le même groupe a montré les mêmes

effets avec la vitamine C sur la sensibilité à l'insuline, observant de plus une amélioration des lipides circulants [75] ; sous l'effet du traitement, les radicaux libres circulants étaient diminués [76]. Un effet d'un traitement par la silymarine, un agent antioxydant, a été observé chez des patients diabétiques cirrhotiques traités par l'insuline, entraînant une diminution des besoins en insuline exogène [77]. Les patients diabétiques de type 2 ont un taux de glutathion réduit dans les érythrocytes diminué, et la perfusion de glutathion réduit augmente l'utilisation du glucose au cours d'un clamp euglycémique hyperinsulinémique [78].

Curieusement, face d'une part à ces études montrant un effet sur l'amélioration de la sensibilité à l'insuline d'un traitement par les anti-oxydants, et d'autre part aux nombreuses évidences, mentionnées plus haut, impliquant les radicaux libres dans la destruction des îlots dans le diabète de type 1, il n'y a à notre connaissance aucune étude clinique montrant un effet d'un traitement par les anti-oxydants sur l'amélioration de l'insulinosécrétion dans le diabète de type 2.

## CONCLUSIONS

Cette revue suggère qu'il est possible que les radicaux libres interviennent chez l'homme dans l'apparition des troubles de l'insulinosécrétion et de la sensibilité à l'insuline qui caractérisent le diabète de type 2. D'une part les cellules bêta sont très sensibles au stress oxydatif, d'autre part de nombreuses données expérimentales indiquent que ce dernier pourrait représenter un mécanisme par lequel l'hyperglycémie chronique aggrave la fonction insulinosécrétoire dans le diabète de type 2 (hypothèse de glucotoxicité). Une publication récente, montrant que la metformine protège les îlots contre les effets délétères des lipides sur la sécrétion d'insuline par des îlots isolés [79], suggère que le stress oxydatif pourrait également jouer un rôle dans les mécanismes de la lipotoxicité au niveau de la cellule bêta.

À ce jour l'effet bénéfique des anti-oxydants n'a été montré chez l'homme qu'en ce qui concerne l'autre versant de ce syndrome bipolaire que représente le diabète, c'est-à-dire l'insulinorésistance. Si cette hypothèse est vérifiée, une intervention à ce niveau par un traitement anti-oxydant pourrait d'une part freiner le passage de l'intolérance au glucose au diabète, voire chez des sujets obèses qui ont des taux élevés d'acides gras libres, supprimer ou ralentir l'apparition du trouble de l'insulinosécrétion qui conduit à la détérioration de l'homéostasie glycémique.

Il pourrait par conséquent être important de tester de manière rétrospective cette hypothèse sur les données disponibles dans l'étude SU-VI-MAX [80], voire de réaliser dans des sous-groupes des études spécifiques, rétrospectives ou prospectives, du potentiel insulinosécrétoire chez des sujets traités, ou non, par anti-oxydants.

## BIBLIOGRAPHIE

1. VAAG A. On the pathophysiology of late onset non-insulin dependent diabetes mellitus. Current controversies and new insights. *Dan Med Bull*, 1999, 46 : 197-234.
2. DE FRONZO RA. Pathogenesis of type 2 diabetes : metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev*, 1999, 5 : 177-269.
3. HU FB, SIGAL RJ, RICH-EDWARDS JW et al. Walking compared with vigorous physical activity and risk of type 2 diabetes in women : a prospective study. *JAMA*, 1999, 282 : 1433-1439.
4. CHUKWUMA C, TUOMILEHTO J. The "thrifty" hypotheses : clinical and epidemiological significance for non-insulin dependent diabetes mellitus and cardiovascular disease risk factors. *J Cardiovasc Risk*, 1998, 5 : 11-23.
5. ROBERTSON RP, HARMON JS, TANAKA Y et al. Glucose toxicity of the beta-cell : cellular and molecular mechanisms. *In* : D Le Roith, SI Taylor, JM Olefsky. *Diabetes Mellitus. A fundamental and clinical text*. 2nd edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000 : 125-132.
6. MCGARRY JD, DOBBINS RL. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. *Diabetologia*, 1999, 42 : 128-138.
7. MOREL Y, BAROUKI R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J*, 1999, 342 Pt 3 : 481-496.
8. GRANKVIST K, MARKLUND SL, TALJEDAL IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*, 1981, 199 : 393-398.
9. LENZEN S, DRINKGERN J, TIEDGE M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*, 1996, 20 : 463-466.
10. AMMON HP, HAGELE R, YOUSSEF N et al. A possible role of intracellular and membrane thiols of rat pancreatic islets in calcium uptake and insulin release. *Endocrinology*, 1983, 112 : 720-726.
11. MALAISSE WJ, MALAISSE-LAGAE F, SENER A, PIPELEERS DG. Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B-cell. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79 : 927-930.
12. OBERLEY LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med*, 1988, 5 : 113-124.
13. MATHEWS CE, LEITER EH. Resistance of ALR/Lt islets to free radical-mediated diabetogenic stress is inherited as a dominant trait. *Diabetes*, 1999, 48 : 2189-2196.
14. TIEDGE M, LORTZ S, MUNDAY R, LENZEN S. Protection against the co-operative toxicity of nitric oxide and oxygen free radicals by overexpression of antioxidant enzymes in bioengineered insulin-producing RINm5F cells. *Diabetologia*, 1999, 42 : 849-855.

15. KRALIK PM, XU B, EPSTEIN PN. Catalase transfection decreases hydrogen peroxide toxicity in a pancreatic beta cell line. *Endocr Res*, 1998, *24* : 79-87.
16. KUBISCH HM, WANG J, LUCHE R et al. Transgenic copper/zinc superoxide dismutase modulates susceptibility to type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, *91* : 9956-9959.
17. KUBISCH HM, WANG J, BRAY TM, PHILLIPS JP. Targeted overexpression of Cu/Zn superoxide dismutase protects pancreatic beta-cells against oxidative stress. *Diabetes*, 1997, *46* : 1563-1566.
18. HOTTA M, TASHIRO F, IKEGAMI H et al. Pancreatic beta cell-specific expression of thioredoxin, an antioxidative and antiapoptotic protein, prevents autoimmune and streptozotocin-induced diabetes. *J Exp Med*, 1998, *188* : 1445-1451.
19. XU B, MORITZ JT, EPSTEIN PN. Overexpression of catalase provides partial protection to transgenic mouse beta cells. *Free Radic Biol Med*, 1999, *27* : 830-837.
20. RABINOVITCH A. An update on cytokines in the pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev*, 1998, *14* : 129-151.
21. ARGILES JM, LOPEZ-SORIANO J, ORTIZ MA et al. Interleukin-1 and beta-cell function : more than one second messenger ? *Endocr Rev*, 1992, *13* : 515-524.
22. RAES M, RENARD P, REMACLE J. Free radicals as second messengers. *C R Seances Soc Biol Fil*, 1995, *189* : 355-366.
23. CUNNINGHAM JM, GREEN IC. Cytokines, nitric oxide and insulin secreting cells. *Growth Regul*, 1994, *4* : 173-180.
24. NOMIKOS IN, WANG Y, LAFFERTY KJ. Involvement of O<sub>2</sub> radicals in 'autoimmune' diabetes. *Immunol Cell Biol*, 1989, *67* : 85-87.
25. HOHMEIER HE, THIGPEN A, TRAN VV et al. Stable expression of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in insulinoma cells prevents IL-1beta- induced cytotoxicity and reduces nitric oxide production. *J Clin Invest*, 1998, *101* : 1811-1820.
26. LORTZ S, TIEDGE M, NACHTWEY T et al. Protection of insulin-producing RINm5F cells against cytokine-mediated toxicity through overexpression of antioxidant enzymes. *Diabetes*, 2000, *49* : 1123-1130.
27. MORISCOT C, PATTOU F, KERR-CONTE J et al. Contribution of adenoviral-mediated superoxide dismutase gene transfer to the reduction in nitric oxide-induced cytotoxicity on human islets and INS- 1 insulin-secreting cells. *Diabetologia*, 2000, *43* : 625-631.
28. BENHAMOU PY, MORISCOT C, RICHARD MJ et al. Adenovirus-mediated catalase gene transfer reduces oxidant stress in human, porcine and rat pancreatic islets. *Diabetologia*, 1998, *41* : 1093- 1100.
29. KRIPPEIT-DREWS P, LANG F, HAUSSINGER D, DREWS G. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced hyperpolarization of pancreatic B-cells. *Pflugers Arch*, 1994, *426* : 552-554.
30. NAKAZAKI M, KAKEI M, KORIYAMA N, TANAKA H. Involvement of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in free radical-mediated inhibition of insulin secretion in rat pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 1995, *44* : 878-883.
31. KRIPPEIT-DREWS P, KRAMER C, WELKER S et al. Interference of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with stimulus-secretion coupling in mouse pancreatic beta-cells. *J Physiol (Lond)*, 1999, *514* : 471-481.
32. MAECHLER P, JORNOT L, WOLLHEIM CB. Hydrogen peroxide alters mitochondrial activation and insulin secretion in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 1999, *274* : 27905-27913.
33. MIWA I, ICHIMURA N, SUGIURA M et al. Inhibition of glucose-induced insulin secretion by 4- hydroxy-2-nonenal and other lipid peroxidation products. *Endocrinology*, 2000, *141* : 2767-2772.
34. BAYNES JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, 1991, *40* : 405-412.
35. TAJIRI Y, MOLLER C, GRILL V. Long term effects of aminoguanidine on insulin release and biosynthesis : evidence that the formation of advanced glycosylation end products inhibits β-cell function. *Endocrinology*, 1997, *138* : 273-280.
36. KEDZIORA-KORNATOWSKA KZ, LUCIAK M, BLASZCZYK J, PAWLAK W. Effect of aminoguanidine on the generation of superoxide anion and nitric oxide by peripheral blood granulocytes of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Chim Acta*, 1998, *278* : 45-53.
37. YILDIZ G, DEMIRYUREK AT, SAHIN-ERDEMLI I, KANZIK I. Comparison of antioxidant activities of aminoguanidine, methylguanidine and guanidine by luminol-enhanced chemiluminescence. *Br J Pharmacol*, 1998, *124* : 905-910.
38. GIARDINO I, FARD AK, HATCHELL DL, BROWNLEE M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes*, 1998, *47* : 1114-1120.
39. LE GUEN CA, JONES AF, BARNETT AH, LUNEC J. Role of reactive oxygen species in the generation of fluorescence by glycation. *Ann Clin Biochem*, 1992, *29* : 184-189.
40. KANETO H, FUJII J, MYINT T et al. Reducing sugars trigger oxidative modification and apoptosis in pancreatic beta-cells by provoking oxidative stress through the glycation reaction. *Biochem J*, 1996, *320 (Pt. 3)* : 855-863.
41. MATSUOKA TA, KAJIMOTO Y, WATADA H et al. Glycation-dependent, Reactive oxygen species mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells. *J Clin Invest*, 1997, *99* : 144-150.
42. TANAKA Y, GLEASON CE, TRAN POT et al. Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, *96* : 10857-10862.
43. IHARA Y, TOYOKUNI S, UCHIDA K et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta- cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999, *48* : 927-932.
44. IHARA Y, YAMADA Y, TOYOKUNI S et al. Antioxidant alpha-tocopherol ameliorates glycemic control of GK rats, a model of type 2 diabetes. *FEBS Lett*, 2000, *473* : 24-26.
45. FUKUI T, NOMA T, MIZUSHIGE K et al. Dietary troglitazone decreases oxidative stress in early stage type II diabetic rats. *Life Sci*, 2000, *66* : 2043-2049.
46. KANETO H, KAJIMOTO Y, MIYAGAWA J et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes : possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 1999, *48* : 2398-2406.
47. SREENAN S, STURIS J, PUGH W et al. Prevention of hyperglycemia in the Zucker diabetic fatty rat by treatment with metformin or troglitazone. *Am J Physiol*, 1996, *271* : E742-E747.
48. SHIMABUKURO M, OHNEDA M, LEE Y, UNGER RH. Role of nitric oxide in obesity-induced β-cell disease. *J Clin Invest*, 1997, *100* : 290-295.
49. PAOLISSO G, TAGLIAMONTE MR, RIZZO MR, GIUGLIANO D. Advancing age and insulin resistance : new facts about an ancient history. *Eur J Clin Invest*, 1999, *29* : 758-769.

50. HANSEN LL, IKEDA Y, OLSEN GS et al. Insulin signaling is inhibited by micromolar concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Evidence for a role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in tumor necrosis factor alpha-mediated insulin resistance. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 25078-25084.
51. RUDICH A, KOZLOVSKY N, POTASHNIK R, BASHAN N. Oxidant stress reduces insulin responsiveness in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol*, 1997, 272 : E935-E940.
52. RUDICH A, TIROSH A, POTASHNIK R et al. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, 1999, 42 : 949-957.
53. TIROSH A, POTASHNIK R, BASHAN N, RUDICH A. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, 1999, 274 : 10595-10602.
54. LAIGHT DW, DESAI KM, GOPAUL NK et al. F<sub>2</sub>-isoprostane evidence of oxidant stress in the insulin resistant, obese Zucker rat : effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol*, 1999, 377 : 89-92.
55. LAIGHT DW, DESAI KM, GOPAUL NK et al. Pro-oxidant challenge in vivo provokes the onset of NIDDM in the insulin resistant obese Zucker rat. *Br J Pharmacol*, 1999, 128 : 269-271.
56. FAURE P, ROSSINI E, WIERNSPERGER N et al. An insulin sensitizer improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity in high fructose-fed rats. *Diabetes*, 1999, 48 : 353-357.
57. NOUROOZ-ZADEH J, TAJADDINI-SARMADI J, MCCARTHY S et al. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes*, 1995, 44 : 1054-1058.
58. DANDONA P, THUSU K, COOK S et al. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet*, 1996, 347 : 444-445.
59. CERIELLO A, FALLETI E, BORTOLOTTI N et al. Increased circulating intercellular adhesion molecule-1 levels in type II diabetic patients : the possible role of metabolic control and oxidative stress. *Metabolism*, 1996, 45 : 498-501.
60. THORNALLEY PJ, McLELLAN AC, LO TW et al. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci (Colch)*, 1996, 91 : 575-582.
61. LEINONEN J, LEHTIMAKI T, TOYOKUNI S et al. New biomarker evidence of oxidative DNA damage in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1997, 417 : 150-152.
62. OPARA EC, ABDEL-RAHMAN E, SOLIMAN S et al. Depletion of total antioxidant capacity in type 2 diabetes. *Metabolism*, 1999, 48 : 1414-1417.
63. YOSHIDA K, HIROKAWA J, TAGAMI S et al. Weakened cellular scavenging activity against oxidative stress in diabetes mellitus : regulation of glutathione synthesis and efflux. *Diabetologia*, 1995, 38 : 201-210.
64. SANTINI SA, MARRA G, GIARDINA B et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes*, 1997, 46 : 1853-1858.
65. REHMAN A, NOUROOZ-ZADEH J, MOLLER W et al. Increased oxidative damage to all DNA bases in patients with type II diabetes mellitus. *FEBS Lett*, 1999, 448 : 120-122.
66. MAXWELL SR, THOMASON H, SANDLER D et al. Antioxidant status in patients with uncomplicated insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Eur J Clin Invest*, 1997, 27 : 484-490.
67. WILL JC, BYERS T. Does diabetes mellitus increase the requirement for vitamin C ? *Nutr Rev*, 1996, 54 : 193-202.
68. SUNDARAM RK, BHASKAR A, VIJAYALINGAM S et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci (Colch)*, 1996, 90 : 255-260.
69. VIJAYALINGAM S, PARTHIBAN A, SHANMUGASUNDARAM KR, MOHAN V. Abnormal antioxidant status in impaired glucose tolerance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabet Med*, 1996, 13 : 715-719.
70. PAOLISSO G, D'AMORE A, VOLPE C et al. Evidence for a relationship between oxidative stress and insulin action in non-insulin-dependent (type II) diabetic patients. *Metabolism*, 1994, 43 : 1426-1429.
71. MAXWELL SR, THOMASON H, SANDLER D et al. Poor glycaemic control is associated with reduced serum free radical scavenging (antioxidant) activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Ann Clin Biochem*, 1997, 34 : 638-644.
72. WIERUSZ-WYSOCKA B, WYSOCKI H, BYKS H et al. Metabolic control quality and free radical activity in diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract*, 1995, 27 : 193-197.
73. CERIELLO A, BORTOLOTTI N, CRESCENTINI A et al. Antioxidant defences are reduced during the oral glucose tolerance test in normal and non-insulin-dependent diabetic subjects. *Eur J Clin Invest*, 1998, 28 : 329-333.
74. PAOLISSO G, D'AMORE A, GIUGLIANO D et al. Pharmacologic doses of vitamin E improve insulin action in healthy subjects and non-insulin-dependent diabetic patients. *Am J Clin Nutr*, 1993, 57 : 650-656.
75. PAOLISSO G, D'AMORE A, BALBI V et al. Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics [published errata appear in *Am J Physiol* 1994 Oct ; 267 (4 Pt 1) : section E following table of contents and 1994 Dec ; 267 (6 Pt 3) : section E following table of contents]. *Am J Physiol*, 1994, 266 : E261-E268.
76. PAOLISSO G, BALBI V, VOLPE C et al. Metabolic benefits deriving from chronic vitamin C supplementation in aged non-insulin dependent diabetics. *J Am Coll Nutr*, 1995, 14 : 387-392.
77. VELUSSI M, CERNIGOI AM, DE MONTE A et al. Long-term (12 months) treatment with an anti-oxidant drug (silymarin) is effective on hyperinsulinemia, exogenous insulin need and malondialdehyde levels in cirrhotic diabetic patients. *J Hepatol*, 1997, 26 : 871-879.
78. DE MATTIA G, BRAVI MC, LAURENTI O et al. Influence of reduced glutathione infusion on glucose metabolism in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 1998, 47 : 993-997.
79. PATANE G, PIRO S, RABUAZZO AM et al. Metformin restores insulin secretion altered by chronic exposure to free fatty acids or high glucose : a direct metformin effect on pancreatic beta-cells. *Diabetes*, 2000, 49 : 735-740.
80. HERCBERG S, PREZIOSI P, BRIANCON S et al. A primary prevention trial using nutritional doses of antioxidant vitamins and minerals in cardiovascular diseases and cancers in a general population : the SU.VI.MAX study-design, methods, and participant characteristics. *Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants. Control Clin Trials*, 1998, 19 : 336-351.