

Université de Montréal

**L'œil et ses malaises : une histoire à retracer**  
**Effet délétère de l'inflammation médiée par interleukine-1 sur le**  
**développement nerveux et vasculaire de l'œil**

par Alexandra Beaudry-Richard

Département de neurosciences  
Faculté de médecine

Mémoire présenté  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise  
en neurosciences

Février, 2019

© Alexandra Beaudry-Richard, 2019

## Résumé

L'inflammation est une composante importante de la naissance prématurée (NP) et a été indépendamment liée à plusieurs morbidités périnatales, dont la cécité. Cependant, l'effet de l'inflammation gestationnelle médiée par l'interleukine (IL)-1 sur le développement oculaire n'a pas encore été défini. Nous avons étudié l'impact de l'inflammation sur le développement de la rétine, des vaisseaux rétiniens et de la choroïde grâce à un modèle murin de NP induite par IL-1, en plus de tester une nouvelle approche thérapeutique ciblant le récepteur IL-1R. Des souris enceintes ont reçu une injection d'IL-1 *in utero* afin d'induire la NP. Certaines souris ont reçu des injections sous-cutanées d'antagonistes d'IL-1R : 101.10 (non compétitif) ou Kineret (compétitif). Les yeux de la progéniture ont été prélevés pour mesurer l'expression génique pro-inflammatoire, augmentée pour *Casp1*, *Il1b*, *Il8* et *Il12*. Suite à l'induction prénatale d'une inflammation, des cellules inflammatoires infiltrèrent chroniquement la rétine et la choroïde. Après la naissance, ces souriceaux ont subi un ralentissement de croissance des vaisseaux rétiniens et un amincissement de la choroïde, et subséquemment de la rétine. Cela a causé des déficits fonctionnels à l'électrorétinographie, où l'amplitude de l'onde b est réduite. L'administration anténatale de 101.10 a protégé la progéniture des effets délétères de l'IL-1, contrairement à Kineret. L'inflammation utérine génère donc une réponse inflammatoire dans l'œil du fœtus, qui nuit au développement normal des vaisseaux, induisant une dégradation de la rétine et de sa fonction. Nous suggérons l'administration anténatale de 101.10 pour protéger le fœtus de l'inflammation et de ses conséquences sur la vision.

**Mots-clés :** inflammation, interleukine-1, rétine, choroïde, angiogenèse, électrorétinographie, prématurité, souris, 101.10, Kineret.

## Abstract

Inflammation has an important role in preterm birth (PTB) and has been independently linked to many perinatal morbidities, including blindness. However, the specific role of gestational inflammation mediated by the interleukin (IL)-1 on vascular development in the eye hasn't yet been defined. Using a murine model of IL-1 induced PTB, we studied that role in the developing retina and choroid, while testing a novel therapeutic approach targeting the IL-1 receptor, IL-1R. Pregnant mice were injected with IL-1 *in utero* to induce PTB. Subcutaneous injections of IL-1R antagonists were received by some of them: 101.10 (non-competitive) or Kineret (competitive). Progeny's eyes were collected to measure inflammatory gene expression, which was elevated for *Casp1*, *Il1b*, *Il8* and *Il12*. After the prenatal induction of inflammation, inflammatory cells infiltrate the retina and choroid before birth and stay present throughout development. After birth, pups exposed to IL-1 during gestation suffer from retinal vessel growth delay, choroidal and subsequent retinal thinning. This causes functional deficits on electroretinography, seen as a diminished b-wave amplitude. Antenatal administration of 101.10 was efficient in preventing those damages, whereas Kineret had a variable effect. Thus, uterine inflammation generates an inflammatory response in the eyes of the fetus, impairing vascular and retinal development and function. We suggest antenatal administration of 101.10 to protect the fetal eyes from deleterious inflammation and potential consequences on vision.

**Keywords:** inflammation, interleukin-1, retina, choroid, angiogenesis, electroretinography, prematurity, mouse, 101.10, Kineret.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures .....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des sigles .....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xiii
1. Introduction.....	1
1.1 Le développement normal de l'œil .....	2
1.1.1 Le développement rétinien.....	2
1.1.2 Le développement vasculaire.....	7
1.1.2.1 La choroïde .....	7
1.1.2.2 Les vaisseaux rétiniens .....	8
1.1.2.3 Le guidage vasculaire .....	10
1.2. La naissance prématurée .....	13
1.2.1 Conséquences de la prématurité sur le développement .....	13
1.2.1.1 Le syndrome de réponse inflammatoire fœtale.....	15
1.3. L'inflammation .....	15
1.3.1 Interleukine-1 .....	17
1.3.2 Antagonistes du récepteur d'interleukine-1 .....	18
1.3.2.1 101.10.....	19
2. Hypothèse et objectifs de la recherche.....	21
3. Méthodologie .....	22
3.1 Animaux.....	22
3.2 Produits chimiques.....	22
3.3 Modèle animal de naissance prématurée induite par IL-1 $\beta$ .....	22
3.4 Modèle animal de naissance prématurée induite sans inflammation.....	23
3.5 Prélèvement des tissus en pré-natal .....	23

3.6	Prélèvement des tissus en post-natal.....	24
3.7	Extraction d'ARN et réaction par polymérase en chaîne quantitative en temps réel .	24
3.8	Méthode d'immuno-enzymologie ELISA .....	25
3.9	Prélèvement et fixation des yeux .....	25
3.10	Immunofluorescence.....	26
3.11	Montage à plat de rétines et de choroïdes.....	26
3.12	Quantification histologique.....	27
3.13	Électrorétinographie.....	27
3.14	Analyse statistique .....	28
4.	Résultats – Article.....	29
4.1	Abstract.....	31
4.2	Introduction.....	32
4.3	Methods.....	35
4.3.1	Animals .....	35
4.3.2	Chemical products .....	35
4.3.3	Animal model of PTB induced by IL-1 $\beta$ .....	35
4.3.4	Animal model of PTB without inflammation .....	36
4.3.5	Prenatal tissue collection.....	36
4.3.6	Postnatal tissue collection .....	37
4.3.7	RNA extraction and Real-Time quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) .....	37
4.3.8	Immuno-enzymology method ELISA.....	38
4.3.9	Eye collection and fixation .....	38
4.3.10	Immunofluorescence.....	39
4.3.11	Retinal and choroidal flat mounts .....	39
4.3.12	Histological quantification.....	40
4.3.13	Electroretinography.....	40
4.3.14	Statistical analysis.....	41
4.3.15	Data Availability .....	42
4.4	Results.....	43

4.4.1 In utero exposure to IL-1 $\beta$ causes an acute perinatal inflammatory response in the foetal retina and sub-retina.....	43
4.4.2 Iba1 <sup>+</sup> cell accumulation persists post-natally in retina and choroid of newborns subjected in utero to inflammation .....	44
4.4.3 Chorioamnionitis leads to persistent ocular inflammation in newborn offspring associated with impaired retinal vascular development and choroidal involution .....	45
4.4.4 Retinal structural and functional deficits in offspring secondary to gestational tissue-triggered inflammation.....	46
4.5 Discussion.....	48
4.6 Acknowledgments.....	53
4.7 Author contributions .....	54
4.8 Figures.....	55
4.9 Tables.....	62
5. Discussion générale .....	63
6. Conclusion .....	70
7. Bibliographie.....	xiv

## Liste des figures

<b>Figure 1.1   Les couches de la rétine.....</b>	<b>3</b>
<b>Figure 1.2   Origine embryonnaire de l'œil. ....</b>	<b>4</b>
<b>Figure 1.3   La mitose cyclique de la neurorétine. ....</b>	<b>6</b>
<b>Figure 1.4   Le guidage des vaisseaux rétiniens.....</b>	<b>11</b>
<b>Figure 4.1   Murine model of inflammation-induced PTB employed for the study.....</b>	<b>55</b>
<b>Figure 4.2   Inflammatory response in the retina and sub-retina of the foetus and newborn. .....</b>	<b>56</b>
<b>Figure 4.3   Infiltration of immune cells in eyes during development of the pups.....</b>	<b>57</b>
<b>Figure 4.4   Delay of retinal vessel growth in progeny.....</b>	<b>58</b>
<b>Figure 4.5   Choroidal thinning precedes retinal degeneration and thinning of the inner nuclear layer.....</b>	<b>60</b>
<b>Figure 4.6   Electroretinogram readings after completion of ocular development.....</b>	<b>61</b>

## Liste des tableaux

<b>Table I</b>   Forward and reverse sequences of primers used for RT-qPCR gene analysis .....	62
--	----



## Liste des sigles

Alk : kinase homologue du récepteur de l'activine

AP-1 : Protéine activatrice-1

CC : Chorio-capillaire

CCG : Couche des cellules ganglionnaires (GCL : *Ganglion cell layer*)

CNE : Couche nucléaire externe (ONL : *Outer nuclear layer*)

CNI : Couche nucléaire interne (INL : *Inner nuclear layer*)

CPE : Couche plexiforme externe (OPL : *Outer plexiform layer*)

CPI : Couche plexiforme interne (IPL : *Inner plexiform layer*)

CXCR4 : C-X-C-récepteur de chimiokines-4

EPR : Épithélium pigmentaire rétinien

FIRS : Syndrome de réponse inflammatoire fœtale

IL-1 : Interleukine-1

IL-1R : Récepteur de l'interleukine-1

INF : Interféron

MAPK : Kinases protéines activées mitogènes

NF- $\kappa$ B : Facteur nucléaire kappa-B

NP : Naissance prématurée

PDGF-A : Facteur de croissance dérivé de plaquettes-A

PDGFR : Récepteur du facteur de croissance dérivé de plaquettes-A

PTB : Preterm birth

ROP : Rétinopathie du prématuré

UAP : Protéines d'activation utérine.

VEGF : Facteur de croissance endothélial vasculaire

VEGFR : Récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire

# Liste des abréviations

Etc. : Et cætera

*À ma mère, Jeanne*

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier mes deux directeurs de recherche, Sylvain Chemtob et Jean-François Bouchard, grâce à qui ce travail fut rendu possible. Ensuite, Mathieu Nadeau-Vallée, qui s'est activement impliqué durant tout le projet. Christiane Quiniou, qui a été d'un soutien intellectuel indispensable durant ma maîtrise. Merci à Xin Hou, José Carlos Rivera, Amarilys Boudreault, Ankush Madaan, Estefania Marin Sierra et Mohammad Nezhady qui ont contribué aux nombreuses expériences délicates, tout en m'enseignant. Noémie Maurice, Elizabeth Prairie et Alexandre Beaulac ont été des étudiants excellents dont le travail a porté ses fruits dans l'article présenté. Merci à Sheetal Pundir et Émilie Heckel, du laboratoire de Jean-Sébastien Joyal, qui ont contribué aux expériences fonctionnelles. Gregory Lodygensky, Sarah A. Robertson, Jeffrey Keelan, Kristina Adams-Waldorf, David M. Olson et William D. Lubell pour leurs conseils et révisions. Merci à ma collègue et amie Lucia Chehade, dont les talents en dessin ont été mis à contribution dans ce mémoire (voir Figure 1.1).

Tout spécialement, un merci à Joseph Bouskila, qui fut le premier à instiller en moi le désir de la recherche, au tout début de mon parcours.

Finalement, j'aimerais remercier le département d'ophtalmologie de l'Université de Montréal, les Instituts de recherche en santé du Canada et les Fonds de recherche du Québec en santé pour leur soutien financier.

# 1. Introduction

Le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans la physiologie humaine normale (Parham 2014). Lorsqu'un pathogène parvient à pénétrer la première barrière physique de la peau, la température du corps et la présence abondante de nutriments lui confèrent l'environnement idéal pour sa croissance et sa multiplication. Il est donc essentiel que le corps possède un mécanisme interne de défense contre les éléments étrangers qui peuvent envahir les tissus et causer des dommages à l'organisme. Ce système de défense agit en deux étapes : d'abord, le système inné reconnaît des motifs sur les bactéries, virus ou fungi et réagit rapidement pour détruire le pathogène. Les cellules typiquement associées à ce système sont les macrophages, servant de « gardes du corps » dans les tissus et experts de la phagocytose, et les cellules dendritiques, qui migrent aux nœuds lymphatiques pour alerter le second système. Celui-ci, le système adaptatif, construit une réponse lente, mais ciblée contre un motif précis qui a été présenté par les cellules dendritiques aux lymphocytes T et B. Ces derniers travaillent ensuite de concert pour amplifier la réaction inflammatoire et former des anticorps de reconnaissance afin de guider les macrophages dans leur combat. À noter, le cerveau possède un type de cellules immunitaires distinct : la microglie. Dérivée des cellules myéloïdes primitives, elle peut reconnaître la présence de dommage cérébral et affaiblir la barrière hématoencéphalique afin de recruter d'autres cellules immunitaires au besoin (Boche, Perry et al. 2013, Xiong, Liu et al. 2016). C'est pour cette raison que dans les processus inflammatoires ayant lieu dans le cerveau, nous pouvons souvent observer la présence de microglie en grand nombre, en plus de macrophages venus de la circulation sanguine (Kim and Cho 2016).

Ainsi, le système immunitaire joue un rôle important dans la survie de l'organisme. Cependant, une suractivation de ce système ou une activation inappropriée peut causer de nombreux dommages. Par exemple, une femme enceinte doit vivre en harmonie avec un corps étranger qui croît dans son utérus. Cette homéostasie fragile peut facilement se rompre lors d'une infection, d'une rupture de membranes, d'un bris de la tolérance materno-fœtale ou autre perturbateur, et la réaction immunitaire de la femme entraîne le rejet du fœtus (Goldenberg, Culhane et al. 2008). Si ce rejet a lieu avant la 37<sup>e</sup> semaine de gestation, on parle alors de naissance prématurée.

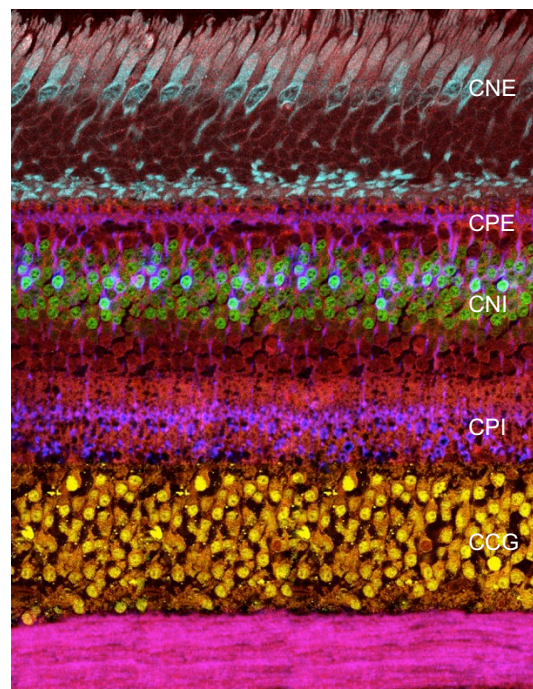
Tandis que le phénomène de naissance prématurée est bien connu, peu d'études se sont penchées sur l'effet de l'inflammation gestationnelle sur le devenir de l'enfant. Particulièrement, l'effet de la présence d'interleukine (IL)-1 – une puissante molécule pro-inflammatoire – sur le développement de l'œil n'a jamais été étudié. Ce travail tente de répondre à cette question, tout en suggérant de cibler son récepteur, IL-1R, afin de prévenir les dommages encourus par la progéniture en développement.

## **1.1 Le développement normal de l'œil**

### **1.1.1 Le développement rétinien**

La rétine des vertébrés est divisée en trois couches de cellules : 1) la couche nucléaire externe (CNE), celle des photorécepteurs qui comprend chez l'humain les cônes et les bâtonnets ; 2) la couche nucléaire interne (CNI), celle des cellules bipolaires dans laquelle cohabitent les cellules horizontales, amacrines et les cellules gliales de Müller et ; 3) la couche des cellules

ganglionnaires (CCG), dont les axones forment le nerf optique pour transmettre l'influx nerveux visuel au cerveau (Stenkamp 2015). Des réseaux de synapses se forment entre ces couches nucléaires : la couche plexiforme externe (CPE) se situe entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires et rassemble leurs synapses ainsi que celles des cellules horizontales. Finalement, la couche plexiforme interne (CPI) regroupe les synapses des cellules bipolaires et ganglionnaires, en plus de contenir celles des cellules amacrines (Figure 1.1).

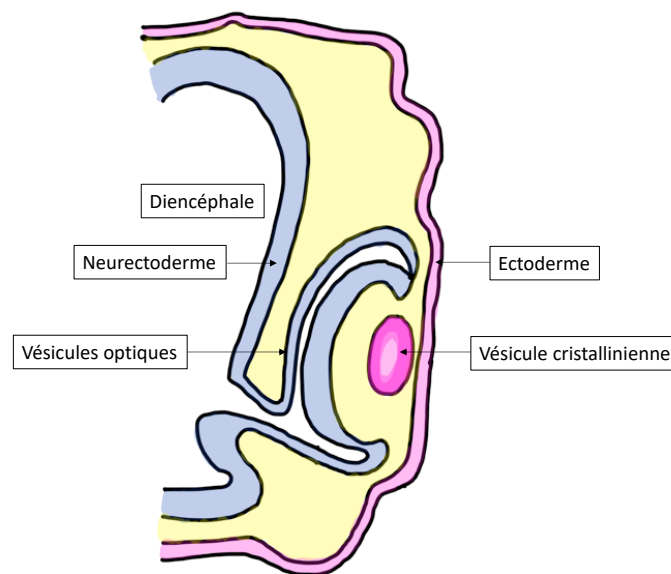


**Figure 1.1 | Les couches de la rétine.**

La rétine est divisée en 5 couches principales : 1) la CNE, qui contient les noyaux des photorécepteurs ; 2) la CPE, où se font les synapses entre les cellules de la CNE et de la CNI ; 3) la CNI avec les noyaux des cellules bipolaires ; 4) la CPI, où se font les synapses entre la CNI et la CCG, et ; 5) la CCG, dont les axones projettent au cerveau. CNE : couche nucléaire externe ; CPE : couche plexiforme externe ; CNI : couche nucléaire interne ; CPI : couche plexiforme interne ; CCG : couche des cellules ganglionnaires. (Page de couverture du journal *Neuroscience*, volume 202, 27 janvier 2012). *Utilisé avec la permission de Joseph Bouskila, auteur de la photo.*



Il s'agit donc d'un organe complexe, dont la croissance embryonnaire doit se faire avec la plus grande cohérence. Tout d'abord, l'ectoderme se replie pour former un tube, dont chaque partie donnera naissance à différentes structures du système nerveux. C'est à partir du diencephale, dans la partie antérieure du tube neural, que la rétine prendra son origine (Figure 1.2). D'abord, des fentes optiques se creusent dans le neurectoderme jusqu'à s'invaginer et former les vésicules optiques, bilatéralement (Wolpert, Tickle et al. 2017). En même temps, une invagination de la surface inférieure des vésicules optiques se forme : la fissure choroïdienne. Alors que les vésicules optiques gonflent, elles parviennent à toucher l'ectoderme de surface, qui s'invagine pour former la placode cristallinienne. Lorsque celle-ci se détache de l'ectoderme, elle forme la vésicule cristallinienne, qui deviendra le cristallin (Wolpert, Tickle et al. 2017).

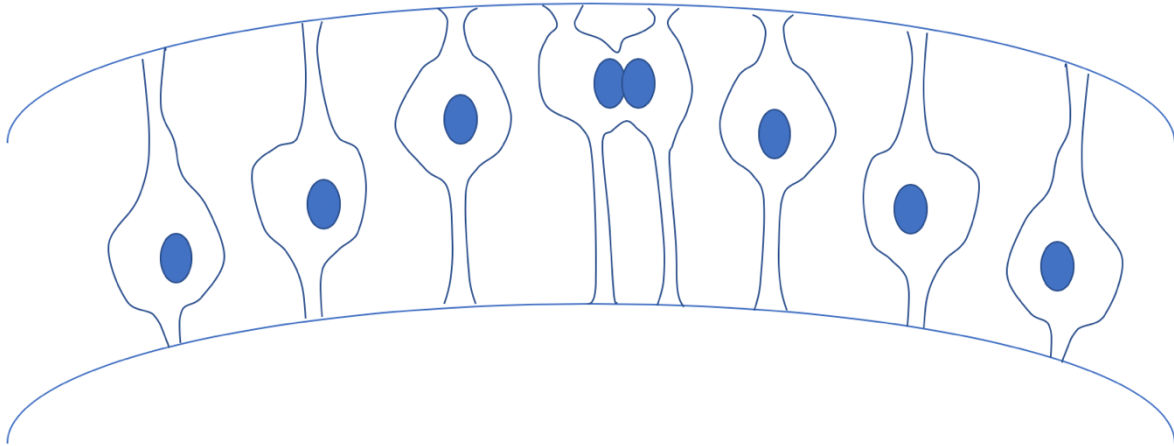


**Figure 1.2 | Origine embryonnaire de l'œil.**

Le neurectoderme au niveau du diencephale forme les vésicules optiques qui deviendront la partie postérieure de l'œil (EPR et rétine). Le cristallin, quant à lui, se forme à partir des vésicules cristalliniennes provenant de l'ectoderme de surface. *Dessin original de Lucia Chegade, utilisé avec permission.*

La cupule optique est formée de 2 couches : la couche neurale et la couche pigmentée, séparées par l'espace intrarétinien. Les deux couches se rejoignent pour faire disparaître l'espace intrarétinien, et la couche pigmentée devient l'épithélium pigmentaire (Retinal Pigmentary Epithelium; RPE) tandis que les 4/5 postérieurs de la couche neurale forme la Pars Optica Retinae pour devenir la rétine, et les 1/5 antérieurs deviennent la Pars Ceca Retinae, pour devenir les corps ciliaires, la partie intérieure non pigmentée de l'iris et les muscles pupillaires. Cette évolution morphologique précise est guidée par l'expression de divers gènes en fonction des axes antéro (cornée)-postérieur (RPE), dorsal-ventral, nasal-temporal et central-périphérique – cela ne sera cependant pas discuté ici (Heavner and Pevny 2012).

À ce moment, la Pars Optica Retinae est à un stade de prolifération neuroépithéliale. Cette prolifération est caractérisée par des mitoses cycliques qui formeront graduellement les différentes couches rétinienne (Figure 1.3). Éventuellement, la Pars Optica Retinae sera constituée de 3 couches primitives : la couche fibreuse, constituée par les axones ganglionnaires, la couche neuroblastique interne, où se différencient les cellules bipolaires et ganglionnaires, puis la couche neuroblastique externe, d'où émergent les cônes et les bâtonnets. Les axones de la couche fibreuse se réunissent finalement pour former la tige optique, qui deviendra le nerf optique (Graw 2010). L'ordre de formation de ces couches varie d'une espèce à l'autre, mais chez l'humain les cellules amacrines et ganglionnaires sont les premières à former des synapses fonctionnelles, suivies par les photorécepteurs puis finalement par les cellules bipolaires (Sernagor, Eglén et al. 2006). De plus, cette différenciation rétinienne suit un patron en éventail, au point de départ ventral, puis nasal, dorsal, pour se compléter en temporal.



**Figure 1.3 | La mitose cyclique de la neurorétine.**

L'ectoderme de la vésicule optique ne forme qu'une seule couche cellulaire, où les cellules subissent des mitoses cycliques jusqu'à former les différentes couches de la rétine. Dans ce processus, les noyaux migrent vers le pôle opposé pour aller se séparer et ainsi former d'autres cellules. Ces dernières se différencieront en cellules amacrines et ganglionnaires, en photorécepteurs puis en cellules bipolaires pour finir le processus de formation de la rétine.

Cependant, la rétine ne se développe pas uniformément. Au point central du champ visuel, les photorécepteurs doivent recevoir un maximum de lumière directe pour favoriser l'acuité visuelle. Ainsi, les autres cellules des couches plus internes se tassent pour laisser un creux : la fovéa (Hendrickson 2016). Cette région essentielle pour la vision ne peut pas être irriguée par les vaisseaux rétiniens, tel que discuté plus bas. C'est donc la choroïde qui devra assurer un apport suffisant en oxygène par diffusion ; cela est possible grâce à la minceur de cette partie de la rétine et la pression d'oxygène qui y est mesurée est constante par rapport au reste de la rétine (Ahmed, Braun et al. 1993).

## **1.1.2 Le développement vasculaire**

Durant la période embryonnaire, l'œil en développement est nourri par les vaisseaux hyaloïdes, qui entrent dans l'œil par la fissure optique pour irriguer la cupule et la vésicule cristallinienne en traversant l'humeur vitrée. Le drainage veineux des artères hyaloïdes se fait par la choroïde (Graw 2010). À la naissance chez la souris ou au 4<sup>e</sup> mois de gestation chez l'humain, les vaisseaux rétiniens qui émergent du disque optique prendront éventuellement le relais et assureront l'apport sanguin de la rétine, tandis que les artères hyaloïdes disparaîtront par apoptose à partir de la 13<sup>e</sup> semaine chez l'humain, et durant la première semaine postnatale chez la souris (Zhu, Madigan et al. 2000, Figg and Folkman 2008).

### **1.1.2.1 La choroïde**

C'est le processus d'angiogenèse, c'est-à-dire de prolifération à partir de vaisseaux sanguins déjà existants, qui caractérise le développement choroïdien (Lutty and McLeod 2018).

La choroïde commence son développement vers la 6<sup>e</sup> semaine de gestation chez l'humain, lorsque des érythroblastes forment des îlots sanguins postérieurement à la couche pigmentée (Hasegawa, McLeod et al. 2007). À la semaine 7, la formation d'une fine couche de capillaires est terminée ; elle se nomme alors la couche chorio-capillaire (CC) (Lutty and McLeod 2018). C'est vers la 12<sup>e</sup> semaine que la CC prolifère vers l'extérieur pour former une choroïde plus épaisse. Cette maturation commence au pôle postérieur et se répand graduellement en périphérie jusqu'à la 22<sup>e</sup> semaine. À cet âge, on y trouve déjà des muscles lisses et des fenestrations, deux caractéristiques de la choroïde adulte (Baba, Grebe et al. 2009). À noter, la

maturation de la choroïde correspond au développement du segment interne des photorécepteurs et au début de leur activité métabolique, qui a lieu également à la 22<sup>e</sup> semaine (Lutty and McLeod 2018).

Cette prolifération choroïdienne est particulièrement active dans la région de la fovéa, où la prolifération neurorétinienne est très active. Effectivement, puisque les vaisseaux rétinien n'atteindront jamais cette région (la précision visuelle requiert un passage de la lumière sans obstacle) c'est la choroïde qui est responsable de l'apport nutritionnel de la fovéa en croissance (Allende, Madigan et al. 2006).

Peu d'information existe sur la chronologie du développement choroïdien chez la souris. Celle-ci se développe de façon progressive depuis le début de la formation de l'œil *in utero* jusqu'à tard dans le développement post-natal (Kur, Newman et al. 2012). Des études montrent que la choroïde est particulièrement fragile aux changements dans son environnement moléculaire entre le 10<sup>e</sup> jour embryonnaire et le 7<sup>e</sup> jour postnatal, surtout lorsque l'expression du Facteur de croissance endothélial vasculaire (*Vegf*) est altérée (Le, Bai et al. 2010). Il s'agirait donc d'une période critique pour le développement sain de la vascularisation des photorécepteurs. Cependant, même des atteintes tardives à l'âge adulte peuvent affecter le fonctionnement des cellules irriguées par la choroïde : les photorécepteurs (Zhou, Rivera et al. 2016).

### **1.1.2.2 Les vaisseaux rétinien**

Durant la gestation, les vaisseaux hyaloïdes sont responsables de l'apport sanguin de l'intérieur de l'œil. Cependant, ces artères obstrueraient le passage de la lumière vers la rétine

et doivent donc être éliminées et remplacées par les vaisseaux réiniens. Tel que nous le verrons, les vaisseaux réiniens suivent un processus de vasculogénèse complexe ; ce sera d'ailleurs le dernier système de vaisseaux oculaires à se former. Contrairement à la choroïde, les vaisseaux réiniens se forment par vasculogénèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux primaires grâce à la différenciation de cellules endothéliales précurseurs (Hughes, Yang et al. 2000).

Chez le fœtus humain, quelques angioblastes sont observés dès la 7<sup>e</sup> semaine de gestation dans la tige optique ainsi que dans les couches internes de la rétine (Lutty and McLeod 2018). Ces angioblastes expriment le récepteur C-X-C-récepteur de chimiokines-4 (CXCR4). Son ligand, le facteur dérivé du stroma (Stroma-derived-factor; SDF)-1, possède un gradient plus élevé dans la région antérieure de l'œil et induit ainsi la migration des angioblastes. Ce processus de migration vers la rétine débute aux semaines 12 à 14 de gestation chez l'humain (Hasegawa, McLeod et al. 2008).

La vascularisation réinienne croît en étoile vers la périphérie, tout en évitant la zone de la macula, grâce à un niveau élevé en récepteur de facteur de croissance endothélial vasculaire 2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2; VEGFR2) dans cette région. Contre intuitivement, VEGFR2 absorbe son ligand, le VEGF, et donc réduit les signaux de croissance vasculaire. Ainsi, les neurones de la macula absorbent le VEGF et ainsi repoussent la croissance vasculaire à proximité, ce qui nuit au passage de la lumière (Okabe, Kobayashi et al. 2014). Vers les semaines 25-26 de gestation chez l'humain, le réseau profond de capillaires se forme par angiogénèse à partir des vaisseaux réiniens (Hughes, Yang et al. 2000).

La fovéa reste avasculaire durant tout le développement, ainsi que la vie adulte (Provis and Hendrickson 2008). Cela serait dû à la présence de facteurs anti-angiogéniques, particulièrement le facteur pigmentaire dérivé d'épithélium (Pigment Epithelium-Derived Factor; PEDF) et le peptide cérébral natriurétique (Brain Natriuretic Peptide; BNP), deux facteurs anti-angiogéniques qui inhibent le VEGF (Kozulin, Natoli et al. 2010).

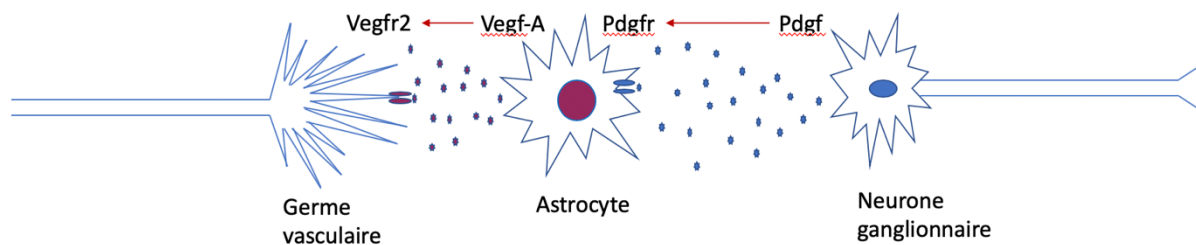
Chez la souris, c'est le décours temporel de la croissance des vaisseaux qui diffère le plus de chez l'humain. Effectivement, le réseau superficiel de vaisseaux rétiniens se forme durant la première semaine après la naissance, puis les couches profondes se complètent jusqu'à la 3<sup>e</sup> semaine de vie, ce qui en fait un modèle particulièrement intéressant pour étudier la vasculogénèse puisque celle-ci peut être suivie *in vivo* en postnatal (Stahl, Connor et al. 2010).

### **1.1.2.3 Le guidage vasculaire**

Le remodelage vasculaire peut se faire de deux manières : par élagage des vaisseaux, un processus dépendant du VEGF (Benjamin, Golijanin et al. 1999), ou par guidage des vaisseaux, comme dans la rétine, où les astrocytes guident la croissance des vaisseaux de manière non aléatoire (Gerhardt, Golding et al. 2003).

Les cellules ganglionnaires de la rétine sécrètent le facteur de croissance dérivé de plaquettes-A (Platelet-Derived Growth Factor-A; PDGF-A), qui attire les astrocytes possédant le récepteur PDGFR $\alpha$  (Fruttiger, Calver et al. 1996). Les astrocytes émergent de la tige optique (Watanabe and Raff 1988) et migrent vers la rétine en longeant les fibres des neurones ganglionnaires, talonnés de près par les vaisseaux rétiniens qui les suivent dans leur course (Ling and Stone 1988). La sécrétion de VEGF par les astrocytes permet le guidage de filopodes des

cellules endothéliales spécialisées, en stimulant le récepteur VEGFR2 au bout des bourgeons vasculaires (Figure 1.4) (Gerhardt, Golding et al. 2003).



**Figure 1.4 | Le guidage des vaisseaux rétiniens.**

Les neurones ganglionnaires sécrètent PDGF, qui attire la migration des astrocytes de la tige optique en stimulant leur récepteur PDGFR. Les astrocytes attirent les bourgeons vasculaires à les suivre dans leur course grâce à la sécrétion de VEGF-A, qui stimule les récepteurs VEGFR2 sur les nouveaux vaisseaux. PDGF : facteur de croissance dérivé de plaquettes-A ; PDGFR : récepteur du facteur de croissance dérivé de plaquettes-A ; VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire ; VEGFR : récepteur de facteur de croissance endothélial vasculaire.

Plusieurs autres facteurs contribuent aussi au guidage vasculaire rétinien. Afin de restreindre les vaisseaux rétiniens en croissance à la surface des fibres ganglionnaires, les neurones sécrètent Semaphorine 3E, un facteur anti-angiogénique qui empêche la pénétration précoce des vaisseaux dans les couches profondes de la rétine (Selvam, Kumar et al. 2018). Récemment, Slit2 a révélé un pouvoir pro-angiogénique en association avec Robo1 et Robo2, qui agissent directement sur les cellules des vaisseaux sanguins afin de promouvoir leur croissance (Rama, Dubrac et al. 2015). Des partenaires moléculaires s'assurent aussi de diriger les vaisseaux les uns par rapport aux autres. Par exemple, le ligand Notch reconnaît la présence



de Jagged1 sur les tiges vasculaires, afin que les bourgeons vasculaires, exprimant plutôt l'homologue de delta-4, s'en éloignent (Hellstrom, Phng et al. 2007, Benedito, Roca et al. 2009). De plus, ce système communique avec une kinase de la famille des récepteurs TGF- $\beta$ /BMP, la kinase homologue du récepteur de l'activine (alk)-1, afin de limiter l'expansion des bourgeons vasculaires en croissance (Larrivee, Prahst et al. 2012).

Lorsque ces systèmes de régulation angiogénique sont déréglés dans un contexte d'inflammation, ils peuvent perturber la croissance vasculaire et causer l'ischémie de l'organe cible. Par exemple, l'hyperoxie induit la sécrétion de sémaphorine 3A par les cellules ganglionnaires, ce qui cause la vaso-oblitération caractéristique du modèle de rétinopathie induite par l'oxygène et prévient la régénération (Joyal, Sitaras et al. 2011, Rivera, Sitaras et al. 2013). Par ailleurs, dans le même modèle, l'induction de BMP9 et Alk1 interfère avec le signal de VEGF ce qui protège contre la néovascularisation, phénomène de croissance vasculaire chaotique menant au détachement de la rétine chez l'enfant atteint de rétinopathie du prématuré (Ntumba, Akla et al. 2016).

Les mécanismes énumérés ci-haut n'offrent qu'un aperçu des multiples processus moléculaires permettant le guidage vasculaire lors du développement fœtal. Les signaux qui permettent aux vaisseaux de pénétrer dans les couches plus profondes de la rétine sont encore mal connus (Selvam, Kumar et al. 2018). La robustesse et la précision de la formation des vaisseaux sanguins du corps humain reste un phénomène mystérieux. La complexité des interactions moléculaires en jeu n'est que partiellement comprise, et de nombreuses découvertes dans ce domaine sont encore à venir.

## **1.2. La naissance prématurée**

La prématurité (naissance prématurée ; NP) est causée par l'accouchement précoce, c'est-à-dire avant la 37<sup>e</sup> semaine de gestation, et touche environ 15 millions d'enfants par année à travers le monde. Il s'agit de la première cause mondiale de mortalité infantile, et les survivants sont à risque de développer de sérieuses conséquences à long terme (Liu, Oza et al. 2015). Aux États-Unis, 9,57% des nouveau-nés sont touchés par année (Murphy, Mathews et al. 2017), ce qui coûte environ 26,2 milliards \$US par année sans compter les dépenses à long terme (Institute of Medicine Committee on Understanding Premature and Assuring Healthy 2007). Malheureusement, aucun traitement ne peut à ce jour efficacement arrêter le travail prématuré lorsque celui-ci est enclenché (Blencowe, Cousens et al. 2013).

### **1.2.1 Conséquences de la prématurité sur le développement**

À la naissance, de nombreux organes sont toujours en développement, ce qui rend l'enfant vulnérable à l'environnement extra-utérin hostile. Dans le cas d'une naissance prématurée, l'exposition précoce à cet environnement peut engendrer de nombreuses conséquences délétères sur différents organes centraux, tels le poumon, l'intestin, le cerveau et l'œil (Hsueh, Caplan et al. 2003, Hou, Norcia et al. 2011, Iliodromiti, Zygouris et al. 2013, Raffa, Dahlgren et al. 2016).

Le développement rétinien est particulièrement affecté, car la croissance neuronale est sensible aux variations subtiles dans le milieu moléculaire, et un état ischémique peut facilement s'installer (Yanni, Wang et al. 2012, Gishti, Jaddoe et al. 2015). Cela prédispose les enfants

prématurés au développement de maladies oculaires et, éventuellement, à la cécité (Hartnett 2015).

La production d'espèces d'oxygène réactive (ROS : *Reactive oxygen species*) est un facteur clé dans le développement de dommage chez les fœtus, principalement parce que la machinerie moléculaire protégeant la cellule des ROS n'est pas encore mise en place (Hardy, Beauchamp et al. 2005). Les ROS sont produits par différentes organelles de la cellule, dont les mitochondries via la chaîne de transport des électrons impliquée dans la production d'ATP, et induisent de nombreux dommages en déstabilisant la membrane lipidique, en endommageant l'ADN mitochondrial et en perturbant diverses enzymes (Rimessi, Previati et al. 2016). L'alternance entre un milieu hyper- et hypoxique, tel que lors d'une naissance prématurée, cause une augmentation de la création de ROS et celle-ci ne peut pas être compensée par les mécanismes antioxydants de la cellule adulte : les vitamines C et E, la superoxyde dismutase, la métallothionéine, l'oxygénase et la catalase hème (Wilkinson-Berka, Rana et al. 2013).

Les ROS sont également étroitement associés à l'inflammation (Elliott and Sutterwala 2015). Dans le cytosol, des assemblages protéiques complexes nommés inflammasomes servent de signal d'alarme intracellulaire. Normalement inactifs, ces inflammasomes ont le pouvoir de déclencher une réponse inflammatoire et la mort cellulaire au besoin (pour combattre une infection, par exemple). L'augmentation de ROS peut activer l'inflammasome NLRP3 (*Nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain containing-3*), contenant l'enzyme inactive pro-caspase-1 (Heid, Keyel et al. 2013). Une fois activée, Caspase-1 clive le précurseur d'une cytokine inflammatoire redoutable : interleukine (IL)-1 $\beta$ . Cette dernière a un effet pléiotrope puissant sur la cascade inflammatoire et peut entraîner de nombreux dommages chez le nouveau-né, tel qu'observé dans le syndrome de

réponse inflammatoire fœtale (*fetal inflammatory response syndrome*; FIRS) (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016).

### **1.2.1.1 Le syndrome de réponse inflammatoire fœtale**

Le FIRS est défini par la présence d'interleukine (IL)-6 dans le sang fœtal, reflétant un état inflammatoire systémique (Gotsch, Romero et al. 2007). La présence élevée d'IL-6 et de TNF $\alpha$  chez la mère enceinte est un fort prédicteur de FIRS (Kunze, Klar et al. 2016). Le FIRS est associé à un âge de gestation plus court et à un mauvais pronostic dû aux effets systémiques de l'inflammation sur le nouveau-né (Hofer, Kothari et al. 2013). Effectivement, le FIRS met l'enfant à haut risque de septicémie, de syndrome de détresse respiratoire, d'entérocolite nécrosante et d'hémorragie intraventriculaire (Gomez, Romero et al. 1998, Bastek, Weber et al. 2014). Lorsque le FIRS est détecté, l'accouchement est provoqué (chez les fœtus >28 semaines) et le nouveau-né reçoit un traitement de glucocorticoïdes et des antibiotiques, en plus d'un traitement pour accélérer la maturation des poumons (Kunze, Hart et al. 2011). Récemment, ce syndrome a été associé à des pathologies périnatales de l'œil, telle la rétinopathie du prématuré (retinopathy of prematurity; ROP) (Sood, Madan et al. 2010). Un rôle de l'inflammation a donc été suggéré dans la ROP, mais à ce jour peu de travaux soutiennent cette hypothèse.

## **1.3. L'inflammation**

Le système immunitaire et l'inflammation sont des acteurs importants dans la gestation normale, afin de favoriser la tolérance materno-fœtale, mais aussi pour induire le rejet du fœtus

– l'accouchement – à terme. Par exemple, des cytokines anti-inflammatoires telles l'IL-10, sont prédominantes durant les 2 premiers trimestres (Hanna, Hanna et al. 2000). À terme, l'expression d'IL-10 diminue et c'est IL-1 $\beta$  qui prend le relai pour déclencher le travail en générant une réponse inflammatoire.

La pathophysiologie de la naissance prématurée n'est pas encore parfaitement comprise, mais les différentes causes semblent converger vers la même cascade d'événements menant au travail précoce (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016). Lors d'un événement déclencheur, telle une infection ou la rupture de membranes, les cellules présentent à leur surface des motifs moléculaires associés aux dommages, ou des motifs moléculaires associés aux pathogènes dans le cas d'une infection. Ces motifs activent les récepteurs de type Toll à la surface des cellules immunitaires, qui produisent une réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines et chimiokines, dont IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et le facteur de nécrose tissulaire (tumor necrosis factor; TNF)- $\alpha$  (Casey, Cox et al. 1989, Dudley, Collmer et al. 1996, Cox, Casey et al. 1997, Dammann and Leviton 1997). Ces molécules servent de messagers pour les leucocytes, induisant leur extravasation et leur activation (Gomez-Lopez, Guilbert et al. 2010). Leur activation induit l'expression de protéines d'activation utérine (uterine-activation proteins; UAP) qui déclenchent le travail prématuré : la cyclooxygénase (COX)-2, le récepteur des prostaglandines F2a, le récepteur d'ocytocine, connexine-43, etc. (Cook, Shallow et al. 2003, Arthur, Taggart et al. 2008, Christiaens, Zaragoza et al. 2008). Il s'agit donc d'une réponse massive inappropriée qui déclenche le travail avant que l'enfant soit à terme. En visant l'inflammation avec de nouveaux traitements pharmacologiques, cette cascade infernale pourrait être freinée, dans le but de protéger l'enfant contre les dommages induits non seulement par la prématurité, mais également par l'inflammation maternelle.

### 1.3.1 Interleukine-1

La cytokine IL-1 $\beta$  et son récepteur, IL-1R, ont été reconnus comme principaux acteurs dans le déclenchement du travail préterme, démontré par : 1) La NP peut être induite dans des modèles animaux avec l'injection d'IL-1 $\beta$  seule ; 2) Chez les humains, la NP est associée à des niveaux élevés d'IL-1 $\beta$  dans le sang des nouveau-nés prématurés ; 3) des mutations dans les gènes d'IL-1 $\beta$  et d'IL-1R sont associées avec de multiples avortements spontanés et ; 4) l'expression des UAPs est induite par IL-1 $\beta$  (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015). Ainsi, IL-1 $\beta$  et son récepteur ont été identifiés par les chercheurs comme une cible potentielle pour prévenir la NP et ses conséquences délétères associées (Cayabyab, Jones et al. 2003, Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016).

Le récepteur IL-1R possède 3 ligands : l'IL-1 $\alpha$ , une alarmine diffusée lorsqu'une cellule nécrosée relâche le contenu de son cytoplasme dans lequel se trouve l'IL-1 $\alpha$  ; l'IL-1 $\beta$  qui est activée par plusieurs signaux induisant son clivage par la protéine caspase-1, puis l'IL-1Ra, un antagoniste endogène qui empêche l'activation du récepteur (Dinarello 1997). Puisqu'une faible activation d'IL-1R enclenche rapidement une forte réponse immunitaire, la présence d'IL-1Ra nécessite de fortes doses d'IL-1 $\alpha/\beta$  pour contrer son effet, et ainsi assure une protection contre la suractivation du récepteur.

Le récepteur IL-1R possède trois boucles extracellulaires et une boucle intracellulaire ; cette dernière possède une homologie avec les domaines de type Toll (Gabay, Lamacchia et al. 2010). Lorsque son ligand l'IL-1 $\beta$  vient se lier, une protéine accessoire s'y arrime pour former un trimère IL-1-IL-1R-IL-1RAcP afin de recruter plusieurs molécules adaptatrices

intracellulaires. Ces dernières activent les voies intracellulaires du facteur nucléaire kappa-B (nuclear-factor kappa-B; NF- $\kappa$ B) et des protéines kinases activées par des agents mitogènes (mitogen-activated protein kinases; MAPK), qui activent à leur tour les kinases c-Jun N-terminal, p38 et la kinase reliée au signal extracellulaire-1, facteurs de transcription induisant la protéine activatrice (AP)-1 (Cirillo, Casalino et al. 1999).

NF- $\kappa$ B et AP-1 sont tous deux connus pour activer la transcription des gènes de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires, et leur inhibition a été associée à une diminution de la réponse inflammatoire (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016). Dans le phénomène de NP, l'inhibition de la voie des MAPK, et donc d'AP-1, est suffisante pour empêcher l'inflammation délétère menant au travail. De plus, la préservation de la voie de NF- $\kappa$ B semble salvatrice, possiblement à cause de son rôle anti-apoptotique (Keelan, Khan et al. 2009). Une inhibition partielle du récepteur visant seulement la voie des MAPK pourrait donc représenter une avenue thérapeutique pour traiter la NP, tel que suggéré par Nadeau-Vallée *et coll.* (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015) Une possible fonction protectrice d'un tel traitement pour l'œil n'a cependant pas encore été testée.

### **1.3.2 Antagonistes du récepteur d'interleukine-1**

Sur le marché, quelques agents pharmacologiques ciblent actuellement la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$ . Il existe un inhibiteur compétitif d'IL-1R, anakinra (Kineret), et les anticorps monoclonaux contre l'IL-1R riloncept (Arcalyst) ou contre l'IL-1 $\beta$  canakinumab (Ilaris) (Dinarello and van der Meer 2013, Hasturk, Yilmaz et al. 2015, Sibley, Chioato et al. 2015).

Ils traitent efficacement certaines maladies inflammatoires tels la goutte, l'arthrite rhumatoïde et le syndrome de Schnitzler, mais leur efficacité à traiter la NP est limitée (Fidel, Romero et al. 1997, de Koning, Schalkwijk et al. 2013, Leitner, Al Shammery et al. 2014, Sundy, Schumacher et al. 2014, Aouba, Deshayes et al. 2015). De plus, le blocage massif du récepteur inhibe la voie intracellulaire de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription de survie cellulaire et un médiateur de l'inflammation important pour la protection fœtale (Pereira and Oakley 2008). La taille importante de l'antagoniste du IL-1R Kineret empêche aussi le composé d'atteindre les tissus gestationnels et d'exercer une protection sur le fœtus (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016). Ainsi, de nombreux défis pharmacologiques empêchent l'utilisation des composés disponibles présentement sur le marché pour traiter la NP.

### **1.3.2.1 101.10**

En vue de pallier ces défis pharmaceutiques, le laboratoire du D<sup>r</sup> Sylvain Chemtob a développé un inhibiteur non compétitif du IL-1R : un petit peptide nommé 101.10 (séquence : RYTVELA) accomplissant une inhibition partielle du récepteur (Quiniou, Sapielha et al. 2008). En se liant à une boucle extracellulaire du récepteur, il a un effet inhibiteur sur la voie de signalisation des MAPK et de p38/JNK/ERK, tout en préservant la voie anti-apoptotique de NF- $\kappa$ B (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015).

Notre laboratoire a récemment démontré le potentiel thérapeutique du 101.10 pour empêcher la naissance prématurée et ses effets délétères sur différents organes du nouveau-né. Effectivement, IL-1 $\beta$  seul a causé l'accouchement préterme chez 56% des souris, tandis que l'injection sous-cutanée de 101.10 a permis de réduire ce taux à 12% (Nadeau-Vallee, Quiniou



et al. 2015). Le 101.10 était aussi efficace pour prévenir la prématurité induite par des agents imitant les infections Gram+ et Gram-. Une autre publication a affirmé le potentiel protecteur de 101.10 sur le développement de certains organes vitaux : le cerveau, l'intestin et le poumon (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017).

## **2. Hypothèse et objectifs de la recherche**

Dans le cadre de ce travail de maîtrise, nous proposons que l'inflammation pré-natale médiée par IL-1B, impliquée dans la genèse du travail prématuré, affecte le développement de la rétine et de la choroïde, entraînant des déficits visuels à long terme chez le prématuré. Pour étudier cette hypothèse, nous avons élucidé l'effet de la présence d'IL-1 $\beta$  dans les tissus gestationnels sur le développement de l'œil en examinant la rétine, les vaisseaux rétiniens, la choroïde et la fonction visuelle globale. De plus, nous avons comparé l'efficacité des antagonistes Kineret et 101.10 pour prévenir les défauts observés. Grâce à ces travaux, nous espérons approfondir la compréhension de l'effet de la naissance prématurée sur l'œil et aussi suggérer un nouvel élément pathophysiologique impliqué dans certaines maladies oculaires telle la rétinopathie du prématuré.

## **3. Méthodologie**

### **3.1 Animaux**

Des souris de souche CD-1, dont la grossesse a été chronométrée, ont été obtenues chez Charles River Inc. À leur arrivée à l'animalerie du Centre de recherche du CHU Sainte-Justine, 4 jours leur ont été laissés afin de s'habituer à leur environnement avant de commencer les expériences. Durant ce temps, elles ont eu un libre accès à de la nourriture standard et à de l'eau, et le cycle luminosité/noirceur était de 12:12. Cette étude a été approuvée par le Comité de protection des animaux de l'hôpital, selon les principes du Manuel sur le soin et l'utilisation des animaux d'expérimentation du Conseil canadien de protection des animaux.

### **3.2 Produits chimiques**

Les produits ont été obtenus des compagnies suivantes : rhIL-1 $\beta$  (#200-01B; PeproTech), 101.10 (Elim Biopharmaceuticals, Hayward, Californie), Kineret (Sobi, Biovitrum Stockholm, Suède) et RU-486 (M8046 ; Sigma-Aldrich).

### **3.3 Modèle animal de naissance prématurée induite par IL-1 $\beta$**

Au jour de gestation (G) 16, les souris enceintes de type CD-1 ont été anesthésiées grâce à un masque d'isoflurane qui fut maintenu en place tout au long de l'intervention chirurgicale. Avec des ciseaux chirurgicaux, une incision de 1,5 cm a été faite dans l'abdomen préalablement rasé. La base de la corne utérine droite a été exposée et 1  $\mu$ g d'IL-1 $\beta$  a été injecté entre deux

membranes fœtales, sans pénétrer la cavité amniotique. Les muscles abdominaux ont été suturés et la peau a été refermée avec des agrafes. Trente minutes avant l'injection d'IL-1 $\beta$ , 100  $\mu$ L de 101.10 (1mg/Kg/12h), de Kineret (4mg/Kg/12h) ou de véhicule ont été administrés dans la nuque de façon sous-cutanée. Les souris ont ensuite été examinées à chaque 2 heures jusqu'à terme (G19-19.5), afin de noter le moment de la parturition et d'observer l'état des nouveau-nés.

### **3.4 Modèle animal de naissance prématurée induite sans inflammation**

Une seule injection de 50  $\mu$ g de RU-486 (Mifepristone ; M8046 ; Sigma-Aldrich) a été faite intra-péritonéalement à G17 chez des souris enceintes de type CD-1. Les souris ont été observées régulièrement jusqu'à l'accouchement, ~18 heures après l'intervention.

### **3.5 Prélèvement des tissus en pré-natal**

Trois à cinq souris par groupe ont été sacrifiées à chacun des jours de gestation suivants : G17, G17.5 et G18. Ces souris ont été anesthésiées à l'isofluorane, puis euthanasiées avec du CO<sub>2</sub> et par dislocation cervicale. Avec des ciseaux chirurgicaux, une large incision a été faite dans l'abdomen. Les cornes utérines ont été exposées, puis les fœtus ont été extraits de leurs sacs amniotiques. Ces derniers ont été décapités, leurs yeux ont été prélevés et congelés rapidement dans de la glace sèche. Ils ont été conservés à -80°C jusqu'aux expériences biochimiques.

### **3.6 Prélèvement des tissus en post-natal**

Six-huit nouveau-nés par groupe ont été sacrifiés à la naissance (P1), puis leurs yeux ont été prélevés et préservés à -80°C pour de futures analyses biochimiques. Après terme (24h après G19), 5-7 souriceaux par groupe ont été décapités et leurs yeux ont été prélevés aux jours post-nataux (afin d'ajuster pour la prématurité) (Pt) 1, Pt 4, Pt 8, Pt 15, Pt 22 et Pt 30. Les souris restantes ont été gardés en vie jusqu'au sevrage à l'âge de 3 semaines. Elles ont ensuite été isolées pour les expériences d'électrophysiologie à Pt 30.

### **3.7 Extraction d'ARN et réaction par polymérase en chaîne quantitative en temps réel**

Les yeux prélevés en anténatal ont été immergés dans 500 µL de ribozol (AMRESCO) pour empêcher la dégradation de l'ARN. Ceux-ci ont été homogénéisés, puis l'ARN a été isolé selon les instructions du manufacturier. Ensuite, la concentration et la pureté d'ARN dans chaque échantillon ont été mesurées au spectrophotomètre Nanodrop 1000. Un total de 500 ng d'ARN par échantillon a été converti en ADN complémentaire (ADNc) grâce au kit de synthèse iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad). Les amorces ont été conçues avec NCBI Primer Blast (tableau I). L'expression génique a été quantifiée au Stratagene MXPro3000 (Stratagene) avec du SYBR Green Master Mix (Bio-Rad). Les niveaux d'expression géniques ont été standardisés avec l'amorce universelle 18S (Ambion Life Technology). Les courbes de dissociation ont été obtenues afin d'assurer la spécificité des amorces. Les gènes analysés sont

les suivants : Il1b, Il6, Il8, Il12, Ccl2, Casp1, Tnfa, Il4, Il10 et Il27. Les séquences des amorces sont détaillées dans le tableau I.

### **3.8 Méthode d'immuno-enzymologie ELISA**

L'ELISA a été effectuée selon les directives du fabricant pour les kits suivants : souris IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Quantikine (#MLB00C; R&D systems), souris IL-6 Quantikine (#M6000B; R&D systems) et souris IL-8 (#MBS261967; Mybiosource; reconnaît l'homologue d'IL-8 CXCL2). Les tissus ont été distribués également et lysés dans une solution RIPA composée de protéases afin d'inhiber la dégradation des protéines. Chaque échantillon de 50  $\mu$ L a ensuite été chargé sur un plateau à 96 puits précédemment enduits avec des anticorps primaires spécifiques, puis incubés durant 2 heures à la température de la pièce. Les puits ont été lavés 5 fois et incubés durant 2 heures avec un anticorps secondaire polyclonal lié à une enzyme. Après d'autres lavages, la solution substrat a été ajoutée. La réaction a été arrêtée après 30 minutes et les plateaux ont été lus à 450 nm avec une correction de longueur d'onde de 570 nm.

### **3.9 Prélèvement et fixation des yeux**

Les souriceaux ont été sacrifiés par décapitation (<Pt 4) ou asphyxiés au CO<sub>2</sub> et par dislocation cervicale (>Pt 7). Les yeux ont été exorbités de la boîte crânienne et prélevés en pinçant le nerf optique avec des micro-ciseaux. La cornée a été percée avec une seringue, puis les yeux ont été fixés 20-30 minutes dans du PFA 4%, transférés dans du PBS et conservés à 4°C jusqu'à ce qu'ils soient utilisés pour les montages à plat ou la cryosection.

### **3.10 Immunofluorescence**

Les yeux ont été disséqués afin de retirer la cornée et le cristallin, puis le reste a été fixé dans du sucrose 30% durant 24 heures à 4°C. Ils ont ensuite été mis en bloc (Frozen Section Compound, FSC 22 Clear) et coupés au cryostat en tranches d'une épaisseur de 14 µm. Une technique classique d'immunofluorescence a été appliquée avec un anticorps et contre Iba-1 (ab5076, Abcam ; 1:500). Un anticorps secondaire fluorescent a été appliqué pour le marquage Iba-1 (Alexa fluor 488, Abcam ; 1:200). Les images ont été prises au microscope confocal (TCS SP2, Leica Microsystems) dans un objectif à 20X.

### **3.11 Montage à plat de rétines et de choroïdes**

Pour chacun des 4 groupes, les yeux de 5 souris à Pt 1, Pt 4 , Pt 8, Pt15, Pt 21 et Pt 30 ont été disséqués afin de ne conserver que la rétine ou la choroïde. Ces dernières ont été marquées avec un anticorps fluorescent rouge contre la lectine (*Bandeiraea simplicifolia*, Sigma-aldrich ; 1:100) et contre Iba-1 (ab5076, Abcam; 1:500). Un anticorps fluorescent secondaire a ensuite été appliqué (Alexa fluor 488, Abcam; 1:200). Sur une lame de microscope, 4 incisions au scalpel ont permis d'étaler la rétine/choroïde en pétales. À l'aide d'un pinceau trempé dans du PBS, les vaisseaux hyaloïdes des nouveau-nés ont été retirés afin d'enlever les artéfacts. Les images ont été obtenues grâce à un microscope confocal avec un objectif à 20X (lectine) ou 100X (Iba-1).

### **3.12 Quantification histologique**

Les analyses de la densité du marquage ont été accomplies grâce au logiciel ImageJ, tel que précédemment décrit (Joyal, Nim et al. 2014). Brièvement, le marquage immunohistochimique de la lectine (vaisseaux sanguins, montrés en rouge dans la rétine) a été isolé des autres structures colorées à l'aide de l'outil de déconvolution de la couleur dans ImageJ. Ensuite, un seuil de détection a été établi afin de ne détecter que la coloration de la lectine, et ainsi permettre une comparaison semi-quantitative de la densité vasculaire. Les cellules positives pour Iba-1 ont été comptées grâce au logiciel ImageJ, tel que décrit (Rivera, Noueihed et al. 2017).

Afin de mesurer l'épaisseur des différentes couches de la rétine et de la choroïde, le logiciel ImageJ a permis de tracer une droite au travers de la région d'intérêt. Les mesures ont été prises au centre, au milieu et à la périphérie de la rétine et ont été répétées pour obtenir un résultat représentatif. Un ratio fut ensuite calculé pour chaque œil pour comparer les groupes. L'épaisseur de la rétine englobe de la couche nucléaire externe à la couche de cellules ganglionnaires et a été mesurées de la même façon que la choroïde.

### **3.13 Électrorétinographie**

L'électrorétinogramme (ERG) a été enregistré avec une machine Espion ERG diagnosys avec un stimulateur ColorDome Ganzfeld (Diagnosys LLC, Lowell, MA). Les souris ont été adaptées au noir durant la nuit et anesthésiées avant l'ERG avec une injection intra-péritonéale d'un mélange de Ketamine (100mg/kg) et de Xylazine (20mg/kg) et la température du corps des



souris a été conservée à 37°C grâce à des coussins chauffants. Des électrodes DTL Plus (Diagnosys LLC) ont été positionnées à la surface de la cornée après avoir induit la dilatation pupillaire avec des gouttes de 1% d'atropine et de 2,5% de phényléphrine (Alcon) et l'ERG par flash a été mesuré. Les réponses scotopiques ont été enregistrées simultanément à une intensité lumineuse de 0,9 cd-s/m<sup>2</sup>. L'ERG a été fait dans une chambre noire éclairée avec de la lumière rouge. Après l'enregistrement, l'hydratation de l'œil a été surveillée et les souris ont été gardées à 37°C jusqu'à l'éveil.

### **3.14 Analyse statistique**

L'analyse paramétrique a été utilisée puisque la puissance statistique est plus forte pour les variables paramétriques continues, et étant donné l'étendue des données entre les groupes (Dwivedi, Mallawaarachchi et al. 2017). Les comparaisons entre deux variables ont été analysées par t-test. Les comparaisons entre plusieurs groupes ont été analysées grâce à une analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA). La méthode de comparaison multiple de Dunnett a été employée lorsque les traitements étaient comparés à un seul contrôle. La valeur de  $p < 0,05$  a été considérée comme statistiquement significative. Les données sont présentées en tant que moyennes  $\pm$  S.E.M.

## 4. Résultats – Article

L'article ci-dessous a été révisé par les pairs et publié dans le journal *Scientific Reports* le 08 août 2018. (Beaudry-Richard, Nadeau-Vallee et al. 2018) L'accord des co-auteurs afin d'utiliser l'article dans le cadre de ce mémoire de maîtrise a été obtenu et est disponible sur demande.

ABR, MNV et SC ont planifié l'étude et préparé le manuscrit. ABR a effectué la majorité des expériences et l'analyse des données. EP a contribué aux résultats sur la rétine et NM a contribué aux résultats sur la choroïde. EH, SP et JSJ ont contribué aux procédures d'électrophysiologie. AM a fourni des données préliminaires sur les vaisseaux rétiniens et choroïdiens. AB et XH ont participé au travail sur les animaux. CQ a conçu le 101.10 et a offert une supervision journalière durant les travaux. EMS, AB et MN ont contribué aux analyses biochimiques. GL, SAR, JK et KAW ont contribué aux révisions du manuscrit. DMO a offert son expertise sur le modèle de naissance prématurée induite par le RU486. JCR a offert des conseils d'expert, a conseillé sur la planification des expériences, a dessiné le schéma (Figure 4.1) et a participé à la préparation du manuscrit. WL a contribué à la conception du 101.10. JFB a contribué à la formation d'images de haute qualité et à l'interprétation des données.

**Title: Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny**

**Running title.** Antenatal IL-1-induced inflammation predisposes to vasculopathy in prematurity

**One-sentence summary.** Antenatal uterine inflammation persists postnatally, impairing offsprings normal vessel development in retina and sub-retina, preventable by interleukin-1 receptor antagonists.

**Keywords.** Inflammation; Interleukin-1; Prematurity; Retina; Angiogenesis; Choroid; Gestation; Electroretinogram; Retinopathy of prematurity; Microglia; Eye; Neonatal morbidity; RU486.

**Authors and affiliations.**

Alexandra Beaudry-Richard<sup>1</sup>, Mathieu Nadeau-Vallée<sup>1,2</sup>, Élisabeth Prairie<sup>1</sup>, Noémie Maurice<sup>1</sup>, Émilie Heckel<sup>1</sup>, Mohammad Nezhady<sup>1</sup>, Sheetal Pundir<sup>1</sup>, Ankush Madaan<sup>1,3</sup>, Amarilys Boudreault<sup>1</sup>, Xin Hou<sup>1</sup>, Christiane Quiniou<sup>1</sup>, Estefania Marin Sierra<sup>1,3</sup>, Alexandre Beaulac<sup>1</sup>, Gregory Lodygensky<sup>1</sup>, Sarah A. Robertson<sup>4</sup>, Jeffrey Keelan<sup>5</sup>, Kristina Adams Waldorf<sup>6</sup>, David M. Olson<sup>7</sup>, Jose-Carlos Rivera<sup>8</sup>, William Lubell<sup>9</sup>, Jean-Sebastien Joyal<sup>1,2,3</sup>, Jean-François Bouchard<sup>10</sup> and Sylvain Chemtob<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, CHU Sainte-Justine Research Centre, Montréal, Canada; <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Université de Montréal, Montréal, Canada; <sup>3</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, McGill University, Montréal, Canada; <sup>4</sup>Dept of Obstetrics and Gynaecology, University of Adelaide, Adelaide, South Australia, 5005, Australia; <sup>5</sup>Div Obstetrics & Gynaecology, University of Western Australia King Edward Memorial Hospital, Perth, Australia; <sup>6</sup>Dept of Obstetrics & Gynaecology, University of Washington, Seattle, WA, USA; <sup>7</sup>Departments of Obstetrics and Gynaecology, Pediatrics and Physiology, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada; Department of Ophthalmology, <sup>8</sup>Research Centre of Maisonneuve-Rosemont Hospital; <sup>9</sup>Department of Chemistry, Université de Montréal, Montréal, Canada; <sup>10</sup>School of Optometry, Université de Montréal, Montréal, Canada.

**Grant support.** This study was funded by GAPPS (Global Alliance for the Prevention of Prematurity and Stillbirth, an initiative of Seattle Children's) and CIHR (DMO, SC). ABR and MNV were supported by scholarships from the Suzanne Veronneau-Troutman Funds associated with the Department of Ophthalmology of Université de Montréal, by FRQS and by CIHR; MNV received a Vanier Canada Graduate Scholarship and a Vision Research Network (RRSV) Performance Scholarship. EP received a scholarship from the Vision Research Network and NM was funded by a scholarship from NSERC. SC holds a Canada Research Chair (Vision Science) and the Leopoldine Wolfe Chair in translational research in age-related macular degeneration.

**Additional footnote.** \*Corresponding author

## 4.1 Abstract

Antenatal inflammation as seen with chorioamnionitis is harmful to foetal/neonatal organ development including to eyes. Although the major pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  participates in retinopathy induced by hyperoxia (a predisposing factor to retinopathy of prematurity), the specific role of antenatal IL-1 $\beta$  associated with preterm birth (PTB) in retinal vasculopathy (independent of hyperoxia) is unknown. Using a murine model of PTB induced with IL-1 $\beta$  injection *in utero*, we studied consequent retinal and choroidal vascular development; in this process we evaluated the efficacy of IL-1R antagonists. Eyes of foetuses exposed only to IL-1 $\beta$  displayed high levels of pro-inflammatory genes, and a persistent postnatal infiltration of inflammatory cells. This prolonged inflammatory response was associated with: 1) a marked delay in retinal vessel growth; 2) long-lasting thinning of the choroid; and 3) long-term morphological and functional alterations of the retina. Antenatal administration of IL-1R antagonists – 101.10 (a modulator of IL-1R) more so than Kineret (competitive IL-1R antagonist) – prevented all deleterious effects of inflammation. This study unveils a key role for IL-1 $\beta$ , a major mediator of chorioamnionitis, in causing sustained ocular inflammation and perinatal vascular eye injury, and highlights the efficacy of antenatal 101.10 to suppress deleterious inflammation.

## 4.2 Introduction

Preterm birth (PTB) still remains a major medical concern (Institute of Medicine Committee on Understanding Premature and Assuring Healthy 2007). At present, PTB is a primary cause of infant mortality and morbidity in the USA and the rest of the world (Liu, Oza et al. 2015, Verstraeten, Mijovic-Kondejewski et al. 2015). Globally, more than 10% of infants are born preterm, amounting to 15 million children worldwide (Blencowe, Cousens et al. 2013). Prematurity disrupts normal organogenesis; this applies to major organs such as lungs, brain, gut, and eyes (Rees and Inder 2005, 2013, Iliodromiti, Zygouris et al. 2013). Exposure to the higher extrauterine O<sub>2</sub> concentrations (relative to those in utero) exerts toxicity to these neonatal organs, including for instance by impairing vessel growth in the eye thus predisposing to the development of retinopathy of prematurity (ROP) (Terry 1942).

Other perinatal conditions also contribute to foetal/neonatal organ damage. Along these lines, inflammation (as seen in chorioamnionitis) is reported to contribute to more than 60% of PTB prior to 28 weeks gestation (Goldenberg, Culhane et al. 2008, Galinsky, Polglase et al. 2013). Chorioamnionitis is also deleterious to many foetal/neonatal organs and can lead to foetal inflammatory response syndrome (FIRS) (Gotsch, Romero et al. 2007, Galinsky, Polglase et al. 2013). Fragile endothelium is particularly vulnerable and a contributor to vascular dysfunction during acute and chronic inflammation (Polverini 1995, Pierce, Giuliano et al. 2017), such that FIRS has not only been linked to higher risks of brain injury<sup>14</sup> but also of that to the retina (Sood, Madan et al. 2010, Moscuza, Belcari et al. 2011, Sato, Nishimaki et al. 2011, Lee and Dammann 2012) by contributing to ROP (Dammann and Leviton 2006) and associated microvascular degeneration (Hong, Lee et al. 2014) and retinal dysfunctions

(Dorfman, Cuenca et al. 2011). Concurrently, inflammation is known to induce numerous cytotoxic mediators in endothelial cells (Varani and Ward 1994).

During infection and sterile inflammation, Toll-like receptors are activated by small molecular motifs on bacterial cell walls and/or by molecules released by stressed cells, which in turn induce the expression of pro-inflammatory cytokines and chemokines to further magnify the inflammatory cascade (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016). Inflammatory mediators activate uterine activation proteins, which will favour cervical ripening and foetal membrane weakening, and trigger contractions and labour (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016). Among the major pro-inflammatory cytokines Interleukin (IL)-6 and IL-8 concentrations dominate in the perinatal period (Kim, Romero et al. 2015, Chaemsaitong, Romero et al. 2016, Kunze, Klar et al. 2016). However, IL-1 $\beta$  is a trigger and amplifier of the inflammatory cascade, including of IL-6 and IL-8 (Tosato and Jones 1990, Kaplanski, Farnarier et al. 1994). Accordingly, increased levels of IL-1 $\beta$  in the foetal compartment are observed with PTB in humans (Cox, Casey et al. 1997, Jacobsson, Mattsby-Baltzer et al. 2003), and polymorphisms of corresponding IL-1 gene pathways affect the risk of preterm birth (Murtha, Nieves et al. 2006, Yilmaz, Verdi et al. 2012, Langmia, Apalasy et al. 2016). IL-1 $\beta$  in turn contributes directly to prematurity (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015) and to foetal/neonatal injury (Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016). In this context, IL-1 $\beta$ -dependent retinal and sub-retinal injury to the immature subject is clearly described and involves direct endothelial cytotoxicity (Kowluru and Odenbach 2004), but the associated inflammation is mostly secondary to post-natal alterations in oxygen exposure (Sivakumar, Foulds et al. 2011, Rivera, Sitaras et al. 2013, Tremblay, Miloudi et al. 2013, Zhou, Rivera et al. 2016). However other than epidemiological links and associated roles in other eye damaging conditions triggered by distinct mechanisms, notably oxidative stress, the direct role

for IL-1 $\beta$  in causing injury to the retina/sub-retina of the immature subject is unknown. To discriminate the specific role of antenatal IL-1 $\beta$  (independent of hyperoxia - a predisposing factor to ROP) on oculo-vascular development we studied the effects of gestational IL-1 $\beta$  associated with foetal inflammatory response on development of retinal and choroidal vessels. To ascertain the role of IL-1 $\beta$  we also desirably used two molecularly distinct IL-1R antagonists, specifically Kineret, a clinically-approved competitive inhibitor of IL-1R, and 101.10, an all-d heptapeptide (sequence: rytvela) non-competitive inhibitor of IL-1R (Quiniou, Sapiéha et al. 2008, Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015, Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017); this approach was adopted since different pharmacologic agents may exhibit different properties. Our findings reveal an important role for antenatal IL-1 $\beta$ , a major mediator of chorioamnionitis, in causing prolonged ocular inflammation in the offspring resulting in damage to retinal and sub-retinal vasculature, structure and function; these deleterious effects were prevented by antenatal 101.10 to a greater extent than Kineret.

## **4.3 Methods**

### **4.3.1 Animals**

The use of timed-pregnant CD-1 mice for this study was first approved by the Animal Care Committee of Sainte-Justine's Hospital following the principles of the Guide for the Care and Use of Experimental Animals developed by the Canadian Council on Animal Care. Animals were ordered from Charles River Inc., all having reached the 11th day of gestation. They were kept in the animal facility for a few days before starting the experiments to let them get used to their new environment. From their arrival to the end of the experiments, they had free access to chow and water, and were kept in a 12:12 light/dark cycle.

### **4.3.2 Chemical products**

The following products were used: rhIL-1 $\beta$  (#200-01B; PeproTech, Rocky Hill, New Jersey), 101.10 (Elim Biopharmaceuticals, Hayward, California), Kineret (Sobi, Biovitrum Stockholm, Sweden) and RU-486 (Mifepristone; M8046; Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany).

### **4.3.3 Animal model of PTB induced by IL-1 $\beta$**

Pregnant CD-1 mice were injected subcutaneously in the neck at gestation day (G) 16.5 with 101.10 (1 mg/Kg/12h), Kineret (4 mg/Kg/12h [clinically recommended dose]) or vehicle (Fig. 4.1A), consistent with previous studies (Varani and Ward 1994). Half an hour later,



mice were anaesthetized with isoflurane with a mask on the muzzle, which was kept during all interventions. With surgical scissors, a 1.5 cm cut was made in the abdomen to expose the uterine horns. An injection of rhIL-1 $\beta$  (1  $\mu$ g) was made between two foetal membranes as reported (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017), being careful not to penetrate the amniotic cavity using transillumination; a schematic diagram is presented in Fig. 4.1B. Abdominal muscles were sutured and the skin was stapled shut. Pregnant dams were thoroughly examined every 2 h until term (G19-19.5) to observe the moment of birth and assess the health of newborns.

#### **4.3.4 Animal model of PTB without inflammation**

A single intraperitoneal injection of the progesterone receptor antagonist RU-486 (1  $\mu$ g/kg) was made at G17. Mice were closely observed until parturition.

#### **4.3.5 Prenatal tissue collection**

To collect the foetal eyes during gestation, 3-5 mice/group were sacrificed at G17, G17.5 and G18. After anaesthesia with isoflurane, they were euthanized with CO<sub>2</sub> and cervical dislocation. The same method of euthanasia was performed for all mice used in the following experiments. Caesarean sections were performed by widely opening the abdomen with surgical scissors and exposing uterine horns. Foetuses were extracted from their amniotic sacs, decapitated and their eyes were collected and snap-frozen in dry ice. They were preserved at -80°C for further biochemical analyses.

### **4.3.6 Postnatal tissue collection**

At birth, 6-8 pups were sacrificed, their eyes collected and quickly processed for biochemical analyses. After term (24 h after G19), 5-7 pups/group were sacrificed at post-term days (to adjust for prematurity) (Pt) 1, Pt 4, Pt 8, Pt 15, Pt 22 and Pt 30 to collect their eyes for histological experiments. The remaining pups were kept alive with their mother until weaning at 3 weeks old. They were then isolated for electrophysiological experiments at Pt 30.

### **4.3.7 RNA extraction and Real-Time quantitative Polymerase Chain**

#### **Reaction (RT-qPCR)**

Eyes collected antenatally were submerged in 500  $\mu$ L of Ribozol (AMRESCO, Solon OH, United States) either after dissection and isolation of retina and sub-retina, or as a whole, to prevent RNA degradation. Samples were then homogenized and RNA was isolated as per manufacturer's instructions. Using the spectrophotometer Nanodrop 1000, RNA concentration and purity (ratio A260:A280 >1.6) were measured. For each sample, 500 ng of RNA was converted into complementary DNA (cDNA) using the synthesis kit iScript Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad; Hercules CA, United States). Primers were designed with NCBI Primer Blast. Gene expression was quantified with Stratagene MXPro3000 (Stratagene) with SYBR Green Master Mix (Bio-Rad). Gene expression levels were standardized with the universal primer 18S (Ambion Life Technology; Burlington ON, Canada). Dissociation curves were obtained to verify primer specificity. We analysed the following genes: Il1b, Il6, Il8, Il12,

Ccl2, Casp1, Tnfa, Il4, Il10 and Il27, as previously described<sup>22,28</sup>; primer sequences are detailed in Table I.

### **4.3.8 Immuno-enzymology method ELISA**

ELISA was performed as documented (Kaplanski, Farnarier et al. 1994, Varani and Ward 1994) and as recommended by the manufacturer for the following kits: mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Quantikine (#MLB00C; R&D systems), mouse IL-6 Quantikine (#M6000B; R&D systems) and mouse IL-8 (#MBS261967; Mybiosource; recognizes the IL-8 homologue CXCL2). Tissue was equally distributed and briefly lysed in a RIPA solution containing proteases to inhibit protein degradation. Each 50 $\mu$ L sample was then loaded on a 96-well plate previously embedded with specific primary antibodies, then incubated for 2 hours at room temperature. Then, wells were washed 5 times and incubated for 2 hours with an enzyme-linked polyclonal secondary antibody. After further washes, substrate solution was added. Reaction was stopped after 30 min and plates were read at 450 nm with a wavelength correction of 570 nm.

### **4.3.9 Eye collection and fixation**

Foetuses and pups (<Pt4) were decapitated or sacrificed with CO<sub>2</sub> and cervical dislocation (>Pt7). By pressing around the orbits with small scissors, eyes were pulled out of the skull and collected by pinching the optic nerve. The cornea was pierced with a syringe and the eyes were fixated for 20-30 min in PFA 4%, then transferred in PBS and preserved at 4°C until they were processed for flat mounts or cryosections.

### **4.3.10 Immunofluorescence**

Eyes were dissected to withdraw the cornea and the lens; the rest was fixated in sucrose 30% for 24 hours at 4°C. They were then imbedded in Frozen Section Compound (FSC 22 Clear), snap-frozen in dry ice and sectioned with a cryostat at a thickness of 14 µm. Classical immunofluorescence technique was used with antibodies against lectin (*Bandeiraea simplicifolia*, Sigma-aldrich; 1:100), Iba-1 (ab5076, Abcam; 1:500) and Dapi (Invitrogen; 1:5000). Fluorescent secondary antibody was applied for the Iba-1 labelling (Alexa fluor 488, Abcam; 1:200). Images were taken with a confocal microscope (TCS SP2, Leica Microsystems) using a 20X objective.

### **4.3.11 Retinal and choroidal flat mounts**

For each group, eyes of 5 mice at Pt1, Pt4, Pt8, Pt15, Pt21 and Pt30 were dissected as reported (Joyal, Nim et al. 2014), to isolate the retina and choroid/retinal pigment epithelium (RPE) complex. Flat mounts were then labelled with a fluorescent antibody against lectin (Sigma-aldrich; 1:100) and Iba-1 (ab5076, Abcam; 1:500). Fluorescent secondary antibody was applied for the Iba-1 labelling (Alexa fluor 488, Abcam; 1:200). On a microscope slide, 4 cuts were performed with a scalpel to flatten the retina and choroid/RPE complex. With a paintbrush soaked with PBS, hyaloid vessels were removed. Images were obtained in confocal microscopy using a 20X (lectin) or 100X (Iba-1) objective. For Iba-1 imaging, the confocal was focused on the superficial retinal vascular layer at Pt 1 (corresponding to the nerve fiber layer [NFL]) and below the intermediate retinal vascular layer at Pt 15 and Pt 30 (corresponding to the INL) (Liu, Wang et al. 2017).

### **4.3.12 Histological quantification**

Vascular surface was measured with ImageJ and expressed in percentage of total retinal surface, and vessel density was analysed using ImageJ software in the mid-periphery of the retina, as described (Joyal, Nim et al. 2014). Briefly, lectin immunolabelling (blood vessels, showed as red on the retina) was isolated from other structures using the colour deconvolution tool in ImageJ. The detection threshold was established to reduce artefacts and a semi-quantitative comparison of vascular density was performed. Iba-1 positive (Iba1<sup>+</sup>) cells were counted using the ImageJ software in the central retina at Pt1 and in the mid-periphery at Pt15 and 30, as reported (Rivera, Noueihed et al. 2017).

In order to measure the thickness of the different retinal layers and of the choroid, ImageJ software was used to draw a line across the region to measure. Measures were taken at the central, middle and periphery of the retina and were repeated to obtain results that were more representative. A ratio was calculated for each eye to make a comparison between the groups. The retinal thickness includes thickness between the outer nuclear layer (ONL) and the ganglion cell layer (GCL), and was measured using the same method than the choroid, as we reported (Dorfman, Cuenca et al. 2011, Shao, Dorfman et al. 2011, Zhou, Rivera et al. 2016).

### **4.3.13 Electroretinography**

Electroretinogram (ERG) recording was performed with Espion ERG diagnosis machine with ColorDome Ganzfeld stimulator (Diagnosis LLC, Lowell, MA), as reported (Zhou, Rivera et al. 2016). Mice were dark-adapted overnight and anesthetized prior to ERG

with an intraperitoneal injection of Ketamine (100mg/kg) and Xylazine (20mg/kg) mixture and mouse body temperature was kept at 37°C using heated pad. DTL Plus electrodes (Diagnosys LLC) were positioned at the surface of the cornea after pupil's dilatation with drops of 1% atropine and 2.5% phenylephrine (Alcon) and flash ERG were measured. Scotopic responses were simultaneously recorded at light intensity 0.9 cd-s/m<sup>2</sup>. ERG was performed under red light in a dark room. After recording, eye hydration was carefully verified, and mice were kept at 37°C until they awake.

#### **4.3.14 Statistical analysis**

The term dam/group refers to the dams per group regardless of number of progeny (pups) of at least 1; hence  $n = 1$  more for a single dam (with  $\geq 1$  progeny). Parametric analysis was performed since the power analysis is generally greater for continuous parametric variables, and given the spread of data between groups (Dwivedi, Mallawaarachchi et al. 2017). Comparisons between two variants was analysed by t-test. Comparisons between several groups were performed using one-way variance analysis (ANOVA); Dunnett's multiple comparison method was used when many treatments were compared with one control. The value  $p < 0.05$  was considered statistically significant. Data is presented as means  $\pm$  S.E.M (Dwivedi, Mallawaarachchi et al. 2017).

### **4.3.15 Data Availability**

Data sets generated during this study can be obtained from the corresponding author upon request.

## 4.4 Results

### 4.4.1 In utero exposure to IL-1 $\beta$ causes an acute perinatal inflammatory response in the foetal retina and sub-retina

To study the retinal and sub-retinal vascular development in foetuses and pups after exposure to IL-1 $\beta$  in utero, we employed an established murine model of IL-1 $\beta$ -induced chorioamnionitis (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015, Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017). As expected, intrauterine IL-1 $\beta$  (G16.5 days) shortened gestation and induced marked neonatal mortality; 101.10 prolonged gestation to term and markedly augmented foetal survival (Suppl. Fig. 1); whereas Kineret exerted no protective effect, as previously reported (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015).

Eyes (undissected) of foetuses exhibited increased mRNA expression of pro-inflammatory mediators with a variable profile depending on timing after exposure to IL-1 $\beta$ -induced chorioamnionitis (Fig. 4.2A-C); at birth, increased protein levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 were detected in the eyes (Fig. 4.2D-F); these were normalized by 101.10, but not by Kineret with the exception of IL-8 attenuation. Interestingly, early (at G17.5) IL-1 $\beta$ -induced expression of anti-inflammatory Il27 was suppressed by Kineret but preserved by 101.10; while expression of Il10 was diminished by both Kineret and 101.10 (Suppl. Fig. 2). To better localize the intraocular inflammatory response, we isolated the retina and choroid of foetuses. IL-1 $\beta$  triggered early (G17.5) mRNA expression of Il1b, Il6, Il8, Il12, Ccl2 and Tnfa in retina more than in choroid (Fig. 4.2G,H), which was associated with increased intra-ocular accumulation



of Iba1+ cells (activated macrophage/microglia) (Ito, Imai et al. 1998) (Fig. 4.2I), as reported in inflammation-associated retinopathy (Wang, Yu et al. 2005); this Iba1+ cell accumulation is clearly distinct from the relatively low level of Iba1+ cells in control animals wherein it plays a role in normal retinal development (Santos, Calvente et al. 2008). Notably, antenatal 101.10 and Kineret significantly attenuated marked IL-1 $\beta$ -elicited cytokine induction and Iba1+ cell accumulation (Fig. 4.2G-I).

#### **4.4.2 Iba1+ cell accumulation persists post-natally in retina and choroid of newborns subjected in utero to inflammation**

Abnormally high numbers of Iba1+ cells in retina over extended duration can affect vascular development and in turn cause long-term deficits of retinal function (Tremblay, Miloudi et al. 2013). Since perinatal inflammation resulting in retinopathy is associated with prolonged inflammation (Tremblay, Miloudi et al. 2013) with IL-1 $\beta$ -dependent microglial accumulation (Rivera, Sitaras et al. 2013), we determined if Iba1+ cells persisted in retina and choroid of animals exposed to IL-1 $\beta$ -induced chorioamnionitis. We detected a 3-fold increase in Iba1+ cell density on post-term (Pt) day 1 in eyes of animals exposed to antenatal IL-1 $\beta$ , which persisted on postnatal days 15 and 30 in retina and choroid (Fig. 4.3 and Suppl Fig. 3), consistent with previous observations related to early postnatal inflammation (Tremblay, Miloudi et al. 2013); coincidentally, Il1b expression was increased from Pt 1 to Pt 15, and subsided by Pt 30 (Suppl. Fig. 4A) as inflammation resolved (in presence of Iba1+ cells) (Guillonneau, Eandi et al. 2017, Zhou, Yoshida et al. 2017). Inflammatory cell accumulation and Il1b expression was normalized by antenatal 101.10 (Fig. 4.3 and Suppl Fig. 3,4A).

### **4.4.3 Chorioamnionitis leads to persistent ocular inflammation in newborn offspring associated with impaired retinal vascular development and choroidal involution**

Based on evidence of increased inflammation in retina and choroid in early weeks after birth we evaluated the impact of chorioamnionitis on retinal vessel growth and choroidal thickness in pups. Retinal vascularized surface area during the first postnatal week was reduced in animals subjected to IL-1 $\beta$ -induced chorioamnionitis (consistent with previous reports (Rivera, Sapielha et al. 2011)) (Fig. 4.4A,B), but by Pt 8 retinal surface was fully vascularized in all groups as vessels reached the periphery (Fig. 4.4C); concordantly, Il1b expression was only marginally increased at Pt 8 ( $p < 0.06$  vs sham-treated; Suppl. Fig. 4.4A). On the other hand, a small decrease in pan-retinal vascular density was detected in mice exposed to chorioamnionitis at Pt 8, which corresponds to the period wherein intra-retinal vessels are actively forming. This hypo-vascularization was aggravated at Pt 15 (Fig. 4.4D) when Il1b (mRNA) expression markedly rose (Suppl. Fig. 4A); ultimately retinal vascularization normalized at Pt 30 (Suppl. Fig. 4B) along with Il1b (mRNA) expression (Suppl. Fig. 4A). Antenatal 101.10 fully rescued retinal vascularization at all ages analysed, whereas Kineret was only partially effective at Pt 1 and ineffective subsequently at Pt 4, Pt 8 and Pt 15 (Fig. 4.4).

Since the choroid is an exclusive blood supply to the outer retina and its involution was recently linked to ROP and retinal functional deficits (Shao, Dorfman et al. 2011, Zhou, Rivera et al. 2016), we measured choroid thickness. As anticipated, choroid thickness was normal soon after IL-1 $\beta$  treatment (at G17.5) (Suppl. Fig. 4C). By Pt 1 choroidal thinning was observed;

these changes persisted beyond the neonatal period (at Pt 21) (Fig. 4.5A,B). Antenatal 101.10, but not Kineret, preserved choroidal (normal) thickness.

To demonstrate that the effects of IL-1 $\beta$  are unrelated to prematurity per se, we showed that PTB induced with the progesterone receptor antagonist RU486 did not significantly affect ocular cytokine profile or postnatal vascular development (Suppl. Fig. 5), inferring an important role for perinatal inflammation on the latter.

#### **4.4.4 Retinal structural and functional deficits in offspring secondary to gestational tissue-triggered inflammation**

Retinal development depends upon normal blood supply (Caprara and Grimm 2012), such that both retinal structure and function are affected by vasculopathy as seen in ROP (Dorfman, Cuenca et al. 2011, Zhou, Rivera et al. 2016). Accordingly, we measured retinal thickness from the outer neuroblastic layer to the nerve fibre layer at G17.5 and Pt 1, and between the ONL and the GCL at Pt 21 (of the same eyes used to assess choroidal thickness). As expected (Zhou, Rivera et al. 2016), full retinal thickness was not affected within the first 2 weeks after antenatal-induced inflammation (Fig. 4.5C). By Pt 15, following retinal vasculopathy (Fig. 4.4), there was a tendency for decreased thickness of the retina (Suppl. Fig. 6A), which was significantly manifested at Pt 21 (Fig. 4.5D), and was largely attributed to thinning of the inner nuclear layer (Fig. 4.5F and Suppl. Fig. 6B); this resulted in a corresponding decreased b-wave amplitude (largely contributed by the inner nuclear layer) (Fig. 4.6). The ONL thickness and corresponding a-wave amplitude remained intact at the end of the first postnatal month (Fig. 4.5E, Fig. 4.6), as reported in ROP-associated choroidopathy (Zhou,

Rivera et al. 2016). Retinal morphometry and inner retinal function were fully preserved by antenatal 101.10, but only partially by Kineret.

## 4.5 Discussion

Gestational inflammation is an independent risk factor for the development of neonatal morbidities, including to the eye (Damman and Leviton 2006, Gotsch, Romero et al. 2007, Moscuza, Belcari et al. 2011). Yet, the identification of a causal factor playing a pivotal role remains a challenge. Studies have suggested that the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  is involved in the pathophysiology of many perinatal complications (Girard, Tremblay et al. 2010, Nold, Mangan et al. 2013). A link between chorioamnionitis and neonatal brain injury is described (Damman and Leviton 2006), and associated with vascular damage (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017). Of relevance, IL-1 $\beta$  plays a critical role in central nervous system insult during the perinatal period (Savard, Lavoie et al. 2013, Leitner, Al Shammary et al. 2014, Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017). In retinal injury the role of IL-1 $\beta$  has mostly been ascribed to inflammation resulting from exposure to hyperoxia (Sivakumar, Foulds et al. 2011, Rivera, Sitaras et al. 2013, Tremblay, Miloudi et al. 2013, Zhou, Rivera et al. 2016), an important predisposing factor to ROP. However, there is still no evidence demonstrating a direct role for IL-1 $\beta$  in retinal/sub-retinal injury of the immature subject. Given that retinal damage represents a major complication of prematurity, itself often associated with inflammation, we set out to discriminate the effects of antenatal (intra-uterine) IL-1 $\beta$ -triggered inflammation on retinal and sub-retinal vascular development in offspring during the perinatal period and adolescence; in this process we also determined the efficacy of 101.10 (compared to Kineret). By inducing utero-placental inflammation as reported (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015, Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017) with intra-uterine IL-1 $\beta$  (which does not cross the placental barrier (Girard and

Sebire 2016)), we found a prolonged inflammation in the eye that begins ante-natally and ensues in choroidal and retinal vascular, structural and ultimately sustained functional deficits; these detrimental changes were prevented by antenatal 101.10 (but not [recommended dose of] Kineret).

The cascade of inflammatory mediators amplified by IL-1 $\beta$  exerts cytotoxicity on its own. As alluded to above macrophage/microglial invasion is a major contributor of IL-1 $\beta$  generation which in turn exerts endothelial cytotoxicity via neuronally-generated Semaphorin3A38, and causes direct neurotoxicity including to photoreceptors (Simi, Tsakiri et al. 2007, Eandi, Charles Messance et al. 2016). In cultured retinal endothelial cells, chronic exposure (5 days) to IL-1 $\beta$  leads to increased caspase-3 activity and apoptosis (Kowluru and Odenbach 2004). Concordantly, inhibition of IL-1 $\beta$  signalling using pharmacological or genetic approaches decreases caspase activity and apoptosis in retina, and prevents microvascular degeneration in hyperglycaemia-induced retinopathy models (Vincent and Mohr 2007). Comparably, IL-12 is a cytokine produced by macrophages, neutrophils, and other inflammatory cells, and acts by triggering T-cell differentiation (Sun, He et al. 2015); IL-12 exhibits antiangiogenic properties (Voest, Kenyon et al. 1995), and has been associated with serious ocular diseases including uveitis (el-Shabrawi, Livir-Rallatos et al. 1998). Interestingly, IL-1-induced IL-12 retinal production was inhibited by 101.10 which may represent an additional mechanism through which 101.10 protects retinal vasculature. The role of TNF in cytotoxicity is more complex as it depends on the receptor it acts upon which may convey opposing actions (Kraft, McPherson et al. 2009, Watters and O'Connor 2011).

In addition to retinopathy, choroidopathy has lately also been regularly observed in subjects formerly afflicted with ROP as recently reviewed (Hansen, Moskowitz et al. 2017, Rivera, Holm et al. 2017); and this feature was recently reproduced in models of ROP (Zhou, Rivera et al. 2016). Involution of the choroid was found to be sustained and subsequently led to retinal pigment epithelium and photoreceptor degeneration (Zhou, Rivera et al. 2016). In this context, IL-1 $\beta$  exerts a major contribution to choroidal thinning of the newborn subjected to perinatal oxidative stress, which in turn results in long-term injury to the sub- and outer retina. In line with this concept, we observed sustained presence of inflammatory cells post-natally, resulting in choroidal thinning as early as Pt 1, which we had found to predispose to subsequent photoreceptor injury. Together, current and previous observations (Zhou, Rivera et al. 2016) related respectively to antenatal and postnatal inflammation and ensued retinal damage, reveal efficacy of anti-IL-1 $\beta$  treatment. Our findings are consistent with brain neuronal cell death of pups exposed to IL-1 $\beta$ -induced chorioamnionitis (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017). Hence, chorioamnionitis triggers an inflammatory cascade that spreads to the foetus causing retinal and choroidal injury.

An important feature reported herein is the long-term deficit in retinal structure (inner nuclear layer thinning) and function caused by exposure to IL-1 $\beta$  in utero, despite recovery of retinal vascular density at Pt 30 which coincided with abated IL-1 $\beta$  expression, consistent with diminished expression of inflammatory cytokines in residing macrophages upon resolution of the pro-inflammatory state (Guillonneau, Eandi et al. 2017, Zhou, Yoshida et al. 2017). Inner retinal functional deficits (depicted by b-wave amplitude suppression) are well described in former ROP subjects and believed to result prominently from retino-vascular injury (Dorfman, Cuenca et al. 2011, Hansen, Moskowitz et al. 2017). Although we also observed

early involution of the choroid upon exposure to utero-placental inflammation, time is needed until developmentally increased photoreceptor metabolism can no longer be supported by insufficient O<sub>2</sub> and nutrient supply from the damaged choroid, resulting in photoreceptor damage (Zhou, Rivera et al. 2016). Hence, we surmise a gradual degeneration of photoreceptors (and retinal pigment epithelium) after exposure to antenatal inflammation. Together, the retinal and sub-retinal damage observed in response to antenatal IL-1 $\beta$  are indicative of an important role for inflammation, found to be prolonged.

A relevant aspect of this study applies to the efficacy of 101.10 compared to Kineret in protecting the choroid and retina. We recently showed that inhibition of IL-1 receptor using a novel small peptide labelled 101.10, was fully effective in preventing PTB, improving survival and preserving foetal lung, gut and brain integrity (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017); whereas current commercially available IL-1 receptor antagonist (namely Kineret) were mostly ineffective. These findings represented an unparalleled therapeutic which improved foetal/newborn outcome. Kineret is a competitive antagonist of the IL-1 receptor. Doses utilized corresponded to those clinically recommended (4 mg/kg/dose). Although higher doses of Kineret are more effective, a 7-fold-increase in dosage is needed to augment gestation and ensuing foetal maturation (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017), which would seriously compromise immune response, an established side effect of Kineret. As a competitive antagonist of IL-1 receptor Kineret suppresses both JNK/p38/c-jun/AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways; whereas 101.10 acts as a modulator that biases IL-1R-induced signal transduction resulting in inhibition of the JNK/p38/c-jun/AP-1 pathway, while desirably preserving the NF- $\kappa$ B pathway (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015, Nadeau-Vallee, Obari et al. 2016), important for immune vigilance (Medeiros, Frasnelli et al. 2014, Tukaj, Zillikens et al. 2014). Along these lines, in contrast to



Kineret, 101.10 maintained activity of some endogenous anti-inflammatory cytokines, notably IL-27 known to neutralize macrophage activity (Rückerl, Heßmann et al. 2006), thus augmenting its anti-inflammatory activity; interestingly, IL-10 release is p38-dependent (Mion, Tonon et al. 2014) and IL-27 generation is NF- $\kappa$ B-dependent (Guzzo, Che Mat et al. 2010), consistent with signalling actions of 101.10 and Kineret. Another disadvantage of Kineret applies to its relatively large size (17.5 kDa) curtailing passage across the placental barrier to sufficiently block inflammation in the foetal compartment (Girard and Sebire 2016); whereas 101.10 is a small molecule (0.85 kDa) that can distribute in gestational tissues (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017), consistent with its preferred antenatal efficacy in suppressing detrimental inflammation and preserving foetal organ integrity.

In summary, this study unveils an unprecedented key role for IL-1 $\beta$  during gestation in the development of long-lasting inflammation and injury to the eye of the progeny, independently of prematurity per se. Antenatal inflammation as seen in chorioamnionitis induces damage to the choroid and retinal vasculature, structure and function, all of which is remarkably preserved by the small IL-1 receptor modulator 101.10. 101.10 could represent a novel therapeutic approach not only to tackle PTB (Nadeau-Vallee, Quiniou et al. 2015) but also in preventing major foetal/neonatal organ injury including to the eye of premature subjects exposed to antenatal inflammation.

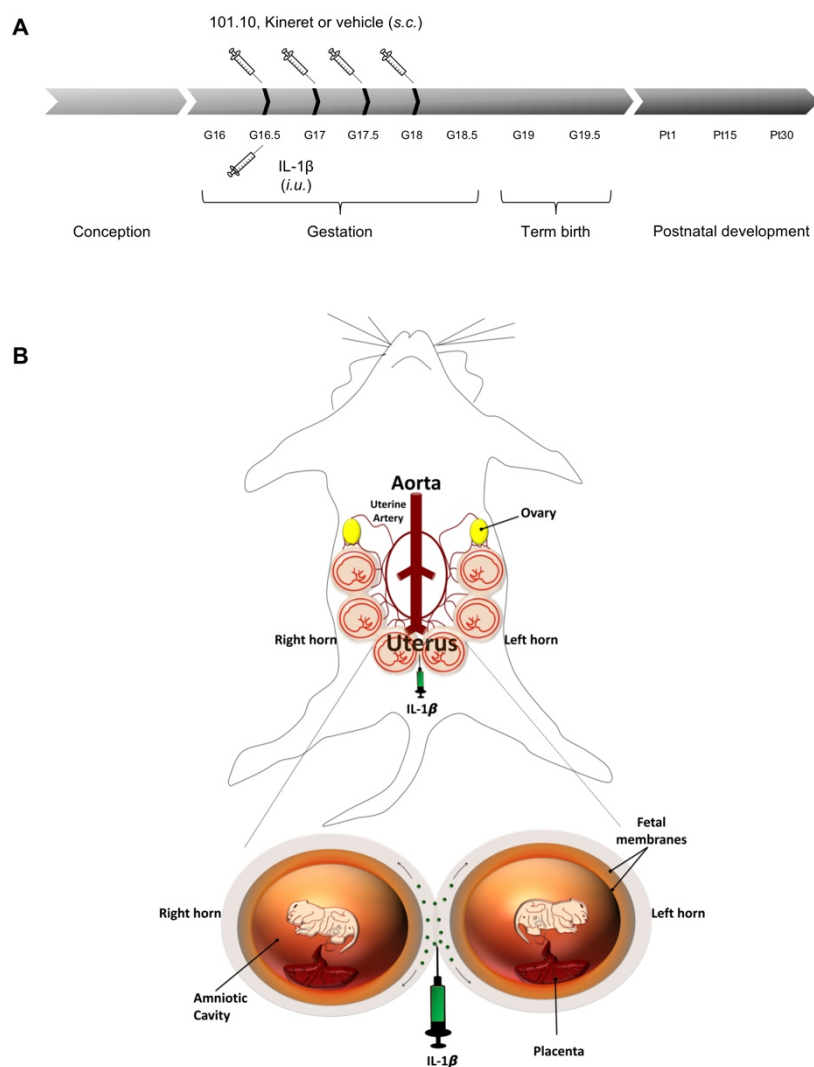
## 4.6 Acknowledgments

We would like to graciously thank Isabelle Lahaie and Dr. Jacqueline Orquin for the help in analysing murine ERG and reviewing the manuscript. Funding. This study was funded by GAPPS (Global Alliance for the Prevention of Prematurity and Stillbirth, an initiative of Seattle Children's) (DMO, SC, SAR, WL), SickKids Foundation-CIHR (SG) and Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (DMO, SC, SAR, WL, JFB). AB-R was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), Fonds de Recherche du Québec en Santé (FRQS) and a scholarship from the Suzanne Veronneau-Troutman Funds associated with the Department of Ophthalmology of Université de Montréal. MNV was granted a Vanier Canada Graduate Scholarship, a scholarship from the Suzanne Veronneau-Troutman Funds associated with the Department of Ophthalmology of Université de Montréal, by the Vision Research Network (RRSV), by FRQS and by CIHR; E.P. received a scholarship from the Vision Research Network and NM was funded by a scholarship from NSERC. AB is supported by FRQS; AM was recipient of the CIHR Drug design training program and Systems biology training program; MN was supported by the Suzanne Veronneau-Troutman award. JK and KAW are respectively funded by the National Health Medical Research Council of Australia and the National Institutes of Health-USA. JSJ is supported by the Burroughs Wellcome Fund Career Award for Medical Scientists, Foundation Fighting Blindness, FRQS and CIHR. SC holds a Canada Research Chair (Vision Science) and the Leopoldine Wolfe Chair in translational research in age-related macular degeneration. Competing interests. The authors have no conflicts of interest.

## **4.7 Author contributions**

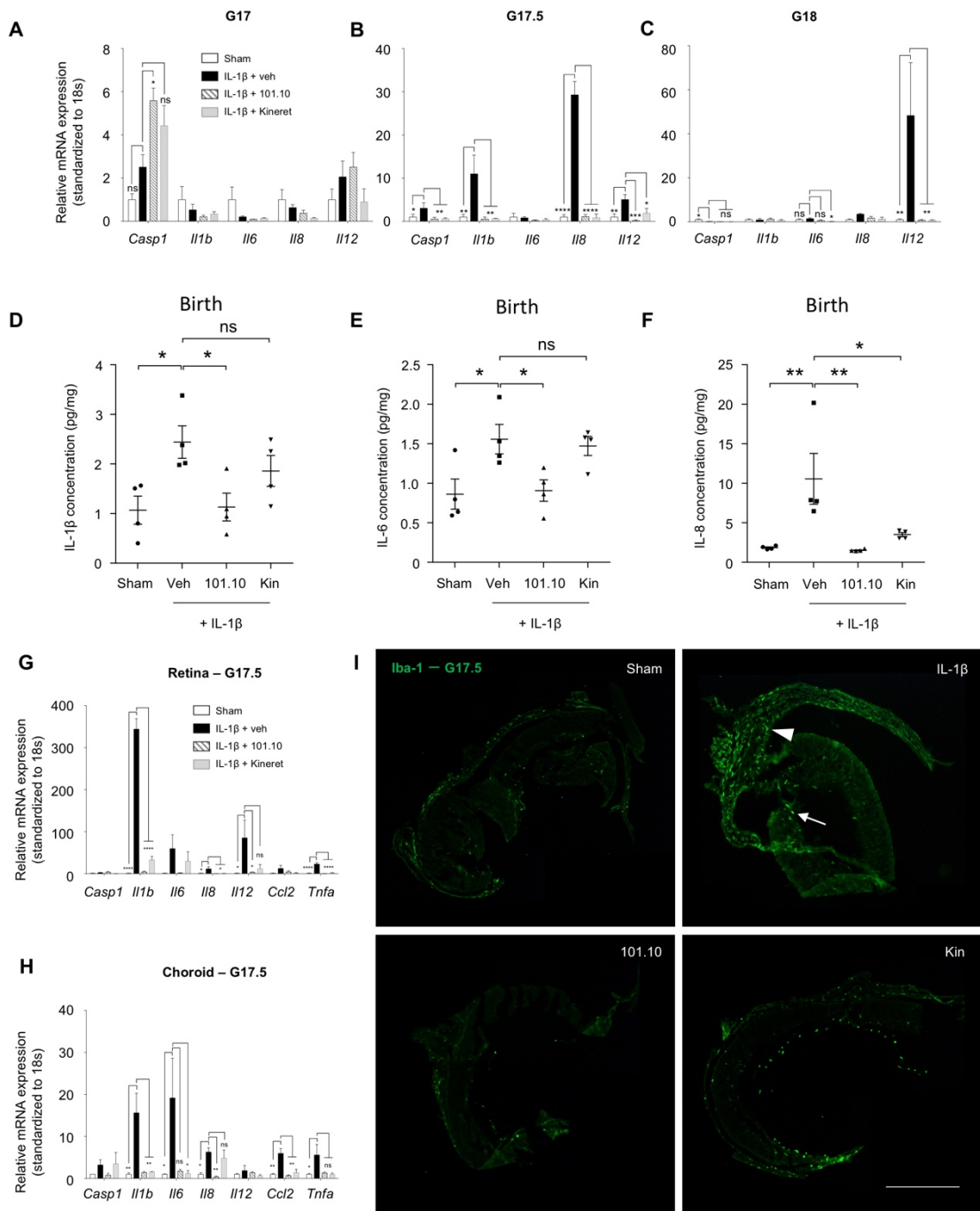
ABR, MNV and SC designed the study and prepared the manuscript. ABR performed the majority of the experiments and the data analysis. EP contributed to retinal data and NM contributed to choroidal data. EH, SP and JSJ contributed to the electrophysiological procedures. AM provided preliminary data on the retinal and choroidal vessels. AB and XH participated to the work on animals. CQ designed 101.10 and provided daily supervision during the study. EMS, AB and MN contributed to the biochemical analyses. GL, SAR, JK and KAW contributed to the revision of the manuscript. DMO provided expertise concerning the RU486 model. JCR contributed with expertise advice, design of experiments and the scheme, and participated in preparation of the manuscript. WL contributed to the design of 101.10. JFB contributed to high quality imaging and data interpretation.

## 4.8 Figures



**Figure 4.1 | Murine model of inflammation-induced PTB employed for the study.**

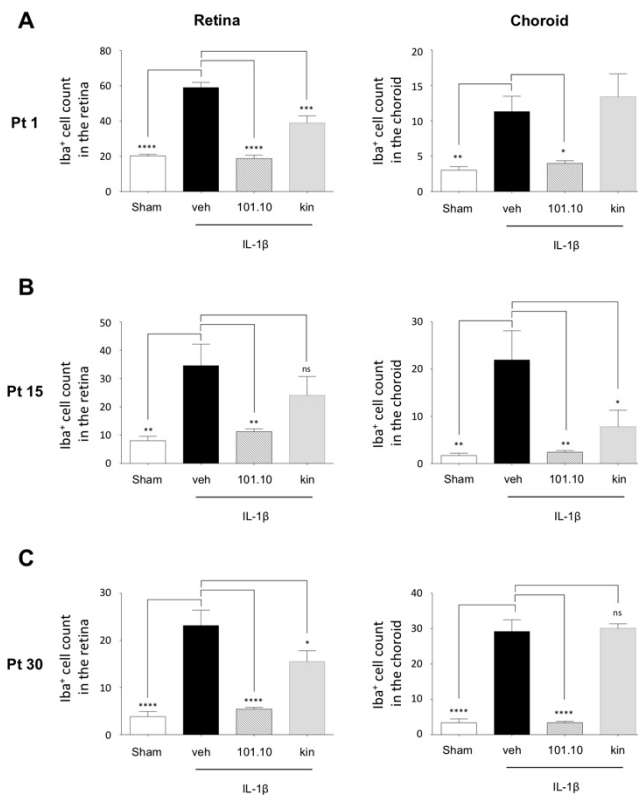
A, IL-1 $\beta$  (1 $\mu$ g) was administered intrauterine at G16.5, whereas 101.10 (1 mg/Kg/12h), Kineret (4 mg/Kg/12h) or vehicle were administered subcutaneously for 2 consecutive days, with the first dose administered 30 min prior to IL-1 $\beta$ . B, intrauterine injection of IL-1 $\beta$  was made between two foetal membranes, without penetrating the amniotic cavity.



**Figure 4.2 | Inflammatory response in the retina and sub-retina of the foetus and newborn.**

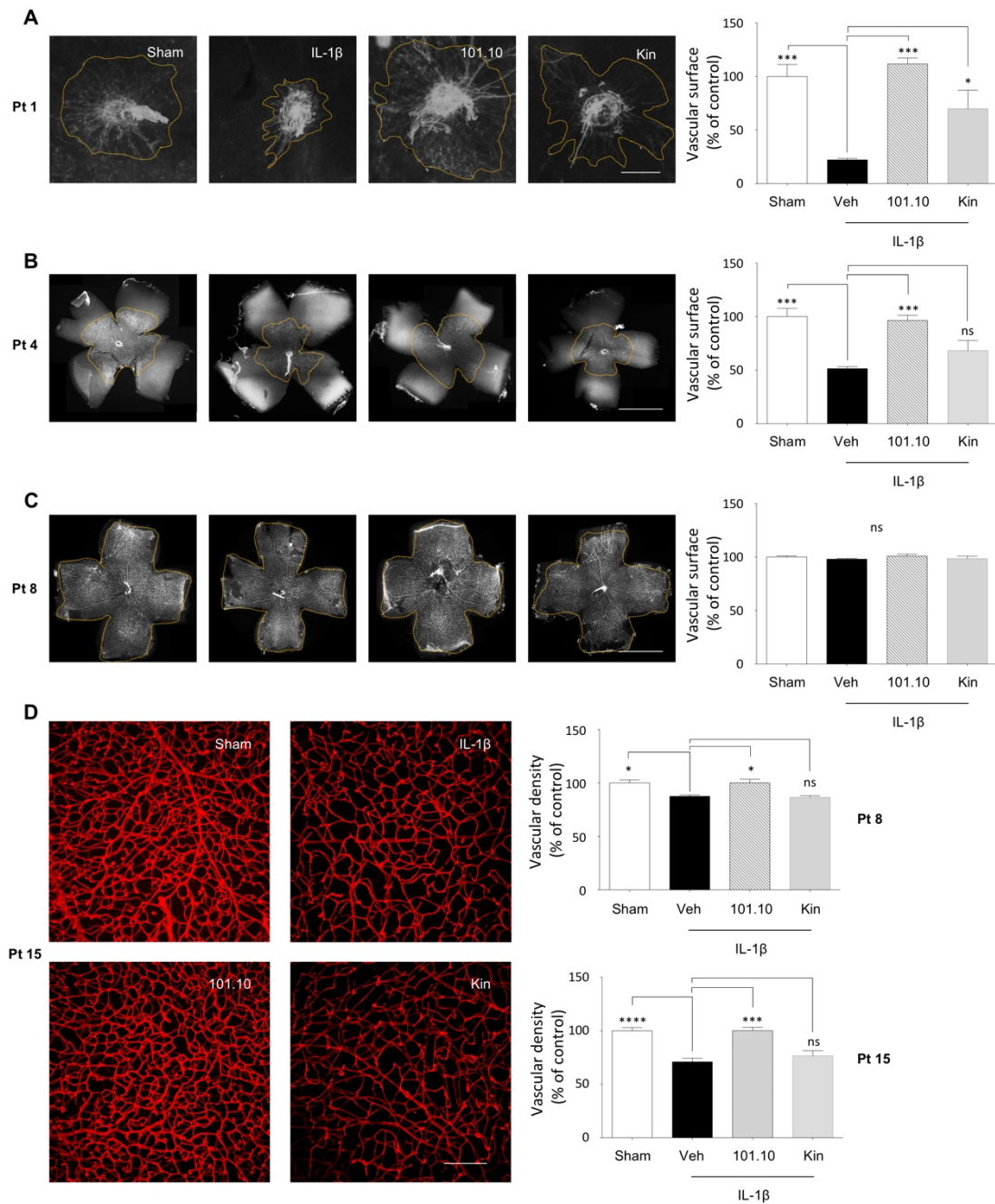
A-C, foetal eyes were collected at G17 (A), G17.5 (B) and G18 (C) after in utero exposure to IL-1β to perform quantitative PCR. Results are relative to 18S and plotted as fold change vs. the

control groups. n=3-8 dams/group; 4 foetal eyes per sample. D-F, cytokine levels in eyes of newborns exposed to the indicated treatments in utero (Fig.4.1). n=4 dams/group; 4 eyes per sample. G-H, quantitative PCR of IL-1, IL-6 and IL-8 performed on isolated retina (G) and choroid (H) collected on foetuses at G17.5; n=3 dams/group; 10 retinas or sub-retinas per sample. I, Iba-1-stained cryosections of retina from foetuses at G17.5 exposed to the indicated treatments in utero; n=3 foetuses/group. Kin refers to Kineret. Scale bar, 300  $\mu$ m. Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 by one-way ANOVA with Dunnett's post-analysis.



**Figure 4.3 | Infiltration of immune cells in eyes during development of the pups.**

A-C, quantification of Iba-1+ cells observed on retinal and choroidal flat mounts at Pt 1 (A), Pt 15 (B) and Pt 30 (C). n=3-6 pup/group for each time point. Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001 by one-way ANOVA with Dunnett's post-analysis.

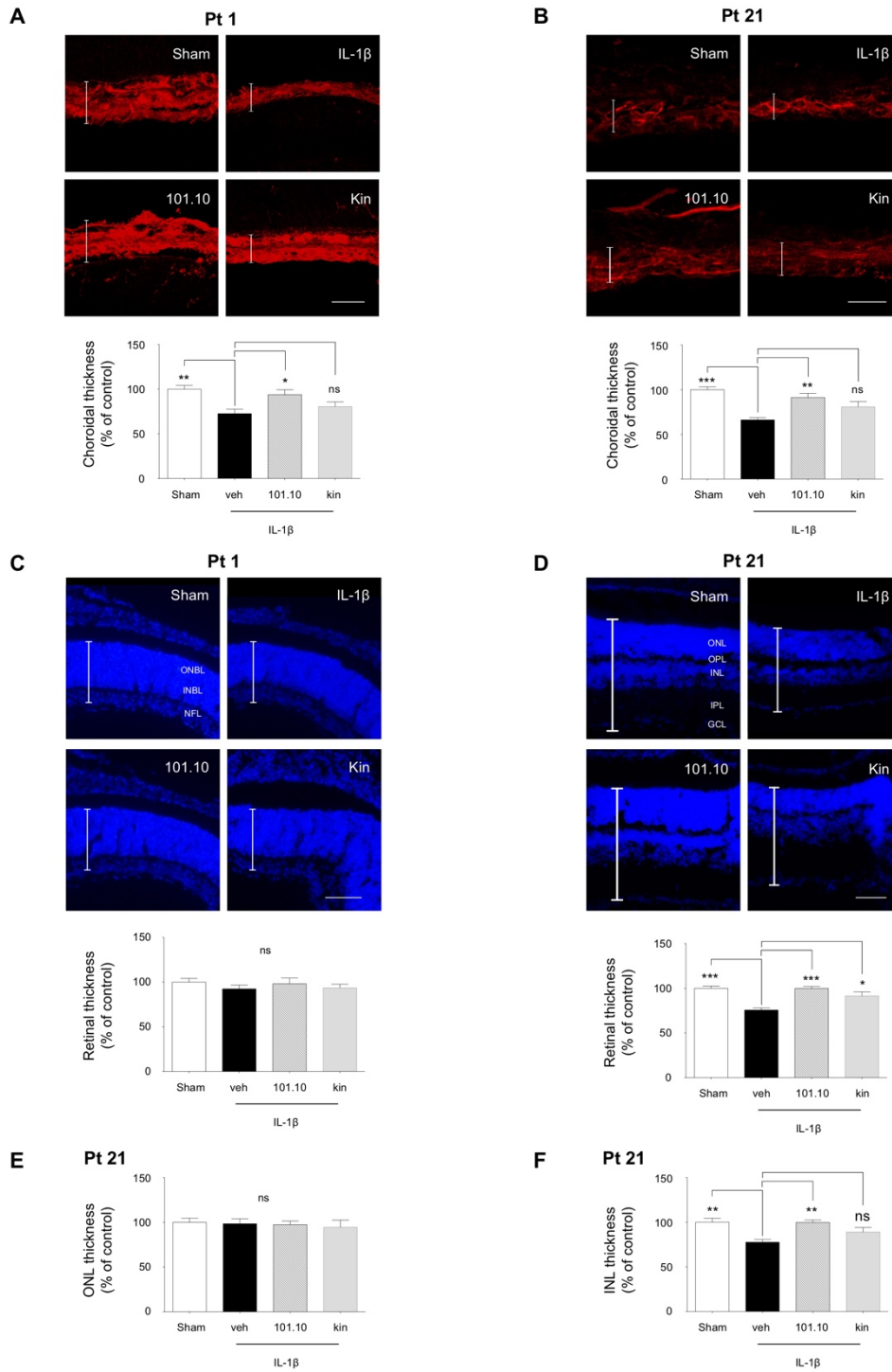


**Figure 4.4 | Delay of retinal vessel growth in progeny.**

A-C, lectin-stained flat-mounts of retinas from pups at Pt 1 (A), Pt 4 (B) and Pt 8 (C) previously exposed in utero to the indicated treatments (Fig. 4.1). Images are representative of 3 to 5 separate pups per treatment group. Dotted lines depict the vascular front. Scale bar for A, 1500  $\mu\text{m}$ ; scale bar for B, 2500  $\mu\text{m}$ ; scale bar for C, 3000  $\mu\text{m}$ . Right panels show quantification of the

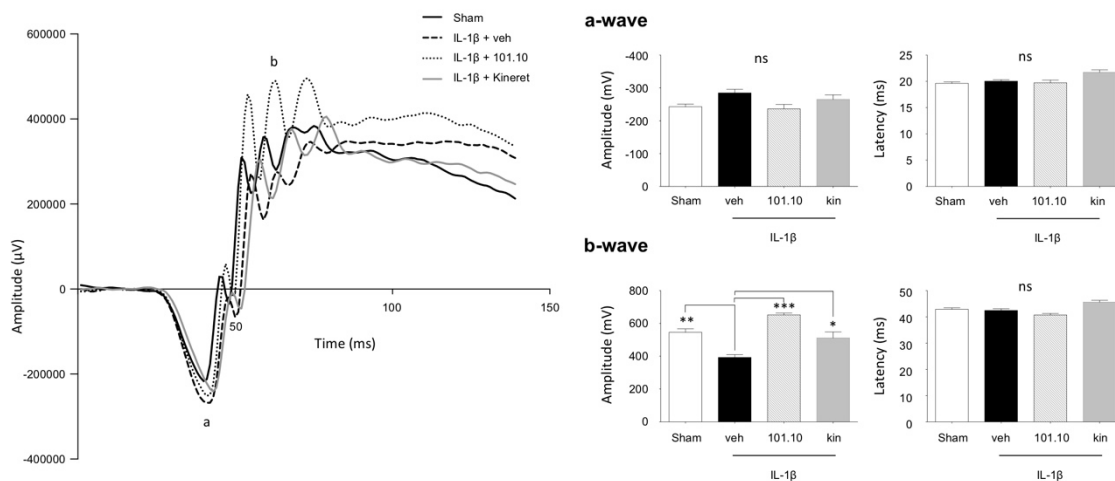
vascular area, n=3-5 dams/group. D, magnification of lectin-stained flat-mounts of retinas from pups at Pt15 showing vascular density. Images are representative of 5 to 8 separate pups per treatment group. Scale bar, 150  $\mu$ m. Right panel shows quantification of the vascular area at Pt8 and Pt15, n=5-8 dams/group. Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 by one-way ANOVA with Dunnett's post-analysis.





**Figure 4.5 | Choroidal thinning precedes retinal degeneration and thinning of the inner nuclear layer.**

A-B, representative images (top panels) and quantification (bottom panels) of lectin-stained cross-sections of choroids from pups at Pt 1 (A) and Pt 21 (B) previously exposed to the indicated treatments in utero (Fig. 4.1). Vertical bars represent the average choroidal thickness. Scale bar for A, 30  $\mu\text{m}$ ; scale bar for B, 50  $\mu\text{m}$ .  $n=3-4$  pups/group. C-D, representative images (top panels) and quantification (bottom panels) of DAPI-stained cross-sections of retinas from pups at Pt1 (C) and Pt21 (D) previously exposed to the indicated treatments in utero (Fig. 4.1);  $n=3-4$  pups/group. Vertical bars represent the average retinal thickness. Scale bar for C, 250  $\mu\text{m}$ ; scale bar for B, 500  $\mu\text{m}$ . E-F, quantification of DAPI-stained cross-sections of the ONL (E) and INL (F) from the same retinas measured in D. Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  by one-way ANOVA with Dunnett's post-analysis. ONBL, outer neuroblastic layer; INBL, inner neuroblastic layer; NFL, nerve fibre layer; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; GCL, ganglion cell layer.



**Figure 4.6 | Electretinogram readings after completion of ocular development.**

A, representative ERG response of pups at Pt 30 previously exposed to the indicated treatments in utero (Fig. 4.1). B-C, a-wave amplitude (B) and latency (C) of scotopic ERGs of corresponding animals. D-E, b-wave amplitude (D) and latency (E) of scotopic ERGs of corresponding animals.  $n=8-22$  pups/group. Values are presented as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  by one-way ANOVA with Dunnett's post-analysis.

## 4.9 Tables

**Table I** | Forward and reverse sequences of primers used for RT-qPCR gene analysis

<b>Primers</b>		
<b>Gene</b>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
IL-1 $\beta$	5'-CAACGATGATGCACTTGCAGA-3'	5'-GGAAGGTCCACGGGAAAGAC-3'
IL-6	5'-AGATGAAGGGCTGCTTCCAAA-3'	5'-TCTCTCTGAAGGACTCTGGCT-3'
IL-8	5'-TGCTTTTGGCTTTCGTTGA-3'	5'-GTCAGAACGTGGCGCTATCT-3'
IL-12	5'-TTCTCACCGTGCACATCCAA-3'	5'-GAGGAGGTAGCGTGATTGACA-3'
CCL2	5'-GCTCAGCCAGATGCAGTTA-3'	5'-TGTCTGGACCCATTCTTCT-3'
Caspase-1	5'-CACAGCTCTGGAGATCGGTGAA-3'	5'-CCACGGCATGCCTGAATAATG-3'
TNF $\alpha$	5'-ATGGCCTCCCTCTCATCAGT-3'	5'-TGGTTTGCTACGACGTGGG-3'
IL-4	5'-CCATATCCACGGATGCGACA-3'	5'-CTGTGGTGTTCCTTCGTTGCTG-3'
IL-10	5'-AGGCGCTGTCATCGATTTCT-3'	5'-TGGCCTTGTAGACACCTTGGT-3'
IL-27	5'-TGTCCACAGCTTTGCTGAAT-3'	5'-AGGAGGTCCAGTTCACTCC-3'

## 5. Discussion générale

La formation d'un organisme aussi complexe que l'humain est un processus aussi compliqué que délicat ; chaque perturbation est susceptible de nuire au développement des organes. Particulièrement, l'œil est un organe dont chaque composante joue un rôle essentiel dans la physique optique, la photoconversion et la transmission électrique du signal permettant la vision. De plus, la croissance des vaisseaux sanguins doit se faire en symbiose avec le développement de la rétine, puisqu'un moment d'ischémie peut avoir des répercussions fonctionnelles importantes en ce début fragile de vie. Comme nous l'avons compris grâce à ce travail de maîtrise, le changement d'environnement engendré par l'inflammation utérine peut affecter la fonction à long terme du système visuel. Pour la première fois, un lien a été observé entre la présence d'IL-1 $\beta$  dans l'utérus et les dommages oculaires de la progéniture avant et après la naissance.

Aussitôt qu'un jour après l'induction de l'inflammation utérine avec IL-1 $\beta$ , une réponse inflammatoire est montée dans l'œil du fœtus et celle-ci est 23 fois plus importante dans la rétine que dans la choroïde. Dans cette réponse, l'IL-1 $\beta$  est la cytokine prédominante malgré une présence marquée d'autres acteurs inflammatoires tels l'IL-6, l'IL-8 et le TNF- $\alpha$ . Après la naissance, une inflammation chronique s'installe, et correspond à la présence accrue de cellules immunitaires dans la rétine et la choroïde, jusqu'à l'âge adulte. Il est intéressant de noter que les macrophages et microglies semblent se retirer de la rétine, tandis que leur nombre s'accroît dans la choroïde avec le temps. L'atteinte de la choroïde a déjà fait l'objet d'une étude longitudinale dans un modèle semblable, et une dégénérescence des photorécepteurs en était la conséquence tardive (Zhou, Rivera et al. 2016). Ainsi, la continuation de nos observations aurait

probablement révélé une atteinte tardive des photorécepteurs, en concordance avec la progression de l'inflammation dans la choroïde.

Ces travaux montrent aussi une atteinte fonctionnelle après un mois de vie, particulièrement au niveau des cellules bipolaires, dont l'amplitude de la réponse est diminuée à l'électrorétinographie. Étant donné le retard marqué de croissance des vaisseaux rétiniens, cette couche de cellules est la dernière à recevoir l'apport sanguin et a probablement subi une ischémie lorsque la prolifération des couches profondes était retardée. Effectivement, les vaisseaux rétiniens atteignent la couche des cellules bipolaires en tout dernier ; tout retard peut significativement affecter la réponse neuronale à l'électrorétinographie (Noonan, Lamoureux et al. 2015). Déjà, un amincissement de la rétine est mesuré au 21<sup>e</sup> jour de vie, qui touche particulièrement la couche INL ; celle des cellules bipolaires. Ainsi, un substrat morphologique précède les résultats fonctionnels. Cependant, notre laboratoire n'avait pas l'expertise de faire les études d'électrophysiologie avant le 30<sup>e</sup> jour de vie, à cause de la petite taille des yeux de jeunes souris. Des études fonctionnelles longitudinales aideraient à déterminer le délai entre l'ischémie rétinienne et les défauts fonctionnels. Des expériences additionnelles auraient pu également approfondir le processus impliqué dans la perte de fonction rétinienne. S'agit-il d'un retard de développement ou plutôt d'une apoptose induite par l'ischémie?

Ces travaux montrent bien l'effet d'IL-1 $\beta$  sur le développement de l'œil, indépendamment de l'âge gestationnel. Pour la première fois, des observations menées depuis la période prénatale jusqu'à la fin du développement postnatal jettent la lumière sur l'importance de considérer l'environnement *in utero* lors de l'étude de maladies périnatales, telle la rétinopathie du prématuré. Un élément important de ces recherches est aussi l'absence de déficits lorsque l'accouchement est provoqué prématurément avec du RU486, un stéroïde

antagoniste du récepteur de la progestérone, qui enclenche le travail indépendamment de l'inflammation (Dudley, Branch et al. 1996).

Cependant, des travaux plus poussés seraient appropriés pour comparer les effets observés avec l'accouchement prématuré induit par une injection *in utero* de lipopolysaccharides (LPS), un motif retrouvé typiquement sur les bactéries Gram<sup>-</sup>. En se liant aux récepteurs de type Toll, le LPS peut déclencher une cascade inflammatoire similaire à la chorioamnionite infectieuse (Adams Waldorf, Persing et al. 2008). Une comparaison entre le LPS et l'IL-1 $\beta$  permettrait de voir si cette dernière est suffisante pour reproduire la palette des dommages oculaires causés par la chorioamnionite, ou si d'autres mécanismes pathophysiologiques pourraient être impliqués.

Plusieurs autres molécules jouent un rôle important dans la genèse de l'inflammation et devraient être testées dans ce modèle périnatal de dommages oculaires. Par exemple, une élévation de l'IL-6 et une diminution de l'IL-10 dans le sang de la mère sont associées à un risque élevé de NP (Pandey, Chauhan et al. 2017). Ainsi, leur contribution à la pathophysiologie de la rétinopathie du prématuré n'est sûrement pas négligeable. Un lien a d'ailleurs déjà été établi entre la présence d'IL-6 dans le sang néonatal et le développement de rétinopathie du prématuré (Hellgren, Lofqvist et al. 2018). Cependant, l'IL-6 semble tenir un rôle dans le maintien de l'inflammation, plutôt que dans son induction (Tanaka, Narazaki et al. 2014). Cibler l'IL-6 pourrait contribuer au traitement en brisant l'inflammation chronique, si la fenêtre d'action de thérapies anti-IL1 est dépassée. Aussi, une combinaison de 101.10 avec un inhibiteur de l'IL-6 pourrait grandement augmenter l'efficacité d'un traitement anti-inflammatoire.

Une autre piste de recherche intéressante qui a été ouverte par ce travail est le rôle de l'IL-12 dans la morbidité oculaire périnatale. Une forte augmentation de son expression suit de près celle de l'IL-1 $\beta$ . L'IL-12 est une cytokine sécrétée par les tissus lésés afin de stimuler la différenciation des cellules T et d'entretenir l'état inflammatoire (Sun, He et al. 2015). Elle est également associée à des pathologies oculaires inflammatoires, telle l'uvéïte, où des taux particulièrement élevés ont été mesurés dans la chambre antérieure en phase aigüe (el-Shabrawi, Livir-Rallatos et al. 1998). De plus, l'IL-12 est bien connue dans le monde de la recherche sur le cancer pour ses propriétés anti-angiogéniques ; elle est étudiée dans la thérapie immunologique afin d'empêcher la croissance de néo-vaisseaux dans la tumeur (Voest, Kenyon et al. 1995). Plusieurs mécanismes semblent être en cause : 1) induction de l'expression d'interféron (INF)- $\gamma$ , qui à son tour inhibe la production de VEGF et de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$ , ce qui diminue la survie et l'adhésion des cellules endothéliales (Dias, Boyd et al. 1998, Ruegg, Yilmaz et al. 1998) ; 2) inhibition de la métalloprotéïnase-9, ce qui affecte le remodelage vasculaire en déstabilisant la matrice extracellulaire (Mitola, Strasly et al. 2003) ; et 3) stimulation de la production de protéines inductibles par INF-10 et de monokines inductibles par INF Mig, qui réduisent l'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire, en plus d'inhiber leur division cellulaire (Strasly, Cavallo et al. 2001). Quelques questions restent cependant sans réponse : quel est le rôle de l'IL-12 dans la NP? Est-elle directement ou indirectement induite par l'IL-1 $\beta$ ? L'IL-12 peut-elle nuire à elle seule au développement vasculaire? Une étude plus approfondie des interactions entre l'IL-1 $\beta$  et l'IL-12 permettrait de mieux comprendre le retard de croissance observé dans les vaisseaux rétiniens induit par l'inflammation.

Tel que décrit plus haut, l'apport sanguin de la rétine se divise en deux compartiments : celui de la choroïde, qui nourrit les photorécepteurs et l'EPR, et celui des vaisseaux rétiniens,

qui desservent toutes les autres couches de la rétine. Puisque ces deux systèmes travaillent de concert, on peut s'interroger sur la différence de résultats entre les deux compartiments, avec une réponse particulièrement élevée dans la rétine par rapport à la choroïde. La réponse se trouve sûrement dans la chronologie des événements. L'inflammation utérine est induite au jour de gestation 17,5 – bien après que la choroïde soit formée. Il y a un ralentissement dans sa croissance, tel que montré par une choroïde significativement plus mince à la naissance, mais les vaisseaux déjà en place permettent un apport sanguin suffisant aux photorécepteurs. Du côté rétinien, les vaisseaux n'ont pas commencé à se former chez la souris au moment de l'injection. Ainsi, la présence de facteurs anti-angiogéniques tel l'IL-12 ralentit l'initiation de la vasculogénèse. Malgré que les vaisseaux parviennent à atteindre leur cible après un mois de vie, le retard de bourgeonnement vasculaire a des répercussions à long terme sur la fonction de la rétine, particulièrement sur les cellules de la couche INL.

Dans cet article et d'autres qui ont précédé, la différence d'efficacité entre le 101.10 et le Kineret est flagrante (Nadeau-Vallee, Chin et al. 2017). Malgré que ces derniers retardent tous deux l'inflammation oculaire chez le fœtus (Figure 4.2A-C), le Kineret, qui bloque pourtant tout le récepteur d'IL-1, a des effets très limités pour empêcher les répercussions cliniques de l'inflammation à long terme. De son côté, le 101.10 possède un effet cliniquement plus important en empêchant même l'inflammation de provoquer la NP. Deux éléments de réponses ont été suggérés. Premièrement, la petite taille du 101.10 en comparaison au Kineret lui donne une meilleure biodisponibilité dans les tissus gestationnels (Girard and Sebire 2016). Des études non publiées montrent que le 101.10 ne traverse pas la barrière placentaire et donc n'atteint pas le fœtus ; ses effets ne sont donc pas sur l'œil directement, mais en atténuant l'inflammation induite du côté maternel. Le Kineret permettrait donc peut-être de retarder la réponse



inflammatoire, mais celle-ci s'emballe dès que les injections sont arrêtées – dans ce cas, à la naissance – tel que vu dans les résultats d'ELISA (Figure 4.2D-F). Deuxièmement, l'activation partielle du récepteur par le 101.10 permet de préserver la voie intracellulaire du NF- $\kappa$ B et donc de promouvoir la survie cellulaire, un rôle physiologique de l'inflammation important. Si le 101.10 était donné en anténatal, cela préviendrait l'inflammation délétère à sa source et protégerait le fœtus contre d'éventuels dommages causés par la naissance prématurée. De plus, le 101.10 est particulièrement efficace pour protéger l'œil. D'autres travaux ont également montré son efficacité dans un modèle postnatal de rétinopathie du prématuré, donc il pourrait être utilisé à différents stades de la maladie (Rivera, Sitaras et al. 2013).

La rétinopathie du prématuré est une maladie récente, apparue dans les années 1940 lorsque les enfants prématurés ont été placés dans des incubateurs avec de hauts niveaux d'oxygène pour favoriser leur survie (Hellstrom, Smith et al. 2013). Ainsi, la maladie a été liée à l'hyperoxie et le modèle utilisé en recherche se limite à cette association : les rongeurs sont placés dans des incubateurs avec de hauts taux d'oxygène après la naissance (Liegl, Priglinger et al. 2019). Or ce modèle possède deux failles. D'abord, les rongeurs utilisés sont nés à terme, et donc le développement oculaire est plus avancé que si un modèle de NP était utilisé. Aussi, les souris ne sont pas exposés à l'inflammation durant la gestation. Grâce au travail présenté ici, une amélioration du modèle en combinant la NP induite par l'inflammation et l'hyperoxie améliorerait la recherche de nouveaux traitements plus efficaces pour la rétinopathie du prématuré. Effectivement, les traitements présentement disponibles ne ciblent que les phases tardives et ne peuvent pas renverser les dommages oculaires comme le décollement rétinien et la néovascularisation (Hellstrom, Smith et al. 2013). Ce travail est le premier à faire le pont

entre l'inflammation et la vasculogénèse rétinienne anormale, et cela ajoute un élément crucial dans la compréhension de la pathophysiologie des désordres vasculaires périnataux.

L'étude de l'IL-1 $\beta$  maternelle sur le développement des organes fœtaux a permis de mieux comprendre le rôle de l'inflammation dans les processus pathologiques entourant la NP. La prochaine étape découlant directement de cet article ainsi que des publications récentes sur le 101.10 serait d'amener ce peptide en essais cliniques. D'abord, des essais de pharmacocinétique seront nécessaires pour estimer les dosages nécessaires, ainsi que la voie d'administration optimale. Puis, après des études précliniques de toxicité et de tératogénicité approfondies, les essais cliniques de phase I devraient être lancés sans délai, avec l'espoir de pouvoir éventuellement faire des essais sur des femmes très à risque d'accouchement prématuré.

Le 101.10, avec ses effets encourageants sur l'inflammation aiguë, pourrait être testé dans d'autres maladies auto-immunes. Ce peptide a déjà montré des résultats intéressants dans la lésion ischémique cérébrale du nouveau-né (Quiniou, Kooli et al. 2008). Des maladies telles que la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde et les accidents cérébro-vasculaires pourraient bénéficier d'essais cliniques avec le 101.10, en espérant obtenir des effets supérieurs aux traitements actuels.

## **6. Conclusion**

En résumé, c'est avec beaucoup d'espoir que cet article a été publié. Celui d'un pas vers l'avant dans la compréhension des morbidités périnatales associées à la prématurité, et aussi celui de propulser vers l'avant un nouveau traitement pour les maladies inflammatoires résistantes aux médicaments actuels. En fin de compte, ce sont 15 millions d'enfants prématurés par année qui pourraient bénéficier d'un tel anti-inflammatoire, en plus d'améliorer leur qualité de vie future.

## 7. Bibliographie

(2013). "ACOG committee opinion no. 561: Nonmedically indicated early-term deliveries." Obstet Gynecol **121**(4): 911-915.

Adams Waldorf, K. M., D. Persing, M. J. Novy, D. W. Sadowsky and M. G. Gravett (2008). "Pretreatment with toll-like receptor 4 antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced preterm uterine contractility, cytokines, and prostaglandins in rhesus monkeys." Reprod Sci **15**(2): 121-127.

Ahmed, J., R. D. Braun, R. Dunn, Jr. and R. A. Linsenmeier (1993). "Oxygen distribution in the macaque retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(3): 516-521.

Allende, A., M. C. Madigan and J. M. Provis (2006). "Endothelial cell proliferation in the choriocapillaris during human retinal differentiation." Br J Ophthalmol **90**(8): 1046-1051.

Aouba, A., S. Deshayes, L. Frenzel, A. Decottignies, C. Pressiat, B. Bienvenu, F. Boue, G. Damaj, O. Hermine and S. Georgin-Lavialle (2015). "Efficacy of anakinra for various types of crystal-induced arthritis in complex hospitalized patients: a case series and review of the literature." Mediators Inflamm **2015**: 792173.

Arthur, P., M. J. Taggart, B. Zielnik, S. Wong and B. F. Mitchell (2008). "Relationship between gene expression and function of uterotonic systems in the rat during gestation, uterine activation and both term and preterm labour." J Physiol **586**(24): 6063-6076.

Baba, T., R. Grebe, T. Hasegawa, I. Bhutto, C. Merges, D. S. McLeod and G. A. Luty (2009). "Maturation of the fetal human choriocapillaris." Investigative ophthalmology & visual science **50**(7): 3503-3511.

Bastek, J. A., A. L. Weber, M. A. McShea, M. E. Ryan and M. A. Elovitz (2014). "Prenatal inflammation is associated with adverse neonatal outcomes." Am J Obstet Gynecol **210**(5): 450.e451-410.

Beaudry-Richard, A., M. Nadeau-Vallee, E. Prairie, N. Maurice, E. Heckel, M. Nezhady, S. Pundir, A. Madaan, A. Boudreault, X. Hou, C. Quiniou, E. M. Sierra, A. Beaulac, G. Lodygensky, S. A. Robertson, J. Keelan, K. Adams-Waldorf, D. M. Olson, J. C. Rivera, W. D. Lubell, J. S. Joyal, J. F. Bouchard and S. Chemtob (2018). "Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny." Sci Rep **8**(1): 11875.

Benedito, R., C. Roca, I. Sorensen, S. Adams, A. Gossler, M. Fruttiger and R. H. Adams (2009). "The notch ligands Dll4 and Jagged1 have opposing effects on angiogenesis." Cell **137**(6): 1124-1135.

Benjamin, L. E., D. Golijanin, A. Itin, D. Pode and E. Keshet (1999). "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal." J Clin Invest **103**(2): 159-165.

Blencowe, H., S. Cousens, D. Chou, M. Oestergaard, L. Say, A.-B. Moller, M. Kinney and J. Lawn (2013). "Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births." Reproductive health **10**(1): S2.

Blencowe, H., S. Cousens, D. Chou, M. Oestergaard, L. Say, A. B. Moller, M. Kinney and J. Lawn (2013). "Born too soon: the global epidemiology of 15 million preterm births." Reprod Health **10 Suppl 1**: S2.

Boche, D., V. H. Perry and J. A. Nicoll (2013). "Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain." Neuropathol Appl Neurobiol **39**(1): 3-18.

Caprara, C. and C. Grimm (2012). "From oxygen to erythropoietin: relevance of hypoxia for retinal development, health and disease." Prog Retin Eye Res **31**(1): 89-119.

Casey, M. L., S. M. Cox, B. Beutler, L. Milewich and P. C. MacDonald (1989). "Cachectin/tumor necrosis factor-alpha formation in human decidua. Potential role of cytokines in infection-induced preterm labor." J Clin Invest **83**(2): 430-436.

Cayabyab, R. G., C. A. Jones, K. Y. Kwong, C. Hendershott, C. Lecart, P. Minoo and R. Ramanathan (2003). "Interleukin-1beta in the bronchoalveolar lavage fluid of premature neonates: a marker for maternal chorioamnionitis and predictor of adverse neonatal outcome." J Matern Fetal Neonatal Med **14**(3): 205-211.

Chaemsaihong, P., R. Romero, S. J. Korzeniewski, A. Martinez-Varea, Z. Dong, B. H. Yoon, S. S. Hassan, T. Chaiworapongsa and L. Yeo (2016). "A point of care test for interleukin-6 in amniotic fluid in preterm prelabor rupture of membranes: a step toward the early treatment of acute intra-amniotic inflammation/infection." J Matern Fetal Neonatal Med **29**(3): 360-367.

Christiaens, I., D. B. Zaragoza, L. Guilbert, S. A. Robertson, B. F. Mitchell and D. M. Olson (2008). "Inflammatory processes in preterm and term parturition." J Reprod Immunol **79**(1): 50-57.

Cirillo, G., L. Casalino, D. Vallone, A. Caracciolo, D. De Cesare and P. Verde (1999). "Role of distinct mitogen-activated protein kinase pathways and cooperation between Ets-2, ATF-2, and Jun family members in human urokinase-type plasminogen activator gene induction by interleukin-1 and tetradecanoyl phorbol acetate." Mol Cell Biol **19**(9): 6240-6252.

Cook, J. L., M. C. Shallow, D. B. Zaragoza, K. I. Anderson and D. M. Olson (2003). "Mouse placental prostaglandins are associated with uterine activation and the timing of birth." Biol Reprod **68**(2): 579-587.

Cox, S. M., M. L. Casey and P. C. MacDonald (1997). "Accumulation of interleukin-1beta and interleukin-6 in amniotic fluid: a sequela of labour at term and preterm." Hum Reprod Update **3**(5): 517-527.

Dammann, O. and A. Leviton (1997). "Maternal intrauterine infection, cytokines, and brain damage in the preterm newborn." Pediatr Res **42**(1): 1-8.

Dammann, O. and A. Leviton (2006). "Inflammation, brain damage and visual dysfunction in preterm infants." Semin Fetal Neonatal Med **11**(5): 363-368.

de Koning, H. D., J. Schalkwijk, J. van der Ven-Jongekrijg, M. Stoffels, J. W. van der Meer and A. Simon (2013). "Sustained efficacy of the monoclonal anti-interleukin-1 beta antibody canakinumab in a 9-month trial in Schnitzler's syndrome." Ann Rheum Dis **72**(10): 1634-1638.

Dias, S., R. Boyd and F. Balkwill (1998). "IL-12 regulates VEGF and MMPs in a murine breast cancer model." Int J Cancer **78**(3): 361-365.

Dinarello, C. A. (1997). "Interleukin-1." Cytokine Growth Factor Rev **8**(4): 253-265.

Dinarello, C. A. and J. W. van der Meer (2013). "Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans." Semin Immunol **25**(6): 469-484.

Dorfman, A. L., N. Cuenca, I. Pinilla, S. Chemtob and P. Lachapelle (2011). "Immunohistochemical evidence of synaptic retraction, cytoarchitectural remodeling, and cell death in the inner retina of the rat model of oxygen-induced retinopathy (OIR)." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(3): 1693-1708.

Dudley, D. J., D. W. Branch, S. S. Edwin and M. D. Mitchell (1996). "Induction of preterm birth in mice by RU486." Biol Reprod **55**(5): 992-995.

Dudley, D. J., D. Collmer, M. D. Mitchell and M. S. Trautman (1996). "Inflammatory cytokine mRNA in human gestational tissues: implications for term and preterm labor." J Soc Gynecol Investig **3**(6): 328-335.

Dwivedi, A. K., I. Mallawaarachchi and L. A. Alvarado (2017). "Analysis of small sample size studies using nonparametric bootstrap test with pooled resampling method." Stat Med **36**(14): 2187-2205.

Eandi, C. M., H. Charles Messance, S. Augustin, E. Dominguez, S. Lavalette, V. Forster, S. J. Hu, L. Siquieros, C. M. Craft, J. A. Sahel, R. Tadayoni, M. Paques, X. Guillonneau and F. Sennlaub (2016). "Subretinal mononuclear phagocytes induce cone segment loss via IL-1beta." Elife **5**.

el-Shabrawi, Y., C. Livir-Rallatos, W. Christen, S. Baltatzis and C. S. Foster (1998). "High levels of interleukin-12 in the aqueous humor and vitreous of patients with uveitis." Ophthalmology **105**(9): 1659-1663.

Elliott, E. I. and F. S. Sutterwala (2015). "Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly." Immunol Rev **265**(1): 35-52.

Fidel, P. L., Jr., R. Romero, J. Cutright, N. Wolf, R. Gomez, H. Araneda, M. Ramirez and B. H. Yoon (1997). "Treatment with the interleukin-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein does not prevent endotoxin-induced preterm parturition in mice." J Soc Gynecol Investig **4**(1): 22-26.

Figg, W. D. and J. Folkman (2008). Angiogenesis: An Integrative Approach from Science to Medicine, Springer US.



Fruttiger, M., A. R. Calver, W. H. Kruger, H. S. Mudhar, D. Michalovich, N. Takakura, S. Nishikawa and W. D. Richardson (1996). "PDGF mediates a neuron-astrocyte interaction in the developing retina." Neuron **17**(6): 1117-1131.

Gabay, C., C. Lamacchia and G. Palmer (2010). "IL-1 pathways in inflammation and human diseases." Nat Rev Rheumatol **6**(4): 232-241.

Galinsky, R., G. R. Polglase, S. B. Hooper, M. J. Black and T. J. Moss (2013). "The consequences of chorioamnionitis: preterm birth and effects on development." J Pregnancy **2013**: 412831.

Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima and C. Betsholtz (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." J Cell Biol **161**(6): 1163-1177.

Girard, S. and G. Sebire (2016). "Transplacental Transfer of Interleukin-1 Receptor Agonist and Antagonist Following Maternal Immune Activation." Am J Reprod Immunol **75**(1): 8-12.

Girard, S., L. Tremblay, M. Lepage and G. Sebire (2010). "IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation." J Immunol **184**(7): 3997-4005.

Gishti, O., V. W. Jaddoe, L. Duijts, E. Steegers, I. Reiss, A. Hofman, T. Y. Wong, M. K. Ikram and R. Gaillard (2015). "Impact of birth parameters and early life growth patterns on retinal microvascular structure in children: The Generation R Study." J Hypertens **33**(7): 1429-1437.

Goldenberg, R. L., J. F. Culhane, J. D. Iams and R. Romero (2008). "Epidemiology and causes of preterm birth." Lancet **371**(9606): 75-84.

Gomez, R., R. Romero, F. Ghezzi, B. H. Yoon, M. Mazor and S. M. Berry (1998). "The fetal inflammatory response syndrome." Am J Obstet Gynecol **179**(1): 194-202.

Gomez-Lopez, N., L. J. Guilbert and D. M. Olson (2010). "Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy." J Leukoc Biol **88**(4): 625-633.

Gotsch, F., R. Romero, J. P. Kusanovic, S. Mazaki-Tovi, B. L. Pineles, O. Erez, J. Espinoza and S. S. Hassan (2007). "The fetal inflammatory response syndrome." Clin Obstet Gynecol **50**(3): 652-683.

Graw, J. (2010). Eye development. Current topics in developmental biology, Elsevier. **90**: 343-386.

Guillonnet, X., C. M. Eandi, M. Paques, J. A. Sahel, P. Sapielha and F. Sennlaub (2017). "On phagocytes and macular degeneration." Prog Retin Eye Res **61**: 98-128.

Guzzo, C., N. F. Che Mat and K. Gee (2010). "Interleukin-27 induces a STAT1/3- and NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine profile in human monocytes." J Biol Chem **285**(32): 24404-24411.

Hanna, N., I. Hanna, M. Hleb, E. Wagner, J. Dougherty, D. Balkundi, J. Padbury and S. Sharma (2000). "Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts." J Immunol **164**(11): 5721-5728.

Hansen, R. M., A. Moskowitz, J. D. Akula and A. B. Fulton (2017). "The neural retina in retinopathy of prematurity." Prog Retin Eye Res **56**: 32-57.

Hardy, P., M. Beauchamp, F. Sennlaub, F. Gobeil, Jr., L. Tremblay, B. Mwaikambo, P. Lachapelle and S. Chemtob (2005). "New insights into the retinal circulation: inflammatory

lipid mediators in ischemic retinopathy." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **72**(5): 301-325.

Hartnett, M. E. (2015). "Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity." Ophthalmology **122**(1): 200-210.

Hasegawa, T., D. S. McLeod, I. A. Bhutto, T. Prow, C. A. Merges, R. Grebe and G. A. Luty (2007). "The embryonic human choriocapillaris develops by hemo-vasculogenesis." Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists **236**(8): 2089-2100.

Hasegawa, T., D. S. McLeod, T. Prow, C. Merges, R. Grebe and G. A. Luty (2008). "Vascular precursors in developing human retina." Investigative ophthalmology & visual science **49**(5): 2178-2192.

Hasturk, A. E., E. R. Yilmaz, E. Turkoglu, M. Arıkan, G. Togrul, N. Hayırlı, B. I. Erguder and O. Evirgen (2015). "Potential neuroprotective effect of Anakinra in spinal cord injury in an in vivo experimental animal model." Neurosciences (Riyadh) **20**(2): 124-130.

Heavner, W. and L. Pevny (2012). "Eye development and retinogenesis." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(12).

Heid, M. E., P. A. Keyel, C. Kamga, S. Shiva, S. C. Watkins and R. D. Salter (2013). "Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation." J Immunol **191**(10): 5230-5238.

Hellgren, G., C. Lofqvist, I. Hansen-Pupp, M. Gram, L. E. Smith, D. Ley and A. Hellstrom (2018). "Increased postnatal concentrations of pro-inflammatory cytokines are associated with reduced IGF-I levels and retinopathy of prematurity." Growth Horm IGF Res **39**: 19-24.

Hellstrom, A., L. E. Smith and O. Dammann (2013). "Retinopathy of prematurity." Lancet **382**(9902): 1445-1457.

Hellstrom, M., L. K. Phng, J. J. Hofmann, E. Wallgard, L. Coultas, P. Lindblom, J. Alva, A. K. Nilsson, L. Karlsson, N. Gaiano, K. Yoon, J. Rossant, M. L. Iruela-Arispe, M. Kalen, H. Gerhardt and C. Betsholtz (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-780.

Hendrickson, A. (2016). "Development of Retinal Layers in Prenatal Human Retina." Am J Ophthalmol **161**: 29-35.e21.

Hofer, N., R. Kothari, N. Morris, W. Muller and B. Resch (2013). "The fetal inflammatory response syndrome is a risk factor for morbidity in preterm neonates." Am J Obstet Gynecol **209**(6): 542.e541-542.e511.

Hong, H. K., H. J. Lee, J. H. Ko, J. H. Park, J. Y. Park, C. W. Choi, C. H. Yoon, S. J. Ahn, K. H. Park, S. J. Woo and J. Y. Oh (2014). "Neonatal systemic inflammation in rats alters retinal vessel development and simulates pathologic features of retinopathy of prematurity." J Neuroinflammation **11**: 87.

Hou, C., A. M. Norcia, A. Madan, S. Tith, R. Agarwal and W. V. Good (2011). "Visual cortical function in very low birth weight infants without retinal or cerebral pathology." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(12): 9091-9098.

Hsueh, W., M. S. Caplan, X. W. Qu, X. D. Tan, I. G. De Plaen and F. Gonzalez-Crussi (2003). "Neonatal necrotizing enterocolitis: clinical considerations and pathogenetic concepts." Pediatr Dev Pathol **6**(1): 6-23.

Hughes, S., H. Yang and T. Chan-Ling (2000). "Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(5): 1217-1228.

Iliodromiti, Z., D. Zygouris, S. Sifakis, K. I. Pappa, P. Tsikouras, N. Salakos, A. Daniilidis, C. Siristatidis and N. Vrachnis (2013). "Acute lung injury in preterm fetuses and neonates: mechanisms and molecular pathways." J Matern Fetal Neonatal Med **26**(17): 1696-1704.

Institute of Medicine Committee on Understanding Premature, B. and O. Assuring Healthy (2007). The National Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health. Preterm Birth: Causes, Consequences, and Prevention. R. E. Behrman and A. S. Butler. Washington (DC), National Academies Press (US)  
National Academy of Sciences.

Ito, D., Y. Imai, K. Ohsawa, K. Nakajima, Y. Fukuuchi and S. Kohsaka (1998). "Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1." Brain Res Mol Brain Res **57**(1): 1-9.

Jacobsson, B., I. Mattsby-Baltzer, B. Andersch, H. Bokstrom, R. M. Holst, N. Nikolaitchouk, U. B. Wennerholm and H. Hagberg (2003). "Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes." Acta Obstet Gynecol Scand **82**(5): 423-431.

Joyal, J. S., S. Nim, T. Zhu, N. Sitaras, J. C. Rivera, Z. Shao, P. Sapieha, D. Hamel, M. Sanchez, K. Zaniolo, M. St-Louis, J. Ouellette, M. Montoya-Zavala, A. Zabeida, E. Picard, P. Hardy, V. Bhosle, D. R. Varma, F. Gobeil, Jr., C. Beausejour, C. Boileau, W. Klein, M. Hollenberg, A. Ribeiro-da-Silva, G. Andelfinger and S. Chemtob (2014). "Subcellular localization of coagulation factor II receptor-like 1 in neurons governs angiogenesis." Nat Med **20**(10): 1165-1173.

Joyal, J. S., N. Sitaras, F. Binet, J. C. Rivera, A. Stahl, K. Zaniolo, Z. Shao, A. Polosa, T. Zhu, D. Hamel, M. Djavari, D. Kunik, J. C. Honore, E. Picard, A. Zabeida, D. R. Varma, G. Hickson, J. Mancini, M. Klagsbrun, S. Costantino, C. Beausejour, P. Lachapelle, L. E. Smith, S. Chemtob and P. Sapieha (2011). "Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A." Blood **117**(22): 6024-6035.

Kaplanski, G., C. Farnarier, S. Kaplanski, R. Porat, L. Shapiro, P. Bongrand and C. A. Dinarello (1994). "Interleukin-1 induces interleukin-8 secretion from endothelial cells by a juxtacrine mechanism." Blood **84**(12): 4242-4248.

Keelan, J. A., S. Khan, F. Yosaatmadja and M. D. Mitchell (2009). "Prevention of inflammatory activation of human gestational membranes in an ex vivo model using a pharmacological NF-kappaB inhibitor." J Immunol **183**(8): 5270-5278.

Kim, C. J., R. Romero, P. Chaemsathong, N. Chaiyasit, B. H. Yoon and Y. M. Kim (2015). "Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features, and clinical significance." Am J Obstet Gynecol **213**(4 Suppl): S29-52.

Kim, E. and S. Cho (2016). "Microglia and Monocyte-Derived Macrophages in Stroke." Neurotherapeutics **13**(4): 702-718.

Kowluru, R. A. and S. Odenbach (2004). "Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy." Br J Ophthalmol **88**(10): 1343-1347.

Kozulin, P., R. Natoli, K. M. B. O'Brien, M. C. Madigan and J. M. Provis (2010). "The cellular expression of antiangiogenic factors in fetal primate macula." Investigative ophthalmology & visual science **51**(8): 4298-4306.

Kraft, A. D., C. A. McPherson and G. J. Harry (2009). "Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival." Neurotoxicology **30**(5): 785-793.

Kunze, M., J. E. Hart, A. M. Lynch and R. S. Gibbs (2011). "Intrapartum management of premature rupture of membranes: effect on cesarean delivery rate." Obstet Gynecol **118**(6): 1247-1254.

Kunze, M., M. Klar, C. A. Morfeld, B. Thorns, R. L. Schild, F. Markfeld-Erol, R. Rasenack, H. Proempeler, R. Hentschel and W. R. Schaefer (2016). "Cytokines in noninvasively obtained amniotic fluid as predictors of fetal inflammatory response syndrome." Am J Obstet Gynecol **215**(1): 96.e91-98.

Kur, J., E. A. Newman and T. Chan-Ling (2012). "Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease." Prog Retin Eye Res **31**(5): 377-406.

Langmia, I. M., Y. D. Apalasy, S. Z. Omar and Z. Mohamed (2016). "Interleukin 1 receptor type 2 gene polymorphism is associated with reduced risk of preterm birth." J Matern Fetal Neonatal Med **29**(20): 3347-3350.

Larrivee, B., C. Prahst, E. Gordon, R. del Toro, T. Mathivet, A. Duarte, M. Simons and A. Eichmann (2012). "ALK1 signaling inhibits angiogenesis by cooperating with the Notch pathway." Dev Cell **22**(3): 489-500.

Le, Y. Z., Y. Bai, M. Zhu and L. Zheng (2010). "Temporal requirement of RPE-derived VEGF in the development of choroidal vasculature." Journal of neurochemistry **112**(6): 1584-1592.

Lee, J. and O. Damman (2012). "Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity." Semin Fetal Neonatal Med **17**(1): 26-29.

Leitner, K., M. Al Shammery, M. McLane, M. V. Johnston, M. A. Elovitz and I. Burd (2014). "IL-1 receptor blockade prevents fetal cortical brain injury but not preterm birth in a mouse model of inflammation-induced preterm birth and perinatal brain injury." Am J Reprod Immunol **71**(5): 418-426.

Liegl, R., C. Priglinger and A. Ohlmann (2019). "Induction and Readout of Oxygen-Induced Retinopathy." Methods Mol Biol **1834**: 179-191.

Ling, T. L. and J. Stone (1988). "The development of astrocytes in the cat retina: evidence of migration from the optic nerve." Brain Res Dev Brain Res **44**(1): 73-85.

Liu, C. H., Z. Wang, Y. Sun and J. Chen (2017). "Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies." Faseb j **31**(11): 4665-4681.

Liu, L., S. Oza, D. Hogan, J. Perin, I. Rudan, J. E. Lawn, S. Cousens, C. Mathers and R. E. Black (2015). "Global, regional, and national causes of child mortality in 2000-13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis." Lancet **385**(9966): 430-440.

Lutty, G. A. and D. S. McLeod (2018). "Development of the hyaloid, choroidal and retinal vasculatures in the fetal human eye." Prog Retin Eye Res **62**: 58-76.

Medeiros, M. C., S. C. Frasnelli, S. Bastos Ade, S. R. Orrico and C. Rossa, Jr. (2014). "Modulation of cell proliferation, survival and gene expression by RAGE and TLR signaling in cells of the innate and adaptive immune response: role of p38 MAPK and NF-KB." J Appl Oral Sci **22**(3): 185-193.



Mion, F., S. Tonon, B. Toffoletto, D. Cesselli, C. E. Pucillo and G. Vitale (2014). "IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p38 activation." Mol Immunol **62**(2): 266-276.

Mitola, S., M. Strasly, M. Prato, P. Ghia and F. Bussolino (2003). "IL-12 regulates an endothelial cell-lymphocyte network: effect on metalloproteinase-9 production." J Immunol **171**(7): 3725-3733.

Moscuzza, F., F. Belcari, V. Nardini, A. Bartoli, C. Domenici, A. Cuttano, P. Ghirri and A. Boldrini (2011). "Correlation between placental histopathology and fetal/neonatal outcome: chorioamnionitis and funisitis are associated to intraventricular haemorrhage and retinopathy of prematurity in preterm newborns." Gynecol Endocrinol **27**(5): 319-323.

Murphy, S. L., T. J. Mathews, J. A. Martin, C. S. Minkovitz and D. M. Strobino (2017). "Annual Summary of Vital Statistics: 2013-2014." Pediatrics **139**(6).

Murtha, A. P., A. Nieves, E. R. Hauser, G. K. Swamy, B. A. Yonish, T. R. Sinclair and R. P. Heine (2006). "Association of maternal IL-1 receptor antagonist intron 2 gene polymorphism and preterm birth." Am J Obstet Gynecol **195**(5): 1249-1253.

Nadeau-Vallee, M., P. Y. Chin, L. Belarbi, M. E. Brien, S. Pundir, M. H. Berryer, A. Beaudry-Richard, A. Madaan, D. J. Sharkey, A. Lupien-Meilleur, X. Hou, C. Quiniou, A. Beaulac, I. Boufaied, A. Boudreault, A. Carbonaro, N. D. Doan, J. S. Joyal, W. D. Lubell, D. M. Olson, S. A. Robertson, S. Girard and S. Chemtob (2017). "Antenatal Suppression of IL-1 Protects against Inflammation-Induced Fetal Injury and Improves Neonatal and Developmental Outcomes in Mice." J Immunol **198**(5): 2047-2062.

Nadeau-Vallee, M., D. Obari, J. Palacios, M. E. Brien, C. Duval, S. Chemtob and S. Girard (2016). "Sterile inflammation and pregnancy complications: a review." Reproduction **152**(6): R277-r292.

Nadeau-Vallee, M., D. Obari, C. Quiniou, W. D. Lubell, D. M. Olson, S. Girard and S. Chemtob (2016). "A critical role of interleukin-1 in preterm labor." Cytokine Growth Factor Rev **28**: 37-51.

Nadeau-Vallee, M., C. Quiniou, J. Palacios, X. Hou, A. Erfani, A. Madaan, M. Sanchez, K. Leimert, A. Boudreault, F. Duhamel, J. C. Rivera, T. Zhu, B. Noueihed, S. A. Robertson, X. Ni, D. M. Olson, W. Lubell, S. Girard and S. Chemtob (2015). "Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth." J Immunol **195**(7): 3402-3415.

Nold, M. F., N. E. Mangan, I. Rudloff, S. X. Cho, N. Shariatian, T. D. Samarasinghe, E. M. Skuza, J. Pedersen, A. Veldman, P. J. Berger and C. A. Nold-Petry (2013). "Interleukin-1 receptor antagonist prevents murine bronchopulmonary dysplasia induced by perinatal inflammation and hyperoxia." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(35): 14384-14389.

Noonan, J. E., E. L. Lamoureux and M. Sarossy (2015). "Neuronal activity-dependent regulation of retinal blood flow." Clin Exp Ophthalmol **43**(7): 673-682.

Ntumba, K., N. Akla, S. P. Oh, A. Eichmann and B. Larrivee (2016). "BMP9/ALK1 inhibits neovascularization in mouse models of age-related macular degeneration." Oncotarget **7**(35): 55957-55969.

Okabe, K., S. Kobayashi, T. Yamada, T. Kurihara, I. Tai-Nagara, T. Miyamoto, Y. S. Mukoyama, T. N. Sato, T. Suda, M. Ema and Y. Kubota (2014). "Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina." Cell **159**(3): 584-596.

Pandey, M., M. Chauhan and S. Awasthi (2017). "Interplay of cytokines in preterm birth." Indian J Med Res **146**(3): 316-327.

Parham, P. (2014). The Immune System, Fourth Edition, Taylor & Francis Group.

Pereira, S. G. and F. Oakley (2008). "Nuclear factor-kappaB1: regulation and function." Int J Biochem Cell Biol **40**(8): 1425-1430.

Pierce, R. W., J. S. Giuliano, Jr. and J. S. Pober (2017). "Endothelial Cell Function and Dysfunction in Critically Ill Children." Pediatrics **140**(1).

Polverini, P. J. (1995). "The pathophysiology of angiogenesis." Crit Rev Oral Biol Med **6**(3): 230-247.

Provis, J. M. and A. E. Hendrickson (2008). "The foveal avascular region of developing human retina." Arch Ophthalmol **126**(4): 507-511.

Quiniou, C., E. Kooli, J. S. Joyal, P. Sapiha, F. Sennlaub, I. Lahaie, Z. Shao, X. Hou, P. Hardy, W. Lubell and S. Chemtob (2008). "Interleukin-1 and ischemic brain injury in the newborn: development of a small molecule inhibitor of IL-1 receptor." Semin Perinatol **32**(5): 325-333.

Quiniou, C., P. Sapiha, I. Lahaie, X. Hou, S. Brault, M. Beauchamp, M. Leduc, L. Rihakova, J. S. Joyal, S. Nadeau, N. Heveker, W. Lubell, F. Sennlaub, F. Gobeil, Jr., G. Miller, A. V. Pshezhetsky and S. Chemtob (2008). "Development of a novel noncompetitive antagonist of IL-1 receptor." J Immunol **180**(10): 6977-6987.

Raffa, L. H., J. Dahlgren, A. Hellstrom and M. Andersson Gronlund (2016). "Ocular morphology and visual function in relation to general growth in moderate-to-late preterm school-aged children." Acta Ophthalmol **94**(7): 712-720.

Rama, N., A. Dubrac, T. Mathivet, R. A. Ni Charthaigh, G. Genet, B. Cristofaro, L. Pibouin-Fragner, L. Ma, A. Eichmann and A. Chedotal (2015). "Slit2 signaling through Robo1 and Robo2 is required for retinal neovascularization." Nat Med **21**(5): 483-491.

Rees, S. and T. Inder (2005). "Fetal and neonatal origins of altered brain development." Early Hum Dev **81**(9): 753-761.

Rimessi, A., M. Previati, F. Nigro, M. R. Wieckowski and P. Pinton (2016). "Mitochondrial reactive oxygen species and inflammation: Molecular mechanisms, diseases and promising therapies." Int J Biochem Cell Biol **81**(Pt B): 281-293.

Rivera, J. C., M. Holm, D. Austeng, T. S. Morken, T. E. Zhou, A. Beaudry-Richard, E. M. Sierra, O. Dammann and S. Chemtob (2017). "Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies." J Neuroinflammation **14**(1): 165.

Rivera, J. C., B. Noueihed, A. Madaan, I. Lahaie, J. Pan, J. Belik and S. Chemtob (2017). "Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is associated with augmented inflammation and microvascular degeneration in the retina." J Neuroinflammation **14**(1): 181.

Rivera, J. C., P. Sapienza, J. S. Joyal, F. Duhamel, Z. Shao, N. Sitaras, E. Picard, E. Zhou, P. Lachapelle and S. Chemtob (2011). "Understanding retinopathy of prematurity: update on pathogenesis." Neonatology **100**(4): 343-353.

Rivera, J. C., N. Sitaras, B. Noueihed, D. Hamel, A. Madaan, T. Zhou, J. C. Honore, C. Quiniou, J. S. Joyal, P. Hardy, F. Sennlaub, W. Lubell and S. Chemtob (2013). "Microglia and interleukin-1beta in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A." Arterioscler Thromb Vasc Biol **33**(8): 1881-1891.

Rückerl, D., M. Heßmann, T. Yoshimoto, S. Ehlers and C. Hölscher (2006). "Alternatively activated macrophages express the IL-27 receptor alpha chain WSX-1." Immunobiology **211**(6): 427-436.

Ruegg, C., A. Yilmaz, G. Bieler, J. Bamat, P. Chaubert and F. J. Lejeune (1998). "Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma." Nat Med **4**(4): 408-414.

Santos, A. M., R. Calvente, M. Tassi, M. C. Carrasco, D. Martin-Oliva, J. L. Marin-Teva, J. Navascues and M. A. Cuadros (2008). "Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina." J Comp Neurol **506**(2): 224-239.

Sato, M., S. Nishimaki, S. Yokota, K. Seki, H. Horiguchi, H. An, F. Ishida, S. Fujita, K. Ao and H. Yatake (2011). "Severity of chorioamnionitis and neonatal outcome." J Obstet Gynaecol Res **37**(10): 1313-1319.

Savard, A., K. Lavoie, M. E. Brochu, D. Grbic, M. Lepage, D. Gris and G. Sebire (2013). "Involvement of neuronal IL-1beta in acquired brain lesions in a rat model of neonatal encephalopathy." J Neuroinflammation **10**: 110.

Selvam, S., T. Kumar and M. Fruttiger (2018). "Retinal vasculature development in health and disease." Prog Retin Eye Res **63**: 1-19.

Sernagor, E., S. Eglén, B. Harris and R. Wong (2006). Retinal Development, Cambridge University Press.

Shao, Z., A. L. Dorfman, S. Seshadri, M. Djavari, E. Kermorvant-Duchemin, F. Sennlaub, M. Blais, A. Polosa, D. R. Varma, J. S. Joyal, P. Lachapelle, P. Hardy, N. Sitaras, E. Picard, J.

Mancini, P. Sapienza and S. Chemtob (2011). "Choroidal involution is a key component of oxygen-induced retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(9): 6238-6248.

Sibley, C. H., A. Chioato, S. Felix, L. Colin, A. Chakraborty, N. Plass, J. Rodriguez-Smith, C. Brewer, K. King, C. Zalewski, H. J. Kim, R. Bishop, K. Abrams, D. Stone, D. Chapelle, B. Kost, C. Snyder, J. A. Butman, R. Wesley and R. Goldbach-Mansky (2015). "A 24-month open-label study of canakinumab in neonatal-onset multisystem inflammatory disease." Ann Rheum Dis **74**(9): 1714-1719.

Simi, A., N. Tsakiri, P. Wang and N. J. Rothwell (2007). "Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration." Biochem Soc Trans **35**(Pt 5): 1122-1126.

Sivakumar, V., W. S. Foulds, C. D. Luu, E. A. Ling and C. Kaur (2011). "Retinal ganglion cell death is induced by microglia derived pro-inflammatory cytokines in the hypoxic neonatal retina." J Pathol **224**(2): 245-260.

Sood, B. G., A. Madan, S. Saha, D. Schendel, P. Thorsen, K. Skogstrand, D. Hougaard, S. Shankaran and W. Carlo (2010). "Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity." Pediatr Res **67**(4): 394-400.

Stahl, A., K. M. Connor, P. Sapienza, J. Chen, R. J. Dennison, N. M. Krah, M. R. Seaward, K. L. Willett, C. M. Aderman, K. I. Guerin, J. Hua, C. Lofqvist, A. Hellstrom and L. E. Smith (2010). "The mouse retina as an angiogenesis model." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(6): 2813-2826.

Stenkamp, D. L. (2015). "Development of the Vertebrate Eye and Retina." Prog Mol Biol Transl Sci **134**: 397-414.

Strasly, M., F. Cavallo, M. Geuna, S. Mitola, M. P. Colombo, G. Forni and F. Bussolino (2001). "IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk." J Immunol **166**(6): 3890-3899.

Sun, L., C. He, L. Nair, J. Yeung and C. E. Egwuagu (2015). "Interleukin 12 (IL-12) family cytokines: Role in immune pathogenesis and treatment of CNS autoimmune disease." Cytokine **75**(2): 249-255.

Sundy, J. S., H. R. Schumacher, A. Kivitz, S. P. Weinstein, R. Wu, S. King-Davis and R. R. Evans (2014). "Rilonacept for gout flare prevention in patients receiving uric acid-lowering therapy: results of RESURGE, a phase III, international safety study." J Rheumatol **41**(8): 1703-1711.

Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2014). "IL-6 in inflammation, immunity, and disease." Cold Spring Harb Perspect Biol **6**(10): a016295.

Terry, T. L. (1942). "Extreme Prematurity and Fibroblastic Overgrowth of Persistent Vascular Sheath Behind Each Crystalline Lens\*\* From the Massachusetts Eye and Ear Infirmary. This investigation is made possible through the Special Fund for Research for Pathology Laboratory.: I. Preliminary Report." American Journal of Ophthalmology **25**(2): 203-204.

Tosato, G. and K. D. Jones (1990). "Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes." Blood **75**(6): 1305-1310.

Tremblay, S., K. Miloudi, S. Chaychi, S. Favret, F. Binet, A. Polosa, P. Lachapelle, S. Chemtob and P. Sapiéha (2013). "Systemic Inflammation Perturbs Developmental Retinal Angiogenesis and Neuroretinal Function Perinatal Sepsis Provokes Developmental Retinal Vascular Anomalies." Investigative Ophthalmology & Visual Science **54**(13): 8125-8139.

Tukaj, S., D. Zillikens and M. Kasperkiewicz (2014). "Inhibitory effects of heat shock protein 90 blockade on proinflammatory human Th1 and Th17 cell subpopulations." J Inflamm (Lond) **11**(1): 10.

Varani, J. and P. A. Ward (1994). "Mechanisms of endothelial cell injury in acute inflammation." Shock **2**(5): 311-319.

Verstraeten, B. S., J. Mijovic-Kondejewski, J. Takeda, S. Tanaka and D. M. Olson (2015). "Canada's pregnancy-related mortality rates: doing well but room for improvement." Clin Invest Med **38**(1): E15-22.

Vincent, J. A. and S. Mohr (2007). "Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia." Diabetes **56**(1): 224-230.

Voest, E. E., B. M. Kenyon, M. S. O'Reilly, G. Truitt, R. J. D'Amato and J. Folkman (1995). "Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12." J Natl Cancer Inst **87**(8): 581-586.

Wang, A. L., A. C. Yu, L. T. Lau, C. Lee, M. Wu le, X. Zhu and M. O. Tso (2005). "Minocycline inhibits LPS-induced retinal microglia activation." Neurochem Int **47**(1-2): 152-158.

Watanabe, T. and M. C. Raff (1988). "Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve." Nature **332**(6167): 834-837.

Watters, O. and J. J. O'Connor (2011). "A role for tumor necrosis factor-alpha in ischemia and ischemic preconditioning." J Neuroinflammation **8**: 87.

Wilkinson-Berka, J. L., I. Rana, R. Armani and A. Agrotis (2013). "Reactive oxygen species, Nox and angiotensin II in angiogenesis: implications for retinopathy." Clin Sci (Lond) **124**(10): 597-615.



Wolpert, L., C. Tickle and A. M. Arias (2017). Biologie du développement: Les grands principes, Dunod.

Xiong, X. Y., L. Liu and Q. W. Yang (2016). "Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke." Prog Neurobiol **142**: 23-44.

Yanni, S. E., J. Wang, M. Chan, J. Carroll, S. Farsiu, J. N. Leffler, R. Spencer and E. E. Birch (2012). "Foveal avascular zone and foveal pit formation after preterm birth." Br J Ophthalmol **96**(7): 961-966.

Yilmaz, Y., H. Verdi, A. Taneri, A. C. Yazici, A. N. Ecevit, N. M. Karakas, A. Tarcan, A. Haberal, N. Ozbek and F. B. Atac (2012). "Maternal-fetal proinflammatory cytokine gene polymorphism and preterm birth." DNA Cell Biol **31**(1): 92-97.

Zhou, T. E., J. C. Rivera, V. K. Bhosle, I. Lahaie, Z. Shao, H. Tahiri, T. Zhu, A. Polosa, A. Dorfman, A. Beaudry-Richard, S. Costantino, G. A. Lodygensky, P. Lachapelle and S. Chemtob (2016). "Choroidal Involution Is Associated with a Progressive Degeneration of the Outer Retinal Function in a Model of Retinopathy of Prematurity: Early Role for IL-1beta." Am J Pathol **186**(12): 3100-3116.

Zhou, Y. D., S. Yoshida, Y. Q. Peng, Y. Kobayashi, L. S. Zhang and L. S. Tang (2017). "Diverse roles of macrophages in intraocular neovascular diseases: a review." Int J Ophthalmol **10**(12): 1902-1908.

Zhu, M., M. C. Madigan, D. van Driel, J. Maslim, F. A. Billson, J. M. Provis and P. L. Penfold (2000). "The human hyaloid system: cell death and vascular regression." Experimental eye research **70**(6): 767-776.