

Université de Montréal

**Les rétinopathies ischémiques prolifératives :
étude des régulateurs de l'inflammation dans l'angiogenèse
pathologique**

par

Gaëlle Stéphanie Mawambo Tagne

Programme de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal
Faculté de Médecine

Thèse présentée
en vue de l'obtention du grade de Doctorat
en Biochimie

Juillet, 2021

© Gaëlle Stéphanie MAWAMBO TAGNE, 2021

Université de Montréal

Département de biochimie et médecine moléculaire, Université de Montréal, Faculté de
Médecine

Cette thèse intitulée

**Les rétinopathies ischémiques prolifératives :
étude des régulateurs de l'inflammation dans l'angiogenèse
pathologique**

Présentée par

Gaëlle Stéphanie Mawambo Tagne

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

Dr Nikolaus Heveker

Président-rapporteur

Dr Przemyslaw (Mike) Sapiha

Directeur de recherche

Dre Marie-Ève Tremblay

Membre

Dr Nicolas Pilon

Examineur externe

Dr Martin Guimond

Représentant de la doyenne

Résumé

Les rétinopathies ischémiques prolifératives telles que la rétinopathie diabétique proliférative et la rétinopathie du prématuré sont les principales causes de la perte de la vision dans la population active et pédiatrique des pays industrialisés. Malgré le fait que les événements initiateurs sont différents et propres à chacune des pathologies, les rétinopathies ischémiques prolifératives sont le résultat d'un processus biphasique. On a d'abord une phase initiale de dégénérescence microvasculaire suivie d'une néovascularisation excessive et pathologique de la rétine hypoxique qui tente de réinstaurer l'apport en nutriments et en énergie. Mais au lieu d'aller revasculariser les zones avasculaires de la rétine, ces nouveaux vaisseaux sanguins sont mal orientés et se dirigent plutôt vers le vitré normalement avasculaire. Ceci provoque des tensions physiques dans la rétine et mène à long terme à son détachement et une perte de vision conséquente. Les traitements actuels ne viennent pas sans effets secondaires majeurs. Par exemple, la formation de la cataracte et l'augmentation de la pression intraoculaire avec l'utilisation des corticostéroïdes ou la perte de la vision partielle dans le cas du traitement au laser sont fréquemment observées. De même, la thérapie anti-VEGF (Vascular endothelial growth factor) apporte aussi son lot de complications, telles que la thromboembolie veineuse et l'augmentation de la neurotoxicité après un long usage, vu les propriétés neuro- et vaso-protectrices du VEGF. Le développement d'une nouvelle approche thérapeutique pour les rétinopathies ischémiques prolifératives est donc nécessaire afin de contrer ces limitations thérapeutiques.

Dans notre première étude, nous mettons en évidence un nouveau mécanisme par lequel les cellules neuronales sous stress diabétique sont à l'origine d'une forte inflammation oculaire. Nos résultats démontrent que le co-récepteur multi-ligand Neuropiline-1, le VEGF et la Sémaphorine-3A agissent de concert afin d'attirer une sous-population particulière de phagocytes mononucléaires susceptibles d'activer le processus de croissance vasculaire pathologique dans la rétine diabétique. De plus, notre étude propose une base pour de futures recherches sur l'impact des phagocytes mononucléaires exprimant Neuropiline-1 dans les pathologies du système nerveux central caractérisées par une inflammation excessive. Nos résultats permettent aussi de mettre en lumière le caractère anti-inflammatoire potentiel des

thérapies actuelles anti-VEGF (à cause du rôle de VEGF dans la mobilisation des phagocytes mononucléaires *via* Neuropiline-1) au niveau oculaire.

Dans notre deuxième étude, nous mettons en évidence l'activation du facteur HIF1 α dans les phagocytes mononucléaires présents dans la rétine hypoxique. L'utilisation d'une approche protéomique non biaisée de spectrométrie de masse en tandem nous a permis d'identifier les partenaires interagissant avec HIF1 α dans un milieu déficient en oxygène. Nous avons pu ainsi déterminer pour la première fois l'association entre la voie d'HIF1 α et celle d'IRE1 α (un des trois senseurs de la voie de l'UPR « unfolded protein response ») dans le processus d'adaptation à l'oxygène des phagocytes mononucléaires. Nos résultats révèlent ensuite l'importance d'IRE1 α (plus principalement son activité kinase) dans la production d'HIF1 α . Nous démontrons finalement que la synergie entre les signalisations d'IRE1 α et HIF1 α pourrait être responsable du comportement pathogénique des phagocytes mononucléaires *via* leur libération de cytokines inflammatoires; ce qui participerait ainsi à la progression des rétinopathies.

Collectivement, nos travaux ont permis d'identifier d'importants régulateurs de l'activité pathogénique des phagocytes mononucléaires. Nous montrons : **1)** le rôle de Neuropiline-1 dans l'infiltration des phagocytes mononucléaires au niveau des zones endommagées de la rétine et **2)** l'impact du mécanisme convergent entre les voies d'IRE1 α et HIF1 α sur leur sécrétion de facteurs pro-inflammatoires durant les rétinopathies. Nos résultats offrent une base pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (ciblant Neuropiline-1, IRE1 α et HIF1 α) dans le traitement de maladies oculaires et d'autres pathologies caractérisées par une inflammation excessive.

Mots-clés : Rétinopathies ischémiques prolifératives, Neuropiline-1, VEGF, Sémaphorine 3A, Hypoxie, UPR, phagocytes mononucléaires (microglies/macrophages), HIF1 α , IRE1 α .

Abstract

Proliferative ischemic retinopathies such as proliferative diabetic retinopathy (PDR) and retinopathy of prematurity (ROP) are the principal causes of vision loss in working age and pediatric populations of industrialized countries. Although they display different initial triggers, proliferative ischemic retinopathies are biphasic ocular diseases that affect retinal vessels. There is an initial degeneration of the microvasculature, followed by a hypoxic stress on the retina. This triggers a second phase of deregulated and destructive blood vessel growth within the retina. Given this sequence of events and prominent clinical features, the currently most widely used local ocular therapeutic interventions directly target pathological blood vessel growth, yet present a number of non-desirable off-target effects such as the destruction of the retina itself. In fact, currently available treatments for proliferative ischemic retinopathies present non-negligible side effects, such as cataract formation with intravitreal use of corticosteroid or reduced visual field with laser-based photocoagulation surgery. Similarly, the anti-VEGF (Vascular endothelial growth factor) therapy may be associated with thromboembolic events, neuronal toxicity and atrophy when used as frequent long-term treatment given the fact that VEGF serves a vaso- and neuro-protective factor in the retina. Overcoming these therapeutic limitations and exploring novel pharmacological avenues are therefore required to ameliorate the safety profiles of current interventions.

In our first study, we describe a novel mechanism by which severely stressed neuronal cells in the diabetic retina provoke destructive inflammation in the eye. We demonstrate that the multi-ligand co-receptor Neuropilin-1, VEGF and Semaphorin3A act as potent attractants for a specialized population of immune cells (mononuclear phagocytes) that later promote the exaggerated pathological vessel growth associated with the disease progression. Importantly, we provide evidence for a novel pharmacological intervention that reduces the inflammation associated with pathological retinal vessel growth. Our findings also suggest that current anti-VEGF therapies (a popular treatment for ocular vascular diseases) may in part be effective by reducing destructive ocular inflammation.

In our second study, we provide evidence that those mononuclear phagocytes activate HIF1 α in the hypoxic and inflamed retina. After using the unbiased proteomic approach of

tandem mass spectrometry, we were able to identify HIF1 α partners and found a novel link between HIF1 α and the UPR (unfolded protein response) sensor IRE1 α . Our data next established the crucial role of IRE1 α (precisely *via* its kinase activity) in HIF1 α production. We also suggested that the synergy between IRE1 α and HIF1 α pathways may be responsible of the pathogenic activity of the hypoxic mononuclear phagocytes *via* their secretion of inflammatory cytokines, thus contributing to the progression of the retinopathy.

Collectively, our work identifies important regulators of the pathogenic activity of mononuclear phagocytes. We show that: **1)** Neuropilin-1 promotes the infiltration of mononuclear phagocytes in the retina and **2)** the convergent mechanism between IRE1 α and HIF1 α pathways is responsible for their release of pro-inflammatory factors during retinopathy. Our results could be used as a basis for the development of alternative therapeutic strategies (targeting Neuropilin-1, IRE1 α and HIF1 α) to treat ocular diseases or other pathologies characterized by an excessive inflammation.

Keywords: Ischemic proliferative retinopathy, Neuropilin-1, VEGF, Semaphorin3A, Hypoxia, UPR, mononuclear phagocytes (microglia/macrophages), HIF1 α , IRE1 α .

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract.....	3
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles.....	11
Liste des abréviations.....	12
Remerciements.....	16
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	18
<u>SECTION 1 : LA RÉTINE ET LES MALADIES ASSOCIÉES.....</u>	<u>19</u>
1.1.1 ANATOMIE GÉNÉRALE DE L'ŒIL.....	19
<i>1.1.1.1 Anatomie et physiologie de la rétine.....</i>	<i>21</i>
1.1.1.1.1 L'épithélium pigmentaire rétinien.....	23
1.1.1.1.2 La couche de photorécepteurs.....	25
1.1.1.1.3 La couche plexiforme externe.....	26
1.1.1.1.4 La couche plexiforme interne.....	26
1.1.1.1.5 Les cellules ganglionnaires.....	27
1.1.1.1.6 Les cellules gliales.....	27
<i>1.1.1.2 L'angiogenèse rétinienne.....</i>	<i>36</i>
<i>1.1.1.3 Pathologies de la rétine.....</i>	<i>39</i>
1.1.1.3.1 La rétinopathie diabétique.....	39
1.1.1.3.2 La rétinopathie du prématuré (ROP) :.....	47
1.1.1.3.3 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD):.....	50
1.1.1.3.4 Autres pathologies de la rétine.....	51
1.1.1.3.5 Modèle animal des rétinopathies prolifératives : la rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) chez la souris.....	52
<u>SECTION 2 : SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ ET VOIES IMPLIQUÉES DANS LES RÉTINOPATHIES ISCHÉMIQUES PROLIFÉRATIVES.....</u>	<u>55</u>
1.2.1 IMMUNITÉ INNÉE DANS LES PATHOLOGIES DE LA RÉTINE.....	55

1.2.1.1 Le rôle des phagocytes mononucléaires : microglies et macrophages	55
1.2.2 VOIES DE SIGNALISATIONS AU NIVEAU DES PHAGOCYTES MONONUCLÉAIRES ET LEUR IMPACT DANS LES PATHOLOGIES DE LA RÉTINE.....	59
1.2.2.1 Les récepteurs de molécules de guidage : le rôle de Neuropiline-1 (NRP1).....	59
1.2.2.2 La réponse cellulaire au stress hypoxique.....	63
1.2.2.2.1 La voie d'HIF	63
1.2.2.2.2 La voie du stress au réticulum endoplasmique.....	66
1.2.2.2.2.1 La voie de PERK	68
1.2.2.2.2.2 La voie d'ATF6	68
1.2.2.2.2.3 La voie d'IRE1 α	69
1.2.2.2.2.4 Le stress dans le réticulum endoplasmique (RE) chronique et la voie de l'UPR : la phase apoptotique.....	70
SECTION 3 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS.....	72
Objectif 1 : Déterminer le rôle des phagocytes mononucléaires exprimant NRP1 dans les rétinopathies ischémiques prolifératives	72
Objectif 2 : Déterminer le rôle des senseurs hypoxique et métabolique, HIF1 α et IRE1 α , au niveau des phagocytes mononucléaires dans les rétinopathies ischémiques prolifératives	74
CHAPITRE 2 : ARTICLE 1.....	76
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 1	77
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....	78
TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE 1	80
<u>Assessment of SEMA3A protein levels by western-blot.....</u>	113
CHAPITRE 3: ARTICLE 2	129
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 2	130
CONTRIBUTIONS DES AUTEURS.....	131
TEXTE DE L'ARTICLE 2 EN PRÉPARATION POUR SOUMISSION	132
CHAPITRE 4: DISCUSSION ET PERSPECTIVES	178

<u>SECTION 1 : IMPACT DU RECRUTEMENT IMMUNITAIRE DANS LES PATHOLOGIES DE LA RÉTINE : RÔLE DU RÉCEPTEUR NRP1 AU NIVEAU DES PHAGOCYTES MONONUCLÉAIRES</u>	179
<u>SECTION 2 : LA RÉGULATION DES PHAGOCYTES MONONUCLÉAIRES PAR LA TENSION LOCALE EN OXYGÈNE -SIGNALISATION CONVERGENTE ENTRE LES VOIES D'HIF1α ET D'IRE1α/XBP-1</u>	181
<u>SECTION 3 : PERSPECTIVES</u>	183
Conclusion.....	190
Bibliographie	i

Liste des tableaux

TABLEAU 1. DIFFÉRENTES ÉTAPES DE L'ÉVOLUTION DE LA RÉTINOPATHIE AVEC LES SYMPTÔMES OBSERVÉS.	43
TABLEAU 2. TRAITEMENTS ET EFFETS SECONDAIRES DES THÉRAPIES DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	47
TABLEAU 3. COMPOSÉS CIBLANT LA SIGNALISATION DU STRESS DANS LE RE.	189

Liste des figures

FIGURE 1. APPARENCE DE LA RÉTINE D'UN ŒIL HUMAIN NORMAL VUE À PARTIR D'UN OPHTALMOSCOPE.....	20
FIGURE 2. SCHÉMA REPRÉSENTATIF D'UN ŒIL HUMAIN. AGRANDISSEMENT DE LA ZONE ENCADRÉE MONTRANT LES DIFFÉRENTES COUCHES DE LA RÉTINE.....	21
FIGURE 3. IMAGE DE MICROSCOPIE À TRANSMISSION ÉLECTRONIQUE REPRÉSENTANT L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE D'UN ŒIL HUMAIN NORMAL.....	25
FIGURE 4. ORIGINE ET PROPRIÉTÉS CLÉS DES MICROGLIES DES MAMMIFÈRES.....	31
FIGURE 5. TRAJECTOIRES DÉVELOPPEMENTALES DES MICROGLIES ET MACROPHAGES TISSULAIRES.....	32
FIGURE 6. RÉGULATION DE L'HOMÉOSTASIE DES MICROGLIES.....	33
FIGURE 7. SYSTÈME DE DIFFÉRENCIATION DÉFINITIVE ENTRE LES MICROGLIES ET LES MONOCYTES SANGUINS.....	34
FIGURE 8. SCHÉMA REPRÉSENTATIF DE LA VASCULATURE OCULAIRE.....	38
FIGURE 9. ÉVOLUTION TEMPORELLE DE LA CROISSANCE DES VAISSEAUX SANGUINS DE LA RÉTINE POST-NATALE CHEZ LA SOURIS.....	39
FIGURE 10. APPARENCE DU FONDS DE L'ŒIL ET DE LA RÉTINE D'UN PATIENT ATTEINT DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE PROLIFÉRATIVE.....	40
FIGURE 11. ÉVÉNEMENTS BIOCHIMIQUES EXPLIQUANT LA PROGRESSION DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	41
FIGURE 12. PATHOGENÈSE ET TRAITEMENTS DE LA RÉTINOPATHIE DU PRÉMATURÉ.....	50
FIGURE 13. MODÈLE MURIN DE LA RIO.....	54
FIGURE 14. STRUCTURES DE NRP1, NRP2 ET DE LEURS ISOFORMES.....	60
FIGURE 15. MÉCANISME MOLÉCULAIRE DE LA SIGNALISATION D'HIF EN FONCTION DE LA TENSION LOCALE EN OXYGÈNE.....	66
FIGURE 16. LES TROIS BRANCHES DE L'UPR.....	67

Liste des sigles

FDA.: Food and drug administration

Liste des abréviations

ATP: Adenosine triphosphate

Fas-L: Fas-Ligand

FGF: Fibroblast growth factor

TGF- β .: Transforming growth factor- β

IGF: Insulin like growth factor

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

PEDF: Pigment epithelium-derived factor

VEGF: Vascular endothelial growth factor

PDGF: Platelet-derived growth factor

LEDGF: Lens epithelium-derived growth factor

Cl⁻: ion chlorure⁻

SIRPA: Signal regulatory protein alpha

AIF1 (ou IBA1): Allograft inflammatory factor 1

IBA1: Ionized calcium-binding adapter molecule 1

EMPs: Erythroid/ myeloid progenitors

HSCs: Hematopoietic stem cells

KIT: Tyrosine-protein kinase

ADGRE1 (ou F4/80): Adhesion G Protein-Coupled Receptor E1

ITGAM (ou CD11b): Integrin alpha M

RUNX1: runt-related transcription factor 1

IRF8: Interferon regulatory factor 8

CD45: Lymphocyte common antigen

CX3CR1: CX3C chemokine receptor 1

CX3CL1(ou Fractalkine): CX3C chemokine ligand 1

IL: Interleukin

CSF: Colony-stimulating factor

PU1: Purine-rich 1

NGF: Nerve growth factor

BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

NT3: Neurotrophin 3
RANTES (ou CCL5): Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted
SDF-1 α : Stromal cell-derived factor-1 α
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
IFN γ : Interferon γ
IP-10: Interferon gamma-inducible protein 10
TNF: Tumor necrosis factor
MIP: Macrophage inflammatory protein
GFP: Green fluorescent protein
RAR α : Retinoid acid receptor α
HIF: Hypoxia-inducible factor
RE: Réticulum endoplasmique
UPR: Unfolded protein response
GRP78: Glucose regulated 78kDa protein
BiP: Binding immunoglobulin protein
Bcl2: B-cell lymphoma 2
Bax: Bcl-2-associated X
CHOP: C/EBP homologous protein
ATF6: Activating transcription factor 6
IRE1 α : Inositol-requiring protein 1 α
XBP-1: X-box binding protein-1
RIDD: IRE1-dependent decay of mRNA
PERK: Protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
eIF2: eukaryotic initiation factor 2
GAAD34: Growth arrest and DNA damage inducible gene 34
TRAF2: TNF receptor associated factor 2
ASK1: Apoptosis signal-regulating kinase 1
JNK: c-Jun N-terminal kinase
ERAD: Endoplasmic reticulum associated degradation

ARNm: acide ribonucléique messenger

siRNA: silencing ribonucleic acid

shRNA: short hairpin ribonucleic acid

KO: Knockout

RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction

ChIP: Chromatin Immunoprecipitation

À mes parents, mon mari et mon fils

Remerciements

Cette thèse de Doctorat en Biochimie marque un tournant dans ma vie que je n'aurais pu atteindre sans l'aide des personnes suivantes.

Mes parents, Maman Esther et Papa Michel, sans qui je n'aurais existé. Je tiens aussi à leur exprimer ma gratitude inestimable pour leur éducation, leur encadrement et leur encouragement continuels.

Mes 2^e parents, Tonton Roger, sa femme Tata Marjorie et Tonton Benjamin, pour leur parrainage et leur soutien avant et après mon installation au Canada.

Mes sœurs (Yvonne, Marcelle, Vanessa et Marie-Clara) et mon frère William, pour l'environnement fraternel et constructif dans lequel j'ai grandi.

Mon mari, Johan, mon partenaire sur qui j'ai toujours pu compter pour son oreille attentive et son support indéfectible.

Mon fils, Shawn, pour l'équilibre émotionnel qu'il m'apporte en tout temps et la joie de le voir grandir.

Ma famille rapprochée (particulièrement Tonton Martin et Tata Solange), pour leurs enseignements et leur bonne guidance.

Mes amis pour leurs encouragements et leurs conseils face à toute épreuve.

Mon directeur de recherche Dr Przemyslaw (Mike) Sapieha, pour m'avoir fait confiance avec mes projets de Doctorat et les nombreux travaux de son laboratoire auxquels j'ai participé. Je tiens aussi à remercier Dr Sapieha pour son excellent mentorat qui m'a permis de m'épanouir scientifiquement.

Dre Malika Oubaha, pour son encadrement autant professionnel que personnel durant mes études de Doctorat. Je tiens aussi à étendre un spécial Merci à son mari Yannick, pour son aide dans la correction de ma thèse.

Les membres passés et présents de l'équipe de recherche du Dr Sapieha pour leur implication dans la productivité du laboratoire. Les membres de l'équipe de recherche du Dre Nathalie Labrecque (Dr Salix Boulet, Dre Cindy Audiger et Jean-François Daudelin) pour leur aide dans la portion immunologique de mes projets. Martine Dupuis pour son aide au FACS. Les techniciennes de l'animalerie pour leur bonne prise en charge des souris.

Les membres de mon comité de thèse (Dre Nathalie Labrecque et Dr Tony Antakly) pour leurs interventions constructives.

Les membres de mon jury (Dr Heveker, Dr Guimond, Dre Tremblay et Dr Pilon), pour l'évaluation de ce manuscrit.

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

Des cinq sens utilisés chaque jour par un être humain, la vue est celui qui nous permet d'apprécier notre monde environnant dans tous ses détails et de communiquer nos désirs et pensées dans ce qu'on appelle le langage visuel. Perdre ce sens fondamental, à n'importe quel âge, devient donc un défi : en effet, les personnes avec une vision atténuée ou inexistante se retrouvent avec une indépendance et qualité de vie réduites. Sans pour autant enlever l'importance des autres parties de l'œil, la rétine est reconnue comme l'une des plus vitales pour la perception d'une bonne image. C'est pourquoi depuis bon nombre d'années, des recherches scientifiques ont été menées et le sont toujours pour essayer de comprendre toute la biologie entourant le fonctionnement d'une rétine de vertébrés dans un contexte physiologique tout comme pathologique.

L'objectif de ce 1^{er} chapitre est de proposer dans la section 1 une vue d'ensemble de la littérature sur la rétine et les pathologies associées comme la rétinopathie du prématuré. À partir de la section 2, l'accent sera mis sur le rôle du système immunitaire inné dans la progression des rétinopathies ischémiques prolifératives. Par la suite, nous mettrons une emphase particulière sur les mécanismes moléculaires impliqués (le récepteur de molécule de guidage Neuropiline-1(NRP1) et les senseurs métabolique et hypoxique IRE1 α et HIF1 α).

SECTION 1 : LA RÉTINE ET LES MALADIES ASSOCIÉES

1.1.1 ANATOMIE GÉNÉRALE DE L'ŒIL

L'œil (Voir **Figures 1 et 2**) est l'organe de la vision et comporte différentes parties :

- 3 couches : la sclérotique, couche périphérique, qui devient en avant une surface transparente appelée cornée; l'uvée, couche intermédiaire et vasculaire, qui comprend en arrière la choroïde et se prolonge en avant par l'iris et le corps ciliaire; la rétine, en profondeur, qui constitue la couche sensorielle de l'œil.
- 3 chambres de fluides transparents : la chambre antérieure entre l'iris et la cornée ainsi que la chambre postérieure entre l'iris et le cristallin remplies d'humeur aqueuse; la chambre du vitré entre la rétine et le cristallin qui contient un fluide plus visqueux appelé humeur vitrée.
- 2 portions topographiques de part et d'autre du cristallin : en avant on a le segment antérieur incluant l'iris, la cornée et en arrière le segment postérieur comportant la sclérotique, le vitré, la choroïde et la rétine.

Pour le reste du manuscrit, nous allons nous concentrer sur la structure fonctionnelle de la rétine (**Figures 1 et 2**) et discuter des maladies découlant d'un dysfonctionnement au sein de son réseau complexe.

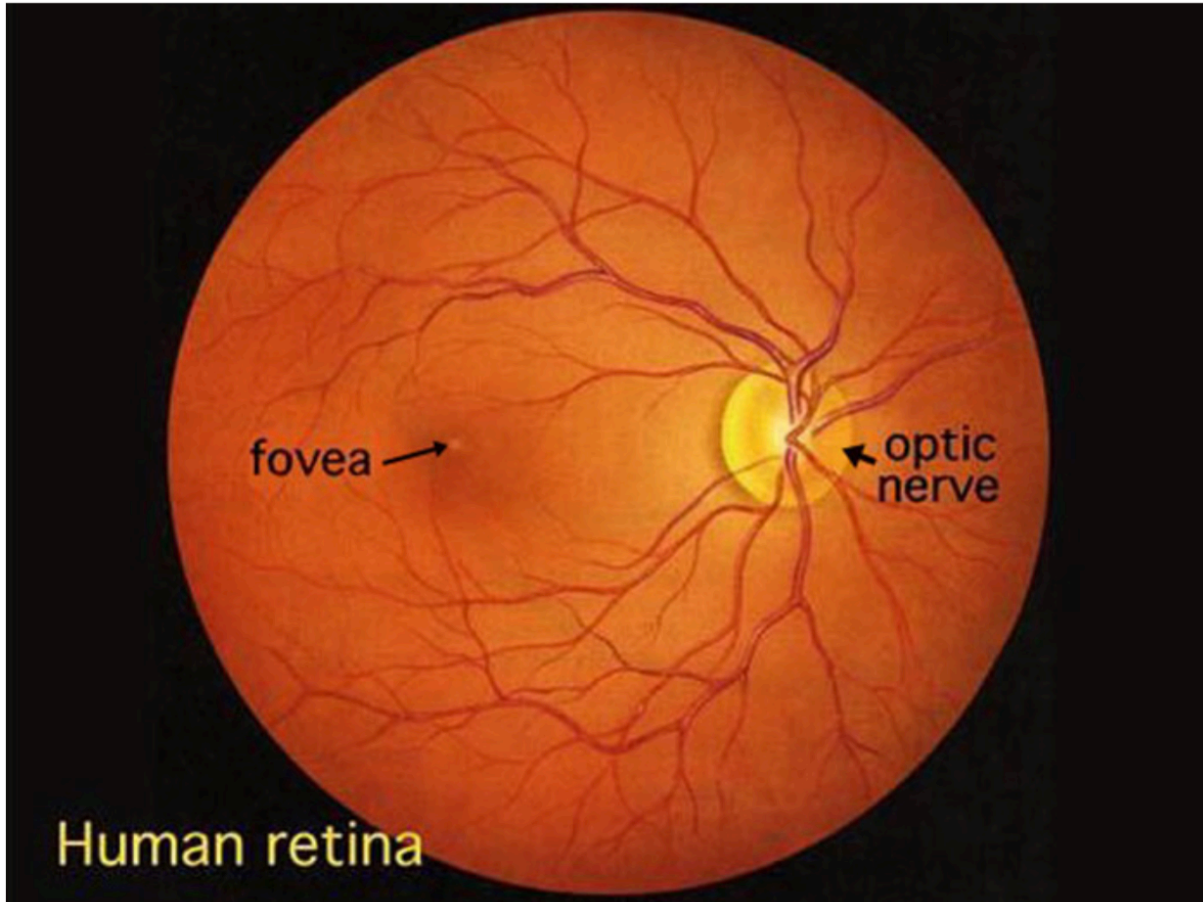


Figure 1. Apparence de la rétine d'un œil humain normal vue à partir d'un ophtalmoscope.(Selon (Helga Kolb, Fernandez, & Nelson, 1995))

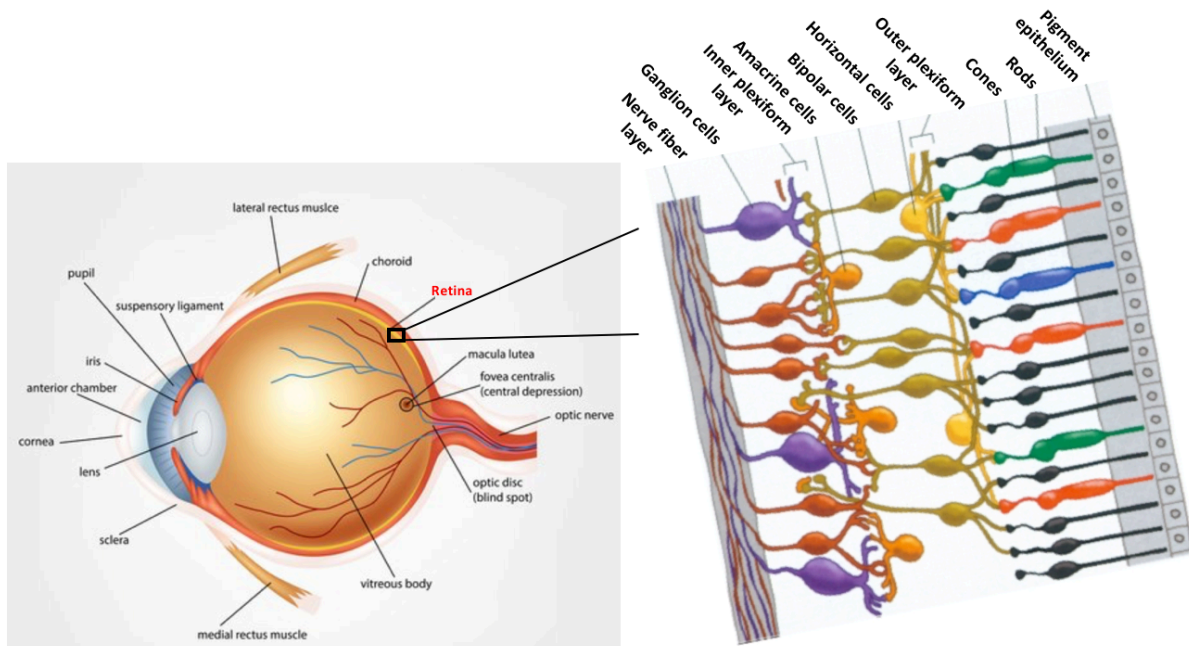


Figure 2. Schéma représentatif d'un œil humain. Agrandissement de la zone encadrée montrant les différentes couches de la rétine. (Image à gauche tirée du site web <https://www.webrn-maculardegeneration.com/macula-lutea.html> consulté le 08 février 2021. Image à droite tirée de (H. Kolb, 2003))

1.1.1.1 Anatomie et physiologie de la rétine

La rétine fait partie du système nerveux central, et comme tous les organes de ce système, dérive du tube neural, plus précisément durant le développement de l'embryon à partir des vésicules optiques situées de part et d'autre du tube neural en croissance. Ces vésicules optiques primordiales se replient entre elles pour former un tube optique comportant à l'intérieur la rétine en devenir et à l'extérieur une fine couche d'épithélium plus tard connue sous le nom d'épithélium rétinien pigmentaire (Helga Kolb et al., 1995). Le développement de la rétine sensorielle commence aussitôt avec la migration de cellules hautement spécialisées dans sa surface interne. Le développement de la rétine se poursuit avec l'addition d'autres couches de l'intérieur vers l'extérieur issues de la division et la migration cellulaires : les cellules

ganglionnaires arrivent en premier et la formation des couches subséquentes se poursuit jusqu'à la couche de photorécepteurs en dernier (Helga Kolb et al., 1995). Ce processus de développement de la rétine continue avec l'ajout de multiples et complexes connections intercellulaires, et tout le réseau rétinien de base est établi vers le 5^e mois gestationnel (Helga Kolb et al., 1995). Vers le 7^e mois de gestation, la sensibilité de l'œil à la lumière est acquise grâce à la maturation des photorécepteurs. La partie finale de rétine sensorielle à se développer est la fovéa qui continue sa maturation jusqu'à 4 années après la naissance (Helga Kolb et al., 1995).

La rétine est le tissu nerveux essentiel de l'œil qui permet de transformer les rayons lumineux du monde extérieur en signal nerveux pour ensuite le transmettre au cerveau qui procède enfin à la formation d'une image visuelle. La rétine, circulaire d'environ 30 à 40 mm de diamètre, a en son centre le disque optique qui contient les terminaisons axonales des cellules ganglionnaires et d'où ressortent les vaisseaux sanguins (artère centrale et capillaires choroïdiens) irriguant les couches de la rétine. Lorsqu'on examine une rétine au microscope, elle se révèle de l'extérieur vers l'intérieur en 10 couches comprenant : l'épithélium pigmentaire, les photorécepteurs de type cône et bâtonnet, la membrane limitante externe, la couche nucléaire externe, la couche plexiforme externe, la couche nucléaire interne, la couche plexiforme interne, les cellules ganglionnaires, la couche de fibres optiques et la membrane limitante interne (**Figures 1 et 2**) (Boycott, Dowling, & Kolb, 1969; Tsang & Sharma, 2018). Une autre intéressante observation à noter est la différence de structure entre la rétine périphérique et la rétine centrale. En effet la zone centrale rétinienne proche de la fovéa est beaucoup plus épaisse par rapport à la périphérie rétinienne proche de l'ora serrata. Ceci est principalement dû à la prédominance des photorécepteurs de type cône, des cellules ganglionnaires et bipolaires associées à la rétine centrale tandis que la rétine périphérique est dominée par les photorécepteurs de type bâtonnet. Les couches plexiformes interne et externe sont plus denses et épaisses dans la rétine centrale et additionnellement, les couches nucléaires internes et de cellules ganglionnaires contiennent plus de cellules (Boycott et al., 1969; Helga Kolb et al., 1995).

Les différentes parties constituant la rétine travaillent ensemble dans le but ultime de procurer une image visuelle fonctionnelle. Le rôle des différents composants de la rétine sera discuté dans les prochains paragraphes.

1.1.1.1.1 L'épithélium pigmentaire rétinien

Chez les vertébrés, l'épithélium rétinien pigmentaire (couche la plus externe de la rétine) constitue avec les photorécepteurs les 2 types cellulaires responsables de la détection de la lumière. Il se situe entre les segments externes des photorécepteurs (au niveau de sa partie apicale) et la membrane de Bruch (au niveau basolatéral; c'est une membrane perméable dont l'épaisseur augmente avec l'âge) qui sert de matrice d'interaction avec les capillaires sanguins choroïdiens (**Figure 3**). L'habilité des photorécepteurs à détecter la lumière dépend entièrement de leur interaction avec l'épithélium pigmentaire dont les rôles sont les suivants (Baylor, 1996; Helga Kolb et al., 1995; Steinberg, 1985; Olaf Strauss, 2005; O. Strauss, 2009):

- L'absorption de la lumière : l'épithélium rétinien comprend des granules pigmentaires qui permettent d'absorber la lumière. Cette fonction expose ainsi l'épithélium rétinien pigmentaire à la photo-oxydation et aux radicaux libres sous l'effet de l'énergie lumineuse.
- Le transport épithélial : Les cellules de l'épithélium pigmentaire contiennent entre elles des jonctions serrées. Elles constituent ainsi une barrière hémato-rétinienne (BHR) qui permet un transport hautement sélectif entre le sang et l'espace sous-rétinien. Cette barrière joue aussi un rôle dans le privilège immunitaire dont l'œil bénéficie (Forrester, McMenamin, & Dando, 2018). Le transport épithélial se fait dans les 2 sens. D'une part le transport du sang vers la rétine sert au transfert de nutriments aux photorécepteurs. Le transport de la rétine vers le sang d'autre part permet l'échange d'ions (principalement l'ion Cl⁻), l'élimination d'eau et de métabolites du tissu rétinien et la régulation du pH dans les cellules de l'épithélium pigmentaire.
- Le maintien du cycle visuel : la transduction de la lumière débute avec l'absorption de photons par la rhodopsine contenue dans les photorécepteurs de type bâtonnet. Le processus d'absorption de la lumière est régi par la photo-isomérisation du 11-cis rétinol (le rétinol est un dérivé de la Vitamine A et est la base moléculaire de la vision) en l'état tout-trans rétinol. Le tout-trans rétinol est ensuite métabolisé en tout-trans rétinol et délivré à l'épithélium pigmentaire rétinien. Pour le maintien du cycle de la vision, le tout-trans rétinol doit être re-isomérisé en 11-cis rétinol. Cette re-isomérisation prend

place dans l'épithélium pigmentaire rétinien et permet d'obtenir le 11-cis rétinol. Celui-ci est enfin retransporté aux photorécepteurs.

- La phagocytose des segments externes des photorécepteurs endommagés par la photo-oxydation : ceci contribue au renouvellement constant des photorécepteurs pour permettre le maintien de la vision.
- La sécrétion : l'épithélium pigmentaire interagit de son côté apical avec les photorécepteurs mais sa proximité du côté basolatéral aux capillaires sanguins choroïdiens lui permet aussi d'interagir avec les cellules endothéliales et immunitaires. Dans ce sens, les différents facteurs sécrétés par les cellules de l'épithélium pigmentaire œuvrent pour la stabilité des photorécepteurs, de la choroïde et la modulation du système immunitaire. Les molécules sécrétées incluent: ATP, fas-L (fas-ligand), FGF-1,2 et 5 (fibroblast growth factors-1, 2 et 5), TGF- β (transforming growth factor- β), IGF-1 (insulin-like growth factor-1), CNTF (ciliary neurotrophic factor), PEDF (pigment epithelium-derived factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor) et LEDGF (lens epithelium-derived growth factor).

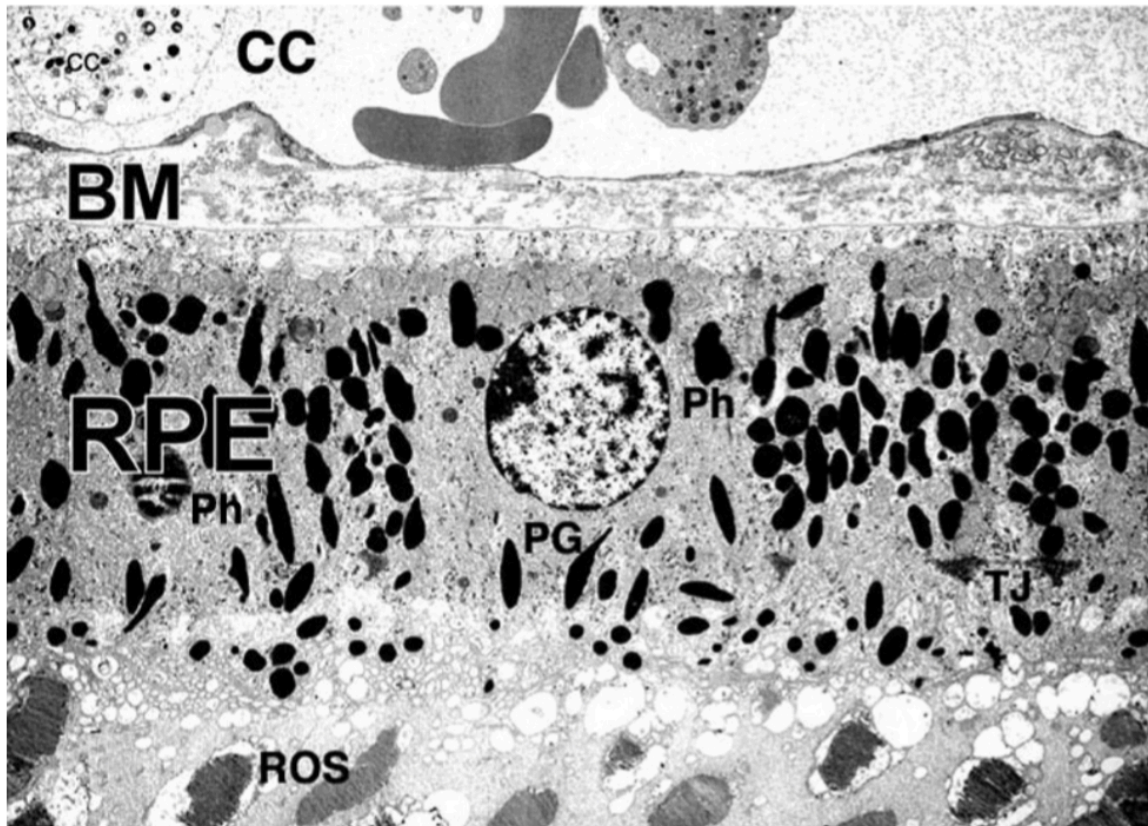


Figure 3. Image de microscopie à transmission électronique représentant l'épithélium pigmentaire d'un œil humain normal. CC : capillaires sanguins choroïdiens; BM : membrane de bruch; RPE : épithélium rétinien pigmentaire; ROS : segments externes des photorécepteurs de type bâtonnet; Ph : phagosomes; PG : granules pigmentaires; TJ : jonctions serrées. (Tel que montré dans (Helga Kolb et al., 1995))

1.1.1.1.2 La couche de photorécepteurs

La rétine humaine comporte 2 groupes de photorécepteurs (les photorécepteurs de type cône et de type bâtonnet) et 4 sous-groupes de photorécepteurs (les photorécepteurs de type cône « blue » à courte longueur d'onde, de type cône « green » à moyenne longueur d'onde, de type cône « red » à longue longueur d'onde et les photorécepteurs de type bâtonnet) (Anderson & Fisher, 1976; Furukawa, Ueno, & Omori, 2019; Helga Kolb et al., 1995; Nathans, Thomas, & Hogness, 1986). Les photorécepteurs sont essentiels à l'absorption et la transduction de la lumière. Ils sont capables de détecter le signal lumineux grâce à la présence de pigments visuels à l'intérieur des disques optiques contenus dans leurs segments externes (Anderson & Fisher,

1976; Furukawa et al., 2019; Helga Kolb et al., 1995; Nathans et al., 1986). Ce sont ces segments externes qui sont endommagés à force d'être exposés constamment à la lumière et doivent être phagocytés par les phagosomes de l'épithélium pigmentaire pour permettre leur renouvellement.

Les photorécepteurs de type bâtonnet sont hautement sensibles et utilisés pour la vision nocturne ou sombre (Anderson & Fisher, 1976; Furukawa et al., 2019; Helga Kolb et al., 1995; Nathans et al., 1986). Ils contiennent comme pigment visuel la rhodopsine qui permet la détection de la lumière bleue-verte avec une sensibilité maximale de longueur d'onde allant jusqu'à de 500nm (Anderson & Fisher, 1976; Helga Kolb et al., 1995; Nathans et al., 1986). Les photorécepteurs de type cône quant à eux contiennent comme pigment visuel l'opsine. Dépendamment de la configuration de la molécule d'opsine, ces photorécepteurs sont sensibles à une plus grande variété de longueurs d'onde allant de la lumière rouge (longueur d'onde longue), la lumière verte (longueur d'onde moyenne) à la lumière bleue (longueur d'onde courte) (Anderson & Fisher, 1976; Helga Kolb et al., 1995; Nathans et al., 1986).

1.1.1.1.3 La couche plexiforme externe

C'est au niveau de la couche plexiforme externe que se passent les deux premières interactions synaptiques nécessaires pour l'intégration du message visuel dans la rétine. En premier le signal visuel est divisé en 2 canaux d'informations, un pour traiter les objets plus clairs par rapport à l'arrière-plan visuel et l'autre pour traiter ceux qui sont plus sombres. En deuxième le contraste des objets visuels est simultanément intégré (H. Kolb, 1970; Helga Kolb et al., 1995; Tsang & Sharma, 2018). La couche plexiforme externe permet aussi d'abriter les interconnexions neuronales entre les cellules bipolaires, les cellules de Müller et les cellules horizontales (H. Kolb, 1970; Helga Kolb et al., 1995; Tsang & Sharma, 2018).

1.1.1.1.4 La couche plexiforme interne

La couche plexiforme interne abrite les terminaisons axonales des cellules bipolaires qui s'en servent pour relayer l'information provenant de la couche plexiforme externe. La couche plexiforme interne est une couche neuropile qui contient aussi un réseau complexe permettant

l'interconnexion entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules amacrines et ganglionnaires (H. Kolb, 1970, 1997; Helga Kolb et al., 1995; H. Kolb, Linberg, & Fisher, 1992; Tsang & Sharma, 2018). Les différents niveaux d'embranchements entre les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires permettent d'établir un circuit d'interactions spécialisé important pour un rapide transfert d'informations (H. Kolb, 1970, 1997; Helga Kolb et al., 1995; H. Kolb et al., 1992; Tsang & Sharma, 2018).

1.1.1.1.5 Les cellules ganglionnaires

La couche ganglionnaire, où les cellules ganglionnaires (en moyenne plus larges par rapport aux autres cellules neuronales rétinienne) se localisent est la couche la plus profonde de la rétine (H. Kolb, 1970; Helga Kolb et al., 1995; H. Kolb et al., 1992; Miltner & La Torre, 2019; Tsang & Sharma, 2018). Le processus de formation de l'image visuelle commence aussitôt que la lumière traverse la pupille, le cristallin puis la rétine pour se finaliser dans le cerveau. Bien que le cerveau soit responsable du produit final de la vision des objets qui nous entourent, c'est la rétine, tissu nerveux de l'œil, qui est essentielle à l'étape préalable, soit le traitement de l'information visuelle qui commence au niveau des photorécepteurs et converge vers la couche neuronale ganglionnaire. Celle-ci est la sortie finale et unique du message visuel provenant de la rétine vers le cerveau (H. Kolb, 1970; Helga Kolb et al., 1995; H. Kolb et al., 1992; Miltner & La Torre, 2019; Tsang & Sharma, 2018). Les axones des cellules ganglionnaires convergent vers le centre de la rétine, au niveau du nerf optique qui collecte toutes ces fibres neuronales (plus d'un million chez l'humain) et relaie l'information à des cibles spécifiques du cerveau (H. Kolb, 1970; Helga Kolb et al., 1995; H. Kolb et al., 1992; Miltner & La Torre, 2019; Tsang & Sharma, 2018).

1.1.1.1.6 Les cellules gliales

Décrites par Cajal aussi loin qu'en 1892, les cellules gliales de la rétine humaine se divisent en 3 types cellulaires : les microglies et les macroglies incluant les astrocytes et les cellules de Müller. Bien que les paragraphes suivants aborderont brièvement les propriétés et fonctions

principales des cellules de Müller et des astrocytes, une attention particulière sera portée sur les microglies, une des cellules d'intérêt du manuscrit.

- **Les cellules de Müller :** Les cellules de Müller, principales cellules gliales, maintiennent une relation étroite avec les neurones pour assurer leur homéostasie (H. Kolb, 2003; Helga Kolb et al., 1995; Sorrentino, Alikabes, Salsini, Bonifazzi, & Perri, 2016; Tsang & Sharma, 2018). Elles ont une rangée de fonctions incluant principalement : le support architectural de la neurorétine, le maintien de l'apport nutritionnel dans la rétine et la redistribution des déchets métaboliques produits par les neurones (métabolisme oxydatif des photorécepteurs) tels que le dioxyde de carbone, l'ammoniac, l'eau et l'excédent de neurotransmetteurs (comme le glutamate) (H. Kolb, 2003; Helga Kolb et al., 1995; Sorrentino et al., 2016; Tsang & Sharma, 2018).
- **Les astrocytes :** Considérés comme la « colle » du cerveau, les astrocytes (cinq fois plus nombreuses que les neurones) sont des cellules gliales qui sont originaires, non pas de l'épithélium neurorétinien, mais entreraient plutôt dans la rétine en développement à partir du cerveau, puis à travers le nerf optique en développement (H. Kolb, 2003; Helga Kolb et al., 1995; Sofroniew & Vinters, 2010; Sorrentino et al., 2016; Tsang & Sharma, 2018; Voskuhl et al., 2009). Après plusieurs mitoses dans le nerf optique, les astrocytes migreraient avec les vaisseaux sanguins dans la rétine pour se localiser exclusivement dans les couches les plus profondes soient les couches plexiformes et nucléaires internes de la rétine (H. Kolb, 2003; Helga Kolb et al., 1995; Sofroniew & Vinters, 2010; Sorrentino et al., 2016; Tsang & Sharma, 2018; Voskuhl et al., 2009). Tout comme les cellules de Müller, les astrocytes sont reconnus pour leur abondance en glycogène et contribuent ainsi à l'apport nutritif en glucose des neurones. Ils maintiennent aussi une relation étroite avec les vaisseaux sanguins et dans ce sens, sont les principaux producteurs de VEGF autant dans les contextes physiologiques que pathologiques de formation de vaisseaux sanguins (Sorrentino et al., 2016; Voskuhl et al., 2009). Ils sont d'une importance primordiale dans le maintien de la BHR interne (Sofroniew & Vinters, 2010; Sorrentino et al., 2016). Ils enveloppent presque toutes les synapses et sont

cruciaux pour le maintien de l'homéostasie des ions, du pH, des neurotransmetteurs, et sont essentiels à la signalisation neuronale (Sofroniew & Vinters, 2010).

- **Les microglies :**

o **Ontogénie et propriétés principales**

Il faudrait remonter dans les années 1900 avec les travaux de Pío Del Río-Hortega pour parler de la première caractérisation phénotypique de l'unique population immunitaire du parenchyme cérébral, maintenant connue sous le nom de microglies (Q. Y. Li & Barres, 2018; Perez-Cerda, Sanchez-Gomez, & Matute, 2015). Les microglies sont des cellules ubiquitaires dans la rétine humaine et peuvent se retrouver dans toutes les couches rétinienne. Ce sont les phagocytes mononucléaires résidents du système nerveux central (M. Karlstetter, Ebert, & Langmann, 2010).

Au début, les microglies ont d'abord été étiquetées avec une origine neuroectodermale, mais cette idée a été remplacée plus tard par le concept prônant que les microglies proviendraient plutôt des précurseurs de cellules souches hématopoïétiques détectés dans la moelle osseuse au jour embryonnaire (E) E10.5. Ce consensus a dominé le domaine scientifique pendant les trois dernières dizaines d'années mais a été remis en question par des récentes études qui ont démontré que les microglies proviendraient plutôt, entre le jour embryonnaire (E) E7 et E7.5, des progéniteurs erythromyéloïdes (EMPs) du sac vitellin (yolk sac) qui expriment le facteur KIT (mast/stem cell growth factor receptor Kit) (Goldmann et al., 2016). Les précurseurs des microglies, exprimant les marqueurs ADGRE1 (adhesion G protein-coupled receptor E1 aussi appelé F4/80) et ITGAM (α M integrin aussi connu sous le nom de CD11b), commenceraient ensuite à apparaître dans le cerveau au jour embryonnaire E9.5, bien avant les précurseurs des cellules souches hématopoïétiques (HSCs) détectés au jour embryonnaire E10.5 (**Figures 4 et 5**). Les facteurs de transcription contrôlant le développement des microglies jusqu'à maturité sont les facteurs RUNX1 (runt-related transcription factor 1), PU.1 et IRF8 (interferon regulatory factor 8). Les travaux de développement faits chez la souris ont permis de déterminer que les facteurs RUNX1 et PU.1 sont importants pour la transition des progéniteurs EMPs (jour embryonnaire E7 à E7.5) aux cellules à l'état immature A1 (jour embryonnaire E8) exprimant des niveaux élevés de CD45 et faibles de KIT (**Figure 5**). La prochaine étape de maturation

nécessite la présence des facteurs de transcription IRF8 et RUNX1 pour passer des cellules à l'état immature A1 aux cellules à l'état immature A2 (jour embryonnaire E9) exprimant CX3CR1 (CX3C chemokine receptor 1) et ADGRE1 tout en perdant leur expression de KIT. La dernière étape de développement des microglies se fait grâce à l'induction des facteurs IL-34 (interleukin-34), CSF1 (colony-stimulating factor 1) et TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1).

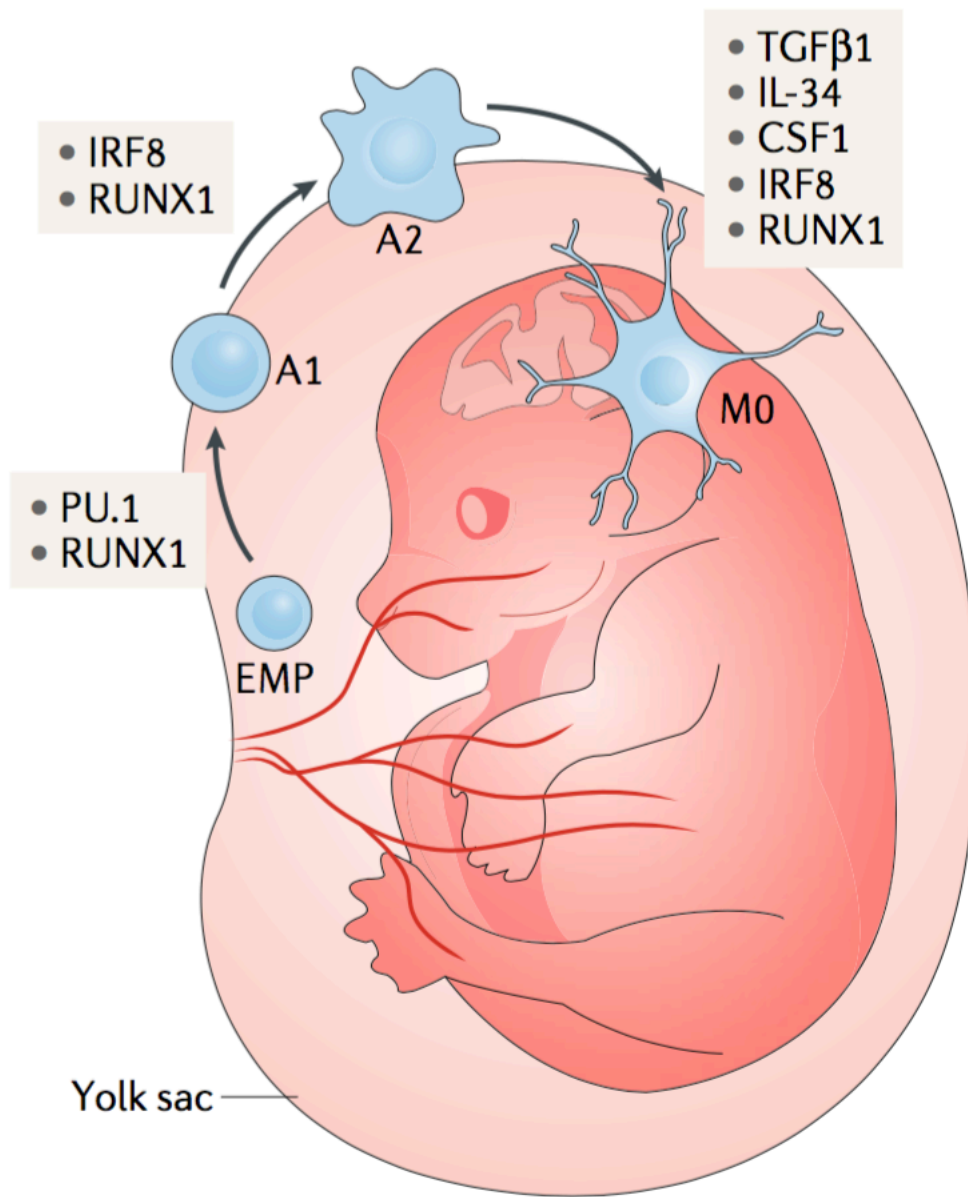


Figure 4. Origine et propriétés clés des microglies des mammifères. EMP : progéniteurs érythromyéloïdes; A1 : stade d’immaturité où les cellules expriment des niveaux élevés de CD45 et faibles de KIT mais n’expriment pas CX3CR1 et ADGRE1; A2 : étape de maturation après le stade A1 où les cellules expriment CX3CR1 et ADGRE1 et perdent l’expression de KIT; M0 : microglie homéostatique. (D’après l’article (Butovsky & Weiner, 2018))

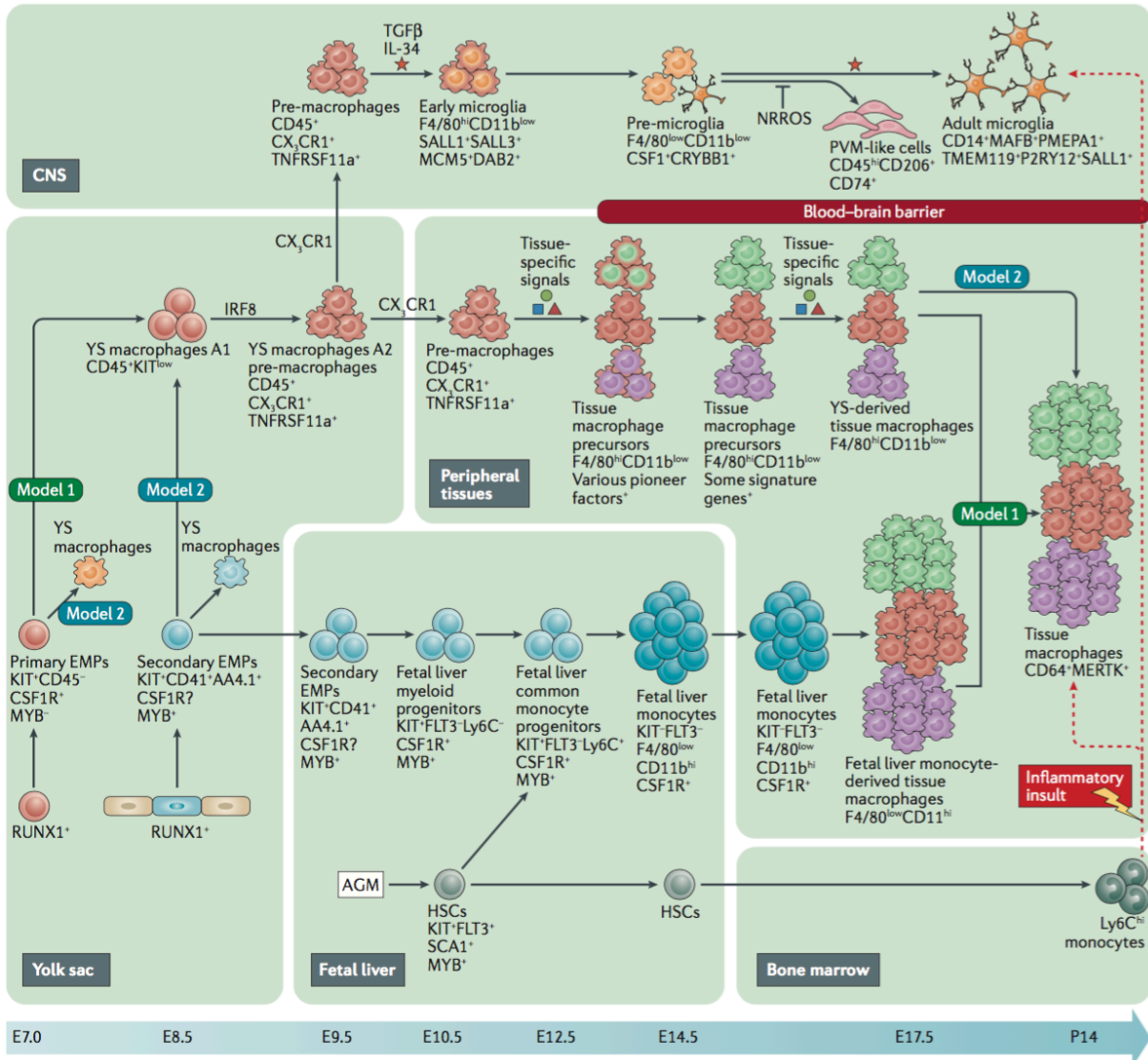


Figure 5. Trajectoires développementales des microglies et macrophages tissulaires. (D’après l’article (Q. Y. Li & Barres, 2018))

Une fois établies dans le cerveau, les cellules microgliales se maintiennent de manière autonome à travers la signalisation de TGF-β1. Elles se renouvellent soit par expansion clonale locale, ou dans certaines conditions par un remplacement des microglies perdues par des macrophages (maintenant leur propre identité) dérivant de la périphérie et recrutés dans le système nerveux central (Figure 6) (Butovsky & Weiner, 2018; Hashimoto et al., 2013).

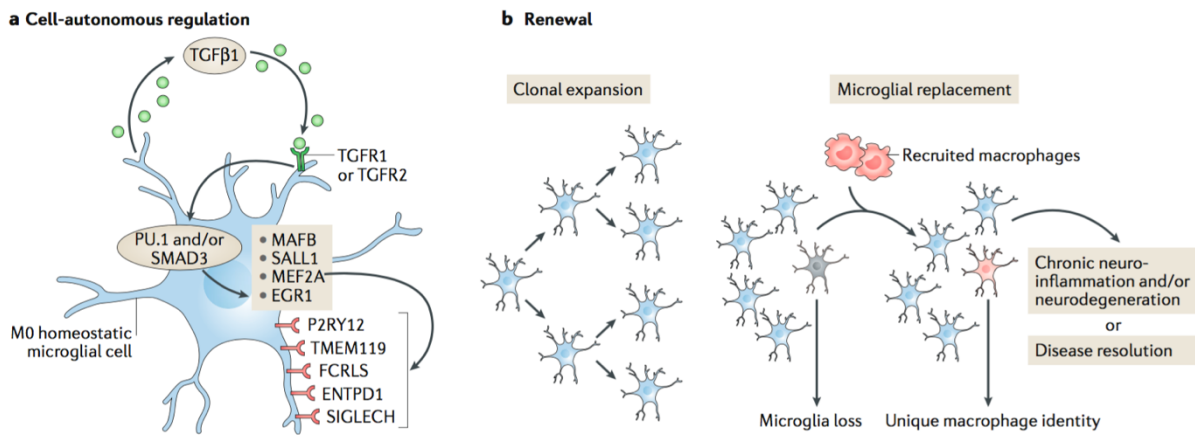


Figure 6. Régulation de l'homéostasie des microglies. (D'après la revue scientifique (Butovsky & Weiner, 2018))

Toutes ces propriétés ont ainsi permis de définir les microglies comme population immunitaire unique du système nerveux central et les différencier des cellules de macrophages dérivées des monocytes sanguins. En effet, même si les microglies expriment plusieurs marqueurs retrouvés chez les macrophages de souris ou d'humains (F4/80, CD11b, CSFR1 ou CD115, CD200R1, SIRPA ou CD172A, AIF1 ou IBA1), l'expression différentielle de certains marqueurs a permis de les discriminer des monocytes et macrophages. Par exemple, les microglies expriment des niveaux plus faibles de CD45 et des niveaux plus élevés de CX3CR1 par rapport aux monocytes et macrophages. Il existe aussi d'autres méthodes de discrimination parmi lesquelles celle utilisant le système rapporteur d'expression du récepteur CX3CR1 inductible au tamoxifène pour visualiser les microglies (**Figure 7**).

Les cellules de microglies du système nerveux central sont une population hétérogène et avec une grande plasticité, ce qui leur permet de s'adapter et réagir différemment en fonction de la variété des stimuli auxquels elles sont exposées (Gomez Perdiguero, Schulz, & Geissmann, 2013; Stratoulis, Venero, Tremblay, & Joseph, 2019; Tay, Carrier, & Tremblay, 2019). Dans leur état homéostatique, elles ont une morphologie de type « ramifié » (phénotype « surveillance ») avec des ramifications longues, étendues et multipolaires tandis que durant l'inflammation

elles peuvent exhiber une forme de type amiboïde (phénotype « réactif ») et produire des cytokines inflammatoires (Ladeby et al., 2005).

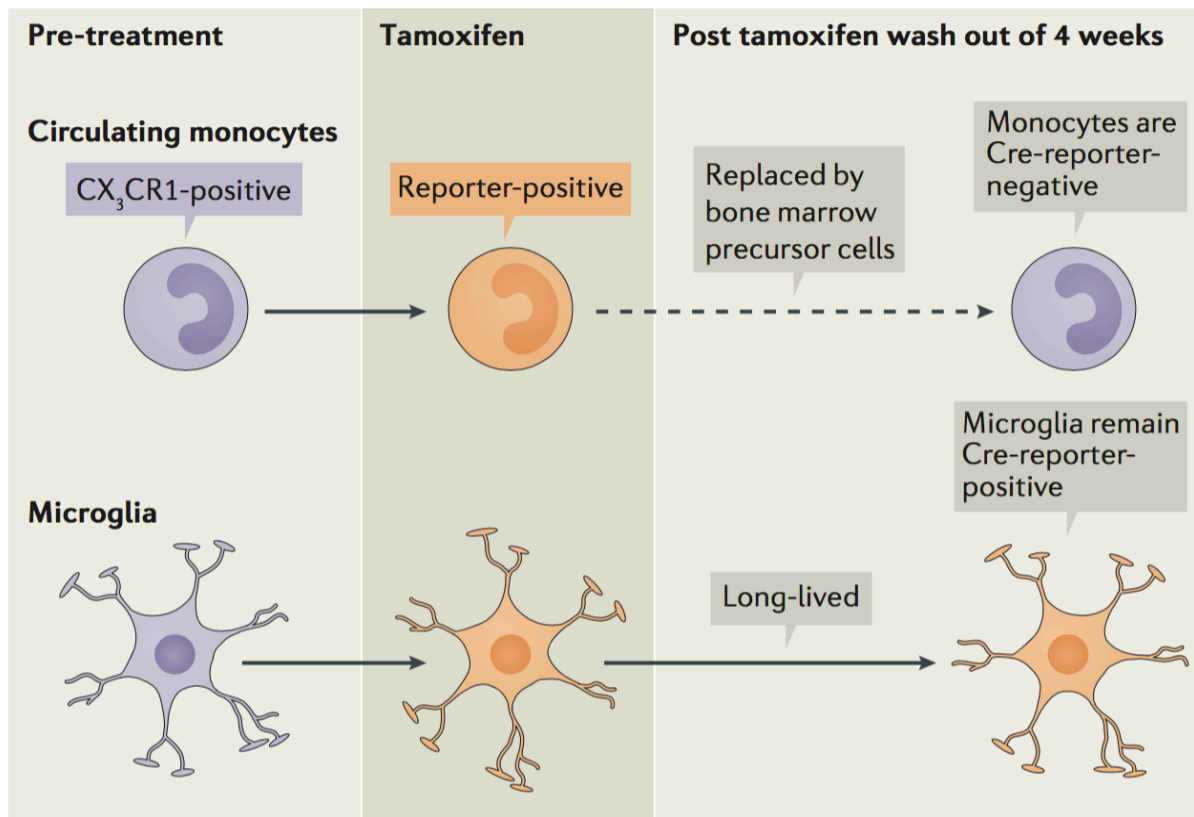


Figure 7. Système de différenciation définitive entre les microglies et les monocytes sanguins. (D'après l'article (Reyes, O'Koren, & Saban, 2017))

○ Fonctions physiologiques des microglies

Les propriétés des microglies discutées précédemment les rendent propices à exercer plusieurs fonctions importantes pour l'homéostasie du système nerveux central.

- Synaptogénèse et plasticité des synapses : les microglies sont essentielles à l'élagage des synapses (« synapse pruning »), processus naturel qui se produit dans le cerveau en développement où elles éliminent par phagocytose les excédents de synapses et axones

pour maintenir l'efficacité de l'activité neuronale (Butovsky & Weiner, 2018; Siskova & Tremblay, 2013). À l'âge adulte, les microglies entraînent la perte des synapses avec une contribution essentielle du système de complément (Butovsky & Weiner, 2018; Siskova & Tremblay, 2013). L'activité des microglies est essentielle à la maintenance de la fonction et l'intégrité des synapses dans la rétine mature. Des études utilisant des modèles murins de la maladie d'Alzheimer ont révélé que ce processus d'élagage synaptique par les microglies et le système de complément est activé de façon inappropriée et contribue au déclin cognitif observé (Butovsky & Weiner, 2018; Hong et al., 2016; Tay et al., 2017).

- Production de facteurs neurotrophiques : dans le cerveau à l'état physiologique, les microglies avec leur forme ramifiée jouent le rôle de « patrouilleurs » en restant constamment à l'affût du microenvironnement et en interagissant avec les autres cellules gliales et les neurones (M. Karlstetter et al., 2010; Q. Y. Li & Barres, 2018). Elles assurent la survie des neurones en sécrétant différentes neurotrophines telles que NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT3 (neurotrophin 3), FGF (fibroblast growth factor) et IGF1 (insulin-like growth factor 1). De plus, des études réalisées sur des embryons de souris ont suggéré que ces facteurs neurotrophiques sécrétés par les microglies participeraient à la formation de synapses (synaptogénèse) (Kettenmann, Kirchhoff, & Verkhratsky, 2013).
- Neurogénèse : les microglies participent à la formation de neurones de deux manières. D'une part à travers leur activité phagocytaire dépendante du récepteur tyrosine kinase MerTK (MERTK) pour éliminer les excès de cellules nouvellement formées et d'autre part *via* leur libération de cytokines (Butovsky & Weiner, 2018; Sierra et al., 2010).
- Chimiotaxie et recrutement de cellules immunitaires : cette dernière fonction des microglies est surtout pertinente dans un contexte pathologique. En effet, les microglies, à travers leur sécrétion de la chimiokine CCL2 (CC-chemokine ligand 2), sont capables de recruter les macrophages dérivés de monocytes circulants et exprimant le récepteur CCR2 (CC-chemokine receptor 2) (Butovsky & Weiner, 2018). Le recrutement de ces cellules immunitaires favorise l'augmentation de l'inflammation, ce qui est néfaste dans les pathologies du système nerveux central dont les rétinopathies (Rathnasamy, Foulds,

Ling, & Kaur, 2019a; Stephenson, Nutma, van der Valk, & Amor, 2018; Yamasaki et al., 2014).

1.1.1.2 L'angiogenèse rétinienne

L'angiogenèse peut être définie comme la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'une vasculature préexistante. Dans la rétine, le développement vasculaire est un processus hautement coordonné qui génère un réseau d'artères, de veines et capillaires dont la densité dépend des besoins métaboliques locaux tels que l'approvisionnement en oxygène et nutriments (Gariano Ray, 2005; Selvam Senthil, 2018). Le modulateur principal du développement et de l'homéostasie vasculaires est le facteur de croissance endothéliale VEGF (Rattner Amir, 2019). VEGF est un polypeptide sécrété en réponse à l'hypoxie et qui permet l'activation des récepteurs sur les cellules endothéliales vasculaires (CE) pour favoriser la survie, la prolifération, la perméabilité et le déplacement des CE vers la source de VEGF, étapes essentielles dans la formation et l'entretien des vaisseaux sanguins (Rattner Amir, 2019). La production de VEGF est régulée par les facteurs de transcription HIF (Hypoxia inductible factor) qui agissent comme des senseurs intracellulaires d'oxygène et permettent de s'assurer que la croissance des vaisseaux sanguins se fait seulement où elle est nécessaire (Rattner Amir, 2019). La signalisation HIF/VEGF joue ainsi un rôle crucial dans l'angiogenèse et dépendamment de son niveau d'activité, on peut assister à une croissance, une stabilisation ou une régression vasculaires (Rattner Amir, 2019).

La rétine est un tissu de choix accessible qui a été très exploité pour étudier des aspects importants de l'angiogenèse. Chez la plupart des mammifères incluant l'humain et la souris, la rétine est approvisionnée par un arrangement d'artères et de veines avec des capillaires intermédiaires et un système de lits de vaisseaux à plusieurs niveaux (superficiel, intermédiaire et profond) qui alimentent les différentes couches rétinienne (**Figure 8**) (Gariano Ray, 2005; Luty Gerard, 2018; Rattner Amir, 2019; Tata, Ruhrberg, & Fantin, 2015). Les artères et les veines qui alimentent les vaisseaux intra-rétiens entrent dans l'œil au niveau du nerf optique, puis se ramifient en s'étendant radialement le long de la surface interne de la rétine (**Figure 9**)

(Tata et al., 2015). L'épithélium pigmentaire rétinien et les photorécepteurs en forme de bâtonnet et de cône dans la rétine externe sont alimentés par les vaisseaux sanguins de la choroïde (Tata et al., 2015).

La vasculature rétinienne se développe durant les deux premières semaines après la naissance chez la souris. Son développement débute par la prolifération et la migration radiale des astrocytes sur la surface vitrée de la rétine, suivie par la prolifération et la migration radiale des CE le long du réseau d'astrocytes (**Figure 9**) (Tata et al., 2015). Au jour post-natal 7 environ, la couche primaire superficielle de capillaires intra-rétiens à expansion radiale a atteint la périphérie de la rétine (Tata et al., 2015). À ce stade, de nouveaux vaisseaux émergent de ce plexus et s'étendent perpendiculairement pour plonger dans les couches externes de la rétine et former d'abord le plexus profond puis le plexus intermédiaire (**Figures 8 et 9**) (Liu Chi-Hsiu, 2017; Tata et al., 2015). Les vaisseaux sanguins intra-rétiens forment une BHR qui remplit un rôle similaire à celui de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et qui est composée de cellules endothéliales avec des jonctions étroites (Tata et al., 2015). La BHR est une frontière hautement sélective et semi-perméable qui régule le flux de nutriments, de déchets métaboliques, d'ions et de protéines dans l'espace rétinien. Le dysfonctionnement de cette barrière joue un rôle clé dans le phénotype hyperperméable que présentent les vaisseaux sanguins pathologiques retrouvés dans les rétinopathies prolifératives.

Des anomalies dans la vasculature de la rétine sont ainsi associées à des maladies oculaires qui sont discutées dans la prochaine section.

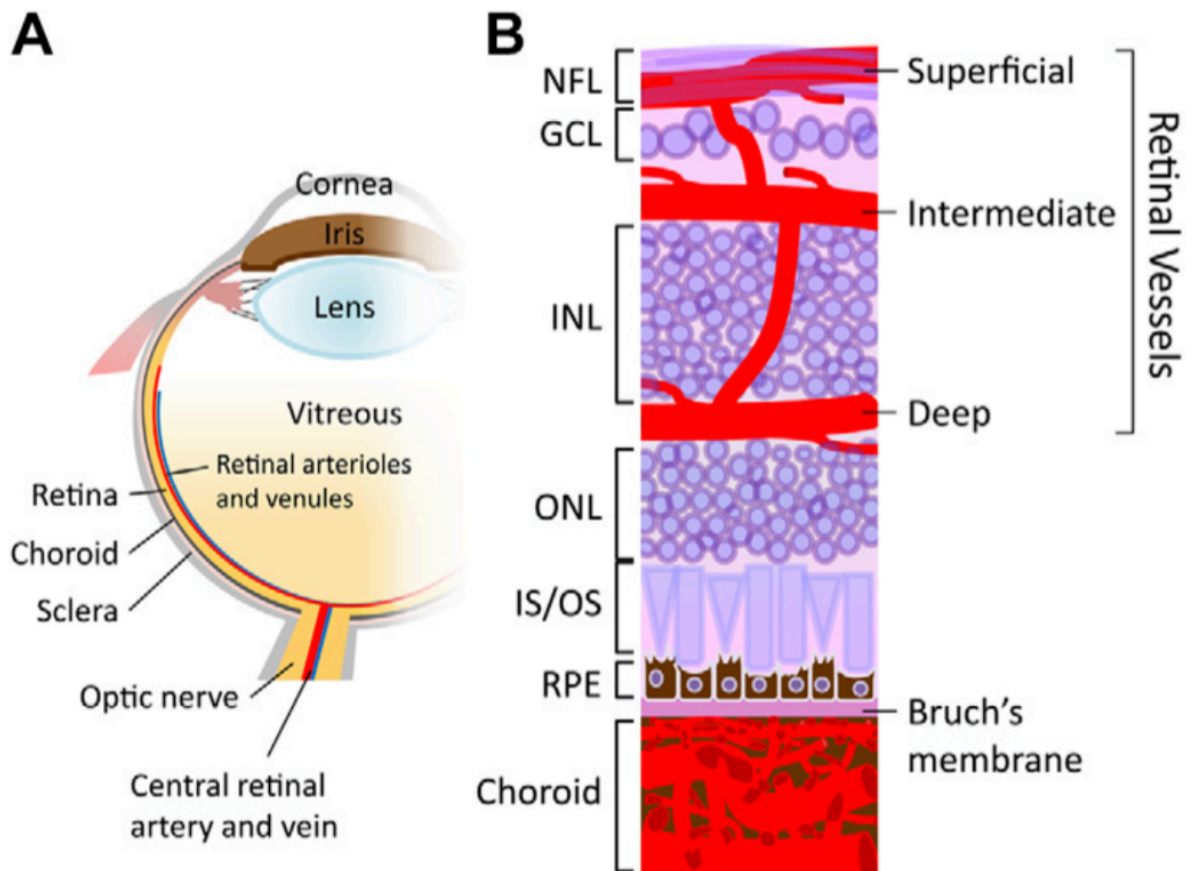


Figure 8. Schéma représentatif de la vasculature oculaire. A) Illustration d'une coupe transversale d'un œil. B) Représentation schématique agrandie montrant une vue en section transversale du système vasculaire de la rétine et de la choroïde. NFL (Nerve fiber layer); GCL (Ganglion cell layer); INL (Inner nuclear layer); ONL (Outer nuclear layer); IS/OS (inner segment/outer segment of photoreceptor); RPE (Retinal pigment epithelium). (D'après l'article (Liu Chi-Hsiu, 2017))

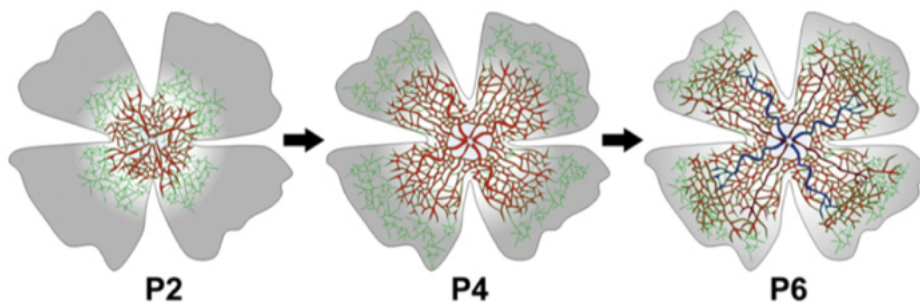


Figure 9. Évolution temporelle de la croissance des vaisseaux sanguins de la rétine post-natale chez la souris. En vert, le nid d'astrocytes. En rouge, le plexus vasculaire avec en rouge foncé les artères et en bleu les veines. (D'après l'article (Tata et al., 2015))

1.1.1.3 Pathologies de la rétine

La rétine humaine est un tissu délicat qui abrite un réseau complexe de neurones, cellules gliales et vaisseaux sanguins. Lorsque ce réseau est compromis, cela mène à de sérieux dommages dans la rétine qui ne peut plus assurer le transfert du message visuel vers le cerveau et le risque de la perte de vision devient un souci primordial. Les prochains paragraphes relateront les différentes pathologies affectant la rétine et menaçant la santé visuelle.

1.1.1.3.1 La rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique comme son nom l'indique est une complication secondaire du diabète qui s'étend dans la rétine, affecte son réseau vasculaire et est la majeure cause de cécité chez les individus de la classe active mondiale (**Figures 10 et 11**). Il existe 2 formes reconnues de diabète : 1) Le diabète de type 1, aussi appelé diabète juvénile ou insulino-dépendant, se caractérise par une destruction auto-immune des cellules bêta du pancréas entraînant une déficience sévère en insuline. 2) Le diabète de type 2, regroupant environ 90 à 95% de tous les patients diabétiques, est non insulino-dépendant et se manifeste à l'âge adulte (Flaxel et al., 2019). Même si les cas de diabète de type 1 sont associés à des risques plus fréquents et sévères de complications oculaires, les patients diabétiques de type 2, à cause de

leur plus large proportion, représentent le plus grand nombre de cas de déficience visuelle due à la rétinopathie diabétique (Flaxel et al., 2019).

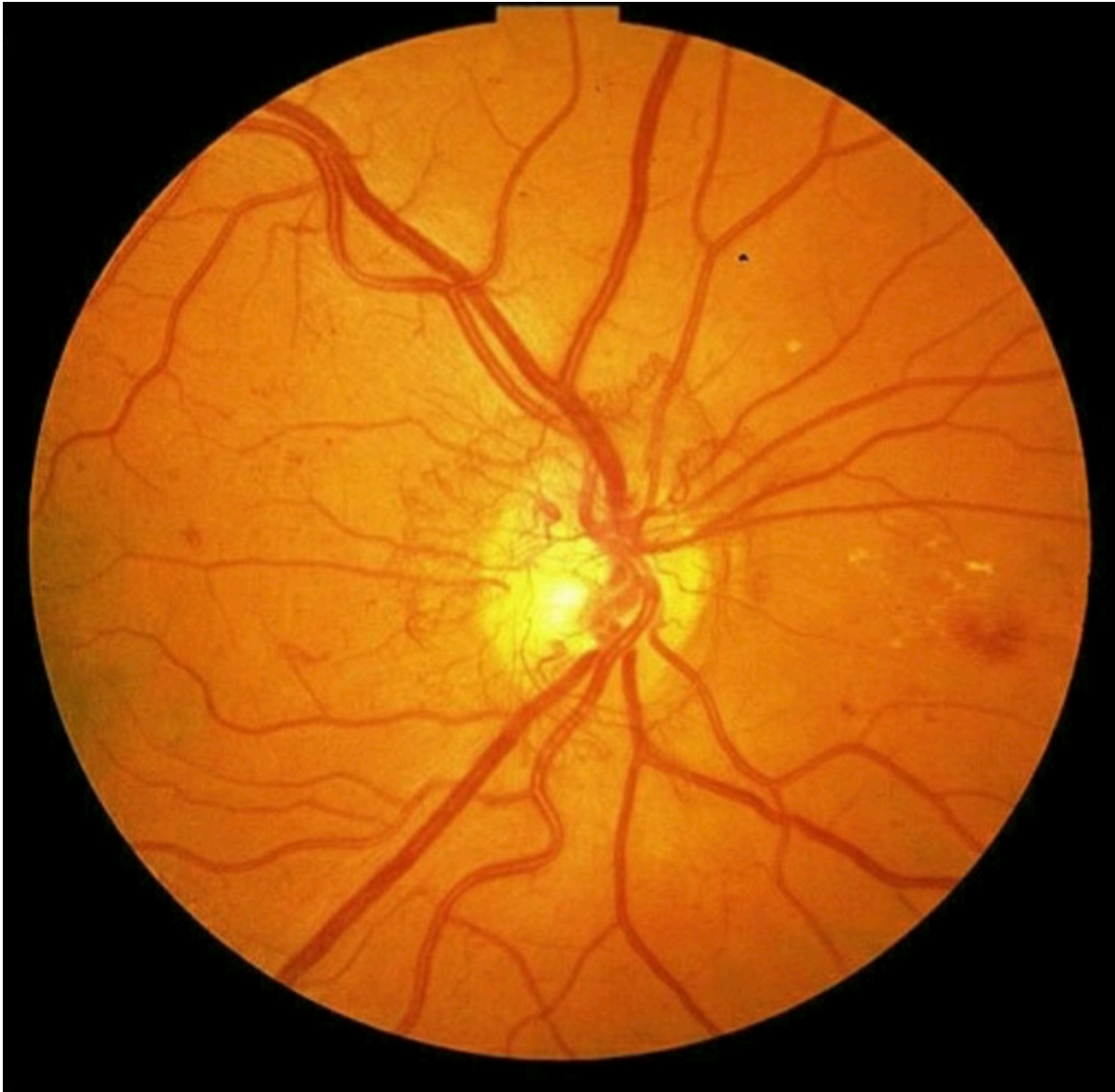


Figure 10. Apparence du fonds de l'œil et de la rétine d'un patient atteint de la rétinopathie diabétique proliférative. (Photo tirée de l'article (Helga Kolb et al., 1995))

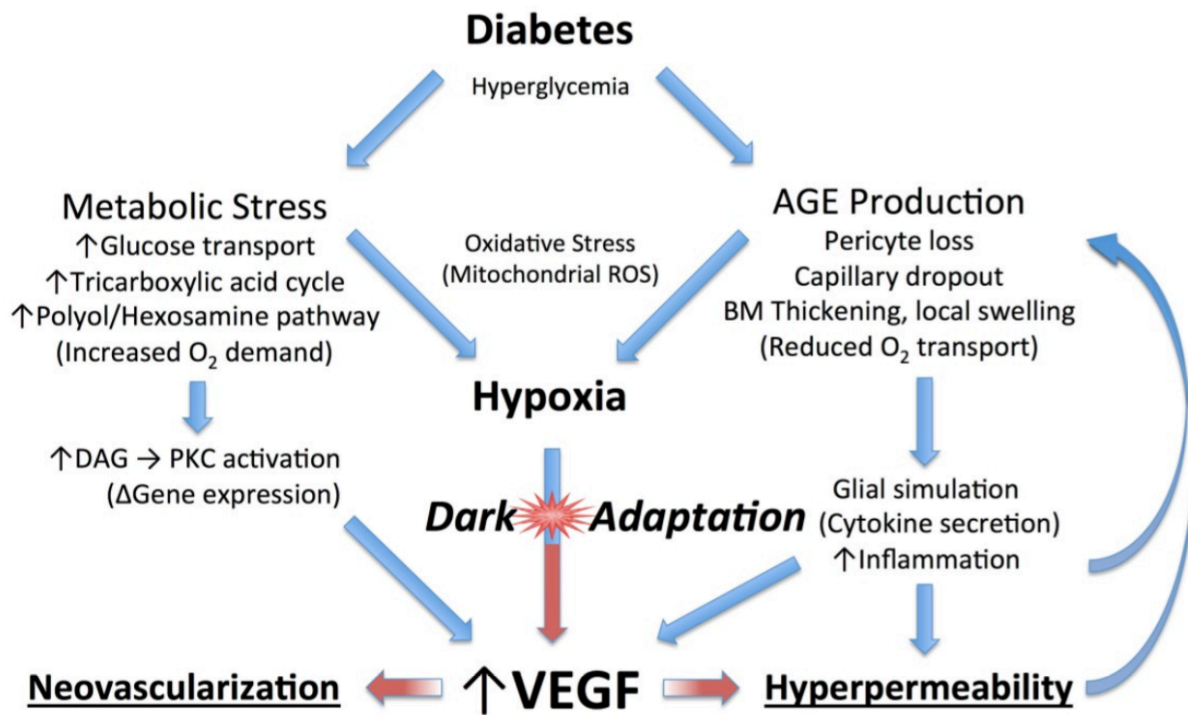


Figure 11. Événements biochimiques expliquant la progression de la rétinopathie diabétique. DAG: Diacyl glycerol; PKC: Protein kinase C; BM: Basement membrane; ROS: Reactive oxygen species; AGE: Advanced glycation end products; VEGF: Vascular endothelial growth factor. (D’après l’article (Helga Kolb et al., 1995) mis à jour en mai 2019)

Avec l’augmentation de l’industrialisation et de la mondialisation, l’incidence du diabète s’est vite accrue au fil des années pour devenir une épidémie mondiale alarmante. En termes de chiffres, la prévalence dans le monde entier de la rétinopathie chez les patients diabétiques âgés de 40 ans et plus est d’environ 34,6% (environ 93 millions de personnes) et on s’attend à plus de 190 millions de cas de rétinopathie diabétique menaçant la santé visuelle d’ici 2030 (Flaxel et al., 2019; Lechner, O’Leary, & Stitt, 2017). Maintenant, plus la durée du diabète s’étend, plus grand est le risque de développer la rétinopathie diabétique. En effet, la prévalence de rétinopathie diabétique chez des patients diabétiques de type 1 est estimée à 25%, 60% et 80% pour une durée du diabète d’environ 5, 10 et 15 ans respectivement (Flaxel et al., 2019). De

plus, des études épidémiologiques et cliniques ont montré que l'hyperglycémie et l'hypertension sont aussi des facteurs à risque majeur à considérer (Flaxel et al., 2019).

En termes d'évolution, la rétinopathie diabétique est une pathologie qui se développe en différentes phases allant d'un niveau léger à sévère et une intervention adéquate est requise en fonction des symptômes observés. La classification (**Tableau 1**) des différentes étapes de la maladie basée sur les aspects cliniques observés comprend (Flaxel et al., 2019; Helga Kolb et al., 1995; Lechner et al., 2017):

- Niveau asymptomatique de rétinopathie diabétique après examination avec l'ophtalmoscope : pas d'anomalies observées dans le fond de l'œil.
- Rétinopathie diabétique non proliférative à niveau léger : l'examen ophtalmique révèle seulement la présence de microaneurysmes qui ont l'apparence de petites lésions vasculaires dans le fonds de l'œil. Ces lésions représentent la dilatation des capillaires à la suite de la perte de support par les péricytes et/ou l'attachement des cellules gliales.
- Rétinopathie diabétique non proliférative à niveau modéré : à ce stade il y'a la présence d'au moins 2 des symptômes suivants : microaneurysmes, hémorragie, dépôt de lipoprotéines et des premiers signes d'ischémie. En effet en raison de la rupture des capillaires sanguins affaiblis, il y'a des taches d'hémorragies dans la rétine et aussi des dépôts protéiques dans la rétine périphérique et souvent aux alentours de la macula provenant des fuites des microvaisseaux et de la défaillance de la BHR.
- Rétinopathie diabétique non proliférative à niveau sévère : elle se caractérise par les signes suivants : au moins une vingtaine ou plus d'hémorragies intrarétiniennes, la présence de dilatation veineuse et l'augmentation du nombre d'anomalies dans les microvaisseaux rétiniens.
- Rétinopathie diabétique proliférative : au fur et à mesure que la pathologie progresse, les capillaires sanguins affaiblis et obstrués ne réussissent pas à bien perfuser la rétine. Ceci entraîne une ischémie dans la rétine qui mène ultimement à la production de facteurs proangiogéniques (comme le VEGF) pour la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. La caractéristique principale et cruciale du stade de rétinopathie diabétique proliférative est donc cette néovascularisation déclenchée par la rétine pour tenter de revasculariser

les régions où il y a eu des pertes de capillaires sanguins. Cette tentative est un échec car les nouveaux vaisseaux sanguins, au lieu de restaurer la perfusion de la rétine ischémique, vont pénétrer la membrane limitante interne et former un plexus dense de capillaires entre les surfaces internes de la rétine, ou pénétrer dans le vitré qui est physiologiquement avasculaire. De plus, ces nouveaux vaisseaux sont fragiles, hautement perméables (à cause de l'altération de la BHR) et peuvent entraîner la perte de la vision par le développement des hémorragies dans le vitré et sous la membrane limitante interne de la rétine.

Disease Severity Level	Findings Observable upon Dilated Ophthalmoscopy
No apparent retinopathy	No abnormalities
Mild NPDR (see Glossary)	Microaneurysms only
Moderate NPDR (see Glossary)	More than just microaneurysms but less than severe NPDR
Severe NPDR	
U.S. definition	Any of the following (4-2-1 rule) and no signs of proliferative retinopathy: <ul style="list-style-type: none"> • Severe intraretinal hemorrhages and microaneurysms in each of 4 quadrants • Definite venous beading in 2 or more quadrants • Moderate IRMA in 1 or more quadrants
International definition	Any of the following and no signs of proliferative retinopathy: <ul style="list-style-type: none"> • More than 20 intraretinal hemorrhages in each of 4 quadrants • Definite venous beading in 2 or more quadrants • Prominent IRMA in 1 or more quadrants
PDR	One or both of the following: <ul style="list-style-type: none"> • Neovascularization • Vitreous/preretinal hemorrhage

IRMA = intraretinal microvascular abnormalities; NPDR = nonproliferative diabetic retinopathy; PDR = proliferative diabetic retinopathy

Tableau 1. Différentes étapes de l'évolution de la rétinopathie avec les symptômes observés. (D'après l'article (Flaxel et al., 2019))

L'œdème maculaire diabétique

Il s'agit d'une des complications les plus sérieuses de la rétinopathie diabétique qui implique la région centrale de la rétine, comprenant la fovéa et la macula, permettant

une vision centrale hautement précise. Au début de la manifestation de la rétinopathie diabétique, c'est la région périphérique de la rétine qui est touchée et les changements dans les fonctions de la rétine ne sont pas encore considérés alarmants à cause de la capacité du système nerveux central à ignorer les défauts de la vision périphérique (Helga Kolb et al., 1995). Mais au fur et à mesure que la maladie progresse, les dommages dans le réseau vasculaire rétinien augmentent en nombre et en sévérité et s'étendent dans la macula (Helga Kolb et al., 1995). L'œdème maculaire diabétique se caractérise par un épaissement du centre de la macula (la fovéa, qui est avasculaire) causé par l'accumulation de protéines plasmatiques et fluides résultant des fuites des capillaires sanguins et des bris dans la BHR (Helga Kolb et al., 1995). Le développement de la tomographie en cohérence optique (ou OCT qui permet de mesurer de façon non invasive l'épaisseur de la rétine et d'examiner les sections de la rétine en temps réel) a apporté des solutions pour monitorer l'œdème maculaire et mieux suivre la progression de l'œdème maculaire diabétique (Helga Kolb et al., 1995; Lechner et al., 2017).

Des années de recherche clinique ont permis d'implanter des stratégies de traitements de la rétinopathie diabétique (**Tableau 2**) qui se sont révélées efficaces à 90% pour la prévention de la perte visuelle. Ces traitements incluent :

- Photocoagulation panrétinienne au laser : il s'agit du traitement standard efficace de la rétinopathie diabétique qui permet de réduire de moitié le risque de perte de vision sévère (Y. Zhao & Singh, 2018). La destruction au laser de la rétine ischémique vise à diminuer le signal d'angiogenèse, réduire la néovascularisation pathologique et le risque d'hémorragies (Y. Zhao & Singh, 2018). Les limitations principales de ce traitement incluent : la restriction de l'aire de vision rétinienne périphérique et les patients se plaignent souvent de la diminution de leur vision nocturne; le traitement se fait au laser, ce qui laisse des cicatrices; le déclin transitoire de la vision centrale dû à l'œdème maculaire a aussi été reporté; l'hémorragie dans le vitré si la néovascularisation est présente et la dilatation de la pupille (Flaxel et al., 2019; Helga Kolb et al., 1995; Y. Zhao & Singh, 2018). L'avancée de la thérapie anti-VEGF dans les dernières années a permis d'améliorer les stratégies de traitement de la rétinopathie diabétique.

- Photocoagulation au laser focal : les études de traitement précoce de la rétinopathie diabétique ont montré que le traitement au laser focal entraîne une réduction du risque de perte de vision modérée chez les patients ayant la rétinopathie diabétique non proliférative à niveau modéré et ceux ayant un stade clinique d'œdème maculaire diabétique (Flaxel et al., 2019; Helga Kolb et al., 1995). Les effets secondaires principaux impliquent : un possible déclin transitoire initial de la vision centrale; un scotome (tache noire dans le champ visuel) paracentral si la chirurgie au laser s'est faite proche de la fovéa; un scotome permanent si le laser a touché la fovéa; une augmentation de la surface des cicatrices avec les années; le développement de la néovascularisation choroïdienne et de la fibrose sous-rétinienne (Flaxel et al., 2019).

- Injections intraoculaires d'agents thérapeutiques

- Injection des inhibiteurs de VEGF : l'expression anormale de VEGF est un des événements clés associés à la progression de la rétinopathie proliférative diabétique. Des molécules inhibitrices ont été développées dans la dernière dizaine d'années et comportent : le Bevacizumab (ou Avastin), le Ranibizumab (ou Lucentis) et l'Aflibercept (ou Eylea) (Flaxel et al., 2019). Le Bevacizumab est un anticorps monoclonal dirigé contre la forme recombinante humaine entière de VEGF et dont l'approbation par l'Agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux (FDA) a été donnée pour le traitement du cancer colorectal métastatique (Y. Zhao & Singh, 2018). Le Bevacizumab a une demi-vie deux fois plus longue que le Ranibizumab et est utilisé (sans approbation de la FDA) par les ophtalmologues pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge de type néovasculaire et l'œdème maculaire diabétique (Y. Zhao & Singh, 2018). Il s'agit d'une alternative largement utilisée, car elle coûte moins cher que le traitement au Ranibizumab. Ce dernier est un fragment d'anticorps monoclonal avec une grande affinité pour le VEGF humain. Il a été spécialement conçu pour l'administration intraoculaire et l'approbation par la FDA a été donnée en 2017 pour le traitement de tous les stades de rétinopathie diabétique (Y. Zhao & Singh, 2018). La nouvelle molécule thérapeutique,

Aflibercept, est une protéine recombinante de fusion des sites de liaisons des récepteurs humains VEGFR1 et VEGFR2 qui cible toutes les isoformes de VEGF et aussi PlGF (placental growth factor) (Y. Zhao & Singh, 2018). L'Aflibercept a été récemment approuvé pour diminuer la progression de la dégénérescence maculaire liée à l'âge de type néovasculaire et l'œdème maculaire diabétique (Flaxel et al., 2019; Y. Zhao & Singh, 2018). La complication la plus sérieuse des injections intravitréales d'anti-VEGF est l'apparition d'une infection de l'œil connue sous le nom d'endophtalmie (Flaxel et al., 2019). Les autres effets secondaires incluent les risques de : hémorragie oculaire; effets systémiques tels que la thromboembolie veineuse (formation de caillots sanguins); augmentation de la pression intraoculaire; cataracte et augmentation des tractions physiques dans la rétine pouvant entraîner son détachement (Flaxel et al., 2019).

- Injection de stéroïdes : L'œdème maculaire diabétique peut aussi être traité par les injections intravitréales de glucocorticoïdes tels que le triamcinolone acétonide, la dexaméthasone, et l'uocinolone acétonide (Flaxel et al., 2019). Ce traitement est particulièrement bénéfique dans les cas de patients ne répondant pas à la thérapie anti-VEGF (Flaxel et al., 2019). Cependant les risques de développement de cataracte et de pression intraoculaire élevée sont plus hauts dans le traitement aux corticoïdes par rapport au traitement anti-VEGF (Flaxel et al., 2019).

- Vitrectomie : Cette chirurgie, utilisée pour augmenter l'acuité visuelle, est réservée aux patients dont la rétinopathie diabétique persiste, qui ne répondent pas aux traitements par laser et/ou aux anti-VEGFs et qui présentent : une persistance de l'hémorragie dans le vitré, une substantielle présence de tractions vitréomaculaires et des tractions physiques pouvant détacher la rétine (Flaxel et al., 2019). Cependant les effets secondaires à considérer sont les risques de : hémorragie dans le vitré, déchirure ou détachement de la rétine, perte de la vision, endophtalmie et cataracte (Flaxel et al., 2019).

Treatment	Side Effect/Complication
Focal laser photocoagulation surgery for DME	<ul style="list-style-type: none"> • Possible transient initial decrease in central vision • Paracentral scotomas if laser burns have been placed close to the fovea, especially large or confluent burns²³⁶ • Permanent central scotoma from inadvertent foveal burns • Expansion of laser scar area (over many years) • Choroidal neovascularization and subretinal fibrosis
Panretinal photocoagulation (scatter) for severe NPDR or PDR	<ul style="list-style-type: none"> • Transient central vision loss from macular edema¹³² • Peripheral visual field constriction with delayed dark adaptation • Vitreous hemorrhage if neovascularization is present • Reduced or compromised accommodation²³⁷ • Pupillary dilation (mydriasis)
Vitrectomy	<ul style="list-style-type: none"> • Vitreous hemorrhage^{238,239} • Retinal tear or detachment²⁴⁰ • Vision loss^{240,241} • Infectious endophthalmitis²⁴² • Cataract²⁴³
Intravitreal injections	<ul style="list-style-type: none"> • Ocular hemorrhage • Elevated IOP (i.e., corticosteroids)^{244,245} • Infectious endophthalmitis • Noninfectious inflammatory reactions • Possible systemic effect from intravitreal medication²¹¹ • Increased retinal traction • Cataract^{244,245}

DME = diabetic macular edema; IOP = intraocular pressure; NPDR = nonproliferative diabetic retinopathy; PDR = proliferative diabetic retinopathy

Tableau 2. Traitements et effets secondaires des thérapies de la rétinopathie diabétique. (D’après l’article (Flaxel et al., 2019))

1.1.1.3.2 La rétinopathie du prématuré (ROP) :

La rétinopathie du prématuré est une des causes majeures de cécité visuelle infantile dans les pays industrialisés. Elle a été premièrement décrite sous le nom de fibroplasie rétrolentale en 1940 par Stewart Clifford et étudiée plus en profondeur par Theodore Terry en 1946 (Hartnett, 2017). Comme son nom l’indique, la rétinopathie du prématuré est un désordre prolifératif des vaisseaux sanguins rétiniens en développement qui touche les enfants nés prématurément. En effet la naissance prématurée est un facteur à haut risque qui affecte de façon négative plusieurs importants systèmes d’organes tels que le cœur, les poumons, le cerveau et l’œil (Cavallaro et al., 2014; J. Chen & Smith, 2007; Hellstrom, Smith, & Dammann, 2013; R.

Liegl, Hellstrom, & Smith, 2016). L'incidence de la ROP corrèle étroitement avec le poids et l'âge gestationnel à la naissance (J. Chen & Smith, 2007; Hartnett, 2017). D'après les données du réseau néonatal canadien, les risques pour les bébés nés avant la 31^e semaine d'âge gestationnel de développer un stade de rétinopathie du prématuré sont d'environ 40 à 50% (Jefferies, Canadian Paediatric Society, & Newborn, 2016).

La ROP est une pathologie à deux phases comprenant une phase initiale de croissance vasculaire altérée et atténuée suivie d'une 2^e phase de prolifération vasculaire (Voir **Figure 12**) (Raffael Liegl, Hellström, & Smith, 2016). Avant de poursuivre dans le détail de la pathogenèse de la maladie, il faudrait rappeler quelques faits importants du développement normal de la vasculature rétinienne. Les vaisseaux sanguins de la rétine proviennent du centre du disque optique et progressent de manière radiale vers l'extérieur de l'ora serrata (Raffael Liegl et al., 2016). Chez l'être humain, le développement de la vasculature rétinienne est initié durant le 4^e mois de grossesse et les vaisseaux sanguins atteignent la périphérie de la rétine juste avant la naissance (Raffael Liegl et al., 2016). Ce processus est aussi étroitement associé aux niveaux adéquats de facteurs de croissance dans l'utérus tels qu'IGF-1 (insulin-like growth factor-1) (Raffael Liegl et al., 2016; Sapiha et al., 2010). Par conséquent, après une naissance prématurée, la rétine du bébé est incomplètement vascularisée et comporte une zone périphérique avasculaire (Raffael Liegl et al., 2016). La taille de l'aire de la zone avasculaire est déterminée par l'âge gestationnel à la naissance du bébé prématuré. La pression partielle de l'oxygène (PaO₂) dans l'utérus est d'environ 50 mmHg comparée à jusqu'à environ 160 mmHg retrouvés dans l'air ambiant (Raffael Liegl et al., 2016). Le bébé prématuré à sa naissance est donc immédiatement exposé à une augmentation dramatique de la pression en oxygène (Raffael Liegl et al., 2016). Des études ont suggéré qu'une pression partielle d'oxygène supérieure ou égale à 80 mmHg empêche non seulement la vascularisation normale mais entraîne aussi des dommages dans les capillaires sanguins existants nouvellement développés (Raffael Liegl et al., 2016). Les hauts niveaux d'oxygène sont ainsi un facteur à risque important du développement de la ROP. Au fur et à mesure que le processus de maturation du bébé prématuré se fait, la région avasculaire de sa rétine devient de plus en plus métaboliquement active et en absence d'un réseau vasculaire adéquat ajouté au manque d'IGF-1, entraîne une hypoxie tissulaire (J. Chen & Smith, 2007; Sapiha et al., 2010). La 1^{re} phase de ROP de dégénérescence

microvasculaire a lieu de la naissance à l'âge post-menstruel d'approximativement 30-32 semaines (J. Chen & Smith, 2007). L'augmentation du métabolisme dans la rétine en développement du bébé prématuré entraîne une haute demande en oxygène et en nutriments et une stimulation de l'expression de facteurs de croissance tels que le VEGF et l'érythropoïétine (R. Liegl et al., 2016). La 2^e phase, entraînée principalement par la sécrétion de VEGF, se caractérise par une néovascularisation pathologique dans le vitré (R. Liegl et al., 2016). Ces nouveaux vaisseaux pathologiques sont très perméables, entraînent des fuites à cause de l'altération de la barrière sang/rétine et ne contribuent pas à restaurer les besoins physiologiques de la rétine (R. Liegl et al., 2016). Au fur et à mesure que la rétine se développe, ces vaisseaux sanguins pathologiques peuvent régresser. Toutefois, une cicatrice fibrotique reste dans le tissu rétinien et a tendance à causer des tractions physiques dans la rétine et dans des cas sévères, un détachement de la rétine et une perte de la vision subséquente (R. Liegl et al., 2016).

Les traitements actuels ne sont pas préventifs (pour empêcher la 1^{re} phase de la maladie sans laquelle la 2^e phase n'aurait pas lieu) mais s'attèlent plutôt à traiter la 2^e phase proliférative de la ROP (**Figure 12**) (R. Liegl et al., 2016). La 1^{re} option de traitement était la cryothérapie de la rétine avasculaire (R. Liegl et al., 2016). Ce traitement a toutefois été remplacé par la photocoagulation panrétinienne au laser et le principe reste le même : détruire la zone avasculaire de la rétine source de la production de facteurs de croissance, afin de réduire leur libération (R. Liegl et al., 2016). Cette procédure relativement sécuritaire permet à la plupart des bébés prématurés d'éviter le détachement de la rétine mais est souvent associée à de faibles résultats cliniques (R. Liegl et al., 2016). L'avènement de la thérapie anti-VEGF a été bénéfique dans le traitement de plusieurs maladies de l'œil chez les adultes et est aussi devenu un traitement préférentiel de la ROP (R. Liegl et al., 2016). Cependant, traiter des bébés prématurés représente un gros défi et la meilleure dose ainsi que l'agent thérapeutique adéquat restent encore à déterminer (R. Liegl et al., 2016).

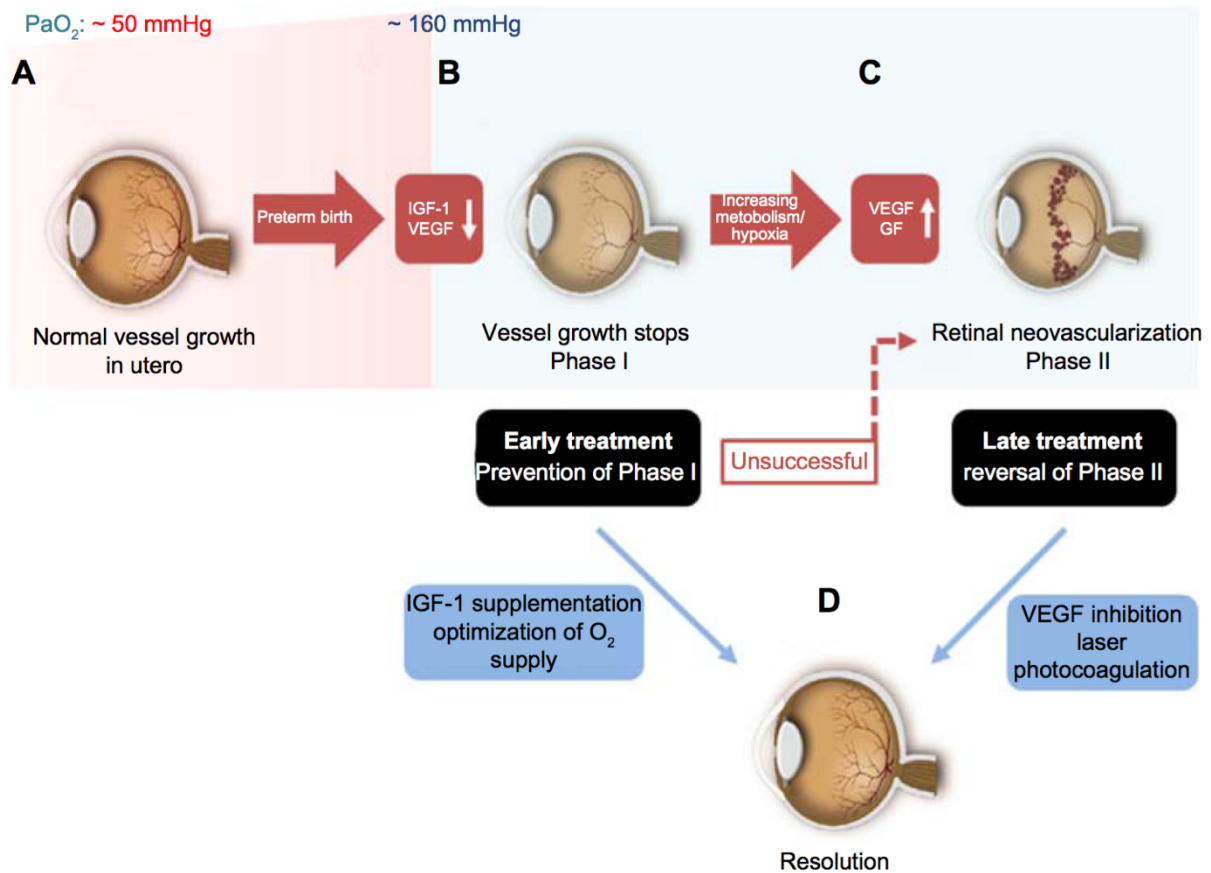


Figure 12. Pathogenèse et traitements de la rétinopathie du prématuré. (D'après l'article (Raffael Liegl et al., 2016))

1.1.1.3.3 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD):

Comme son nom l'indique, il s'agit d'une condition pathologique commune et progressive avec l'âge (la maladie ne se développe pas normalement avant 55 ans). Cette maladie oculaire affecte la région centrale de la rétine ou macula et est une cause majeure de perte de la vision chez la population âgée (Helga Kolb et al., 1995). Elle existe sous 2 formes : la forme sèche pouvant évoluer vers la deuxième forme humide ou néovasculaire (environ 10-15% de tous les patients avec AMD peuvent développer la forme humide) (Fisher & Ferrington, 2018; Guillonnet et al., 2017; Helga Kolb et al., 1995). En général la forme sèche présente un développement de « drusen » (taches jaunes observées dans la fundoscopie) entre la couche de

RPE et la membrane de Bruch adjacente, qui induit un stress et une perte de photorécepteurs (Fisher & Ferrington, 2018; Guillonnet al., 2017; Helga Kolb et al., 1995). On observe aussi une atrophie géographique ou atrophie choroïdorétinienne. Le processus de progression de l'AMD évolue vers la forme humide ou néovasculaire. Cette 2^e forme apparaît à la suite de la mort des photorécepteurs et le détachement des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien dus au développement de vaisseaux sanguins et la fuite de sang et du sérum dans l'espace sous-rétinien (entre la rétine neuronale et la couche de RPE) et l'espace sous-RPE (entre la couche de RPE et la membrane de Bruch) (Fisher & Ferrington, 2018; Guillonnet al., 2017; Helga Kolb et al., 1995). La néovascularisation pathologique associée à la forme humide est aussi appelée néovascularisation choroïdienne car elle provient des capillaires choroïdiens et s'étend à travers la membrane de Bruch vers l'espace sous-rétinien ou sous-RPE (Fisher & Ferrington, 2018; Guillonnet al., 2017; Helga Kolb et al., 1995). Les autres facteurs de risque à part l'âge sont la cigarette, la masse corporelle et l'historique génétique familial. La chirurgie au laser permet de traiter les yeux présentant des « drusen » et la thérapie anti-VEGF est utilisée pour le traitement de la forme humide ou néovasculaire (Fisher & Ferrington, 2018; Guillonnet al., 2017; Helga Kolb et al., 1995).

1.1.1.3.4 Autres pathologies de la rétine

- Le glaucome : il s'agit d'un problème commun venant avec l'âge où la pression intraoculaire devient élevée. La pression intraoculaire augmente car la chambre antérieure de l'œil ne parvient plus à faire adéquatement l'échange de fluides. La pression dans le vitré monte graduellement et compromet les vaisseaux sanguins du nerf optique et éventuellement les axones des cellules ganglionnaires jusqu'à entraîner ultimement leur mort (Ito & Di Polo, 2017; Helga Kolb et al., 1995; Miltner & La Torre, 2019). Les traitements actuels utilisent des agents tels que les analogues de prostaglandine F_{2α} pour baisser la pression intraoculaire (Ito & Di Polo, 2017; Helga Kolb et al., 1995; Miltner & La Torre, 2019). D'autres composés tels que les cannabinoïdes, les bloqueurs des récepteurs aux angiotensines II, les agonistes des récepteurs adénosine I, dont l'efficacité a été démontrée dans les recherches expérimentales, attendent

encore d'être validés lors des tests cliniques (Ito & Di Polo, 2017; Helga Kolb et al., 1995; Miltner & La Torre, 2019).

- La rétinite pigmentaire : c'est une condition pathologique agressive et héréditaire qui ne connaît aucune cure actuellement (Helga Kolb et al., 1995). Dans les stades précoces de la maladie, il y'a une dégénérescence des photorécepteurs de type bâtonnet de la rétine périphérique (Helga Kolb et al., 1995). Au fur et à mesure que la rétine périphérique (où les photorécepteurs de type bâtonnet résident) s'endommage, les patients perdent graduellement leur vue nocturne (Helga Kolb et al., 1995). Il y'a l'apparition caractéristique de pigments noirs dans la rétine périphérique et un amincissement des vaisseaux sanguins à la tête du nerf optique (Helga Kolb et al., 1995).

1.1.1.3.5 Modèle animal des rétinopathies prolifératives : la rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) chez la souris

Le modèle de la rétinopathie induite par l'oxygène permet d'étudier le développement pathologique de la vasculature rétinienne. Il est à l'origine des nombreux progrès réalisés dans les thérapies dirigées contre les maladies oculaires caractérisées par des défauts vasculaires. Tandis que la vasculature de la rétine humaine se développe avant la naissance, celle de la souris apparaît après la naissance, ce qui offre un avantage unique sur la manipulation génétique et expérimentale. Le modèle de RIO développé par Smith et al est reproductible, quantifiable et reflète bien la séquence d'événements pathologiques observés dans les maladies néovasculaires oculaires humaines telles que la rétinopathie du prématuré (ROP), caractérisée par une phase tardive d'angiogenèse destructrice (Smith et al., 1994). La procédure consiste à exposer les souriceaux et leurs mères à 75 % d'O₂ du jour post-natal (P) 7 à P12 (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). Cette phase d'hyperoxie entraîne la perte des vaisseaux sanguins rétiniens dans la zone centrale qui résulte en une vaso-obliteration (avec un pic maximal observé à P9) et mime l'étape initiale de la ROP (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). Après 5 jours à 75% d'O₂, les souris sont retournées à l'air ambiant (21% d'O₂) (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). Lors du retour à l'air ambiant à P12, la surface vaso-oblitérée a engendré une ischémie et une hypoxie (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). Ceci mène à l'activation de la signalisation

d'HIF et la production subséquente de facteurs proangiogéniques tels que VEGF pour essayer de compenser l'apport en oxygène et en nutriments dans la rétine hypoxique. Dans la deuxième phase du modèle de RIO, une néovascularisation due à l'hypoxie se développe ainsi à partir de P14 et atteint son pic maximal à P17 (le dernier point habituel du modèle murin de RIO) (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). On assiste à une croissance excessive et incontrôlée de nouveaux vaisseaux pathologiques (aussi appelés touffes néovasculaires) qui au lieu d'aller revasculariser la rétine, sont mal orientés, désorganisés et vont vers le vitré qui est normalement avasculaire (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). Une augmentation des fuites vasculaires et une détérioration de la BHR sont également observées (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994). Chez la souris après P17, cette néovascularisation anormale amorce une régression graduelle spontanée et disparaît complètement à environ P25 (Liu Chi-Hsiu, 2017; Smith et al., 1994).

Pour regarder les vaisseaux sanguins dans le modèle de RIO, des montages à plat des rétines de souris marquées à l'isolectine sont réalisés. La vaso-oblitération et la néovascularisation peuvent ensuite être quantifiées en fonction de la surface de la rétine totale en utilisant une méthode de quantification semi-automatique (SWIFT_NV) installée sur Image J (Smith et al., 1994).

Le modèle murin de RIO a permis de réaliser certains des premiers travaux qui ont montré l'importance de VEGF dans la néovascularisation pathologique observée dans les rétinopathies prolifératives (Aiello, 1995; Pierce, 1995). Ceci a permis la mise en place des thérapies anti-VEGF, traitement effectif contre les maladies oculaires néovasculaires.

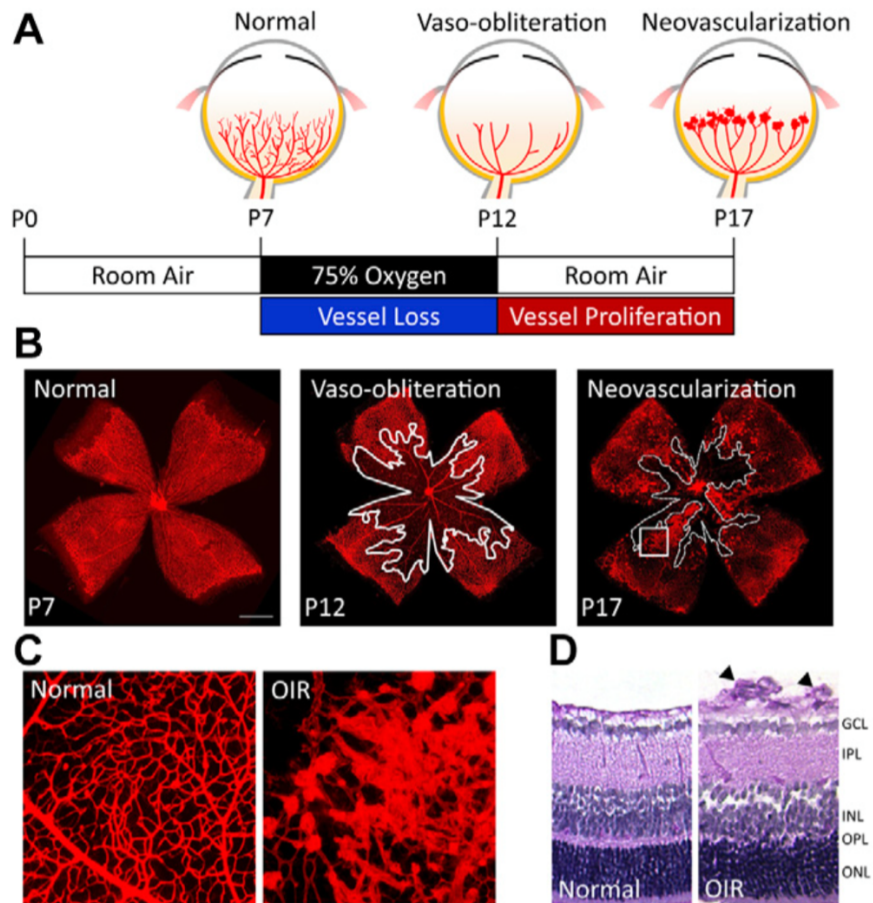


Figure 13. Modèle murin de la RIO. A) Illustration de la procédure de la RIO : les souriceaux et leur mère sont exposés à 75% d'O₂ du jour post-natal (P) 7 à P12 pour favoriser la dégénérescence microvasculaire. À P12, ils sont renvoyés à l'air ambiant (21% d'O₂) pour stimuler la prolifération vasculaire pathologique qui atteint son pic maximal à P17. B) Images représentatives de montages à plat de rétines avec un marquage à l'isolectine (pour regarder les vaisseaux sanguins) dans les rétines RIO à P12 et P17; et un système vasculaire rétinien normal à P7. C) Images agrandies de montages à plat de rétines marquées à l'isolectine montrant le système vasculaire rétinien normal des rétines normoxiques (à gauche) et les néovaisseaux anormaux des rétines RIO (à droite; image agrandie de la région rectangulaire de la boîte blanche dans le panneau B à P17). D) Coupes transversales de rétines de souris normoxiques (à gauche) et RIO (à droite) à P17. Les têtes de flèches indiquent les touffes vasculaires pathologiques provenant de la couche vasculaire superficielle de la rétine et pénétrant dans l'espace normalement avasculaire du vitré. (D'après l'article (Liu Chi-Hsiu, 2017))

SECTION 2 : SYSTÈME IMMUNITAIRE INNÉ ET VOIES **IMPLIQUÉES DANS LES RÉTINOPATHIES ISCHÉMIQUES** **PROLIFÉRATIVES**

1.2.1 IMMUNITÉ INNÉE DANS LES PATHOLOGIES DE LA RÉTINE

1.2.1.1 Le rôle des phagocytes mononucléaires : microglies et macrophages

Véritables cellules gardiennes de l'homéostasie de leur microenvironnement, les phagocytes mononucléaires de la rétine comprennent les microglies résidentes et les macrophages dérivés des monocytes en circulation (Marcus Karlstetter et al., 2015). L'activation des microglies et le recrutement des macrophages dérivés des monocytes sont une importante caractéristique commune aux maladies rétinienne abordées plus haut (Akhtar Schäfer, Wang, Krohne, Xu, & Langmann, 2018; Guillonnet et al., 2017; Marcus Karlstetter et al., 2015). Nous allons toutefois seulement aborder l'impact de ces cellules immunitaires sur les rétinopathies ischémiques prolifératives.

- Le rôle des phagocytes mononucléaires, microglies et macrophages, dans la rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique est une complication oculaire sérieuse et secondaire au diabète. Les premiers événements de la pathologie comprennent la perte de support des péricytes des capillaires sanguins suivie d'une augmentation de la perméabilité vasculaire (Cerani et al., 2013). Ces défauts dans la microvasculature rétinienne sont associés à l'altération de la barrière sang/rétine qui apporte son lot de complications telles que le dépôt d'exsudats dans la rétine, des hémorragies et l'œdème maculaire. L'insuffisance de perfusion sanguine dans la rétine peut entraîner le dysfonctionnement des photorécepteurs et l'hypoxie. Cette hypoxie dans les zones non perfusées de la rétine lance un signal de sécrétion de facteurs proangiogéniques tels que le VEGF pour parer à la situation. Il s'en suit une néovascularisation pathologique, phénomène marquant du

stade le plus sévère de rétinopathie diabétique proliférative pouvant mener à la perte de la vision. En plus des autres facteurs déjà mentionnés, des études, autant chez l'humain que dans les modèles d'animaux expérimentaux, ont montré que l'inflammation chronique joue un rôle clé dans la progression de la rétinopathie diabétique (Kaul, Hodgkinson, Tarr, Kohner, & Chibber, 2010; Rathnasamy, Foulds, Ling, & Kaur, 2019b; Tang & Kern, 2011). En effet des niveaux élevés de chimiokines RANTES et SDF-1 α (reconnues pour leur rôle dans la chimioattraction et l'activation des leucocytes tels que les monocytes) ont été détectés dans le sérum de patients avec la rétinopathie diabétique non proliférative (Meleth et al., 2005). De même, des échantillons d'humeur vitré collectés chez des patients souffrant de la rétinopathie diabétique ont révélé une plus grande concentration de cytokines proinflammatoires telles que GM-CSF, IFN- γ , IL-10, IP-10, RANTES, TNF-RII soluble et MIP-1 β comparée aux vitrés des patients contrôles (Vujosevic et al., 2016). De plus, d'autres études ont montré la présence de médiateurs proinflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-1 β dans les vitrés de patients diabétiques avec œdème maculaire et aussi dans des modèles murins de rétinopathie diabétique (Funatsu et al., 2002; Krady et al., 2005; Shimizu, Funatsu, Yamashita, Yamashita, & Hori, 2002). La production de cytokines proinflammatoires est une des caractéristiques clés de la réactivité des microglies associée aussi à une augmentation du recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages dérivés des monocytes sanguins.

Les travaux de Zeng et al se sont intéressés à l'étude de la réactivité des microglies dans les yeux d'humains souffrant de rétinopathie diabétique aux stades non prolifératif et prolifératif (H.-y. Zeng, Green, & Tso, 2008). En faisant des marquages d'immunohistochimie sur des sections paraffinées d'yeux *post-mortem*, ils ont trouvé que chez les yeux sains, les microglies (identifiées à l'aide des marqueurs HLA-DR «major histocompatibility complex class II antigen», CD68 et CD45) de forme ramifiée étaient étalées dans les couches internes de la rétine (H.-y. Zeng et al., 2008). Par contre, dans les yeux de patients avec la rétinopathie diabétique, les microglies étaient hypertrophiques, en plus grand nombre et se regroupaient au niveau des vaisseaux de la rétine, plus précisément aux sites de microaneurysmes, d'hémorragie, de veines dilatées

et de néovascularisation pathologique (H.-y. Zeng et al., 2008). Dans certaines sections où il y avait la présence d'œdème maculaire diabétique, les auteurs observaient une localisation des microglies au niveau de la rétine externe et dans l'espace sous-rétinien (H.-y. Zeng et al., 2008).

D'autres travaux, cette fois-ci chez des yeux de souris *Ins2^{Akita}* (qui développent spontanément un diabète de type 1) ont révélé la présence de microglies (visualisées par immunohistochimie pour la molécule IBA1 «ionized calcium-binding adaptor molecule», qui est exprimée par les microglies et les macrophages) ayant une fonction proinflammatoire à seulement 8 semaines d'hyperglycémie (stade pouvant être considéré comme précoce) (Barber et al., 2005). D'autres études additionnelles induisant à l'aide de composés chimiques (streptozotocine) le diabète de type 1 chez des rats ont montré la présence de microglies (identifiées aussi par un marquage IBA1) ainsi que de hauts niveaux de cytokines proinflammatoires TNF- α et IL-1 β dans les rétines de rats après 4 semaines d'injection de streptozotocine (Kradny et al., 2005). Des résultats similaires ont été observés par les auteurs Omri et al qui ont utilisé le modèle de rat de Goto Kakizaki, largement connu pour développer le diabète non-insulinodépendant (Goto, Kakizaki, & Masaki, 1976; Goto, Suzuki, Ono, Sasaki, & Toyota, 1988; Marcus Karlstetter et al., 2015). Dans leur article, ils ont montré un grand nombre de phagocytes mononucléaires (microglies/macrophages; ils ont été visualisés par immunohistochimie du marqueur spécifique IBA1) infiltrant la rétine externe et l'espace sous-rétinien entre les photorécepteurs et la couche de l'épithélium pigmentaire après 12 mois d'hyperglycémie (Omri et al., 2011).

Ensemble ces observations suggèrent l'importance des phagocytes mononucléaires (microglies/macrophages) dans l'initiation et la persistance de la rétinopathie diabétique (Xu & Chen, 2017).

- **Le rôle des phagocytes mononucléaires, microglies et macrophages, dans la rétinopathie induite par l'oxygène (RIO)**

Des travaux utilisant le modèle murin de RIO ont montré la présence d'une large proportion de microglies/macrophages (identifiées à l'aide du marqueur IBA1) dans les rétines en condition RIO (Vessey, Wilkinson-Berka, & Fletcher, 2011). De plus, une étude utilisant des souris reportrices CX3CR1-GFP (utilisé pour visualiser les cellules microgliales *in vivo* dans la rétine) a localisé de larges regroupements de microglies (ayant une fonction proinflammatoire) avec une forme amiboïde au niveau des touffes de néovascularisation pathologique au jour 17 de la condition RIO (pic de la néovascularisation pathologique) (L. Zhao, Ma, Fariss, & Wong, 2009). De plus, les auteurs Connor et al ont montré que ces microglies étaient une importante source de TNF- α . TNF- α est une cytokine proangiogénique inflammatoire cruciale dont la présence est associée au développement de la condition RIO (Connor et al., 2007). En effet, les auteurs Gardiner et al ont montré que l'inhibition de TNF- α permettait de réduire significativement la néovascularisation pathologique, de diminuer l'ischémie et d'améliorer la revascularisation normale de la rétine en condition RIO (Gardiner et al., 2005). Ces observations ont été consolidées toujours dans les travaux de Connor et al qui ont montré dans leur modèle RIO qu'une diète en acides gras oméga-3 polyinsaturés (dus à leur propriété antiangiogénique et leur inhibition de la synthèse de TNF- α) favorisait une angiogenèse physiologique et diminuait la néovascularisation pathologique (Connor et al., 2007; Sapieha et al., 2011). Le rôle d'IL-1 β , une autre cytokine proinflammatoire, a aussi été étudié dans le modèle RIO. En effet, dans le papier de Joyal et al, les auteurs montrent que la sécrétion d'IL-1 β dans la zone avasculaire ischémique rétinienne pourrait conduire à la dégénérescence microvasculaire dans la rétine en favorisant la production par les neurones de la molécule de guidage Sémaphorine-3A (Joyal et al., 2011). Les auteurs Rivera et al ont confirmé ces observations et montré qu'IL-1 β était produite par les microglies de la rétine (Rivera et al., 2013). Les microglies immunocompétentes sécrètent d'autres facteurs inflammatoires et proangiogéniques impliqués dans la néovascularisation pathologique tels qu'IL-17A (dont la sécrétion par les microglies est induite à travers leur activation du récepteur nucléaire ROR α) (Talia, Deliyanti, Agrotis, & Wilkinson-Berka, 2016) et FABP4 (fatty acid binding protein 4) (Saint-Geniez et al., 2014). De plus, une réduction

de ROS (reactive oxygen species), bénéfique pour la résolution de la rétinopathie induite à l'oxygène, a été observée chez des souris avec une inhibition de la NADPH oxydase au niveau des microglies (Wilkinson-Berka et al., 2014).

D'autres travaux ont aussi été réalisés pour montrer plutôt le pouvoir réparateur des phagocytes mononucléaires (microglies/macrophages) dans les rétinopathies ischémiques prolifératives en utilisant le modèle de RIO (Marchetti et al., 2011; Ritter et al., 2006). En effet les auteurs Ritter et al montrent que des cellules progénitrices myéloïdes issues de la moelle osseuse (et injectées dans le vitré) se différencient en cellules ressemblant aux microglies et facilitent la normalisation des niveaux d'expression d'HIF-1 α dépendante de la vasculature rétinienne dans la condition RIO (Ritter et al., 2006). Une autre étude publiée quelques années plus tard a montré l'implication de la polarisation des macrophages dans le recouvrement de la vasculature de la rétine en condition RIO (Marchetti et al., 2011). En effet, ils montrent qu'en injectant de façon intravitréale une sous-population de progéniteurs de cellules myéloïdes, ceux-ci se différencieront en macrophages qui vont adopter un phénotype ressemblant à M1 (pro-inflammatoire) ou M2 (anti-inflammatoire) (Fantin et al., 2010; Marchetti et al., 2011). Seule la fraction de macrophages ressemblant à M2 permettra de promouvoir la normalisation de la vasculature rétinienne et la réduction de la néovascularisation pathologique en condition RIO (Fantin et al., 2010; Marchetti et al., 2011).

1.2.2 VOIES DE SIGNALISATIONS AU NIVEAU DES PHAGOCYTES MONONUCLÉAIRES ET LEUR IMPACT DANS LES PATHOLOGIES DE LA RÉTINE

1.2.2.1 Les récepteurs de molécules de guidage : le rôle de Neuropiline-1 (NRP1)

Les Neuropilines sont des co-récepteurs à multiples facettes impliqués dans le développement, l'immunité et le cancer (**Figure 14**) (Dejda, Mawambo-Tagne, et al., 2014;

Prud'homme & Glinka, 2012; Seifi Alan, Shams, Bandehpour, Mirfakhraie, & Ghafouri Fard, 2018; Soker, Takashima, Miao, Neufeld, & Klagsbrun, 1998).

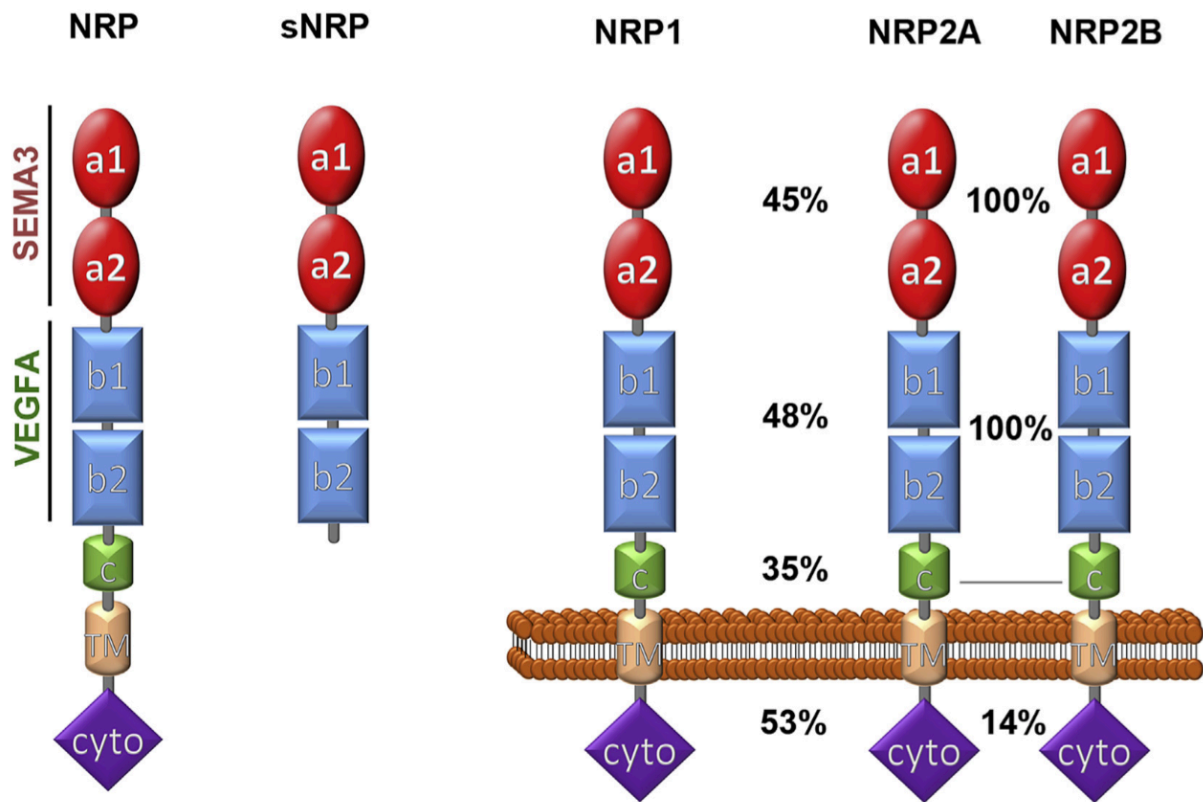


Figure 14. Structures de NRP1, NRP2 et de leurs isoformes. Les pourcentages représentent le pourcentage d'homologie entre les acides aminés des différentes isoformes de Neuropiline. Le récepteur Neuropiline comprend 7 domaines : 2 domaines appelés a1 et a2 qui ressemblent au domaine CUB présent dans le système du complément; 2 domaines b1 et b2 qui s'apparentent aux domaines du facteur de coagulation V/VIII; le domaine c, similaire au domaine MAM (meprin/ antigen 5/receptor tyrosine phosphatase μ); une partie transmembranaire (TM) et une portion cytoplasmique (cyt). (D'après l'article (C. Raimondi, Brash, Fantin, & Ruhrberg, 2016))

Neuropiline-1 est exprimée par plusieurs types cellulaires incluant les neurones, les cellules endothéliales et les cellules immunitaires (C. Raimondi et al., 2016). Un KO (Knockout) constitutif de NRP1 chez la souris est létal à l'état embryonnaire avec des défauts neuronaux et vasculaires (Soker et al., 1998; Tata et al., 2015; Tordjman et al., 2002; Vieira, Schwarz, & Ruhrberg, 2007). Structurellement parlant, NRP1 est composée d'une partie extracellulaire, un domaine transmembranaire et une courte partie intracellulaire cytoplasmique (**Figure 14**) (C. Raimondi et al., 2016). La partie extracellulaire est constituée de deux domaines a1 et a2, deux domaines b1 et b2 et d'un domaine c qui sépare les autres portions extracellulaires de la région transmembranaire. Le petit domaine cytoplasmique est catalytiquement inactif mais contient dans sa partie C-terminale un motif sérine-glutamine-alanine qui lui permet d'interagir avec des protéines intracellulaires contenant un domaine PDZ (**Figure 14**).

Neuropiline-2 est un paralogue de Neuropiline-1 et les pourcentages d'homologie entre les domaines a, b et c de NRP1 et NRP2 humains sont respectivement de 45%, 48% et 35% (**Figure 14**) (Pellet Many, Frankel, Jia, & Zachary, 2008; C. Raimondi et al., 2016). NRP2 a deux isoformes issues de l'épissage alternatif nommées NRP2A et NRP2B (**Figure 14**) (Pellet Many et al., 2008; C. Raimondi et al., 2016). Il existe aussi des formes solubles des Neuropilines qui comprennent les domaines a et b mais n'ont pas de parties transmembranaire et cytoplasmique (**Figure 14**) (Pellet Many et al., 2008; C. Raimondi et al., 2016). Elles peuvent se lier aux ligands des Neuropilines mais sont incapables d'activer les signalisations résultantes. Les Neuropilines solubles identifiées sont : s_{11} NRP1, s_{12} NRP1, s_9 NRP2, s_{III} NRP1 et s_{IV} NRP1 (C. Raimondi et al., 2016).

Les Neuropilines (NRP1 et NRP2) sont une famille de récepteurs transmembranaires initialement caractérisés pour leur rôle dans le guidage axonal embryonnaire à travers leur liaison aux Sémaphorines de classe 3 (SEMA3) (**Figure 14**). La famille des glycoprotéines secrétées SEMA3 comprend : SEMA3A, SEMA3B, SEMA3C, SEMA3D, SEMA3E, SEMA3F et SEMA3F. NRP1 a une affinité de liaison préférentielle pour SEMA3A et SEMA3C tandis que NRP2 se lie de façon prédominante aux SEMAs 3F, 3C, 3B, 3D et 3G. Elles peuvent aussi se lier aux membres de la famille VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) d'où leur rôle dans la vascularisation et l'angiogenèse; et d'autres molécules dont HGF (Hepatocyte Growth

Factor), TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), héparine, fibronectine et Sémaphorine 4A (Kumanogoh & Kikutani, 2013).

NRP1 dans les rétinopathies : La capacité du récepteur NRP1 à se lier à la molécule de guidage axonal SEMA3 et au facteur endothélial vasculaire VEGF l'a rendu intéressant dans le contexte des maladies rétiniennes. La signalisation de SEMA3 à travers les NRPs est impliquée dans de multiples processus : la migration neuronale, le guidage axonal le développement de dendrites et la modulation du développement vasculaire (C. Raimondi et al., 2016). Des études utilisant le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène ont montré que les cellules ganglionnaires exprimaient SEMA3A durant la première phase hyperoxique (75% d'oxygène) du modèle de RIO (Joyal et al., 2011). Cette source de SEMA3A était ensuite responsable dans la deuxième phase (retour à la condition normoxique -environ 21% d'oxygène- pour le développement de la néovascularisation pathologique) de la répulsion des nouveaux vaisseaux formés des zones sévèrement ischémiques de la rétine au profit du vitré (normalement avasculaire), et de la formation des touffes vasculaires pathologiques (Joyal et al., 2011). L'injection intravitréale d'une SEMA3A recombinante ou d'un lentivirus shSEMA3A a permis de réduire la néovascularisation pathologique dans le modèle de RIO (Joyal et al., 2011). D'autres travaux par Yu et al ont confirmé ces résultats et ont montré qu'en injectant une SEMA3A exogène dans le vitré, une inhibition de la formation de ces touffes pathologiques dans le modèle RIO est observée (Yu et al., 2013). Il a aussi été rapporté que la sécrétion de la cytokine inflammatoire IL-1 β par les microglies était responsable de l'induction de l'expression de SEMA3A par les cellules ganglionnaires (Rivera et al., 2013). De plus, la signalisation SEMA3A/NRPs a été associée à l'induction de l'hyperperméabilité vasculaire, néfaste dans la rétinopathie diabétique (Cerani et al., 2013). Alors que des niveaux faibles de SEMA3A sont rencontrés dans la rétine physiologique adulte, une augmentation de son expression a été observée dans le vitré des patients souffrant de rétinopathie proliférative diabétique. SEMA3A est ainsi une cible thérapeutique intéressante pour contrer l'hyperperméabilité vasculaire observée dans diverses maladies ischémiques oculaires (Cerani et al., 2013).

Les travaux étudiant la signalisation de VEGF (plus particulièrement l'isoforme VEGF165) à travers NRP1 (agissant comme corécepteur de VEGFR2) ont indiqué que NRP1 n'était pas essentielle à la voie VEGFR2/MAPK induite par VEGF165, mais augmenterait plutôt

le signal de cette voie (C. Raimondi et al., 2016). VEGF est connu pour son rôle dans la perméabilité vasculaire en plus de promouvoir la croissance vasculaire, d'où son usage comme première ligne de thérapie dans le traitement des maladies ischémiques prolifératives rétinienne. La contribution de NRP1 dans l'induction VEGF-dépendante de la perméabilité vasculaire dépend du contexte étudié. Dans une étude regardant l'effet de la délétion de NRP1 au niveau des cellules endothéliales, les auteurs ont montré que la voie SEMA3A/NRP1 favorisait la perméabilité vasculaire tout en supprimant l'angiogenèse induite par VEGF (Acevedo, Barillas, Weis, Gothert, & Cheresch, 2008). Toutefois, une autre étude a montré que des souris déficientes en NRP1 dans les cellules endothéliales avaient une perméabilité vasculaire normale VEGF-dépendante tout en ayant un défaut de perméabilité SEMA3A-dépendante (C. Raimondi et al., 2016).

1.2.2.2 La réponse cellulaire au stress hypoxique

1.2.2.2.1 La voie d'HIF

Mécanisme mis à l'honneur lors du récent prix Nobel de Médecine décerné aux travaux des illustres chercheurs William Kaelin Jr., Sir Peter Ratcliffe et Gregg Semenza, la voie cellulaire de la réponse au changement de niveau d'oxygène requiert l'activité du complexe protéique nommé HIF (Hypoxia-inducible factor) et découvert par Semenza (Semenza, 2000, 2001, 2012, 2017; Semenza & Wang, 1992).

Initialement identifié pour son rôle dans la production de l'érythropoïétine (Semenza & Wang, 1992), HIF est maintenant reconnu comme étant un modulateur clé de la réponse au stress hypoxique (Majmundar, Wong, & Simon, 2010). HIF est un hétérodimère constitué d'une sous-unité α sensible à l'oxygène et d'une sous-unité stable β ou ARNT (Eltzschig, Bratton, & Colgan, 2014a; Majmundar et al., 2010) (**Figure 15**). Chez les mammifères, on distingue trois isoformes d'HIF α : HIF1 α structurellement similaire à HIF2 α (ou EPAS1) et HIF3 α (ou IPAS), existant sous plusieurs formes épissées capables d'inhiber à la manière d'un dominant-négatif HIF1 α et HIF2 α . HIF1 α est exprimé de façon ubiquitaire tandis qu'HIF2 α et HIF3 α ne sont exprimés que dans certains types cellulaires dont les cellules endothéliales vasculaires, les

cellules rénales interstitielles, les pneumocytes de types II, les cellules du parenchyme hépatique et les cellules myéloïdes (Majmundar et al., 2010).

Comme son nom l'indique, l'activité d'HIF spécialement au niveau de sa sous-unité α , est régulée par la disponibilité en oxygène (Majmundar et al., 2010). Dans un environnement bien oxygéné, la sous-unité HIF α est hydroxylée au niveau de ses résidus conservés de proline par la prolylhydroxylase (PHD) dont l'activité est régulée par la présence en oxygène et certains métabolites intracellulaires incluant les ROS, le fumarate, le succinate, et potentiellement le 2-hydroxyglutarate (Majmundar et al., 2010). Ces motifs hydroxylés sont ensuite reconnus et marqués pour une destruction protéosomale par une ubiquitine ligase E3, le complexe von-Hippel-Lindau (pVHL) (Majmundar et al., 2010). Dans un milieu hypoxique, l'activité des PHDs est inhibée et la sous-unité HIF α est ainsi libre de transloquer au noyau pour former un hétérodimère avec la sous-unité stable β (ARNT) à travers leurs domaines PAS et HLH (Majmundar et al., 2010). L'hétérodimère formé reconnaît et lie les éléments de réponse à l'hypoxie (HREs) dans le génome pour induire la transcription de gènes aux propriétés adaptatives telles que le facteur de croissance vasculaire VEGF qui favorise l'angiogenèse (Majmundar et al., 2010).

HIF1 α dans les rétinopathies : Des évidences d'un rôle proangiogénique d'HIF1 α opposé au rôle antiangiogénique d'HIF2 α au niveau des phagocytes mononucléaires hypoxiques rendent le ciblage d'HIF1 α plus intéressant dans des stratégies antiangiogéniques pour des cas de néovascularisation pathologique (Eubank, Roda, Liu, O'Neil, & Marsh, 2011). L'étude en question publiée par Eubank et al montre qu'HIF1 α au niveau des phagocytes mononucléaires en hypoxie, a un comportement proangiogénique *via* la sécrétion de VEGF, tandis qu'HIF2 α a un effet antiangiogénique *via* l'induction du VEGFR1 soluble, inhibiteur endogène de l'angiogenèse (Eubank et al., 2011). Le rôle angiogénique d'HIF1 α a aussi été décrit dans plusieurs modèles de lésions tels que la cardiomyopathie hypertrophique, la cicatrisation de la peau, l'infarctus du myocarde et la néovascularisation rétinienne observée dans les rétinopathies ischémiques (Majmundar et al., 2010). Sur ce dernier point, des travaux de Hui-Zhuo et al ont montré qu'une administration intravitréale d'un siARN (nommé pSUPERH1-siHIF-1 α) diminuant l'expression de HIF1 α (et réduisant aussi les niveaux d'ARNmessenger de VEGF) résultait en une inhibition de la néovascularisation pathologique rétinienne dans le modèle murin

de rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) (Xu Hui-Zhuo, 2013). De plus, les auteurs Kim Y. et al ont récemment montré en utilisant des souris contenant un *Knock-in HIF1 α* avec un défaut de méthylation (résultant en une stabilisation d'HIF1 α) dans le même modèle RIO, que la stabilisation d'HIF1 α favorisait une augmentation de la croissance vasculaire anormale dans des conditions ischémiques (Kim et al., 2016). D'autres travaux ont utilisé le modèle animal de rétinopathie diabétique et ont montré que l'activation d'HIF1 α dans la rétine diabétique est importante pour les processus pathophysiologiques à travers l'induction des cytokines proinflammatoires IL-6 et TNF- α (Gao, Li, Wang, Li, & Ding, 2017). Les auteurs Gao et al ont également montré en utilisant le modèle murin de rétinopathie induite à l'oxygène, que la rétine ischémique avait des niveaux élevés d'HIF1 α qui corrélaient avec une augmentation d'expression de VEGF associée à l'angiogenèse pathologique (Ozaki et al., 1999).

Ces résultats soulèvent aussi la question concernant les types cellulaires dans lesquels HIF1 α pourrait exercer ses fonctions angiogéniques dans le cas des rétinopathies ischémiques prolifératives. Parmi les cellules rétiniennes capables de produire des facteurs angiogéniques, l'emphase a été mise sur les astrocytes et les cellules de Müller, comme le démontrent les travaux de Weidemann et al. Leur étude démontre que la réponse hypoxique médiée par HIF2 α dans les astrocytes est essentielle pour l'angiogenèse pathologique rétinienne (Mowat et al., 2010; Weidemann et al., 2010). De plus, les auteurs Lin M. et al utilisent des souris *HIF1 α KO* au niveau des cellules de Müller dans un modèle de rétinopathie diabétique et montrent une diminution de la néovascularisation pathologique rétinienne, de la perméabilité vasculaire et de l'inflammation (Lin et al., 2011). Plus récemment, l'implication de la signalisation d'HIF1 α au niveau cellules myéloïdes (macrophages/microglies de la rétine) sur la production de VEGF a émergé dans les rétinopathies, comme le montrent les travaux d'Ahn et al (Ahn et al., 2014; Ritter et al., 2006).

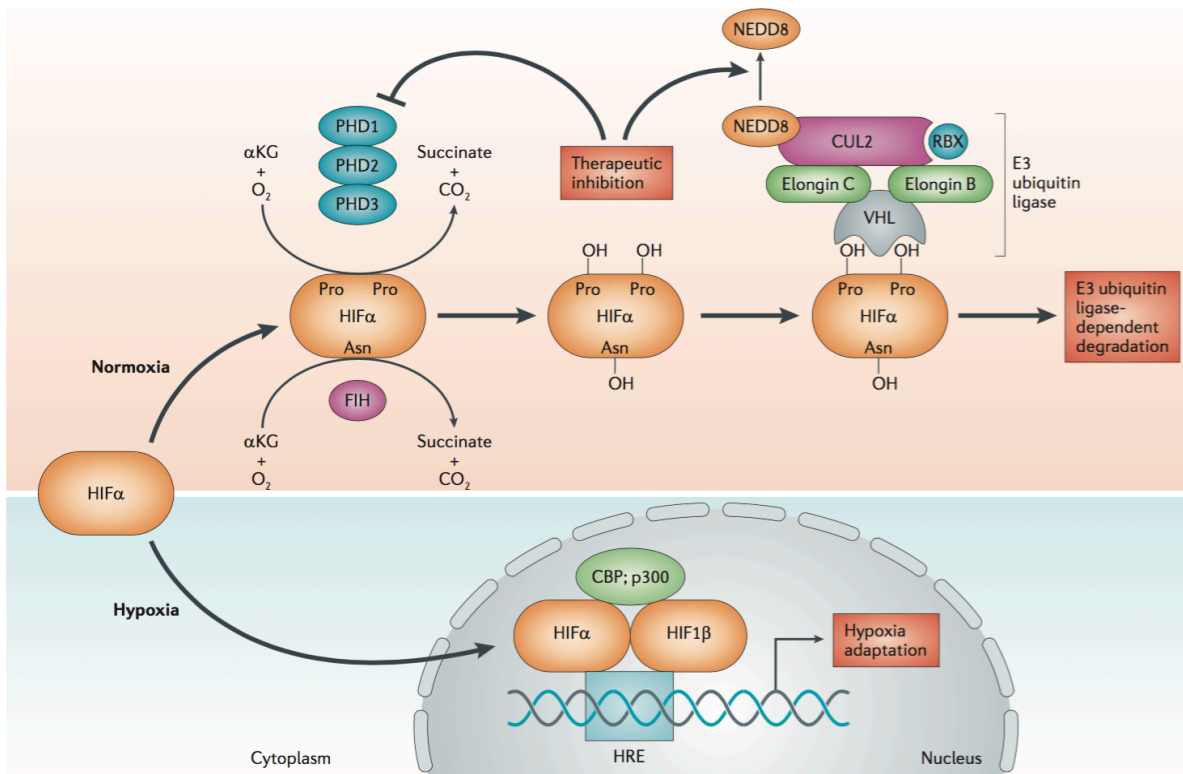


Figure 15. Mécanisme moléculaire de la signalisation d’HIF en fonction de la tension locale en oxygène. HIF: Hypoxia-inducible factor; α -KG: α -Kétoglutarate; PHD: prolyl hydroxylase; VHL: von Hippel-Lindau E3 ubiquitin ligase; NEDD8: ubiquitin-like protein; CUL2 : cullin 2; HRE: hypoxia-response element; CBP: CREB-binding protein. (D’après la revue scientifique (Eltzschig et al., 2014a))

1.2.2.2.2 La voie du stress au réticulum endoplasmique

En condition hypoxique, outre l’activation de la voie HIF, un autre mécanisme adaptatif est induit : la voie du stress dans le réticulum endoplasmique (RE) dont la principale fonction est de permettre le repliement des protéines transmembranaires ou sécrétées. Il existe trois types de senseurs détectant la présence de protéines mal repliées à l’intérieur du RE : les protéines PERK (protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 α (inositol-requiring protein-1 α) et ATF6 (activating transcription factor-6) (Peter Walter & David Ron, 2011). Ces

trois senseurs sont des protéines transmembranaires avec une partie luminaire qui interagit avec les protéines mal repliées et un domaine cytosolique qui transmet le signal de stress vers le noyau (Peter Walter & David Ron, 2011). Ces voies font partie de la réponse aux protéines mal repliées aussi connue sous le nom de *unfolded protein response* ou UPR (Voir **Figure 16**). Les protéines mal repliées interagissent avec la protéine HSPA5 (ou GRP78 ou BiP, normalement associée aux trois senseurs de l'UPR), causant sa libération des senseurs du stress dans le réticulum endoplasmique, l'activation de la voie UPR et la production de protéines chaperonnes (Peter Walter & David Ron, 2011).

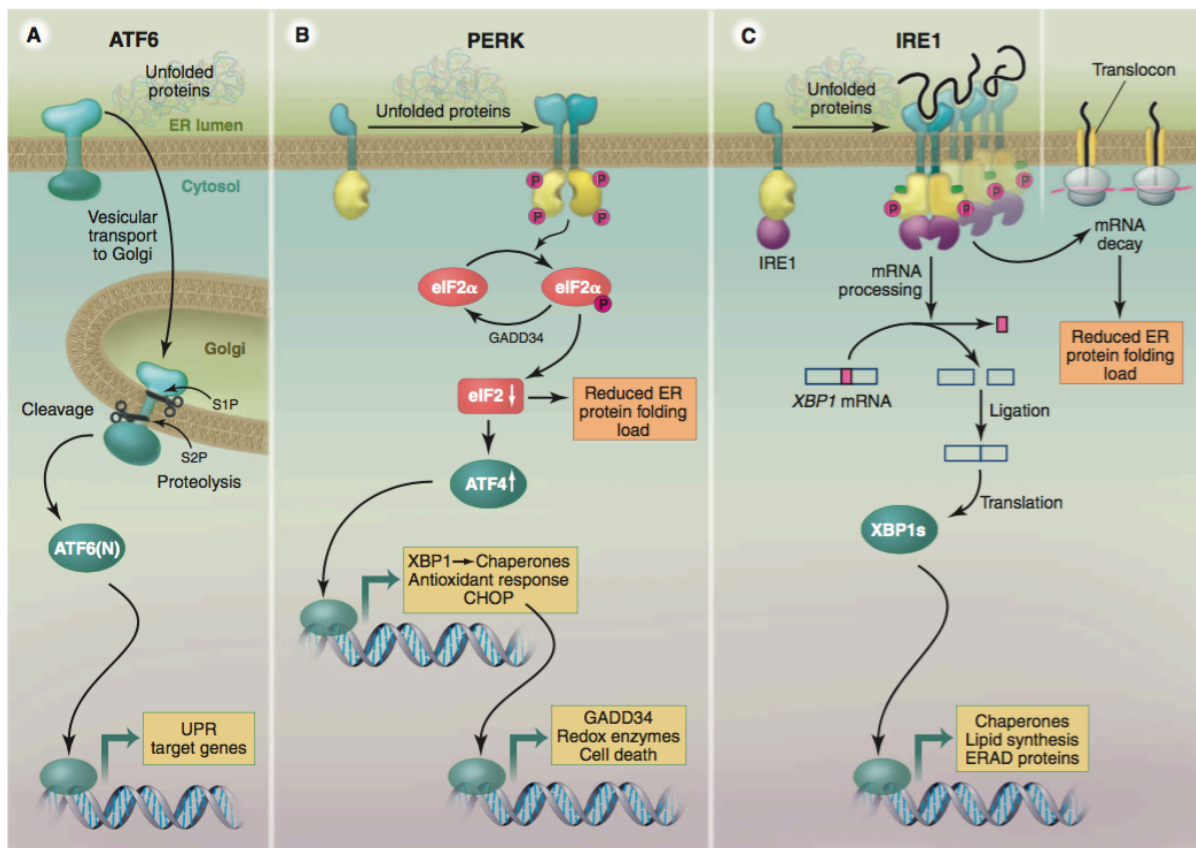


Figure 16. Les trois branches de l'UPR. L'accumulation de protéines mal repliées dans le RE peut induire les trois voies de l'UPR, soit les voies de PERK, IRE1 α et d'ATF6. (D'après l'article (P. Walter & D. Ron, 2011))

1.2.2.2.1 La voie de PERK

En réponse à l'accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du réticulum endoplasmique, la protéine kinase PERK oligomérisse, s'autophosphoryle et phosphoryle ses cibles en aval telles que le facteur ubiquitaire d'initiation de la traduction eIF2 α (P. Walter & D. Ron, 2011). Cela résulte à une diminution générale de la synthèse protéique. PERK contribue ainsi à la réduction du flux de protéines mal repliées entrant dans le réticulum endoplasmique pour soulager le stress dans cette organelle (P. Walter & D. Ron, 2011). Il est toutefois intéressant de noter que ce blocage de la traduction ne s'applique pas à toutes les protéines. En effet certains ARN messagers (qui ont des courts cadres de lecture ou « short open reading frames » dans leur 5') comme celui encodant pour le facteur de transcription ATF4, sont préférentiellement traduits (Lindholm, Korhonen, Eriksson, & Koks, 2017; P. Walter & D. Ron, 2011). L'induction d'ATF4 favorise l'augmentation d'expression d'importantes cibles telles que le facteur de transcription CHOP (transcription factor C/EBP homologous protein), la phosphatase GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34) et les membres de la famille de protéines pro-apoptotiques BCL-2 (Lindholm et al., 2017). CHOP contrôle la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose. Une bonne régulation de la branche de PERK de l'UPR est donc nécessaire car c'est une signalisation qui est protectrice pour la cellule à de petites doses d'activation tandis qu'à de forts degrés de stimulation, elle peut contribuer à la mort cellulaire (P. Walter & D. Ron, 2011). Ces deux faces de la voie de PERK sont régulées de façon dynamique et le destin de la cellule est dicté par le niveau de phosphorylation de eIF2 α et l'activité de ses phosphatases spécifiques (P. Walter & D. Ron, 2011). La protéine GADD34 aussi appelée PPP1R15A, est une phosphatase capable de contrer PERK en déphosphorylant eIF2 α (P. Walter & D. Ron, 2011). L'inhibition sélective de GADD34 permet de protéger la cellule contre le stress dans le réticulum endoplasmique en prolongeant des bas niveaux de phosphorylation d'eIF2 α (P. Walter & D. Ron, 2011).

1.2.2.2.2 La voie d'ATF6

ATF6 est un facteur de transcription initialement synthétisé comme une protéine transmembranaire résidente du réticulum endoplasmique et avec un large domaine dans sa lumière (P. Walter & D. Ron, 2011). Contrairement aux autres senseurs IRE1 α et PERK, lorsque

la voie de l'UPR est activée, la protéine ATF6 doit d'abord être transportée du réticulum endoplasmique au Golgi où elle est ensuite activée par une protéolyse intramembranaire médiée par les protéases S1P (site-1 protease) et S2P (site-2 protease) (Lindholm et al., 2017). Une fois activé, le fragment transcriptionnellement actif d'ATF6 transloque dans le noyau pour réguler l'expression de gènes encodant pour les chaperonnes du réticulum endoplasmique telles que BiP (ou GRP78 ou HSPA5), les composants du réticulum endoplasmique tels que la protéine disulfite isomérase, la chaperonne GRP94 (glucose-regulated protein 94) et même le facteur de transcription de la voie d'IRE1 α , XBP-1 (Lindholm et al., 2017; P. Walter & D. Ron, 2011).

1.2.2.2.3 La voie d'IRE1 α

La signalisation d'IRE1 α est la plus conservée au niveau évolutif. IRE1 est une protéine transmembranaire d'environ 110 kDa qui existe sous deux isoformes : IRE1 α qui est ubiquitaire et IRE1 β retrouvée exclusivement chez les cellules épithéliales gastriques (Bertolotti et al., 2001). Le domaine cytoplasmique d'IRE1 possède une activité sérine/thréonine kinase ainsi qu'une activité endoribonucléase C-terminale (Shamu et Walter, 1996; Papa et al., 2003). L'activation du domaine endoribonucléasique d'IRE1 α permet l'épissage d'une séquence de 26 nucléotides dans l'ARNm de XBP-1 (X-box binding protein 1) (Hetz, Martinon, Rodriguez, & Glimcher, 2011; Peter Walter & David Ron, 2011). L'épissage dans l'ARNm de XBP-1 permet la formation d'un facteur de transcription actif (Yoshida et al., 2001; Calfon et al., 2002). De plus, le facteur de transcription XBP-1 non-épissé possède la même séquence de localisation nucléaire, de liaison à l'ADN et de dimérisation que XBP-1 épissé et actif; sauf le domaine transactivateur nécessaire à la transcription. Ainsi, le XBP-1 non épissé peut inhiber l'activité transcriptionnelle du XBP-1 épissé (Yoshida et al., 2006). Une fois arrivé au noyau, le XBP-1 actif (c'est-à-dire épissé) reconnaît et se lie à des éléments de l'UPR sur l'ADN et permet la transcription des protéines chaperonnes et celles impliquées dans la dégradation de protéines (Lee, Iwakoshi, & Glimcher, 2003). Grâce à son activité endoribonucléase, IRE1 α est aussi associé à la dégradation rapide d'un groupe sélectif d'ARN messagers (Hollien & Weissman, 2006). Ce mécanisme est connu sous le nom de RIDD (IRE1 α -dependant decay of messenger RNAs) (Hollien & Weissman, 2006). IRE1 α favorise ainsi l'altération indépendante de ses

substrats basée sur leur localisation dans la membrane du RE et sur les acides aminés qu'ils encodent (Hollien & Weissman, 2006). Les substrats identifiés dont l'expression est atténuée par IRE1 α incluent les ARN messagers de l'insuline (Lipson, Ghosh, & Urano, 2008), CD59 (complément défense 59) (Oikawa, Tokuda, & Iwawaki, 2007), HMG-CoA réductase, β 2-microglobuline, le micro-ARN miR-17 (Lerner et al., 2012; Upton et al., 2012) et la nétrine-1 (Binet et al., 2013). Le RIDD est une réponse rapide qui vient compléter les autres mécanismes de l'UPR et permet de soulager le stress métabolique engendré par l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (Hollien & Weissman, 2006).

IRE1 α possède également une activité kinase (Han et al., 2009; Hetz et al., 2011; Jurczak et al., 2012). Lorsqu'il y a oligomérisation et autophosphorylation d'IRE1 α , la protéine adaptatrice TRAF2 s'attache au complexe. Cette liaison permet le recrutement et l'activation de JNK (Urano et al., 2000), une kinase connue pour induire l'expression de gènes inflammatoires *via* la phosphorylation du facteur de transcription AP-1.

1.2.2.2.4 Le stress dans le réticulum endoplasmique (RE) chronique et la voie de l'UPR : la phase apoptotique

Dans les conditions où le stress dans le RE persiste de façon chronique, le dysfonctionnement et la mort cellulaires s'en suivent (Sano & Reed, 2013). L'intégration des différentes branches la voie de l'UPR devient cruciale lorsque les cellules décident d'entrer en apoptose (P. Walter & D. Ron, 2011). Si les différentes signalisations de l'UPR ne parviennent pas à soulager le stress dans le réticulum endoplasmique, le processus d'apoptose est activé et implique : 1) l'activation du facteur de transcription pro-apoptotique CHOP médiée par la voie PERK/eIF2 α ; 2) l'activation médiée par IRE1 α de TRAF2 (tumor necrosis factor associated factor 2), qui stimule à son tour la cascade ASK1(apoptosis signal-regulating kinase 1)/JNK(c-jun amino terminal kinase); et 3) la libération de calcium Ca²⁺ du réticulum endoplasmique régulée par le complexe Bax/Bcl2 (Sano & Reed, 2013).

La voie du stress dans le réticulum endoplasmique dans les rétinopathies : Des travaux de recherche étudiant le rôle de la voie du stress dans le RE dans les rétinopathies ont montré son importance dans la progression de la pathologie. En effet des études ont montré l'activation de ses différents senseurs IRE1 α , PERK et ATF6 dans le modèle animal de RIO (L. Liu et al.,

2013); tout comme dans la rétine diabétique (J. Li, Wang, Yu, Wang, & Zhang, 2009). Similairement, les travaux de notre laboratoire ont démontré en utilisant le modèle murin de RIO, le rôle central d'IRE1 α dont l'activité endoribonucléase dégradait la molécule de guidage nétrine-1 (Binet et al., 2013). Ceci résultait en un échec de la revascularisation de la rétine ischémique (Binet et al., 2013). Nous avons également montré que la nétrine-1 favorisait un important mécanisme réparateur au niveau des macrophages/microglies pour permettre une régénération vasculaire réparatrice dans la rétine (Binet et al., 2013; Binet & Sapieha, 2015). IRE1 α serait ainsi un facteur clé dans la progression des rétinopathies ischémiques prolifératives.

SECTION 3 : HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

Objectif 1 : Déterminer le rôle des phagocytes mononucléaires exprimant NRP1 dans les rétinopathies ischémiques prolifératives

La rétinopathie diabétique est l'une des complications majeures du diabète et la cause principale de cécité chez la population active. Le développement de la maladie au niveau rétinien résulte en un processus à deux étapes : une phase de dégénérescence microvasculaire, suivie d'une deuxième phase destructrice de croissance vasculaire anormale et incontrôlée. Du point de vue clinique, la « meilleure » réponse a donc été de contrer la croissance vasculaire pathologique afin de stopper la destruction progressive de la rétine. Ce n'est malheureusement pas sans conséquence, puisque le processus pathologique fait intervenir des molécules qui sont également indispensables au bon fonctionnement de la cellule neuronale. Bloquer ces molécules (exemple : la thérapie anti-VEGF) revient donc à détruire progressivement la rétine à long terme. Envisager de nouvelles options pharmacologiques est donc une priorité afin de proposer des traitements présentant moins d'effets indésirables chez les patients diabétiques.

Plusieurs travaux ont été faits dans ce sens dont un ancien travail publié dans notre laboratoire qui montrait le rôle de Sémaphorine 3A (molécule de guidage axonal classique qui se lie à Neuropiline-1) dans la rétinopathie (Cerani et al., 2013; Joyal et al., 2011). Nous avons utilisé ici le modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (RIO), modèle proxy mimant la pathogenèse des rétinopathies ischémiques prolifératives. Notre étude a révélé que Sémaphorine 3A (ligand de Neuropiline-1) était exprimée dans la condition RIO. Nous avons aussi observé que les phagocytes mononucléaires exprimant Neuropiline-1 étaient associés aux touffes pathologiques que ce soit à P14 (lorsque la néovascularisation pathologique débute) ou à P17 (où elle atteint son pic) de la condition RIO.

Nous avons posé l'hypothèse selon laquelle Neuropiline-1 serait un récepteur obligatoire pour l'entrée et l'accumulation des phagocytes mononucléaires lors des rétinopathies prolifératives.

Nous nous sommes fixés comme objectifs :

- 1) Éclaircir la dynamique de chimioattraction des phagocytes mononucléaires dans le modèle RIO.
- 2) Déterminer le rôle de Neuropiline-1 au niveau de ces cellules dans la condition RIO.
- 3) Investiguer l'impact thérapeutique de nos découvertes en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques de Neuropiline-1 dans le modèle RIO représentatif des rétinopathies ischémiques prolifératives.

Objectif 2 : Déterminer le rôle des senseurs hypoxique et métabolique, HIF1 α et IRE1 α , au niveau des phagocytes mononucléaires dans les rétinopathies ischémiques prolifératives

Les cellules en état de stress hypoxique font face à un apport inadéquat en oxygène et en nutriments dû à des limitations d’approvisionnement par les vaisseaux sanguins. Elles induisent ainsi une série de réponses adaptatives telles que l’activation du facteur de transcription HIF1 α et de la voie du stress dans le réticulum endoplasmique pour restaurer leur homéostasie. De pareilles conditions où le réseau vasculaire est compromis (et le stress hypoxique s’en suit) sont retrouvées dans les rétinopathies ischémiques prolifératives, principales causes de la perte de vision chez la population pédiatrique et active des pays industrialisés. Les traitements actuels comportent des effets secondaires majeurs. Le développement d’une nouvelle approche thérapeutique pour les rétinopathies ischémiques est donc nécessaire afin de contrer les limitations observées.

Nous avons utilisé le modèle murin de rétinopathie induite par l’oxygène (RIO) pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la progression de la pathologie. Nos résultats préliminaires obtenus de l’analyse des données du séquençage d’ARN sur nos souris en condition RIO nous ont permis d’identifier les voies importantes telles que l’inflammation, l’angiogenèse et la réponse cellulaire à l’hypoxie, impliquées dans la progression de la rétinopathie. Les travaux du premier article inclus dans ce manuscrit ont rapporté la forte accumulation de macrophages/microglies dans le modèle RIO. L’intérêt de notre étude s’est donc porté sur la compréhension du mécanisme d’adaptation à l’oxygène des cellules myéloïdes *via* HIF1 α . Afin d’identifier les partenaires interagissant avec HIF1 α dans un milieu déficient en oxygène, nous avons réalisé une immunoprécipitation d’HIF1 α sur des lysats cellulaires de macrophages J774 cultivées en hypoxie suivie de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Nous avons ainsi pu déterminer pour la première fois l’association entre la voie d’HIF1 α et la voie d’IRE1 α (un des trois senseurs de la voie du stress dans le RE) dans le processus cellulaire d’adaptation à l’oxygène.

Nous suggérons ainsi l'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation d'IRE1 α et HIF1 α au niveau des cellules myéloïdes interagiraient ensemble et participeraient à la progression des rétinopathies ischémiques prolifératives.

Pour tester notre hypothèse, nous nous sommes fixés les objectifs suivants :

- 1) Évaluer le rôle d'IRE1 α et HIF1 α au niveau des cellules myéloïdes dans le modèle RIO en utilisant des souris contrôles LysM-cre et des souris LysM-Cre IRE1 $\alpha^{fl/fl}$ ou LysM-Cre HIF1 $\alpha^{fl/fl}$ (où l'expression d'IRE1 α ou HIF1 α est abolie chez les cellules d'origine myéloïde) et en mesurant les aires avasculaires et néovasculaires pathologiques quantifiées à l'aide du logiciel Image J au niveau des vaisseaux sanguins rétiniens marqués à la lectine.
- 2) Élucider les mécanismes convergents et les cibles en amont des voies IRE1 α et HIF1 α au niveau des cellules myéloïdes dans les rétinopathies ischémiques prolifératives.

CHAPITRE 2 : ARTICLE 1

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 1

La communication bidirectionnelle entre les neurones et les cellules immunitaires participe de manière importante au fonctionnement adéquat du système nerveux central. Dans un contexte physiologique, cette activité immunologique est principalement assurée par la réponse immunitaire innée. Cependant, elle pourrait aussi être impliquée dans le développement de plusieurs maladies neurologiques telles que la rétinopathie diabétique, la sclérose en plaques et la maladie d'Alzheimer. Les mécanismes moléculaires mis en place depuis le recrutement des cellules immunitaires aux sites d'infection jusqu'au développement de la maladie, restent encore à découvrir. Dans cette étude nous avons identifié une population de phagocytes mononucléaires (PMs) répondant aux signaux de chimioattractants conservés entre les neurones centraux, les vaisseaux sanguins et les cellules immunitaires. Des niveaux élevés de la molécule de guidage Sémaphorine 3A, agissant à titre de chimioattractant potentiel des phagocytes mononucléaires exprimant Neuropiline-1 (NRP1), ont été observés chez des patients souffrant de rétinopathie diabétique proliférative (RDP) à un stage avancé. Cette population de cellules immunitaires est sélectivement recrutée aux sites de néovascularisation pathologique en réponse aux signaux chimiotaxiques produits localement par la Sémaphorine3A ainsi que le VEGF, et participe à la progression de la pathologie. En utilisant un knockout conditionnel de Neuropiline-1 dans les cellules immunitaires de la lignée myéloïde, nous montrons que les phagocytes mononucléaires déficients en Neuropiline-1 n'arrivent pas à s'introduire dans la rétine dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (RIO) représentatif de la RDP. Ceci résulte en une baisse de la dégénérescence microvasculaire et une diminution significative de la néovascularisation pathologique. Les mêmes effets bénéfiques ont été observés lorsqu'on a administré de manière intravitréale une trappe dérivée de Neuropiline-1, inhibant son activité. Les résultats de cette étude soulèvent ainsi l'importance de la Neuropiline-1 comme un récepteur impliqué dans la chimiotaxie des phagocytes mononucléaires et leur accumulation dans les maladies néovasculaires rétinienne.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

J'ai contribué de façon équitable avec Dre Agnieszka Dejda à l'élaboration de l'étude.

Les travaux de l'article ont été distribués comme suit :

- J'ai participé à l'optimisation du protocole de cytométrie en flux sur les rétines. Ce qui m'a permis d'apporter une contribution substantielle pour la réalisation des figures 1, 2, 7 et 11 où j'ai effectué les expériences de cytométrie en flux (FACS) et l'analyse des résultats. J'ai participé ensuite à la préparation et la réalisation des expériences de qPCR ainsi que l'analyse des données pour la figure 6. Les essais de migration et la prise des photos de la figure 8 complètent la liste de mes contributions sur le plan pratique.
- Agustin Cerani a réalisé les ELISA et Western blot de la figure 5 avec l'aide de Cathérine Menard.
- Dr Khalil Miloudi a réalisé les injections intravitréales de la trappe soluble de NRP1 dans nos souris.
- Dre Malika Oubaha et Dr Khalil Miloudi ont réalisé les expériences de microscopies de la figure 2.
- Dr Boulet et Jean-François Daudelin ont apporté leur soutien conceptuel et technique pour les expériences de FACS.
- Félix Beaudoin et Naoufal Akla ont aidé à la réalisation des essais de migration de la figure 8.
- Sullivan Henriques a procuré les échantillons des parties de la rétine de la figure 6 obtenus par microdissection au laser.
- Dr Zhuo Shao a réalisé les expériences d'explants de choroïdes de la figure 9.
- Dr Flavio Rezende a fourni les images d'angiographies, de fonds d'œil, d'OCT et d'images 3D des patients sélectionnés pour l'étude dans la figure 5.
- Dr Andreas Stahl, Dr Jean-Sébastien Delisle et Dre Nathalie Labrecque ont apporté leurs expertises respectives dans la conception et la correction du papier.

- L'écriture et la correction du papier ont été réalisées par Dr Przemyslaw Sapieha, Dre Agnieszka Dejda et moi-même.

TEXTE ORIGINAL DE L'ARTICLE 1

Title: Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk

Authors: Agnieszka Dejda^{1,2,*}, **Gaelle Mawambo**^{1,*}, Agustin Cerani¹, Khalil Miloudi³, Zhuo Shao¹, Jean-Francois Daudelin⁴, Salix Boulet⁴, Malika Oubaha³, Felix Beaudoin¹, Naoufal Akla², Sullivan Henriques², Catherine Menard¹, Andreas Stahl⁵, Jean-Sébastien Delisle⁴, Flavio A. Rezende², Nathalie Labrecque⁴, Przemyslaw Sapieha^{1,2,3,**}

Affiliations: Departments of Biochemistry and Molecular Medicine¹, Ophthalmology² and Medicine Microbiology, Infectiology and Immunology⁴, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada;

³Department of Neurology-Neurosurgery, McGill University, Montreal, Quebec, H3A 2B4 Canada.

⁵University Eye Hospital Freiburg, Killianstr. 5, Freiburg 79106, Germany.

*Dejda Agnieszka and Gaelle Mawambo contributed equally to this work

**Correspondence: Przemyslaw (Mike) Sapieha, Ph.D.

Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre

5415 Assomption Boulevard, Montreal,

Qc, H1T 2M4, Canada

TEL: (514) 252-3400 ext. 7711. FAX: (514) 252-3430.

E-mail: mike.sapieha@umontreal.ca

Key words: Neuropilin-1, microglia, mononuclear phagocytes, retina, diabetic retinopathy angiogenesis, inflammation, neuroinflammation.

Running title: Myeloid-resident NRP-1 Partakes in Retinopathy

One Sentence Summary: Neuropilin-1 is critical for local chemotaxis of pro-angiogenic mononuclear phagocytes in the CNS.

Article publié en 2014 dans la revue scientifique *The Journal of Clinical Investigation* :

Dejda, A., **Mawambo, G.**, Cerani, A., Miloudi, K., Shao, Z., Daudelin, J. F., . . . Sapiéha, P. (2014). Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk. *Journal of Clinical Investigation*, 124(11), 4807-4822. doi:10.1172/Jci76492

ABSTRACT

Immunological activity in the CNS is largely dependent on an innate immune response and is present in health and heightened in diseases such as diabetic retinopathy, multiple sclerosis, amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease. The molecular dynamics governing immune cell recruitment to sites of injury and disease in the CNS during sterile inflammation remain ill-defined. Here, we identify a subset of mononuclear phagocytes (MPs) that responds to local chemotactic cues that are conserved between central neurons, vessels and immune cells. We provide evidence that patients suffering from late stage proliferative diabetic retinopathy (PDR) produce elevated levels of Semaphorin 3A (SEMA3A) which counterintuitively acts as a potent attractant for Neuropilin-1 (NRP-1)-positive MPs. These pro-angiogenic MPs are selectively recruited to sites of pathological neovascularization in response to locally produced SEMA3A as well as VEGF. NRP-1-positive MPs play a critical role in disease progression as NRP-1-deficient MPs (LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl}) fail to enter the retina in a model of oxygen-induced retinopathy (OIR) that serves as a proxy for PDR. This leads to decreased vascular degeneration and diminished pathological pre-retinal neovascularization. Intravitreal administration of a NRP-1-derived trap effectively mimics the therapeutic benefits observed in LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl} mice. Our findings identify NRP-1 as an obligate receptor for MP chemotaxis and accretion in neovascular retinal disease.

INTRODUCTION

The CNS had long been considered an immune-privileged system, yet it is now clear that the brain, retina and spinal cord are subjected to complex immune-surveillance(1, 2). This is evident in the retina where an intensified, largely microglial/macrophage-based immune response is associated with the progression of several sight threatening diseases such as diabetic retinopathy (DR)(3-5), age related macular degeneration (AMD)(6-8) and retinopathy of prematurity (ROP)(9, 10). Together, these retinal diseases account for the principal causes of loss of sight in industrialized countries(6, 11, 12).

A common etiology for blinding vasoproliferative retinopathies such as DR and ROP is the

initial degeneration of retinal microvasculature, followed by ischemic stress on the neuroretina. This triggers a second phase of deregulated and destructive angiogenesis(13). Given this sequence of events and prominent clinical features, the currently most widely used local ocular therapeutic interventions directly target pathological neovascularization yet present a number of non-desirable off-target effects. For example, front-line treatments such as laser photocoagulation, which ablate ischemic retinal tissue with the aim of reducing production of angiogenic factors, compromise visual field and provoke scotomas. Moreover, given the neurosupportive properties of VEGF, a growing number of neurological and developmental side-effects are being attributed to long term intravitreal anti-VEGFs regimens(4, 11, 14-16). Overcoming these therapeutic limitations or exploring novel pharmacological avenues is therefore required to ameliorate the safety profiles of current interventions. In this regard, there is increasing evidence for the breakdown of the neurovascular unit in proliferative retinopathies(4, 17, 18). In particular, retinal ganglion cells (RGCs) and neurons of the inner nuclear layer that are in intimate contact with degenerating vasculature in DR and ROP (**Supplemental Figure 1**) are subjected to various forms of cellular stress including ER-stress(19), oxidative stress(13), inflammatory stress(18-21) and increased microglial activity(22-25). Whether stressed or damaged central retinal neurons themselves have the propensity to modulate the immune response to reestablish local homeostasis, clear debris(2) or segregate irreparably damaged tissue(17) is unknown and could provide therapeutic insight for designing targeted inhibitors of sterile neuroinflammation.

While a role for mononuclear phagocytes (MPs) such as microglia/macrophages has been established in proliferative retinopathies(22-25), the local tissue specific molecular cues and mechanisms of chemo-attraction by which these cells are called to partake in or respond to neuroretinal injury remain largely ill-defined. We therefore addressed this question with the widely used mouse model of oxygen induced retinopathy (OIR) that mimics the destructive vasoproliferative phase of ocular neovascular diseases such as diabetic retinopathy(26). A candidate receptor that could bridge neuronal stress to an immune response is NRP-1. This single-pass transmembrane receptor with a large 860 amino acid extracellular domain has the unconventional ability to bind at least two structurally unrelated ligands (VEGF₁₆₅ and SEMA3A) via distinct sites(27-29). While predominantly recognized for its roles in neuronal or

vascular guidance and as a co-receptor for VEGF₁₆₅(30), it has also been described on microglia during vascular anastomosis(31) and recently in tumor-associated macrophages with angiogenic properties(32,33). Importantly, the physiological role of myeloid-resident NRP-1 remains unclear, particularly in the context of the CNS. We therefore sought to determine the function of myeloid-resident NRP-1 in the pathogenesis of proliferative retinopathies.

Here we demonstrate that via production of SEMA3A and VEGF, the ischemic neural retina has the inherent capacity to modulate the innate immune response by summoning MPs to sites of vascular injury. We provide evidence in both human and animal studies for the critical role of myeloid-resident NRP-1 in the chemotaxis and accretion of destructive MPs in proliferative retinopathies.

RESULTS

NRP-1 identifies a population of MPs that are mobilized secondary to vascular injury.

To determine whether MPs such as microglia or macrophages partake in the vascular pathogenesis associated with proliferative retinopathies, we first carried-out FACS analysis on whole mouse retinas to elucidate the kinetics of macrophage/microglial accumulation throughout the evolution of OIR (**Figure 1A**) (75% oxygen from P7–P12 [postnatal day 7–12] to induce vaso-obliteration and room air until P17 to attain maximal pre-retinal neovascularization) (26,33) (**Figure 1, B, E, H**). Our data revealed significantly higher numbers of retinal macrophage/microglial cells (Gr-1⁻, F4/80⁺, CD11b⁺, cells) (**Gating scheme in Supplemental Figure 2**) in OIR at all time points analysed including a 36% increase during the vaso-obliterative phase at P10 (P=0.0004) (**Figure 1C**), a 63% rise during the neovascular phase at P14 (P<0.0001) (**Figure 1F**) and a 172% surge during maximal neovascularization at P17 (P=0.0006) (**Figure 1I**). These findings agree with the prevailing notion of microglial involvement in retinal neovascularization(22, 23, 32).

Importantly, at each time point investigated, we observed a proportional increase in NRP-1⁺ MPs in OIR with a rise of 37% at P10 (P=0.0240) (**Figure 1D**), 61% at P14 (P=0.0196) (**Figure 1G**) and 155% at P17 (P=0.0058) (**Figure 1J**) suggesting that this subpopulation of NRP-1-positive MPs was being recruited to the neuroretina during the progression of the disease. For

all OIR experiments, weights of mouse pups were recorded (**Supplement Figure 3**) to ascertain adequate metabolic health(33).

In order to establish the role of MP-resident NRP-1 in retinopathy, we generated a myeloid specific knockout of *Nrp-1* by intercrossing *Nrp1* floxed mice with LysM-Cre mice(34) yielding LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} progeny. The resulting mice showed an approximately 80% decrease in NRP-1 expression in retinal MPs when compared with that in LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} littermate controls (P = 0.0004) (**Figure 1, K and L**). Of note, mice tested negative for the *rd8* mutation of the *Crb1* gene(35). LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice did not show any difference in body weight, size, or open-field activity when compared with littermates throughout the period of experimentation (from P1-P17) (data not shown) and had similar numbers of resident retinal microglia (**Supplement Figure 4**). Remarkably, deletion of NRP-1 on myeloid cells fully abrogated the entry of macrophages/microglia at P10 and P14 OIR (**Figure 1, M-P**) revealing the critical role for this receptor in MP chemotaxis during the early stages of ischemic retinal injury. At P17, following maximal pathological neovascularization, MP infiltration occurs largely independent of NRP-1 (**Figure 1, Q-S**). Consistent with a potential microglial identity, the NRP-1-expressing Gr1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ cells identified above expressed high levels of CX3CR1 and intermediate/low levels of CD45 (**Figure 2A**). As expected, in LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} retinas, CX3CR1^{hi}/CD45^{lo} MPs are devoid of NRP-1- (**Figure 2 B**).

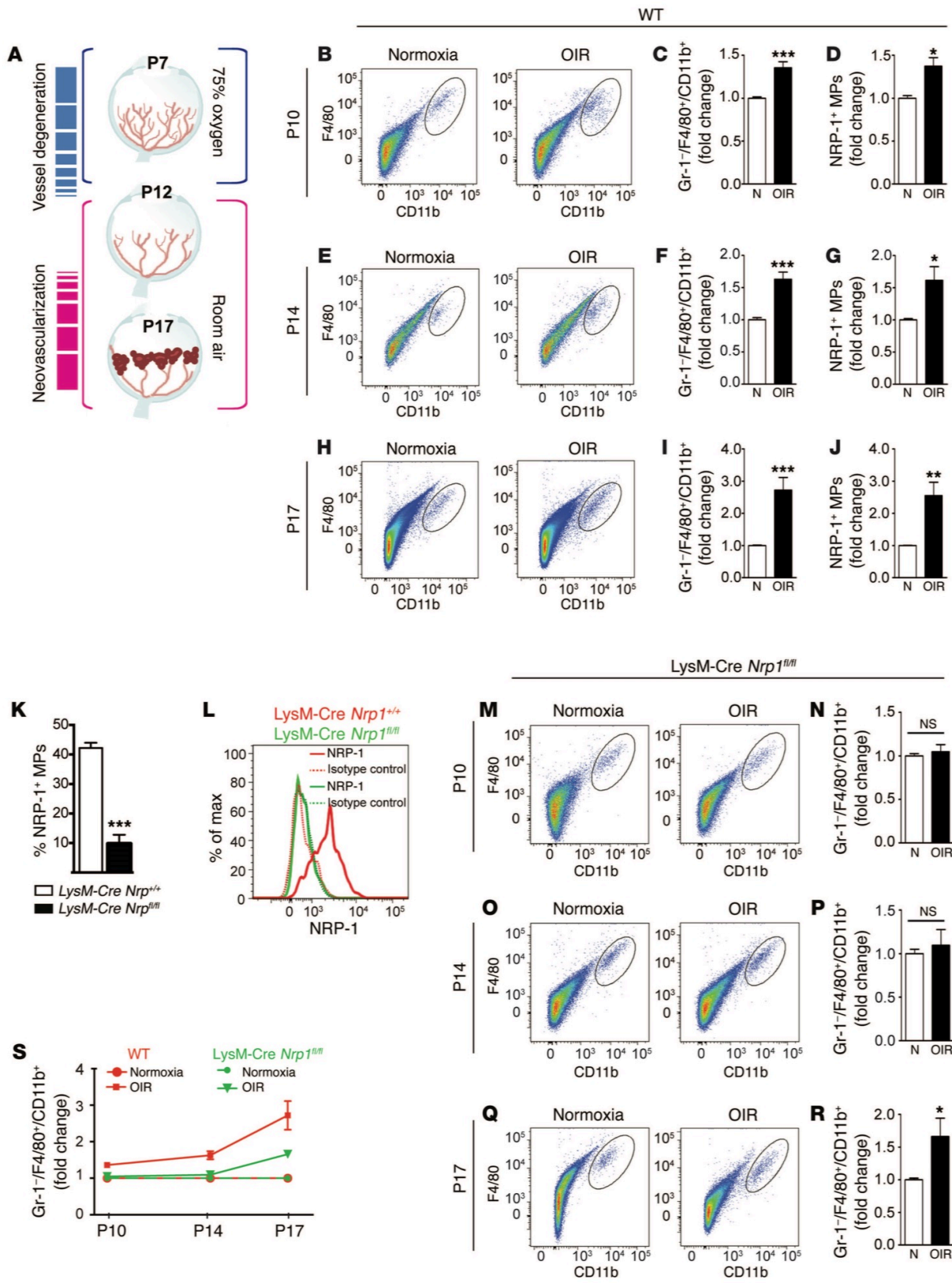


Figure 1. NRP-1 identifies a population of MPs that are mobilized secondary to vascular injury. (A) Schematic depiction of the mouse model of OIR. Representative FACS plots of Gr-1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ cells (microglia) in retinas collected at (B) P10, (E) P14, and (H) P17 from WT OIR and normoxic (N) control mice. (C, F, and I) The number of retinal microglia was significantly increased in OIR at all points analyzed; n = 7–8 (normoxic and OIR) (total of 28–32 retinas per condition; each “n” comprises 4 retinas). (D, G, and J) A proportional increase in the number of NRP-1⁺ microglia was observed in OIR retinas; n = 3–5 (normoxic and OIR) (total of 12–20 retinas per condition; each “n” comprises 4 retinas). (K and L) To investigate the role of MP-resident NRP-1, we generated LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice, which have significantly compromised Nrp1 expression in retinal microglia; n = 3 (WT), n = 4 (LysM-Cre Nrp1^{fl/fl}) (total of 12–16 retinas per condition). (M and O) FACS analysis at P10 and P14 during the proliferative phase of OIR reveals that MP-resident NRP-1 is essential for MP infiltration into the ischemic retina, (N and P) as LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice did not show an increase in numbers of Gr-1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ cells in OIR at these time points. (Q and R) At P17, MPs infiltrate independent of NRP-1; n = 7–8 (normoxic), n = 7–9 (OIR) (total of 28–36 retinas per condition; each “n” comprises 4 retinas). (S) MP accumulation in the retinas over the course of OIR in WT and LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice. Data is expressed as fold change relative to control ± SEM. *P < 0.05, **P < 0.001, ***P < 0.0001.

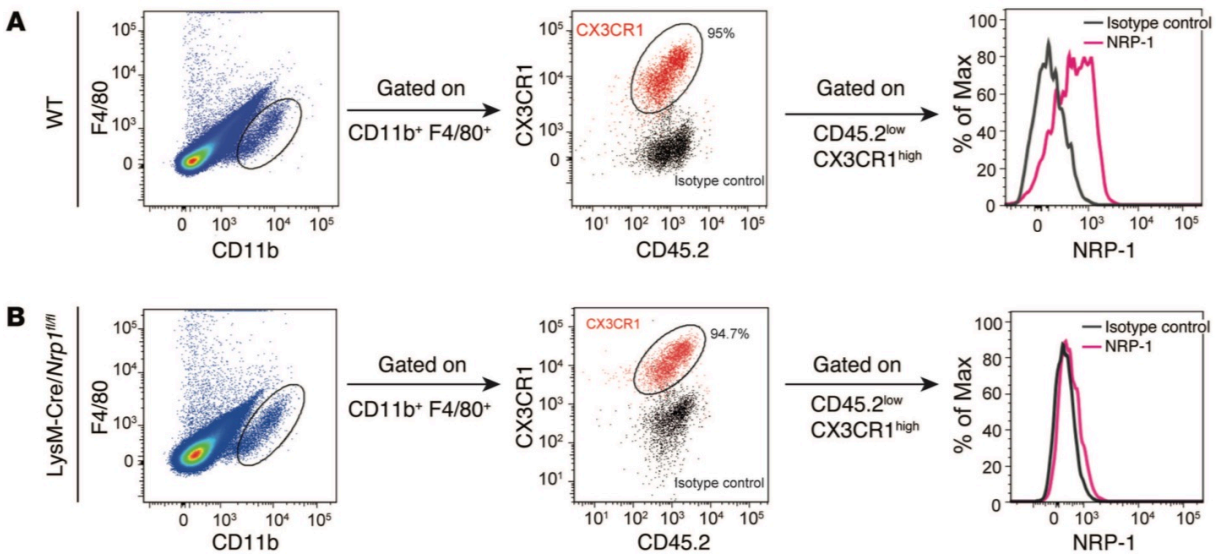


Figure 2. Retinal NRP-1⁺ MPs express microglial markers. Representative FACS plots from P14 OIR retinas depicting that **(A)** 95% (in WT) and **(B)** 94.7% (in LysM-Cre Nrp1^{fl/fl}) of Gr-1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ cells express high levels of CX3CR1 and intermediate/low levels of CD45 consistent with a microglial phenotype. CX3CR1^{hi} and CD45^{lo} cells **(A)** express NRP-1 in WT retinas and **(B)** do not express NRP-1 in retinas from LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice.

NRP-1⁺ myeloid cells localize to sites of pathological neovascularization in the retina.

Given the pronounced influx of NRP-1⁺ macrophage/microglia during OIR, we next sought to determine where these cells localize during the progression of disease. Immunofluorescence on retinal flatmounts revealed that NRP-1⁺ macrophage/microglia (colabeled with IBA1 and NRP-1) were intimately associated with nascent pathological tufts at P14 of OIR (**Figure 3, A-C**) as well as mature tufts at P17 of OIR (**Figure 4, A-C**). White arrows in **Figure 3B** and **Figure 4B** point to NRP-1⁺ MPs associated with preretinal tufts. NRP-1 was also expressed by endothelial cell on the endothelium of neovascular tufts as previously reported(21). Consistent with data presented in Figure 1, LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice had lower numbers of macrophage/microglia and less pronounced neovascularization (see below for full quantification) (**Figure 3, D-F**, and **Figure 4, D-F**).

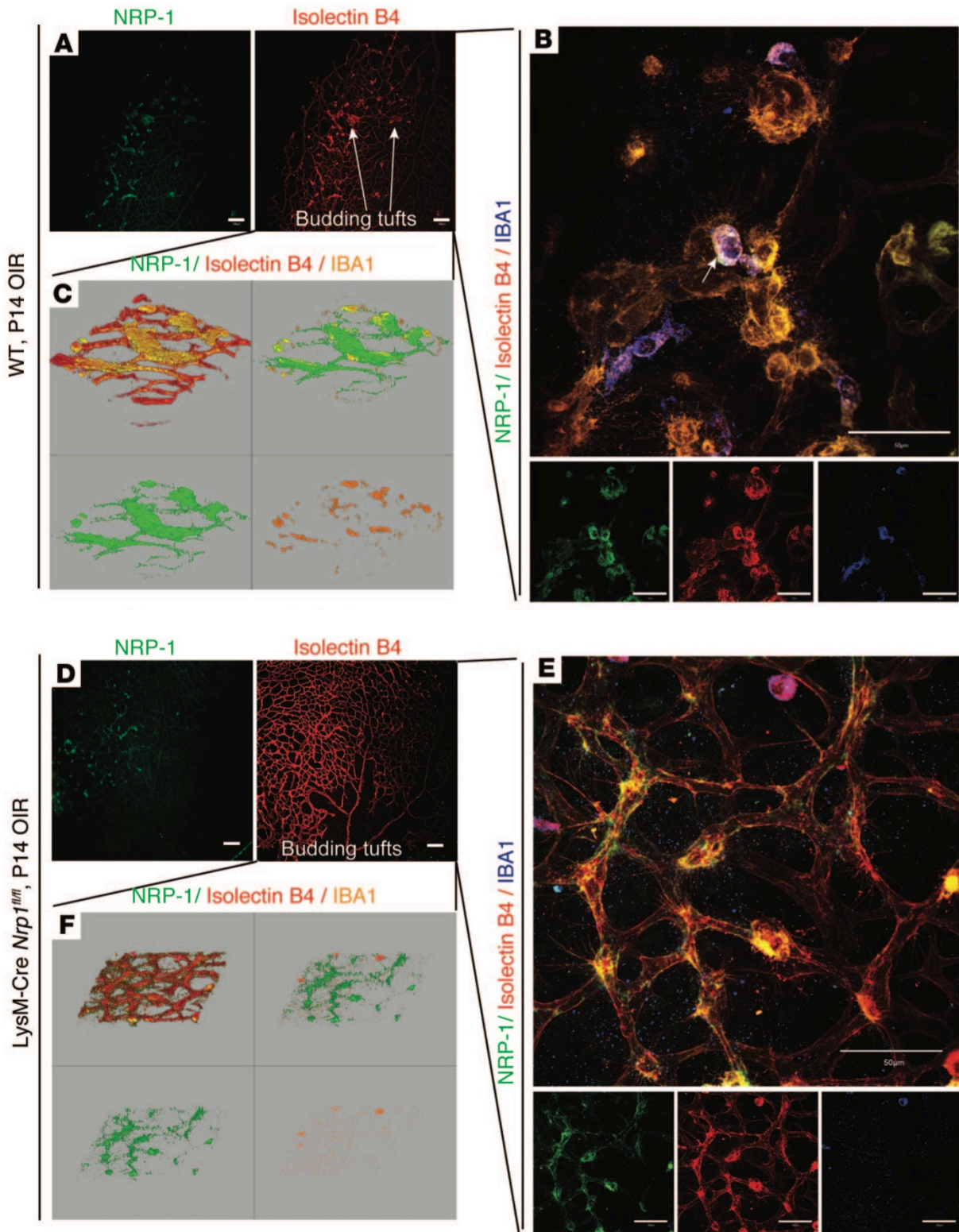


Figure 3. NRP-1⁺ myeloid cells localize to sites of pathological neovascularization in the retina. Confocal images of isolectin B4- (vessel and microglia stain) and NRP-1-stained retinal flat mounts at P14 with budding neovascular tufts in **(A)** WT and **(D)** LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice. **(B)** High-magnification images reveal colocalization of NRP-1⁺ microglia (IBA1) with nascent tufts. **(D–F)** LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice had fewer MPs and fewer developed tufts. **(C and F)** Observations were confirmed by 3D reconstruction. White arrows in **A** point to nascent sprouting tufts. The white arrow in **B** points to NRP-1⁺ MPs associated with growing tufts. For all immunohistochemistry images, representative images of 3 independent experiments are shown. Scale bars: 100 μm (**A** and **D**); 50 μm (**B** and **E**).

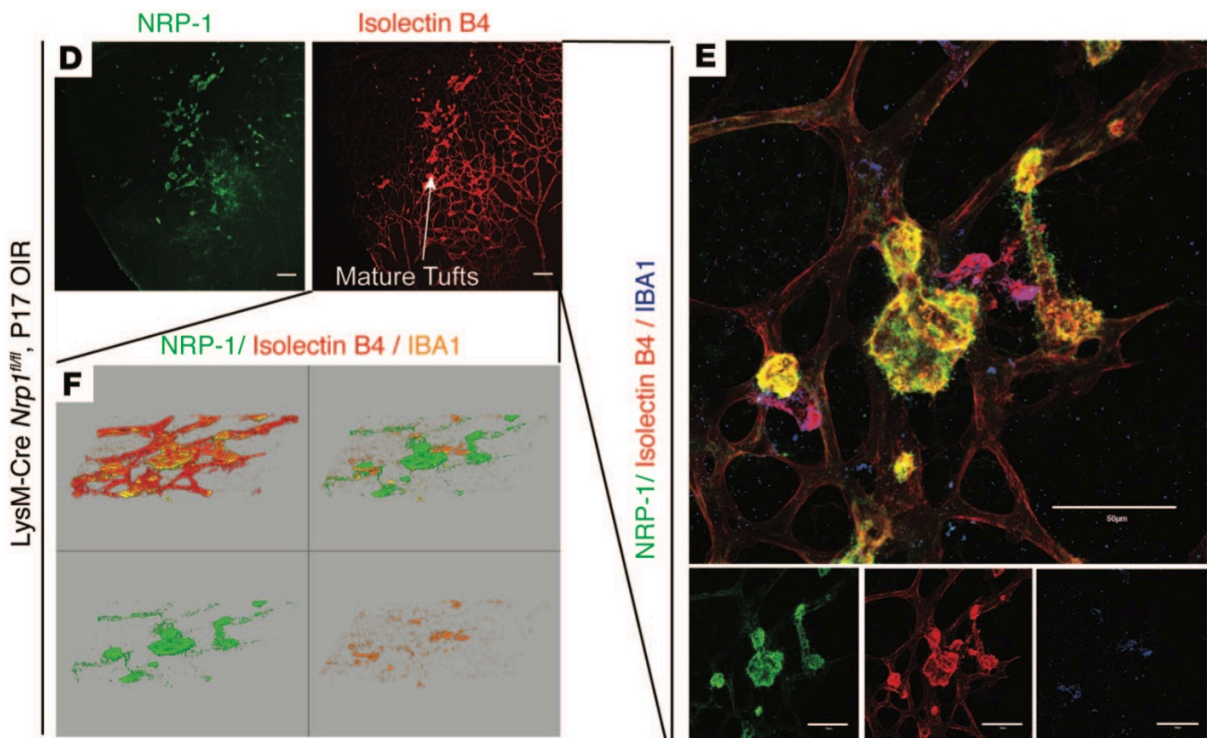
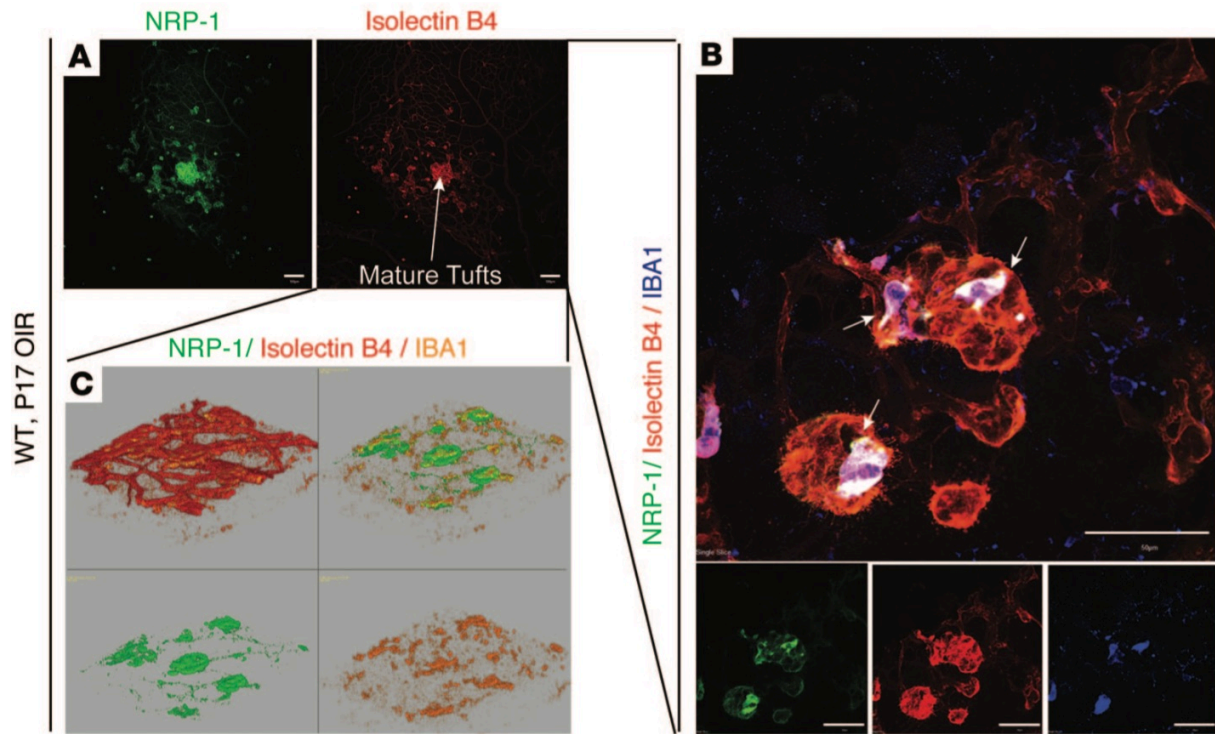


Figure 4. NRP-1⁺ myeloid cells are associated with pathological neovascular tufts. Confocal images of isolectin B4– (vessel and micro- glia stain) and NRP-1–stained retinal flatmounts at P17 during maximal neovascularization in (A–C) WT and (D–F) LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice. In WT retinas, NRP-1⁺ microglia (IBA1) associate with mature tufts. (C and F) Images were reconstructed in 3D. White arrows in A and D point to mature tufts. White arrows in B point to NRP-1⁺ MPs associated with mature tufts. (D–F) LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice had fewer MPs and less tufting. For all immunohistochemistry images, representative images of 3 independent experiments are shown. Scale bars: 100 μm (A and D); 50 μm (B and E).

SEMA3A is elevated in the vitreous of patients suffering from active proliferative diabetic retinopathy.

To establish the clinical relevance of our findings on the obligate role of NRP-1 in MP chemotaxis in retinopathy, we investigated the concentrations of SEMA3A directly in the vitreous of patients suffering from active PDR. Seventeen samples of undiluted vitreous were obtained from patients suffering from active PDR, and seventeen from control patients with nonvascular pathology. Detailed characteristics of patients are included in **Table 1**. Control patients presented with non-vascular pathology and showed signs of non-diabetes-related retinal damage such as tractional tension on vasculature (**Figure 5, A and B, white arrows**) secondary to fibrotic tissue, posterior vitreous detachment and macular bulging (**Figure 5C**). In contrast, all retinas from PDR patients showed signs of disc (**Figure 5D**) or pre-retinal neovascularization (**Figure 5F**), with highly permeable microvessels (leakage of fluorescent dye) (**Figure 5, D and G insets**), microaneurysms (**Figure 5, D-G**) and fibrous scar tissue, indicative of advanced retinopathy (**Figure 5G**). In addition, patients showed some evidence of macular edema due to compromised vascular barrier function, including cystoid formation (white arrowhead) due to focal coalescence of extravasated fluid (**Figure 5H**).

Consistent with a role in PDR, ELISA-based detection of SEMA3A revealed 5-fold higher concentrations of the protein in the vitreous humor of patients with PDR when compared to vitreous from control patients (**Figure 5I**). Results were confirmed by Western blot analysis on equal volumes of vitreous where SEMA3A (125-and 95-kDa isoforms)(38, 39) were elevated

in patients with PDR (**Figure 5J**). Thus, upregulation of SEMA3A in the vitreous is induced in diabetic ocular pathology.

Sample	Age (yr)	Diabetes type	Duration (yr)	Retinopathy	Analysis
C1	74	NA	NA	MH	WB/ELISA
C2	54	NA	NA	MMD	WB/ELISA
C3	72	NA	NA	ERM	WB/ELISA
C4	77	NA	NA	ERM	WB/ELISA
C5	82	NA	NA	MH	WB/ELISA
C6	62	NA	NA	ERM	ELISA
C7	65	NA	NA	MH	ELISA
C8	69	NA	NA	ERM	ELISA
C9	75	NA	NA	MH/cataract	ELISA
C10	77	NA	NA	Ret.Det.	ELISA
C11	69	NA	NA	ERM	ELISA
C12	68	NA	NA	ERM	ELISA
C13	81	NA	NA	ERM	ELISA
C14	70	NA	NA	ERM	ELISA
C15	65	NA	NA	MH	ELISA
C16	74	NA	NA	MH	ELISA
C17	75	NA	NA	MH	ELISA
PDR1	62	2	13	PDR	WB/ELISA
PDR2	79	2	33	PDR	WB/ELISA
PDR3	73	2	15	PDR	WB/ELISA
PDR4	74	2	10	PDR	WB/ELISA
PDR5	54	1	20	PDR	WB/ELISA
PDR6	60	2	34	PDR	WB/ELISA
PDR7	77	2	34	PDR	WB/ELISA
PDR8	71	2	10	PDR	ELISA
PDR9	35	-	-	PDR	ELISA
PDR10	69	2	40	PDR	ELISA
PDR11	78	-	5	PDR	ELISA
PDR12	36	2	-	PDR	ELISA
PDR13	81	1	30	PDR	ELISA
PDR14	70	2	30	PDR	ELISA
PDR15	74	-	35	PDR	ELISA
PDR16	67	2	30	PDR	ELISA
PDR17	69	2	2	PDR	ELISA

MH, macular hole; MMD, myopic macular degeneration; ERM, epiretinal membrane; Ret.Det., retinal detachment; WB, Western blot; NA, not applicable; -, not available.

Table 1. Characteristics of patients having undergone vitreous biopsy.

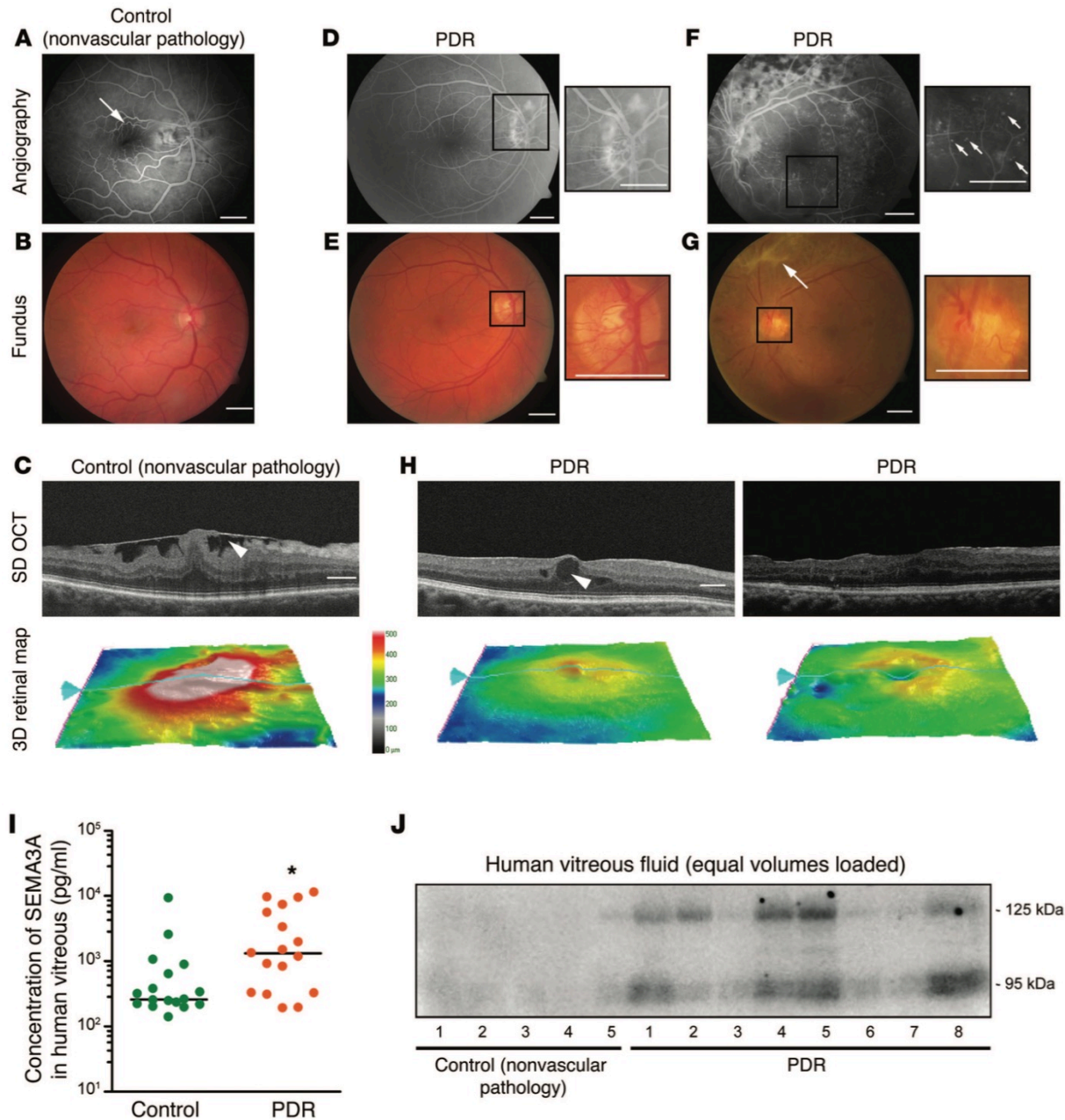


Figure 5. The NRP-1 ligand SEMA3A is induced in patients suffering from PDR. Angiographies, funduscopies, spectral-domain optical coherence tomography (SD-OCT), and 3D retinal maps obtained from patients selected for the study. Control patients had nonvascular pathologies and were compared with patients with PDR. Control patients with epiretinal membrane shows signs of non-diabetes-related retinal damage, such as (A and B) tractional tension on vasculature (arrow) secondary to (C) fibrotic tissue (white arrow) and macular bulging (angiography and 3D map). Retinas from patients with PDR have (E)

neovascularization (high-magnification image) with **(D)** highly permeable microvessels, as evidenced by leakage of fluorescent dye (high-magnification image), **(F)** microaneurysms (arrows in high-magnification image), and **(G)** fibrous scar tissue (**arrow**), indicative of advanced retinopathy. **(H)** Patients with PDR show some evidence of macular edema, including cystoid formation (**white arrowhead**) due to focal coalescence of extravasated fluid. **(I)** Vitreous humor analyzed by ELISA shows 5-fold increased levels of SEMA3A protein in patients with PDR. Horizontal bars represent mean concentration of SEMA3A, and dots represent concentrations of individual samples; n = 17 for controls and 17 for patients with PDR; *P < 0.05. **(J)** Western blot analysis of equal volumes of vitreous corroborates the increase in SEMA3A (~125 KDa and 95 KDa) in patients with PDR with respect to controls. Scale bars: 1,500 μm (**A–G**); 300 μm (**C** and **H**).

NRP-1 ligands are induced in the retinal ganglion cell layer during OIR.

To obtain an accurate kinetic profile of expression of the 2 prominent ligands of NRP-1 in proliferative retinopathy, we investigated levels of *Sema3A* and *Vegf* message in the mouse model of OIR. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) on whole retinas revealed that *Sema3A* was robustly induced in OIR both during the hyperoxic (vasodegenerative) phase at P10 and the ischemic/neovascular stage from P12 to P17 (**Figure 6A**). The observed induction occurred in both wild-type and *LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl}* retinas. Conversely, as expected, *Vegf* transcripts rose exclusively in the ischemic phase of OIR from P12 to P17 (**Figure 6B**). Importantly, *Vegf* was significantly less induced in *LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl}* when compared to wild-type retinas (minimally increased at P12 (P=0.0451) and ~55% lower at P14 when compared wild-type OIR (P=0.0003)) (**Figure 6B**) indicative of a healthier retina.

We next performed laser capture micro-dissection (LCM) followed by RT-qPCR on retinal layers in avascular zones to pinpoint the source of *Sema3A* and *Vegf* message in OIR (**Figure 4C**). Both *Sema3A* and *Vegf* were robustly induced in the ganglion cell layer with *Vegf* also increasing in the inner nuclear layer (**Figure 6, D and E**). Thus, the source of both ligands is geographically consistent with the localization of retinal MPs (**Figures 3 and 4**).

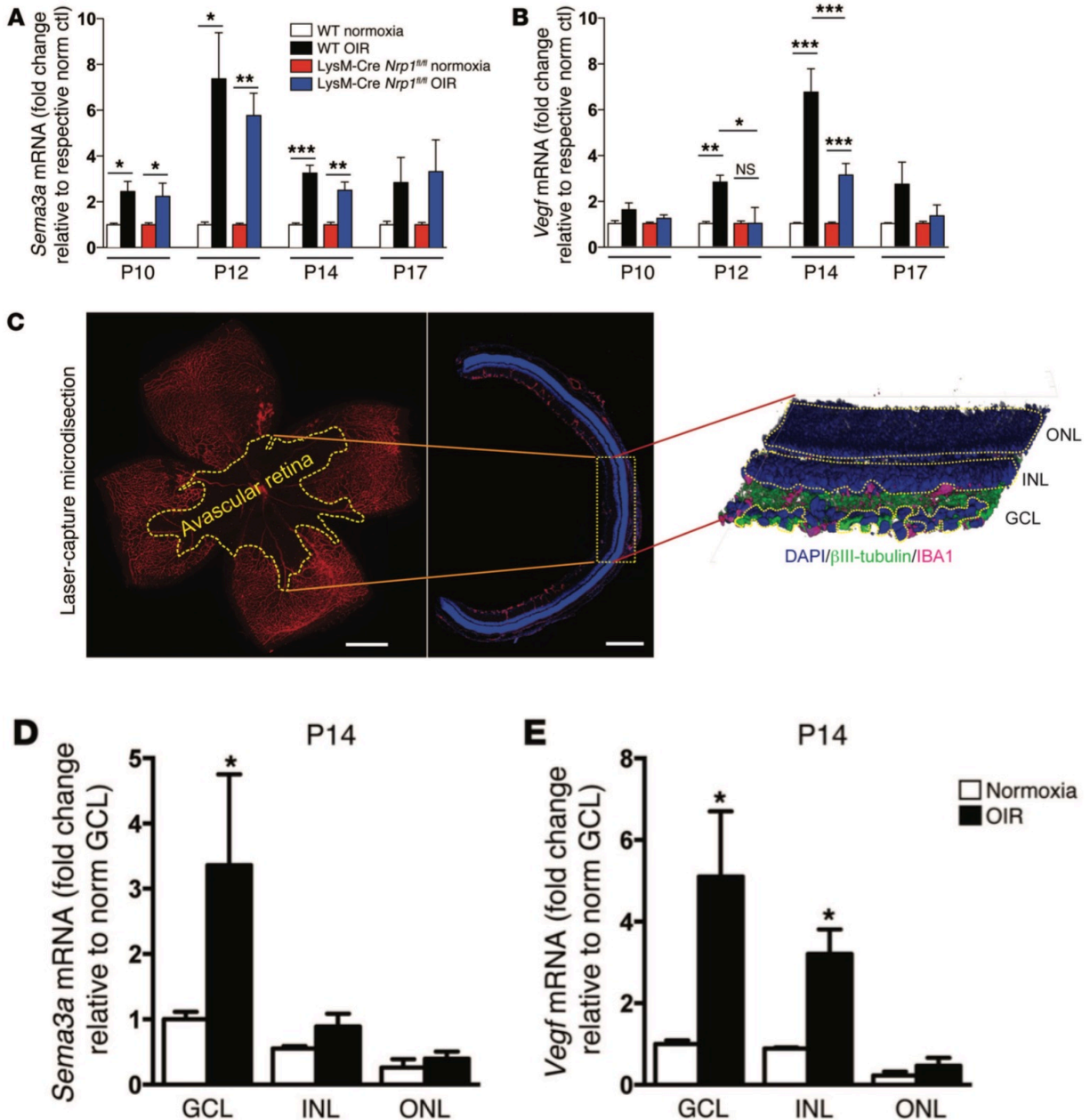


Figure 6. Ligands of NRP-1 are induced in the retinal ganglion cell layer during OIR. (A and B) Retinas from WT and LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} mice under normoxic conditions or in OIR were collected between P10 and P17 and analyzed by RT-qPCR. (A) *Sema3a* mRNA expression was induced throughout OIR in both WT and LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} retinas, (B) while *Vegf* was significantly less induced in LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} retinas compared with WT retinas. Data are expressed as a fold change relative to respective normoxic controls for each time point \pm SEM; $n = 4-7$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. (C) Laser capture microdissection was performed

on P14 mice, with care being taken to select avascular retinal zones in OIR. RT-qPCR on laser capture microdissection of retinal layers in control and OIR avascular zones showed an induction in both **(D)** Sema3a and **(E)** Vegf mRNA in the ganglion cell layer (GCL) in OIR retinas compared with normoxic retinas. **(E)** Vegf was also induced in the inner nuclear layer (INL) of OIR retinas. ONL, outer nuclear layer. Data are expressed as a fold change relative to normoxic GCL \pm SEM. Scale bars: 500 μ m (C; right); 300 μ m (C; left).

MPs do not proliferate in the retina after vascular injury.

In order to determine if the noted rise in NRP-1⁺ MPs was due to an influx from systemic circulation or an increase in MP proliferation within the retina, we investigated local retinal proliferation of these cells. Mice were systemically injected with BrdU at P13 (24 hours prior to sacrifice) and FACS analysis was carried out on retinas (**Figure 7A**) and spleens (**Figure 7B**). Within the retina, Gr1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ MPs did not show significant proliferation (P=0.4708). Considerably more proliferation was observed in spleens. No significant difference was observed between Normoxia and OIR (**Figure 7C**). The lack of proliferation of MPs in the retina suggest that noted accretion NRP-1⁺ MPs during retinopathy has a systemic or bone marrow-derived origin, as previously elegantly demonstrated for proangiogenic macrophages (40, 41).

CD45 (intermediate/low)/Gr-1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺

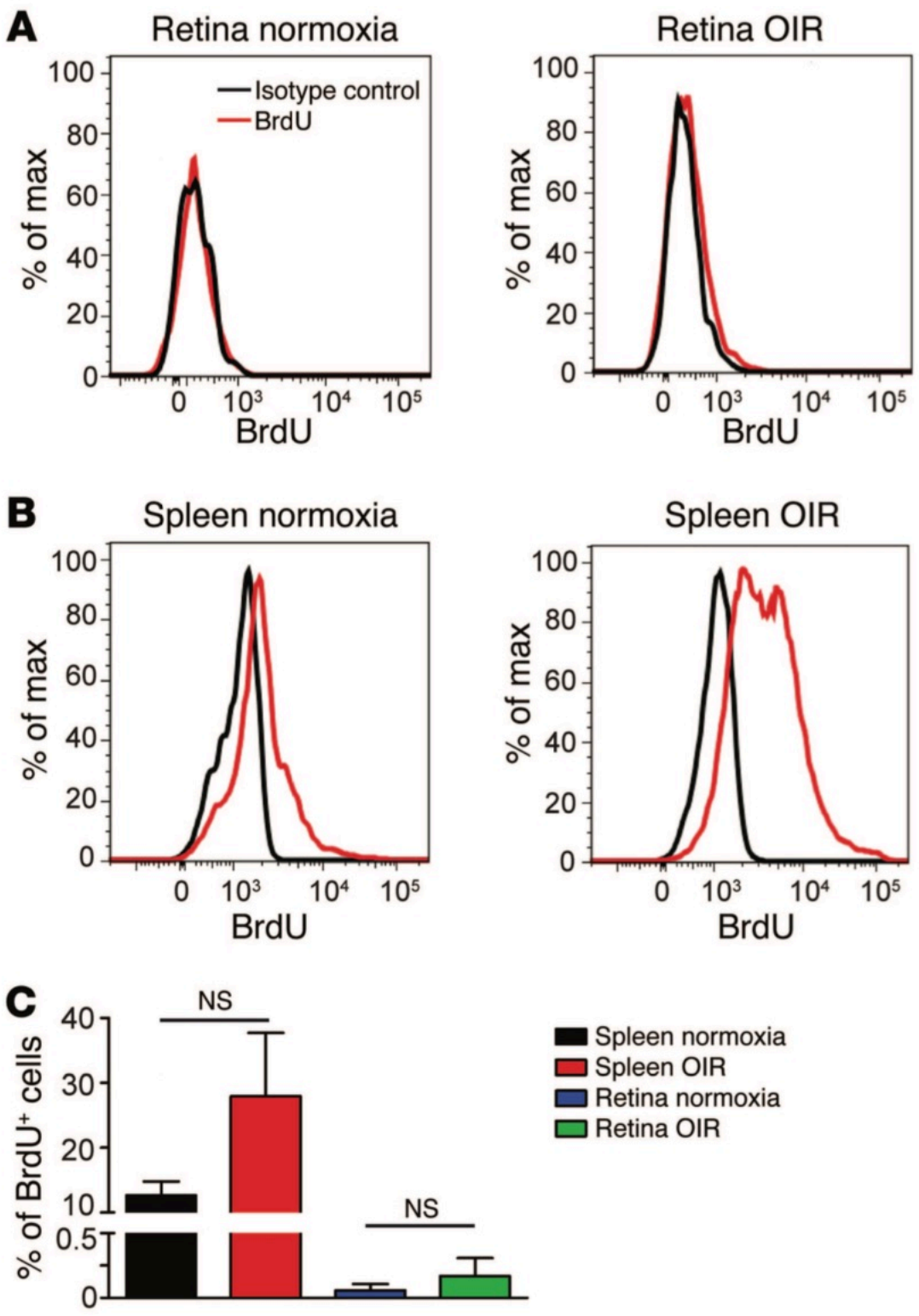


Figure 7. NRP-1+ MPs do not proliferate in the retina after vascular injury. Representative FACS histograms of Gr-1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ cells obtained from (A) retinas and (B) spleens collected at P14 from WT OIR and normoxic control mice injected with BrdU at P13. (C) The number of BrdU⁺ cells was considerably higher in spleens but did not change significantly between OIR and normoxic mice; n = 4 (normoxic), n = 4 (OIR) (total of 16 retinas per condition; each “n” comprises 4 retinas). Data are expressed as a percentage of BrdU⁺ Gr-1⁻/F4/80⁺/CD11b⁺ cells ± SEM.

SEMA3A and VEGF₁₆₅ mobilize MPs via NRP-1.

In light of the requirement of NRP-1 for myeloid cell mobilization to sites of vascular lesion (Figure 1) as well as the induction of the principal ligands of NRP-1 in retinopathy (Figures 5 and 6) and the likely systemic origin of these cells (Figure 7), we sought to determine the propensity of these cues to provoke chemotaxis of MPs. Primary macrophage cultures were isolated from wild-type mice and subjected to a Transwell Boyden chamber migration assay. Both SEMA3A (100ng/ml) (P<0.0001) and VEGF₁₆₅ (50ng/ml) (P=0.0027) provoked macrophage chemotaxis to similar magnitudes as positive control MCP-1 (100ng/ml) (P<0.0001) (Figure 8, A and B). These data were validated by demonstrating that Y-27632, a selective inhibitor ROCK (Rho-associated coiled coil forming protein serine/threonine kinase) abolished their chemotactic properties. ROCK is downstream of NRP-1 signaling(42) and is known to mediate monocyte migration(43). VEGF migration was partially yet not significantly diminished suggesting a contribution from alternate receptors such as VEGFR1 as recently reported(33). Consistent with a role for NRP-1 in SEMA3A and VEGF-mediated chemotaxis, macrophages from LysM-Cre/*Nrp1*^{f/f} mice were uniquely responsive to MCP-1 and not mobilized by SEMA3A or VEGF (Figure 8C).

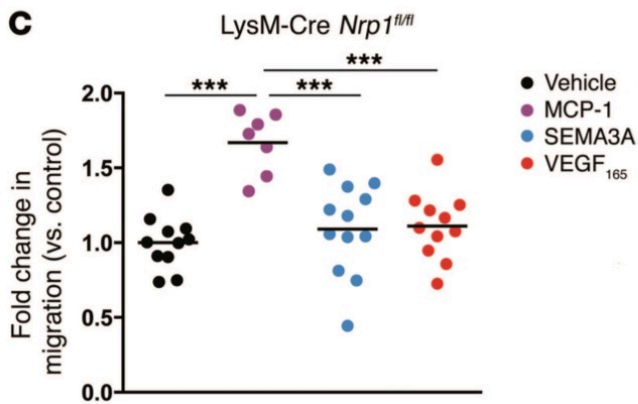
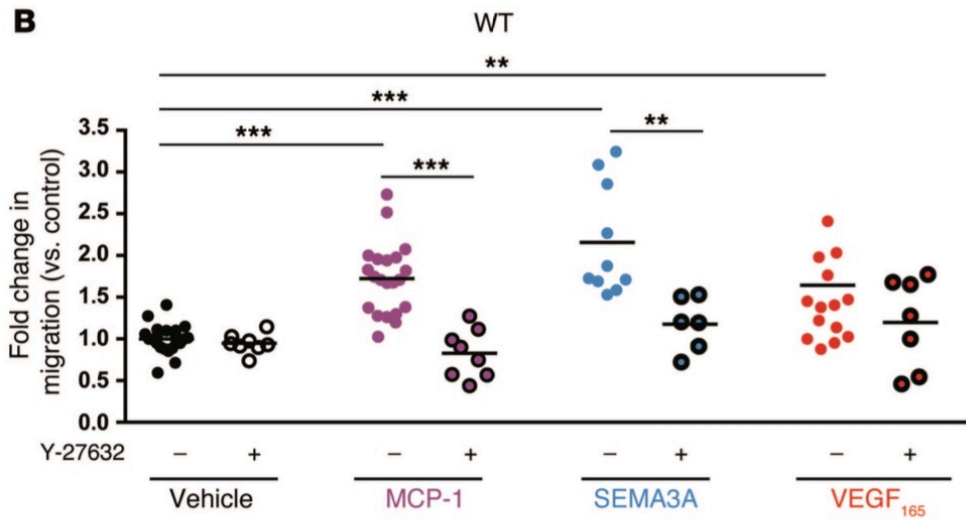
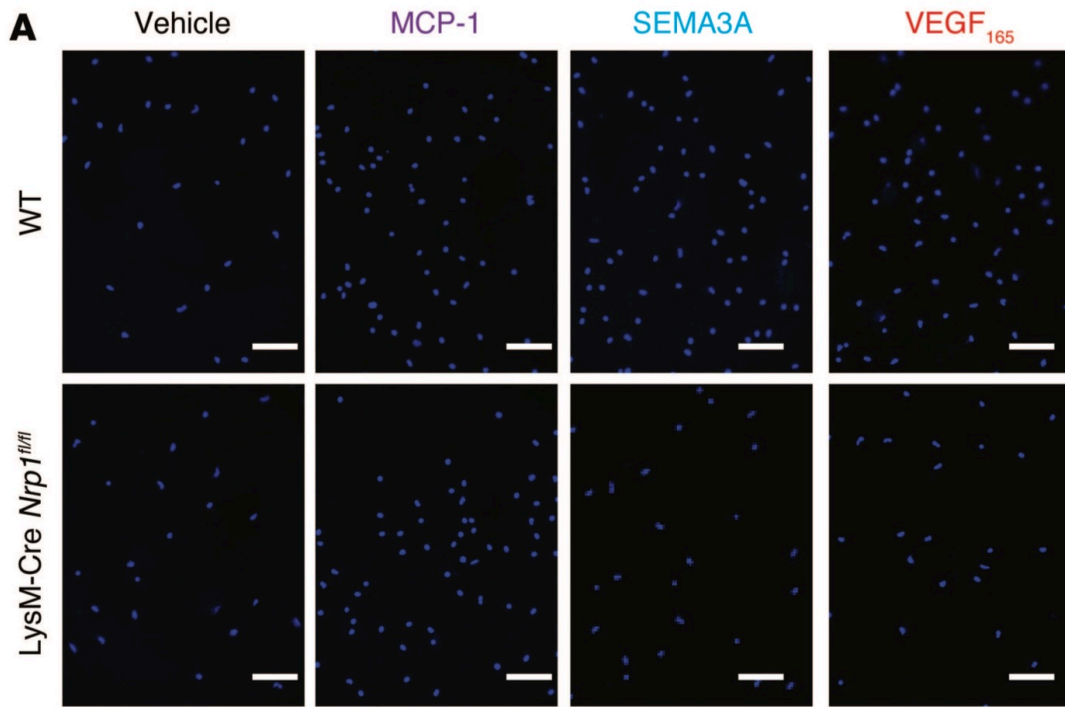


Figure 8. SEMA3A and VEGF are chemoattractive toward macrophages via NRP-1. Primary macrophages were isolated from WT or LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} mice and subjected to a Transwell migration assay, with vehicle, MCP-1 (100 ng/ml), SEMA3A (100 ng/ml), or VEGF (50 ng/ml) added to the lower chamber. **(A)** Representative images of migrated cells stained with DAPI are shown. **(B)** SEMA3A and VEGF promoted macrophage migration to similar extents as the positive control MCP-1. To ascertain that SEMA3A and VEGF were stimulating macrophage chemotaxis, cells were pretreated with the selective ROCK inhibitor Y-27632 (100 µg/ml), which abolished chemotaxis. **(C)** Macrophages from LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} mice were unresponsive to SEMA3A or VEGF but responsive to MCP-1. Data are expressed as a fold change relative to control (nontreated cells); horizontal bars represent mean value of the fold change, and dots represent individual fold changes; n = 6–22; **P < 0.01, ***P < 0.001. Scale bars: 100 µm.

NRP-1⁺ macrophages potentiate microvascular sprouting ex vivo.

To investigate the impact of NRP-1 expressing macrophages on microvascular angiogenesis, we isolated choroid tissue from either LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} mice or LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice, and grew them in MatrigelTM to assess microvascular sprouting. Choroids from LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice sprout ~20% less microvessels when compared to ones from LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} mice (P=0.018) (**Figure 9A**). To investigate the role of NRP-1⁺ macrophages in promoting microvascular sprouting, we used clodronate-liposomes to eliminate endogenous macrophages from the isolated choroid tissues. In explants from both LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} and LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} mice, PBS containing liposomes (i.e. vehicle control) had no impact on vascular sprouting, but clodronate-liposomes reduced microvascular sprouting by ~60% (P=0.0114 for LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} choroid and P=0.0007 for LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} choroid) (**Figure 9, B-E**). To verify whether NRP-1⁺ macrophages have a propensity to promote angiogenesis, we extracted peritoneal macrophages from LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} or LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice and introduced them into choroid explant cultures that had been treated previously with clodronate liposomes and washed. LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} macrophages robustly potentiated microvascular sprouting by 50% to 100% when compared to macrophages from LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice (P=0.0068 for LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} choroid and P=0.0491 for LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} choroid) (**Figure 9, D and E**) and independent of the genotype of the choroidal explant.

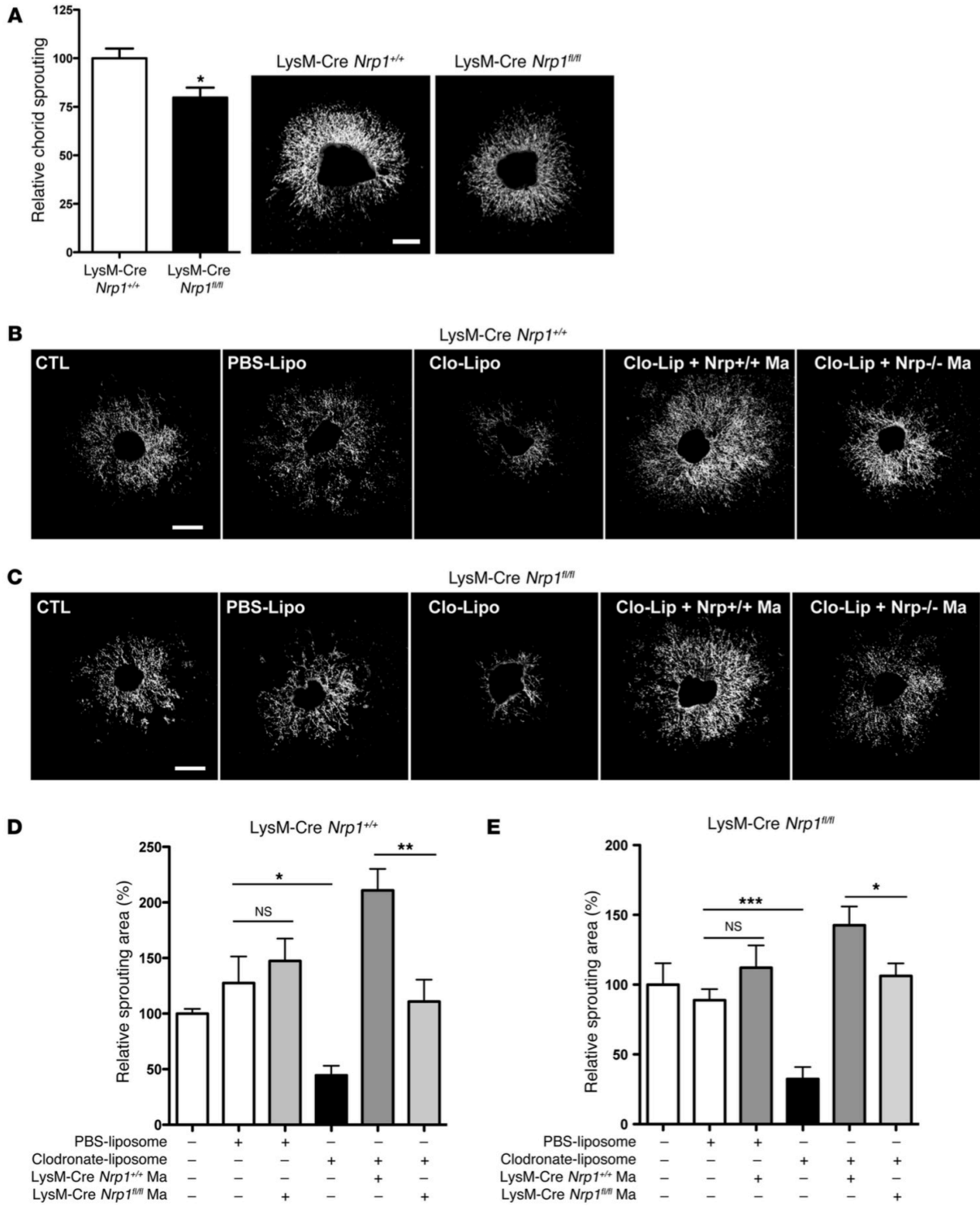


Figure 9. NRP-1⁺ macrophages promote microvascular growth in ex vivo choroid explants. (A) Quantification and representative images of choroid explants isolated from LysM-Cre Nrp1^{+/+} and LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice (n = 6; P = 0.018). (B and C) Representative images of choroid explants from (B) LysM-Cre Nrp1^{+/+} and (C) LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice following clodronate liposome treatment and subsequent addition of exogenous macrophages (Ma). PBS-Lipo, EGM-2 medium with PBS-filled liposome; Clo-Lipo, EGM-2 medium with dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt-filled liposome. (D and E) Quantification of choroidal microvascular sprouting from (D) LysM-Cre Nrp1^{+/+} and (E) LysM-Cre Nrp1^{fl/fl} mice depicted in B and C. PBS-Liposome, EGM-2 medium with PBS-filled liposome; Clodronate-Liposome, EGM-2 medium with dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt-filled liposome. (n = 6, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001). Scale bars: 500 μ m.

Deficiency in myeloid-resident NRP-1 reduces vascular degeneration and pathological neovascularization in retinopathy.

Given the obligate role of NRP-1 in MP infiltration during the early stages of OIR (Figure 1), we next sought to determine the impact of myeloid cell-specific ablation of NRP-1 on the progression of disease. Upon exit from 75% O₂ at P12, LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice showed significantly lower levels of retinal vaso-oblivation when compared to wild-type (P=0.0011) and LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} (P<0.0001) controls (Figure 10, A and B). This may be attributed to lower levels of IL-1 β present in the retinas of LysM-Cre/*Nrp1*^{fl/fl} mice (Supplemental Figure 6). Importantly, at P17 when pathological neovascularization peaks(26), deletion of myeloid-resident NRP-1 profoundly reduced avascular areas [\sim 35% when compared to wild-type (P<0.0001) and \sim 30% compared to LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} mice (P=0.0008)] (Figure 10,C and D). In turn, we observed significant reductions in destructive pre-retinal neovascularization associated with ischemic retinopathy [\sim 36% when compared to wild-type (P=0.0008) and \sim 34% compared to LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+} mice (P=0.0013)] (Figure 10, E and F).

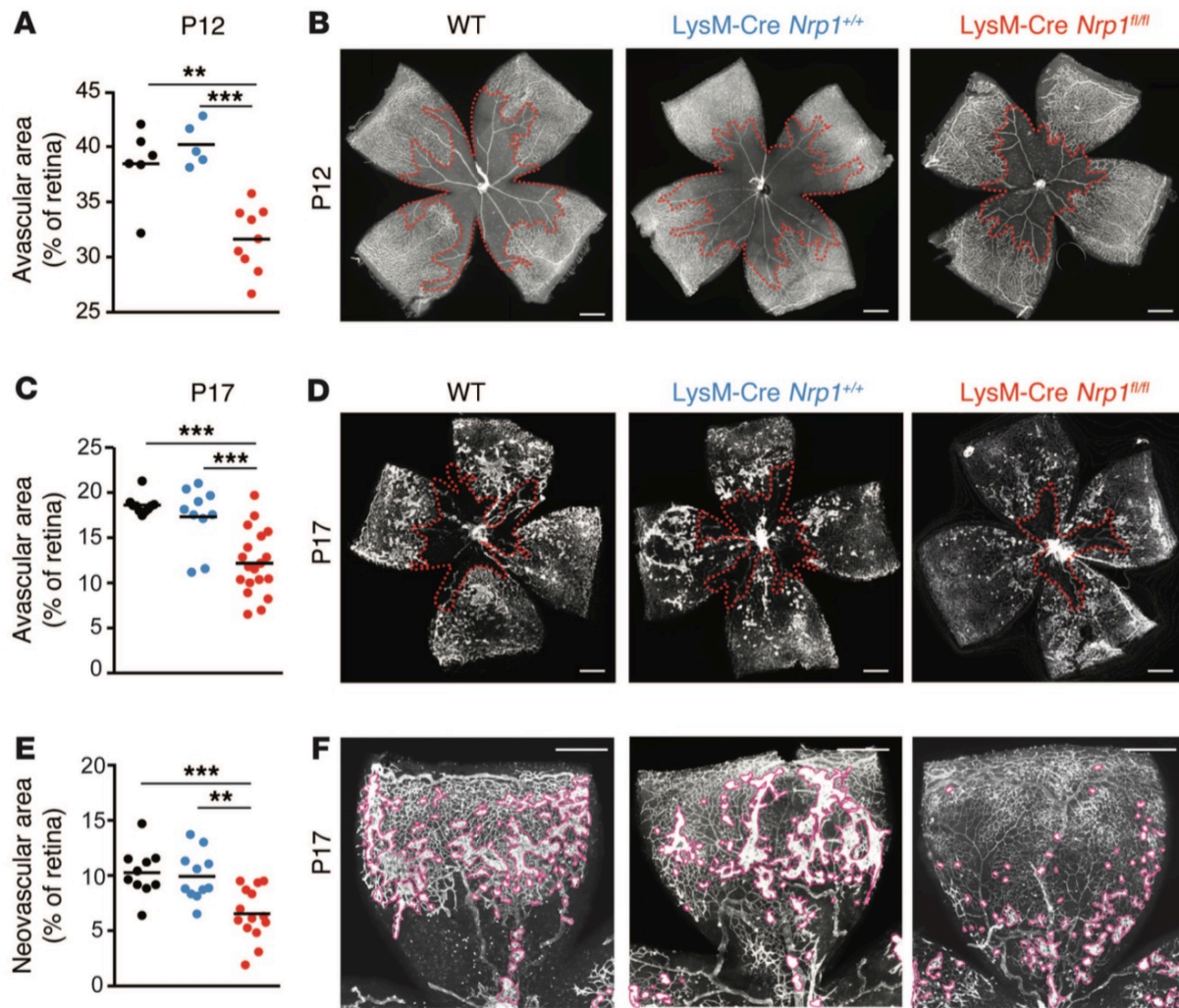


Figure 10. Deficiency in myeloid-resident NRP-1 reduces vascular degeneration and pathological neovascularization in retinopathy. WT, LysM-Cre/*Nrp1*^{+/+}, and LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} mice were subjected to OIR, and retinas were collected at P12 and P17, flatmounted, and stained with isolectin B4. LysM-Cre *Nrp1*^{fl/fl} mice had (A and B) less vaso-obliviation at P12 and (C and D) reduced avascular areas and (E and F) preretinal neovascularization at P17 compared with both control WT or control LysM-Cre *Nrp1*^{+/+} mice. Results are expressed as percentage of avascular or neovascular area versus the whole retinal area. Horizontal bars represent mean value of percentage, and dots represent individual values; n = 5–19; **P < 0.01, ***P < 0.001. Scale bars: 250 μm (B, D, and F).

Therapeutic intravitreal administration of soluble NRP-1 reduces MP infiltration and pathological neovascularization in retinopathy.

To determine the translational potential of our findings, we next employed a soluble recombinant mouse (rm)NRP-1 (**Figure 11A**) as a trap to sequester OIR-induced ligands of NRP-1. A single intravitreal injection of rmNRP-1 at P12 lead to a 30% reduction at P14 ($P=0.0282$) in the number of microglia present in retinas subjected to OIR (**Figure 11B**). This finding attests to the potency of soluble NRP-1 (1 μ l of 50 μ g/ml) to compromise microglial mobilization. Intravitreal administration of soluble NRP-1 provoked a significant ~40% decrease in pathological pre-retinal angiogenesis when compared to vehicle injected controls ($P=0.0025$) (**Figure 11, C and D**). Together, these data suggest that neutralization of ligands of NRP-1 is an effective strategy to reduce destructive neovascularization in retinopathy.

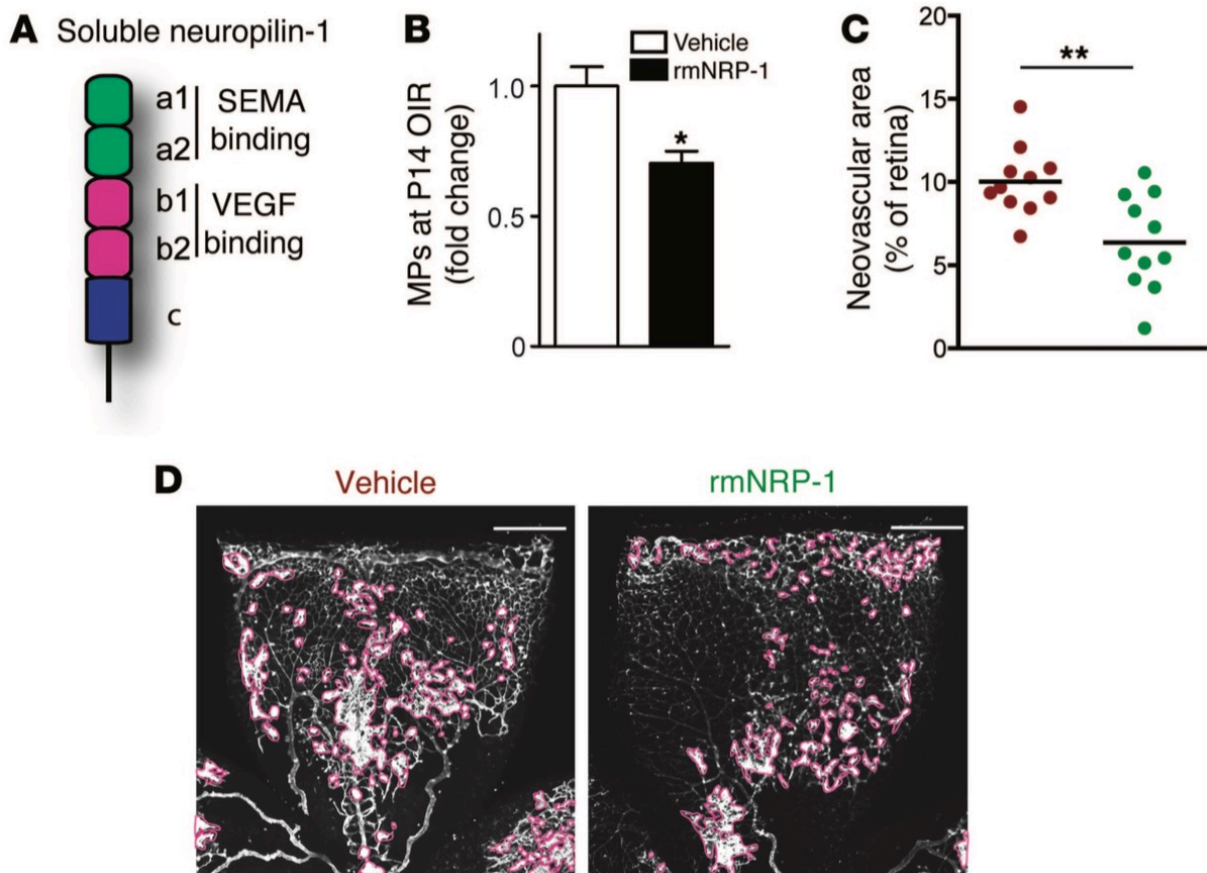


Figure 11. Therapeutic intravitreal administration of soluble NRP-1 reduces MP infiltration and pathological neovascularization in retinopathy. (A) WT mice were subjected to OIR and injected intravitreally at P12 with soluble rmNRP-1 as a trap to sequester OIR-induced ligands of NRP-1. (B) At P14, FACS analysis revealed a decrease of over 30% in the number of retinal MPs in rmNRP-1–injected retinas. Data are expressed as a fold change relative to control (vehicle-injected retinas) \pm SEM; $n = 3\text{--}4$ (total of 12–16 retinas per condition; each “ n ” comprises 4 retinas); $*P < 0.05$. (C and D) Treatment with rmNRP-1 efficiently decreased pathological neovascularization at P17 when compared with vehicle-injected eyes. Results are expressed as percentage of neovascular area versus the whole retinal area. Horizontal bars represent mean value of percentage, and dots represent individual values; $n = 11$, $**P < 0.01$. Scale bars: 250 μm .

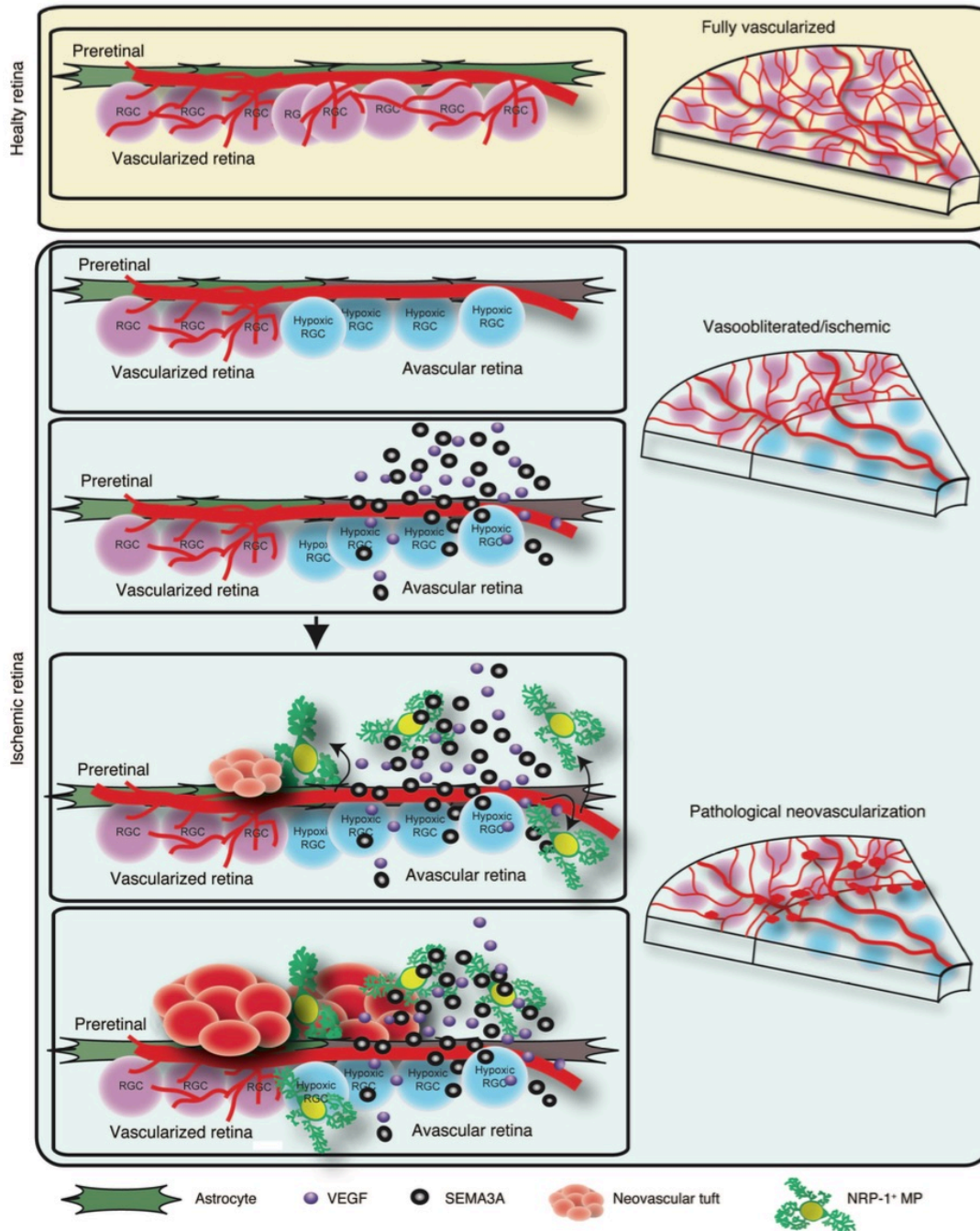


Figure 12. Schematic depiction of findings. The schematic illustrates that during ischemic retinopathies, such as diabetes, avascular zones of the retina, ischemic neurons, and neural tissue produce ligands of NRP-1 (SEMA3A and VEGF), which in turn act as potent chemoattractive agents for proangiogenic microglia. The NRP-1+ microglia then partake in the pathogenesis of proliferative retinopathy. RGC, retinal ganglion cell.

DISCUSSION

Although the contribution of MPs to ocular neovascular diseases such as diabetic retinopathy has been established for over a decade, knowledge of the mechanisms by which they are locally recruited to areas of tissue damage and partake in the disease process remains limited. Here we demonstrate that stressed retinal neurons(19, 21) have the inherent ability to modulate the local innate immune response via unconventional chemotactic agents such as the classical repulsive guidance cue SEMA3A(21), and vaso- and neuro- attractive VEGF (**Figure 12**). We provide evidence that these cues act as potent chemoattractants for NRP-1-positive MPs during the early stages of ischemic injury in the retina and contribute to vascular pathology in retinopathy. This neuroimmune paradigm consolidates the stress-induced neurovascular response to injury with an innate immune response. Either genetic ablation of NRP-1 specifically in myeloid cells (LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl}) or therapeutic administration of a NRP-1-derived trap limits MP recruitment, reduces vascular degeneration and decreases destructive pathological neovascularization.

The association of chronic low-grade inflammation with the progression of DR(5) and the link between neonatal infections and ROP(9, 44) underscores the potential therapeutic worth of anti-inflammatory drugs in treatment of proliferative retinopathies(45) yet toxicity remains a concern especially in pediatric populations. This is observed with prolonged use of intravitreal glucocorticoids (widely used for diabetic macular edema) which leads to increased cataract formation and elevated intraocular pressure(46). Hence, in order to improve safety profiles of current anti-inflammatory treatment paradigms, it will be necessary to provide a honed intervention that specifically targets damaging sterile neuroinflammation.

The identification of the SEMA3A-NRP-1 axis in chemoattraction of destructive MPs in retinopathy may provide such a target. In contrast to VEGF which is essential for retinal homeostasis, expression of SEMA3A in healthy mature retinas is limited(20). However, in diabetes and OIR, retinal ganglion neurons which are in intimate proximity with retinal vessels, generate significant amounts of this cue(20, 21). In addition to a role in local MP chemotaxis, SEMA3A also directly impacts microvessels(47) and may directly induce endothelial apoptosis and promote cytoskeleton remodeling (47-50). Specifically in the retina, SEMA3A hinders physiological vascular regeneration in OIR(21) and provokes pathological compromise of

barrier function in Diabetic Retinopathy(20). Hence, therapeutic neutralization of SEMA3A may provide a multi-faceted advantage over current intravitreally delivered compounds and may have limited toxicity given that its expression is typically restricted to embryogenesis(51). Our data also raise the possibility that beyond direct influence on angiogenesis and barrier function(52), the mode of action of current anti-VEGF therapies may also in part involve limiting MP-induced lesions to the neuroretina.

Together, the findings presented in this study set the floor for future investigations on the role of NRP-1-positive MPs and their ligands in CNS disorders characterized by excessive neuroinflammation. Understanding the signals that influence neuroimmune interplay may provide valuable therapeutic insight for the design of selective anti-inflammatory treatments to counter destructive neuroinflammation.

METHODS

Animals

C57Bl/6 wild-type (WT) mice were purchased from The Jackson Laboratory. LyzM-Cre (*Lyz2^{tm1(cre)Ifo}/J*; no. 004781) and NRP-1-floxed mice (*Nrp1^{tm2Ddg}/J*; no. 005247) were purchased from The Jackson Laboratory.

O₂-induced retinopathy

Mouse pups (WT or LyzM-Cre (Jackson Laboratory) or LyzM-Cre/*Nrp1^{fl/fl}*) and their fostering mothers (CD1, Charles River) were exposed to 75% O₂ from postnatal day 7 (P7) to P12 and returned to room air (53). This model serves as a proxy to human ocular neovascular diseases such as diabetic retinopathy characterized by a late phase of destructive pathological angiogenesis(54, 55). Upon return to room air, hypoxia-driven neovascularization (NV) develops from P14 onwards (26). We enucleated eyes at different time points and dissected the retinas for FACS analysis or mRNA analysis as described. In other experiments, dissected retinas were flatmounted and incubated overnight with fluoresceinated isolectin B4 (1:100) in 1mM CaCl₂ to determine extent of avascular area or neovascularization area at P17 using ImageJ and the SWIFT-neovascularization method(56).

FACS of digested retinas

Retinas from WT or LyzM-Cre/*Nrp1^{fl/fl}* mice were homogenized and incubated in a solution of 750U/mL DNaseI (Sigma-Aldrich) and 0.5mg/mL of collagenase D (Roche) for 15min at 37°C with gentle shaking. Homogenates were then filtered with a 70µm cell strainer and washed in PBS + 3% fetal bovine serum. Spleen samples were homogenized and incubated with 1mg/mL of collagenase D for 10 min at 37°C. Homogenates were washed in PBS + 3% fetal bovine serum and the pellets were resuspended and incubated in lysis buffer (10mM KCHO₃;150 mM NH₄Cl;0,1 mM EDTA) for 5 min at room temperature. Cell suspensions (retina or spleen) were incubated with LEAF purified anti-mouse CD16/32 (Biolegend) for 15 min at room temperature to block Fc receptors. Cells were then incubated for 30 min at room temperature with the following antibodies: FITC anti-mouse/human CD11b (Biolegend), PE/CY7 anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1; Biolegend), Pacific blue anti-mouse F4/80 (Biolegend), 7AAD (BD

Biosciences) and anti-mNRP-1 Allophycocyanin-conjugated rat IgG2A (R&D Systems) or allophycocyanin-conjugated rat IgG2A isotype control (R&D Systems).

For analysis of CX3CR1 and CD45 expression, additional extracellular staining was performed using the above-mentioned antibodies supplemented with Alexa Fluor 700 anti-mouse CD45.2 (Biolegend) and anti-mouse CX3CR1 phycoerythrin-conjugated goat IgG (R&D Systems) or goat IgG Isotype Control phycoerythrin-conjugated goat IgG Isotype Control. FACS was performed on a LSRII (BD Biosciences) device, and data were analysed using FlowJo software (version 7.6.5).

BrdU injections

Wild-type mice subjected to OIR or kept in normoxic conditions were injected intraperitoneally with 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich) at the dose of 1 mg per mouse dissolved in PBS at P13.

Analysis of BrdU incorporation

The staining was performed on the retinal cells from P14 WT mice. Samples were obtained as described above. Extracellular staining was performed as described above (CD45.2 [intermediate/low]; Gr-1⁻; CD11b⁺, F4/80⁺;7AAD). Cells were then fixed with Cytotfix/Cytoperm Buffer (BD Biosciences) for 30min and permeabilised with Perm/Wash Buffer (BD Biosciences) for 10min. Next, cells were treated with 300ug/mL of DNase for 1h at 37°C and washed with Perm/Wash. Intracellular staining of BrdU was performed using anti-BrdU-PE antibodies (Ebioscience) or PE-conjugated mouse IgG1 κ Isotype Control (Ebioscience) for 25 min at 4°C. Cells were then washed in Perm/Wash and resuspended in PBS and 3% FBS before FACS analysis on a LSRII (BD Biosciences).

Vitrectomy

All patients previously diagnosed with PDR were followed and operated by a single vitreoretinal surgeon (F.A. Rezende). Control patients underwent surgical treatment for nonvascular pathology (epiretinal membrane or macular hole) by the same surgeon. In an operating room setting, patients underwent surgery under local retro/peribulbar anesthesia. A 5% povidone-

iodine solution was used to clean the periocular skin and topical instillation into the eye and within the cul-de-sac was left in place for 5 minutes. Three-port 25-gauge transconjunctival pars plana vitrectomy was performed through 25-gauge valved cannulas (Alcon). Under microscope visualization using a wide-angle viewing system (Resight, Zeiss), undiluted vitreous was collected with a 25-gauge vitrector. After vitreous biopsy, the infusion line was opened and vitrectomy and membrane peeling were performed in the usual fashion to treat diabetic vitreous hemorrhage and tractional retinal detachment. This was followed by panretinal endolaser photocoagulation, fluid-air exchange, and intravitreal anti-VEGF injection.

Quantification of SEMA3A protein by ELISA

Vitreous samples were frozen on dry ice and immediately after biopsy and stored at -80°. Samples were centrifuged at 15,000g for 5 minutes at 4°C prior to analysis. Sema3A levels were quantified in supernatants using enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) following manufacturer's instructions (USCN Life Science Inc.).

Assessment of SEMA3A protein levels by western-blot

Equal volumes of vitreous fluid (20uL) from PDR and control patients were assessed by standard SDS-PAGE technique for the presence of SEMA3A (Abcam).

Real-time PCR analysis

RNA was isolated using the GenElute Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) and digested with DNase I to prevent amplification of genomic DNA. Reversed transcription was performed using M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies) and gene expression analyzed using SYBR Green (Bio-Rad) in an ABI Biosystems Real-Time PCR machine. β -actin was used as a reference gene.

Immunohistochemistry

For visualization of pan-retinal vasculature, flat-mount retinas were stained with rhodamine-labeled Griffonia (Bandeiraea) Simplicifolia Lectin I (Vector Laboratories, Inc.) in 1 mM CaCl₂ in PBS for retinal vasculature and anti-mouse/rat NRP-1 antibody (goat IgG; R&D Systems) and IBA1 (rabbit polyclonal; Wako).

Primary peritoneal macrophages culture

Adult WT or *LyzMcre/Nrp-1^{fl/fl}* mice were anesthetized with 2% isoflurane in oxygen 2L/min and then euthanized by cervical dislocation. Then, a small incision in abdominal skin of mouse was performed. Skin was pulled to each size of the mouse, and peritoneal cavity was washed with 5 ml of PBS plus 3% FBS for 2 min. Then, the harvested cells were centrifuged for 5 min at 1000 g, resuspended in medium (DMEM F12 plus 10% FBS and 1% Streptomycin/Penicillin) and plated. After 1 hour of culture at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere the medium was changed and cells were cultured for the next 24 hours in the same conditions before use in Transwell migration assay.

Transwell migration assay

Migration assays were performed in 24-well plates with 8- μ m pore inserts. Primary peritoneal macrophages (5×10^5 cells) resuspended in 200 μ l medium (DMEM F12 plus 10% FBS and 1% streptomycin/penicillin) were added to the upper chamber. 800 μ l medium, with or without migratory factors: MCP-1 (100 ng/ml), Sema 3A (100 ng/ml), and VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) was added to the lower chamber. Cells were allowed to migrate through the insert membrane overnight at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. In some experiments, cells were first pretreated with Y-27632 (Sigma-Aldrich), selective ROCK inhibitor (100 μ g/ml) for 1 hour at 37°C. The inserts were then washed with PBS, and nonmigrating cells were swabbed from the upper surface of the insert membrane with cotton buds. Then the membranes with migrated cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20 minutes, washed twice with PBS and mounted on the slide. The cells were stained using mounting medium with DAPI (Vector Laboratories Inc.). Then, 9 random fields per each membrane were photographed using an inverted fluorescence microscope at 20x magnification and the cells were counted using ImageJ software.

Choroidal explants and microvascular sprouting assay

The ex vivo choroid explants analysis and quantification of microvascular sprouting as described previously(57). Briefly, choroids from *LysM-Cre/Nrp1^{+/+}* and *LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl}* mice (n=6 for each condition) were dissected shortly after enucleating eyes. After plating segmented choroids into 24 well tissue culture plates and covering with Matrigel (BD Biosciences), samples were treated with either EGM-2 medium, EGM-2 medium with PBS filled liposome (liposome-PBS), or EGM-2 medium with dichloromethylenediphosphonic acid disodium salt filled liposome (Sigma-Aldrich). The packaging of liposomes was performed according to ref.58. Twelve hours later, liposomes containing passenger compounds were removed from the wells, followed by washing with PBS. Macrophages from primary peritoneal macrophage cultures (from either *LysM-Cre/Nrp1^{+/+}* or *LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl}* mice) were added to choroidal explant cultures to investigate the impact of macrophages on microvascular sprouting.

Soluble recombinant NRP1

Wild-type mice subjected to OIR were intravitreally injected with rmNRP1 from plasmid (29) or R&D Systems at P12.

Recombinant proteins used

The following recombinant proteins were used: recombinant mouse CCL2/JE/MCP-1 (from E. coli) (R&D Systems) concentration used in vitro at 100ng/ml; recombinant human SEMA3A Fc chimera (from murine myeloma cell line, NS0) (R&D Systems) concentration used in vitro at 100ng/ml; and recombinant human VEGF₁₆₅ (PeproTech) concentration used in vitro at 50ng/ml.

Statistics

Data are presented as mean \pm SEM. We used a 2-tailed Student's t test and ANOVA, where appropriate, to compare the different groups. $P < 0.05$ was considered statistically different. For ELISA, statistical analysis was performed using nonparametric Mann-Whitney test (GraphPad Prism).

Study Approval

Human samples. We obtain approval of human clinic protocols from the Hopital Maisonneuve-Rosemont ethics committee (Ref.CER:10059), and patients recruited for local core vitreal biopsy sampling afflicted with type 1 or type 2 diabetes mellitus provided written informed consent. The entire procedure was performed as an outpatient procedure in the minor procedure room within the ambulatory clinic of the Department of Ophthalmology at Hopital Maisonneuve-Rosemont. All instruments were opened and handled in a sterile manner. The study conforms to the tenets of the Declaration of Helsinki.

Animals. All animal studies were performed according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology Statement for the use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal in agreement with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

Author contributions: P.S. conceived the study. A.D., G.M., A.C, K.M., J.F.D, Z.S., M.O. F.B., N.A., S.H., C.M., F.A.R. performed the experiments. A.D., G.M and J.F.D. analyzed the data. A.S., J.S.D., S.B. and N.L. provided expert advice. P.S., A.D. and G.M. wrote the paper.

Acknowledgements

PS holds a Canada Research Chair in Retinal Cell Biology and The Alcon Research Institute Young Investigator Award. This work was supported by operating grants to PS from the Canadian Institutes of Health Research (221478), the Canadian Diabetes Association (OG-3-14-4544-PS and OG-3-11-3329-PS), and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (418637). Additional support was obtained from the Fondation HMR, Réseau en Recherche en Santé de la Vision du Quebec and the Fond en Recherche en Ophthalmologie de l'UdM. AS is supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (STA 1102/5-1).

REFERENCES

1. Lampron, A., Elali, A., and Rivest, S. 2013. Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and Its environment. *Neuron* 78:214-232.
2. Ousman, S.S., and Kubes, P. 2012. Immune surveillance in the central nervous system. *Nat Neurosci* 15:1096-1101.
3. Adamis, A.P., and Berman, A.J. 2008. Immunological mechanisms in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Semin Immunopathol* 30:65-84.
4. Antonetti, D.A., Klein, R., and Gardner, T.W. 2012. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 366:1227-1239.
5. Jousseaume, A.M., Poulaki, V., Le, M.L., Koizumi, K., Esser, C., Janicki, H., Schraermeyer, U., Kociok, N., Fauser, S., Kirchhof, B., et al. 2004. A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *FASEB J* 18:1450-1452.
6. Ambati, J., and Fowler, B.J. 2012. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 75:26-39.
7. Sennlaub, F., Auvynet, C., Calippe, B., Lavalette, S., Poupel, L., Hu, S.J., Dominguez, E., Camelo, S., Levy, O., Guyon, E., et al. 2013. CCR2(+) monocytes infiltrate atrophic lesions in age-related macular disease and mediate photoreceptor degeneration in experimental subretinal inflammation in Cx3cr1 deficient mice. *EMBO Mol Med* 5:1775-1793.
8. Combadiere, C., Feumi, C., Raoul, W., Keller, N., Rodero, M., Pezard, A., Lavalette, S., Houssier, M., Jonet, L., Picard, E., et al. 2007. CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration. *J Clin Invest* 117:2920-2928.
9. Dammann, O. 2010. Inflammation and retinopathy of prematurity. *Acta Paediatr* 99:975-977.
10. Tremblay, S., Miloudi, K., Chaychi, S., Favret, S., Binet, F., Polosa, A., Lachapelle, P., Chemtob, S., and Sapieha, P. 2013. Systemic inflammation perturbs developmental retinal angiogenesis and neuroretinal function. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:8125-8139.

11. Hartnett, M.E., and Penn, J.S. 2012. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *N Engl J Med* 367:2515-2526.
12. Kempen, J.H., O'Colmain, B.J., Leske, M.C., Haffner, S.M., Klein, R., Moss, S.E., Taylor, H.R., and Hamman, R.F. 2004. The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 122:552-563.
13. Sapienza, P., Hamel, D., Shao, Z., Rivera, J.C., Zaniolo, K., Joyal, J.S., and Chemtob, S. 2010. Proliferative retinopathies: angiogenesis that blinds. *Int J Biochem Cell Biol* 42:5-12.
14. Robinson, G.S., Ju, M., Shih, S.C., Xu, X., McMahon, G., Caldwell, R.B., and Smith, L.E. 2001. Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *FASEB J* 15:1215-1217.
15. Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S., Walshe, T.E., Tucker, B.A., Sekiyama, E., Kurihara, T., Darland, D.C., Young, M.J., and D'Amore, P.A. 2008. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS One* 3:e3554.
16. Hellstrom, A., Smith, L.E., and Dammann, O. 2013. Retinopathy of prematurity. *Lancet*.
17. Sapienza, P. 2012. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood* 120:2182-2194.
18. Kern, T.S., and Barber, A.J. 2008. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol* 586:4401-4408.
19. Binet, F., Mawambo, G., Sitaras, N., Tetreault, N., Lapalme, E., Favret, S., Cerani, A., Leboeuf, D., Tremblay, S., Rezende, F., et al. 2013. Neuronal ER Stress Impedes Myeloid-Cell-Induced Vascular Regeneration through IRE1alpha Degradation of Netrin-1. *Cell Metab* 17:353-371.
20. Cerani A, T.N., Menard C, Lapalme E, Patel C, Sitaras N, Beaudoin F, Leboeuf D, De Guire V, Binet F, Dejda A, Rezende F, Miloudi K, Sapienza P. 2013. Neuron-Derived Semaphorin 3A is an Early Inducer of Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy via Neuropilin-1. *Cell Metabolism*.

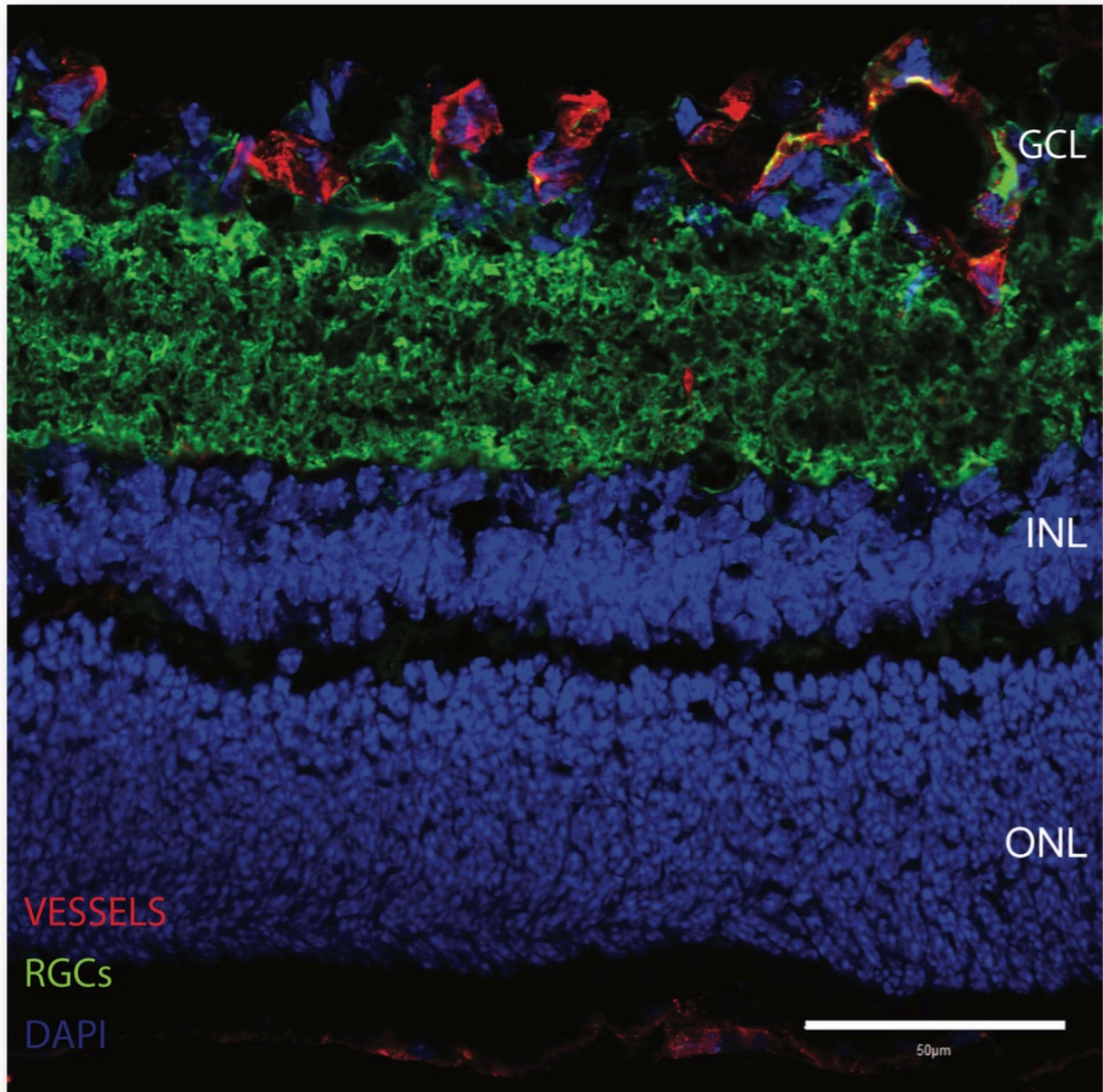
21. Joyal, J.-S., Sitaras, N., Binet, F., Rivera, J.C., Stahl, A., Zaniolo, K., Shao, Z., Polosa, A., Zhu, T., Hamel, D., et al. 2011. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood* 117:6024-6035.
22. Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., and Chemtob, S. 2006. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3595-3602.
23. Connor, K.M., SanGiovanni, J.P., Lofqvist, C., Aderman, C.M., Chen, J., Higuchi, A., Hong, S., Pravda, E.A., Majchrzak, S., Carper, D., et al. 2007. Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nat Med* 13:868-873.
24. Sapiha, P., Stahl, A., Chen, J., Seaward, M.R., Willett, K.L., Krah, N.M., Dennison, R.J., Connor, K.M., Aderman, C.M., Licican, E., et al. 2011. 5-Lipoxygenase Metabolite 4-HDHA Is a Mediator of the Antiangiogenic Effect of {omega}-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Sci Transl Med* 3:69ra12.
25. Stahl, A., Sapiha, P., Connor, K.M., Sangiovanni, J.P., Chen, J., Aderman, C.M., Willett, K.L., Krah, N.M., Dennison, R.J., Seaward, M.R., et al. Short communication: PPAR gamma mediates a direct antiangiogenic effect of omega 3-PUFAs in proliferative retinopathy. *Circ Res* 107:495-500.
26. Smith, L.E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S.K., D'Amato, R., Sullivan, R., and D'Amore, P.A. 1994. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:101-111.
27. Lee, P., Goishi, K., Davidson, A.J., Mannix, R., Zon, L., and Klagsbrun, M. 2002. Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10470-10475.
28. Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Shibuya, M., and Neufeld, G. 2001. Vascular endothelial growth factor receptor-1 and neuropilin-2 form complexes. *J Biol Chem* 276:18688-18694.
29. Mamluk, R., Gechtman, Z., Kutcher, M.E., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Klagsbrun, M. 2002. Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J Biol Chem* 277:24818-24825.

30. Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. 1998. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92:735-745.
31. Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. 2010. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116:829-840.
32. Ritter, M.R., Banin, E., Moreno, S.K., Aguilar, E., Dorrell, M.I., and Friedlander, M. 2006. Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *J Clin Invest* 116:3266-3276.
33. Stahl, A., Chen, J., Sapieha, P., Seaward, M.R., Krah, N.M., Dennison, R.J., Favazza, T., Bucher, F., Lofqvist, C., Ong, H., et al. Postnatal Weight Gain Modifies Severity and Functional Outcome of Oxygen-Induced Proliferative Retinopathy. *Am J Pathol*.
34. Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. 1999. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8:265-277.
35. Mattapallil, M.J., Wawrousek, E.F., Chan, C.C., Zhao, H., Roychoudhury, J., Ferguson, T.A., and Caspi, R.R. 2012. The Rd8 mutation of the Crb1 gene is present in vendor lines of C57BL/6N mice and embryonic stem cells, and confounds ocular induced mutant phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:2921-2927.
36. Klebanov, O., Nitzan, A., Raz, D., Barzilai, A., and Solomon, A.S. 2009. Upregulation of Semaphorin 3A and the associated biochemical and cellular events in a rat model of retinal detachment. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 247:73-86.
37. Koppel, A.M., and Raper, J.A. 1998. Collapsin-1 covalently dimerizes, and dimerization is necessary for collapsing activity. *J Biol Chem* 273:15708-15713.
38. Neufeld, G., and Kessler, O. 2008. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:632-645.
39. Worthylake, R.A., and Burridge, K. 2003. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* 278:13578-13584.

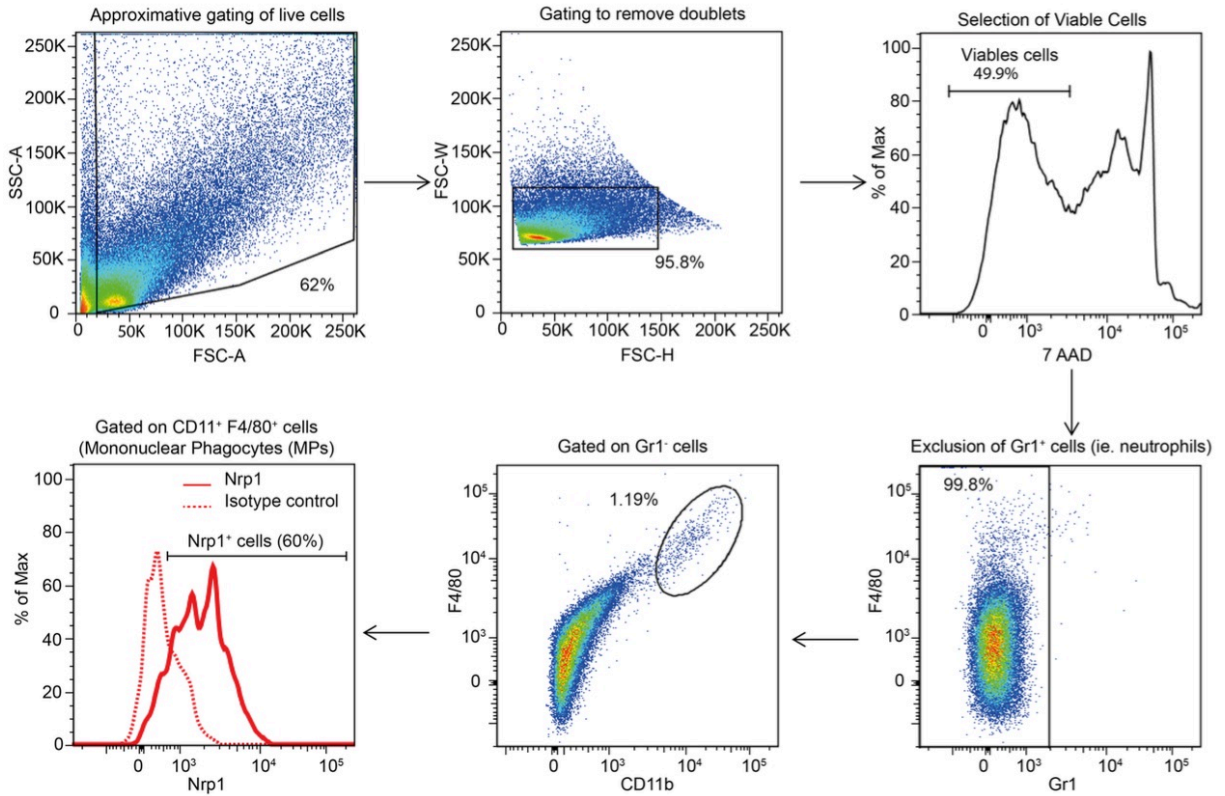
40. Casazza, A., Laoui, D., Wenes, M., Rizzolio, S., Bassani, N., Mambretti, M., Deschoemaeker, S., Van Ginderachter, J.A., Tamagnone, L., and Mazzone, M. 2013. Impeding Macrophage Entry into Hypoxic Tumor Areas by Sema3A/Nrp1 Signaling Blockade Inhibits Angiogenesis and Restores Antitumor Immunity. *Cancer Cell* 24:695-709.
41. Dammann, O., Brinkhaus, M.J., Bartels, D.B., Dordelmann, M., Dressler, F., Kerk, J., Dork, T., and Dammann, C.E. 2009. Immaturity, perinatal inflammation, and retinopathy of prematurity: a multi-hit hypothesis. *Early Hum Dev* 85:325-329.
42. Kastelan, S., Tomic, M., Gverovic Antunica, A., Salopek Rabatic, J., and Ljubic, S. 2013. Inflammation and pharmacological treatment in diabetic retinopathy. *Mediators Inflamm* 2013:213130.
43. Silva, P.S., Cavallerano, J.D., Sun, J.K., Aiello, L.M., and Aiello, L.P. 2010. Effect of systemic medications on onset and progression of diabetic retinopathy. *Nat Rev Endocrinol* 6:494-508.
44. Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., Beaudoin, F., Leboeuf, D., De Guire, V., Binet, F., et al. 2013. Neuron-derived semaphorin 3A is an early inducer of vascular permeability in diabetic retinopathy via neuropilin-1. *Cell Metab* 18:505-518.
45. Miao, H.Q., Soker, S., Feiner, L., Alonso, J.L., Raper, J.A., and Klagsbrun, M. 1999. Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J Cell Biol* 146:233-242.
46. Klagsbrun, M., and Eichmann, A. 2005. A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:535-548.
47. Guttman-Raviv, N., Shraga-Heled, N., Varshavsky, A., Guimaraes-Sternberg, C., Kessler, O., and Neufeld, G. 2007. Semaphorin-3A and semaphorin-3F work together to repel endothelial cells and to inhibit their survival by induction of apoptosis. *J Biol Chem* 282:26294-26305.
48. Neufeld, G., Sabag, A.D., Rabinovicz, N., and Kessler, O. 2012. Semaphorins in angiogenesis and tumor progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006718.

49. Bussolino, F., Valdembri, D., Caccavari, F., and Serini, G. 2006. Semaphoring vascular morphogenesis. *Endothelium* 13:81-91.
50. Yancopoulos, G.D. 2010. Clinical application of therapies targeting VEGF. *Cell* 143:13-16.
51. Miloudi, K., Dejda, A., Binet, F., Lapalme, E., Cerani, A., and Sapielha, P. 2014. Assessment of vascular regeneration in the CNS using the mouse retina. *J Vis Exp*.
52. Sapielha, P., Joyal, J.S., Rivera, J.C., Kermorvant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Hardy, P., Lachapelle, P., and Chemtob, S. 2010. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest* 120:3022-3032.
53. Stahl, A., Connor, K.M., Sapielha, P., Chen, J., Dennison, R.J., Krah, N.M., Seaward, M.R., Willett, K.L., Aderman, C.M., Guerin, K.I., et al. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:2813-2826.
54. Stahl, A., Connor, K.M., Sapielha, P., Willett, K.L., Krah, N.M., Dennison, R.J., Chen, J., Guerin, K.I., and Smith, L.E. 2009. Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis* 12:297-301.
55. Shao, Z., Friedlander, M., Hurst, C.G., Cui, Z., Pei, D.T., Evans, L.P., Juan, A.M., Tahir, H., Duhamel, F., Chen, J., et al. 2013. Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. *PLoS One* 8:e69552.
56. van Rooijen, N., and van Kesteren-Hendrikx, E. 2003. "In vivo" depletion of macrophages by liposome-mediated "suicide". *Methods Enzymol* 373:3-16.

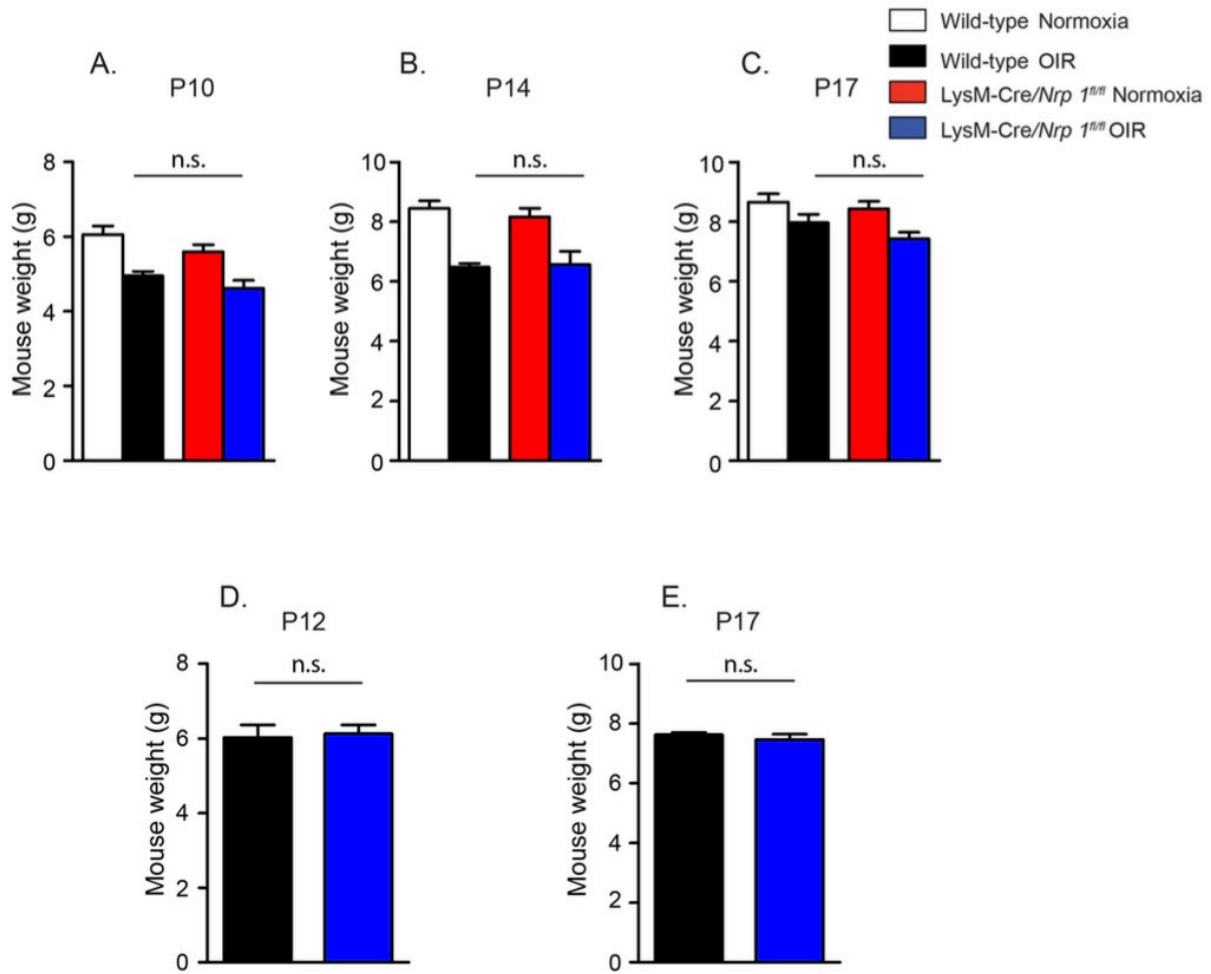
SUPPLEMENTARY FIGURES



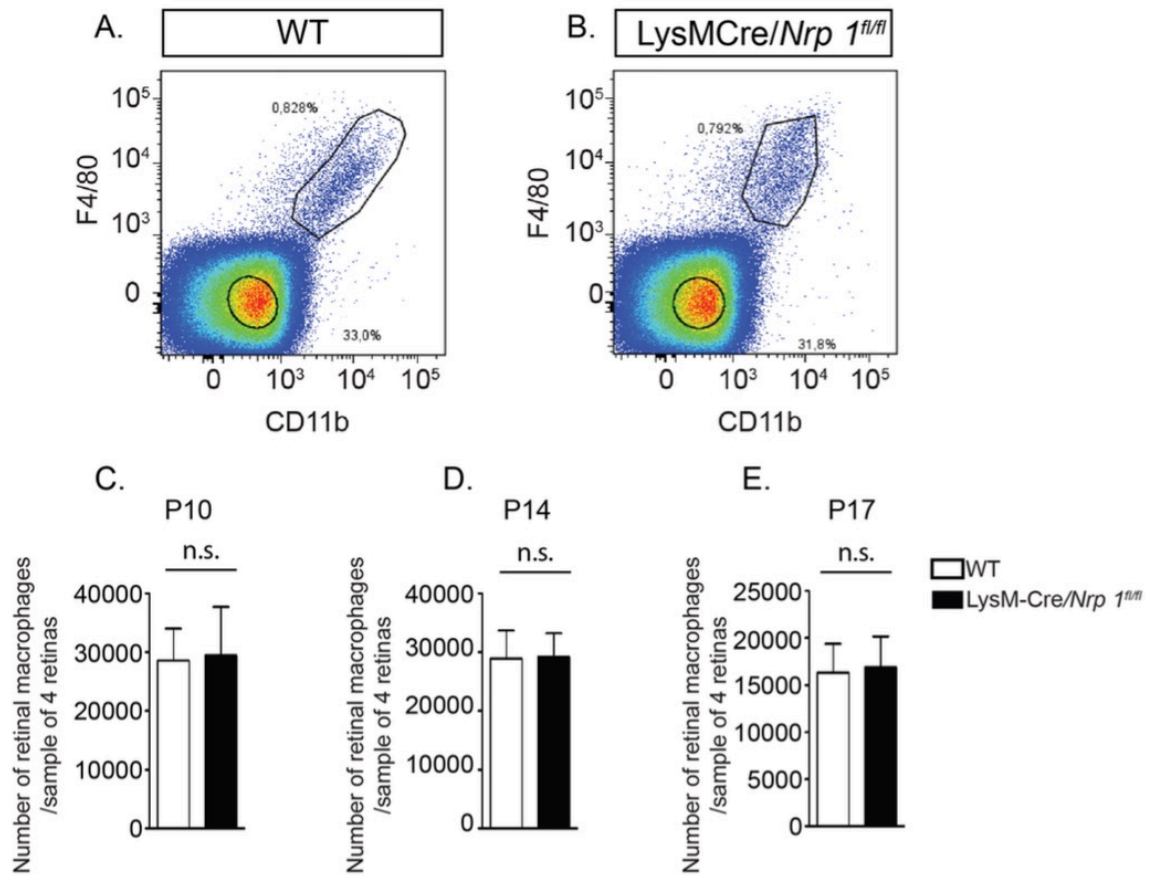
Supplementary Figure 1. Confocal image of retinal cross-section from a WT P14 OIR mouse stained for retinal ganglion cell (RGC)-specific β III tubulin, vessels (Isolectin B4), nuclei (DAPI). The image shows RGCs in intimate contact with degenerating vasculature. Scale bar: 50 μ m.



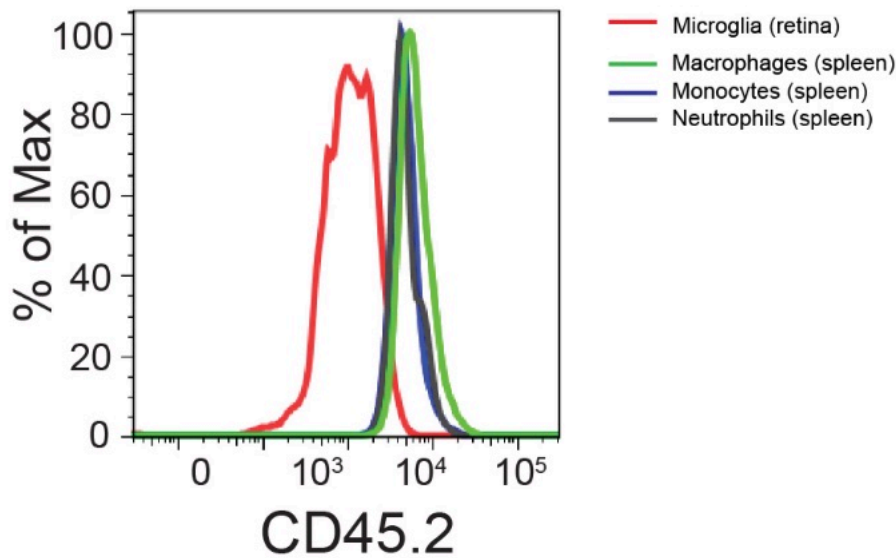
Supplementary Figure 2. Gating scheme explaining the identification of the CD11b⁺/F4-80⁺/Gr1⁻ and CD11b⁺/F4/80⁺/Gr1⁻/NRP⁺ mononuclear phagocytes in whole retinal lysates.



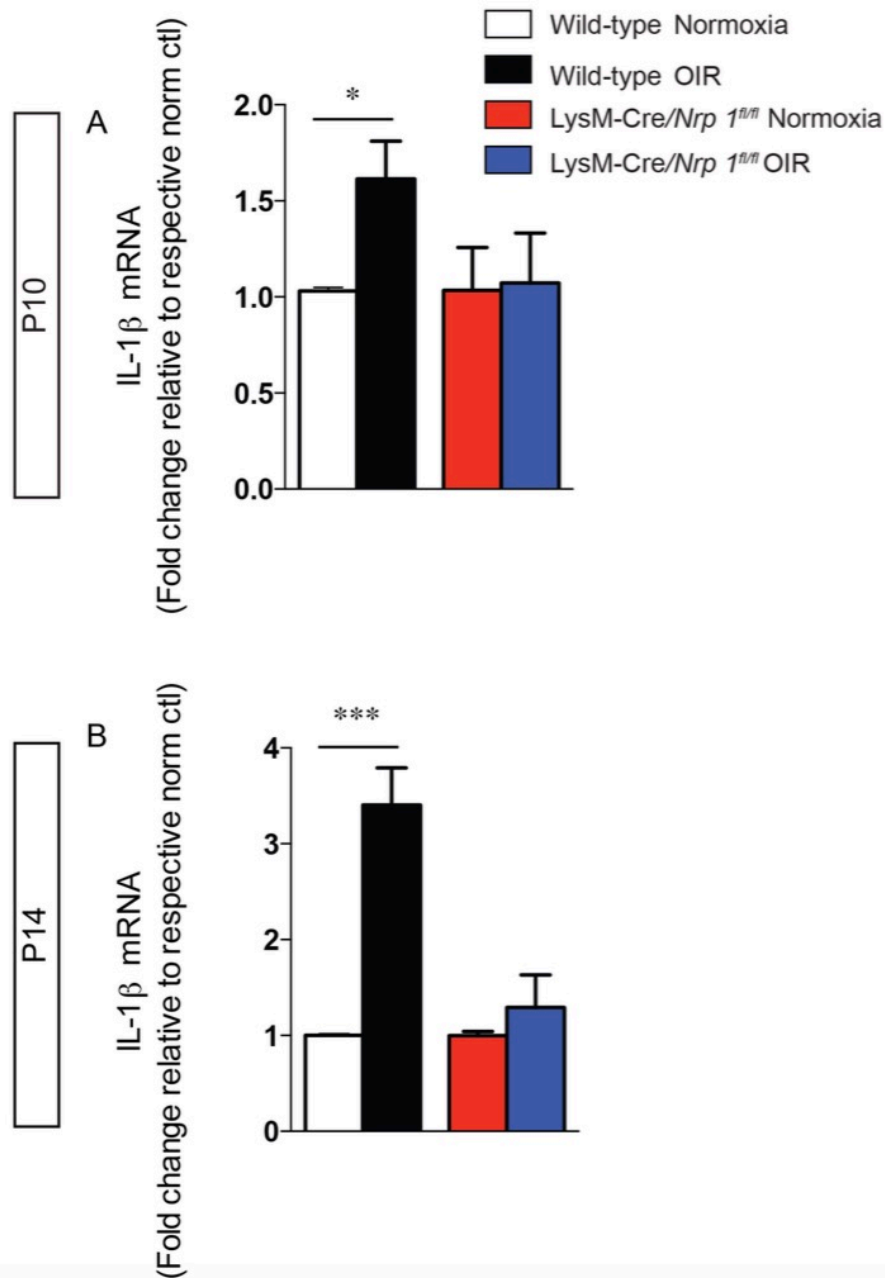
Supplementary Figure 3. Weights of mice in experimental paradigms involving OIR. Bar graphs represent the weight of mice used for FACS analysis in Figure 1 (A-C) and for vaso-obliteration and neovascularization analysis (D, E) in Figure 4. No significant difference was noted between WT or LysM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice attesting that metabolic difference could not account for the observed phenotypes. Expressed as Weight \pm SEM; n=6-18.



Supplementary Figure 4. Numbers of resident retinal microglia in WT and LysM-Cre/Nrp-1^{fl/fl} mice were similar. (A, B) Representative FACS plots show the populations of CD11b⁺/F4-80⁺/Gr1⁻ cells (microglia) in retinas collected from WT or LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl} mice. (C-E) FACS analysis from retinas collected at P10, P14 and P17 from normoxic mice reveals similar numbers of resident microglia in retinas from WT and LysM-Cre/Nrp1^{fl/fl} mice. Data are expressed as total numbers of CD11b⁺/F4-80⁺/Gr1⁻ cells \pm SEM; n=3 - 8 (total of 12-32 retinas per condition; each “n” comprises 4 retinas).



Supplementary Figure 5. CD45 expression on various cell populations in the mouse retina and spleen. Retinas and spleens collected at P14 from WT mice were analyzed by flow cytometry. Representative FACS histograms show intermediate/low expression of CD45 on microglia from retinas ($\text{Gr1}^-/\text{CD11b}^+/\text{F4/80}^+$ cells) when compared to high levels of expression on spleen-derived monocytes ($\text{CD11b}^+/\text{Gr1}^+/\text{F4/80}^+$), neutrophils ($\text{CD11b}^+/\text{Gr1}^{\text{hi}}/\text{F4/80}^-$ cells) and macrophages ($\text{Gr1}^-/\text{CD11b}^+/\text{F4/80}^+$ cells). $n=4$ (total of 16 retinas per condition; each “n” comprises 4 retinas).



Supplementary Figure 6. IL-1 β mRNA expression in OIR. Retinas from OIR and control Normoxic WT or LysM-Cre/*Nrp1^{fl/fl}* mice at P10 (**A**) and P14 (**B**) were analyzed by RT-qPCR. IL-1 β mRNA was significantly induced in OIR in WT retinas yet remained at basal levels in LysM-Cre/*Nrp1^{fl/fl}* mice. Data are expressed as a fold change relative to respective controls \pm SEM; n=4-6; *p < 0.05, ***p < 0.001.

CHAPITRE 3: ARTICLE 2

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS DE L'ARTICLE 2

Les cellules myéloïdes engagent une série de réponses adaptatives lorsqu'elles font face à une diminution de la tension locale en oxygène. Une des signalisations impliquées est celle médiée par le facteur de transcription HIF1 α . En réalisant une immunoprécipitation d'HIF1 α couplée à la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) sur des macrophages cultivés en hypoxie afin d'investiguer les partenaires interagissant avec HIF1 α , nous avons trouvé la présence de la protéine HSPA5 (GRP78), chaperonne essentielle à la réponse aux protéines mal repliées (voie de l'UPR). L'UPR (« unfolded protein response ») est un autre événement cellulaire activé lors de la déficience en nutriments induite par l'hypoxie. Cette réponse est orchestrée par trois senseurs transmembranaires du réticulum endoplasmique : IRE1 α , PERK et ATF6. Nos résultats d'immunoprécipitation d'HIF1 α sur des macrophages hypoxiques ont permis d'isoler IRE1 α comme partenaire d'HIF1 α . Cette association jusque-là méconnue entre deux importantes protéines adaptatives lors d'un stress hypoxique, a des répercussions cruciales dans la capacité des cellules myéloïdes à activer leurs processus angiogéniques et inflammatoires. Plusieurs études ont déjà montré le rôle des signalisations médiée par HIF1 α et par IRE1 α dans la pathogénèse des rétinopathies ischémiques prolifératives. Nos résultats présentent ici des évidences d'un nouveau concept d'une collaboration impliquant IRE1 α dans la réponse cellulaire HIF1 α -dépendante des cellules myéloïdes en hypoxie. Nous montrons que dans des souris transgéniques présentant des cellules myéloïdes déficientes en IRE1 α et/ou HIF1 α , une diminution significative de l'angiogenèse pathologique est observée dans le modèle de rétinopathie ischémique induite par l'oxygène. Nos travaux offrent ainsi une base pour le développement de stratégies thérapeutiques alternatives *via* la modulation de 2 voies adaptatives importantes en hypoxie pour le traitement des rétinopathies ischémiques prolifératives, et d'autres pathologies dont l'hypoxie est un facteur causal.

CONTRIBUTIONS DES AUTEURS

J'ai contribué de façon égale avec Dre Malika Oubaha à l'élaboration de l'étude.

Les travaux de l'article ont été distribués comme suit :

- J'ai réalisé avec l'aide du Dre Malika Oubaha les expériences de séquençage d'ARN, FACS, immunoprécipitations, Western blots, PCR, qPCR et CHIP-qPCR des figures principales et supplémentaires.
- Dre Agnieszka Dejda a aidé à la collecte des macrophages péritonéaux, microglies et réalisé les montages à plat des rétines de la figure 4.
- Normand Beaulieu et Karine Beauchemin ont procuré les plasmides fluorescents utilisés dans la figure 2.
- Roberto Diaz et Dr Sergio Crespo-Garcia ont réalisé l'analyse des données MS/MS en utilisant la base de données STRING pour la figure 1.
- Rachel Juneau et Frédérique Pilon ont aidé à la réalisation des expériences de qPCR.
- Dr François Binet et Dr Sergio Crespo-Garcia ont réalisé l'analyse des données MS/MS en utilisant la base de données REACTOME pour la figure 1.
- Dr Manuel Buscarlet a réalisé l'analyse des données de RNA-seq pour la figure 1.
- L'écriture et la correction du papier ont été faites par Dr Przemyslaw Sapiha, Dre Malika Oubaha et moi-même.

**TEXTE DE L'ARTICLE 2 EN PRÉPARATION POUR
SOUSSION**

Title: HIF1 α -dependent oxygen sensing in myeloid cells requires IRE1 α .

Authors: Gaelle Mawambo^{1, *}, Malika Oubaha^{3, *}, Agnieszka Dejda², Sergio Crespo-Garcia^{1,2}, Normand Beaulieu², Karine Beauchemin², Roberto Diaz¹, Rachel Juneau², Frédérique Pilon², François Binet², Manuel Buscarlet², Flavio A. Rezende² and Przemyslaw Sapieha^{1,2,4, **}

Affiliations: Departments of Biochemistry and Molecular Medicine¹ and Ophthalmology², Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, University of Montreal, Montreal, Quebec, H1T 2M4, Canada; Department of Biological Sciences and BioMed Research Center³, Faculty of Sciences, University of Quebec at Montreal (UQAM), Montreal, Canada; Department of Neurology-Neurosurgery⁴, McGill University, Montreal, Quebec, H3A 2B4 Canada.

* Gaelle Mawambo and Malika Oubaha contributed equally to this work

**Correspondence: Przemyslaw (Mike) Sapieha, Ph.D.
Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre
5415 Assomption Boulevard, Montreal,
Qc, H1T 2M4, Canada
TEL: (514) 252-3400 ext. 7711. FAX: (514) 252-3430.
E-mail: mike.sapieha@umontreal.ca

Key sentences:

- Oxygen sensing in myeloid cells requires a collaboration between HIF1 α and IRE1 α for inflammatory discharge.
- Oxygen sensing in myeloid cells engages HIF1 α and IRE1 α for cytokine production.
- IRE1 α partakes in HIF1 α -dependent oxygen sensing response in myeloid cells.

Key words: HIF1 α , IRE1 α , myeloid cells, ischemic proliferative retinopathies, hypoxia, cytokine production, angiogenesis.

ABSTRACT

Cellular adaptation to low oxygen tension triggers primitive pathways that ensure proper cell function. Conditions of hypoxia and low glucose are characteristic of injured tissues and hence successive waves of inflammatory cells must be suited to function under low oxygen tension and metabolic stress. While Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 α has been deemed essential for the inflammatory response of myeloid cells by regulating the metabolic switch to glycolysis, less is known about how HIF1 α is triggered during inflammation. Here we demonstrate that cells of the innate immune system require the kinase activity of inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α) in order to initiate HIF1 α - dependent release of cytokines such as IL1 β , IL6 and TNF α . Under hypoxic stress, HIF1 α in macrophages interacts with the endoplasmic reticulum-resident chaperone Heat Shock Protein Family A member 5 (HSPA5) and IRE1 α to regulate cellular response to hypoxia. Knockout of either HIF1 α or IRE1 α in myeloid cells ameliorates vascular phenotypes in a model of sterile inflammation-driven retinal pathological angiogenesis. Thus, pathways associated with ER-stress participate with HIF1 α in immune adaptation to low oxygen levels.

INTRODUCTION

Cells of myeloid lineage are highly motile and dynamic early responders to invading pathogens and non-microbial tissue damage¹⁻². As they enter sites of distressed tissues, they engage adaptive responses to cope with the microenvironment that they are called to defend or repair. Tissue injury provokes a series of biochemical events that reduce oxygen tension and glucose levels in damaged cells¹⁻². Hence, as immune cells hone in to injured tissue, they must be suited to function under hypoxic and metabolic stress.

When facing oxygen deprivation, cells activate a set of mechanisms to adapt to this stress. One crucial oxygen sensing effector is the transcription factor Hypoxia Inducible Factor 1-alpha (HIF1 α), a heterodimeric protein containing an oxygen-sensible α subunit and a nuclear localized stable β subunit³⁻⁶. In well-oxygenated environments, HIF1 α is hydroxylated by the prolyl hydroxylase domain (PHD) and targeted for proteasomal degradation by an E3 ubiquitin ligase through binding to the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein³⁻⁶. Under hypoxic stress conditions, HIF1 α is stabilized and can regulate adaptive processes such as angiogenesis and inflammation.

Myeloid cells engage HIF1 α for their activity and adaptation to low oxygen tension⁷. With the goal of identifying modulators of HIF1 α function, we set out to identify contemporaneous events that are triggered when cells of myeloid origin enter hypoxic tissue. Through tandem mass spectrometry (MS/MS), we identified Heat Shock Protein Family A member 5 (HSPA5), also known as Glucose-Regulated Protein 78kDa (GRP78), an ER stress chaperone, as a prospective binder of HIF1 α in myeloid cells during hypoxia. GRP78 plays an important role in the Unfolded Protein Response (UPR)⁸⁻¹⁰. During hypoxic stress, energetic resources are reallocated, selected mRNA transcribed, proteins produced and hence pathways involved in the maintenance of cellular homeostasis are activated¹¹. Part of selective protein production is ensured through conserved pathways known as ER stress, or unfolded protein response, initiated by three axes: the protein kinase RNA-like ER kinase/ activating transcription factor 4 (PERK/ATF4) axis, the inositol-requiring enzyme-1 α / X-box binding protein-1 (IRE1 α / XBP1) axis, and the activating transcription factor 6 (ATF6) axis⁸⁻¹⁰. Here we investigated the potential implication of pathways of ER-stress with HIF1 α during myeloid cells response to hypoxic stress.

RESULTS

HIF1 α and IRE1 α co-regulate cellular responses to hypoxia in macrophages.

To study mechanisms by which cells of myeloid origin function under hypoxic conditions, we used the mouse model of oxygen-induced retinopathy (OIR) that generates avascular regions similar to those observed in diabetic retinopathy. Mouse pups were exposed to 75% oxygen from postnatal date (P) 7 to P12 to instigate the first phase of vaso-obliteration and then returned to room air to initiate the second phase of pathological neovascularization that peaks at P17 (**Figure 1A**)¹². We performed bulk RNA-sequencing and gene set variation analysis (GSVA) on P14 OIR retinas at the vaso-obliterative phase and P17 retinas during the peak of neovascularization to identify prominent pathways associated with OIR progression. As expected, we observed enrichment in genes coding for processes associated with tissue hypoxia at P14 (P-value= 0.0037) when the retina is still avascular and hypoxia (P-value= 0.0001), inflammation (P-value= 0.0017) and angiogenesis (P-value= 5.50E-08) responses at P17 during maximal pathological neovascularization (**Figure 1B-C; Supplemental Figure 1A-B**). Hence, OIR is a suitable model to study inflammatory processes in hypoxic tissue.

Pathological angiogenesis in ischemic retinopathies is driven by mononuclear phagocytes (MNP), which include microglia and macrophages^{1, 13-15}. We therefore performed a FACS-mediated recovery of CD45^{low}/Gr1⁻/CD11b⁺/F4/80⁺ MNPs from P14 OIR and normoxic retinas. Western blot on MNPs from P14 OIR retinas showed upregulation of HIF1 α expression when compared to normoxic controls (**Figure 1D**).

To gain insight on the mechanisms by which HIF1 α function in MNPs during hypoxia, we investigated potential binding partners. We performed immunoprecipitation of HIF1 α from J774 monocyte-macrophage cell line followed by MS/MS under hypoxic conditions (2% O₂), mimicking the environment MNPs encounter when entering an ischemic tissue. We identified 52 proteins from our MS/MS data. The results were inputted into the STRING database, which maps out functional protein association networks¹⁶. As expected, HIF1 α precipitated with known regulators such as thioredoxin-1 (TXN-1), a redox protein involved in HIF1 α stabilization and activity¹⁷(**Figure 1E; Supplemental Table 1**). Interestingly, we also found HSPA5 within the interactome of HIF1 α . HSPA5 (or glucose-regulated protein (GRP) 78) is a critical chaperone involved in UPR signaling⁸⁻¹⁰. To analyze and visualize the signaling

pathways of HIF1 α interactome during hypoxia, we ran the MS/MS results on the Reactome signaling database¹⁸. This revealed pathway of cellular metabolism, specifically those involved in the UPR, including the activation by the UPR sensor ATF6 of the induction of chaperone genes (such as HSPA5) (**Figure 1 F-G**). As the UPR signaling pathway consists of three ER-bound transmembrane sensors, PERK, IRE1 α and ATF6⁸⁻¹⁰, we investigated the potential involvement of each UPR effector with HIF1 α under hypoxic conditions. Immunoprecipitation of HIF1 α in J774 cells under hypoxia followed by immunoblotting confirmed that HSPA5 interacted with HIF1 α (**Supplemental Figure 1C**). Interestingly, of all the three UPR effectors, only IRE1 α co-immunoprecipitated with HIF1 α under hypoxic stress, while PERK and ATF6 did not (**Figure 1H-I**). Together, these data suggest a potential collaboration between HIF1 α and IRE1 α pathways in macrophages during adaptation to conditions of low oxygen tension.

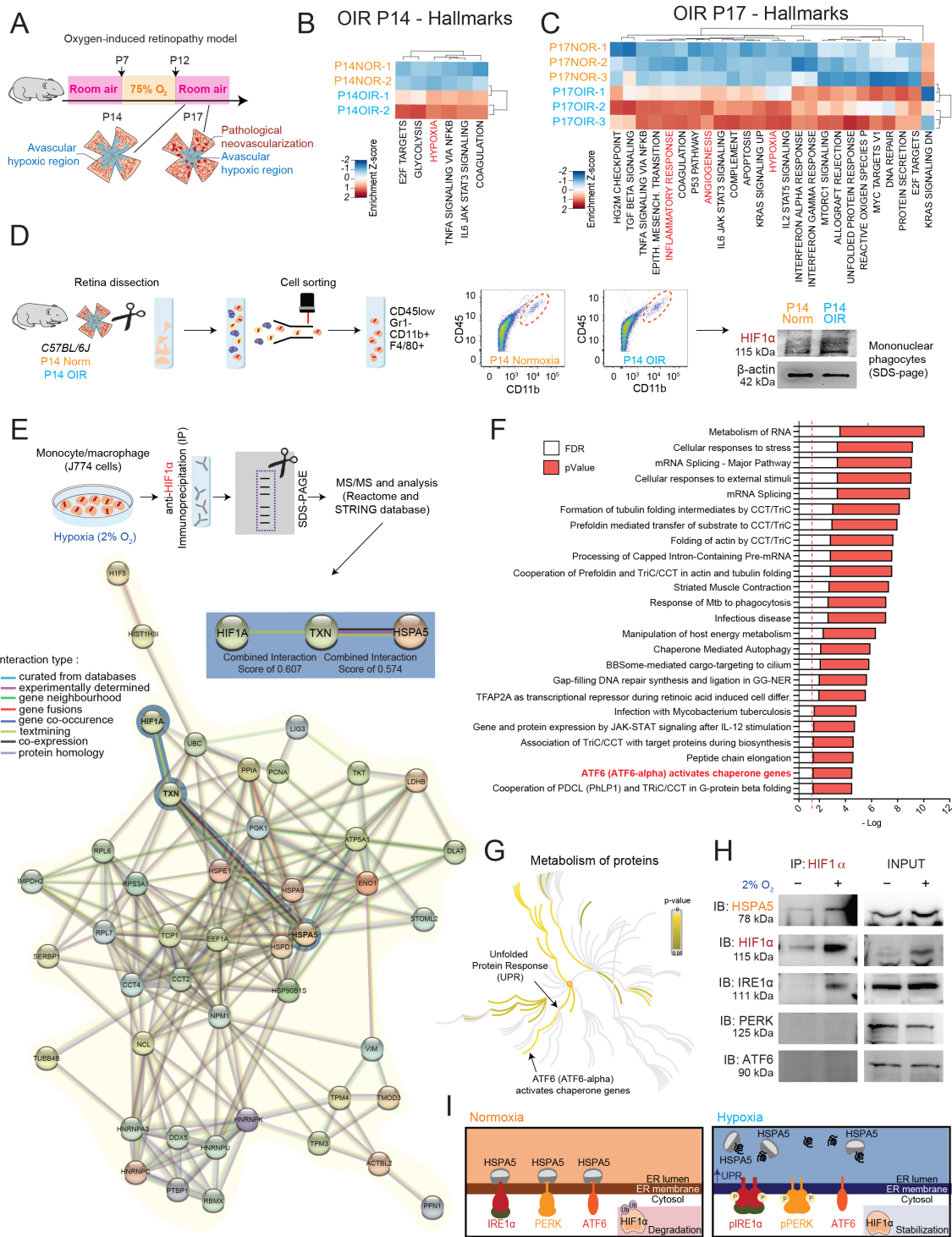


Figure 1. HIF1 α and IRE1 α pathways co-regulate cellular responses to hypoxia in macrophages. (A) Schematic representation of the OIR mouse model. **(B)** Gene set variation analysis (GSVA) of RNA-seq data from P14 and **(C)** P17 normoxic and OIR retinas indicates

significantly different pathways affected and the main hits. At P14 when the retina is still avascular, pathways associated with hypoxia response (Pvalue= 0.0037) are enriched and at P17 when there is maximal preretinal neovascularization, pathways involved in hypoxia (Pvalue=0.0001), inflammatory (Pvalue=0.0017) and angiogenesis (Pvalue=5.50E-08) responses are significantly upregulated. n=2-3 mice per condition. For P14, $p < 0.05$ and > 0.2 logFC and for P17, $p \text{ adj} < 0.05$ and > 0.2 logFC). **(D)** Immunoblot showing HIF1 α stabilization in mononuclear phagocytes (CD45^{low}, Gr1⁻, CD11b⁺, F4/80⁺) FACS-recovered from normoxic and OIR retinas at P14. **(E)** STRING database representation of the protein interaction network of HIF1 α immunoprecipitated from J774 macrophages under hypoxia (2%O₂ for 8h) and subjected to tandem mass spectrometry (MS/MS). Proteins including the unfolded protein response (UPR) chaperone HSPA5 gene are highlighted in blue. **(F)** Reactome pathway analysis of the MS/MS hits shows enrichment for proteins involved in the UPR. **(G)** Reactome over-representation analysis showing pseudocolored nodes according to their p-values. UPR pathway is enriched in proteins from hypoxic J774 macrophages (in yellow). Brighter colors represent nodes with lower p-values (higher activation). **(H)** Co-immunoprecipitation of HIF1 α in J774 macrophages under normoxia (21% O₂) and hypoxia (2% O₂) for 1h followed by immunoblotting (IB) for UPR sensors IRE1 α , PERK and ATF6 (n= 3 independent experiments). **(I)** Schematic representation of the UPR pathway in normoxia and hypoxia.

IRE1 α kinase activity is required for HIF1 α expression in macrophage response to hypoxia.

To study the interplay between HIF1 α and IRE1 α pathways, we next investigated the contribution of both cytosolic kinase and endoribonuclease functions of IRE1 α and examined how they affect its interaction with HIF1 α . Upon activation *via* trans-autophosphorylation IRE1 α acquires endoribonucleolytic activity to cleave selected mRNAs and promote the splicing of XBP1 into an active transcription factor, XBP1s^{8-10, 19, 20}. XBP1s regulates the expression of genes involved in the ER homeostasis^{8-10, 19, 20}. IRE1 α kinase activity on the other hand is associated with the induction of the inflammatory response^{8-10, 21}.

We first performed a time course to assess the expression of HIF1 α and the phosphorylation of IRE1 α in J774 cells under conditions of low oxygen levels. Consistent with their known roles as principal cellular adaptive proteins during conditions of stress such as hypoxia, HIF1 α

expression and IRE1 α phosphorylation were greatly upregulated through the duration of the hypoxic stimulus (**Figure 2A**). We then assessed the localization and association of HIF1 α and IRE1 α by immunofluorescence. We performed confocal microscopy imaging of hypoxic COS-7 cells transiently transfected with both pFuse-IRE1 α _eGFP and pFuse-HIF1 α _mCherry plasmids (**Supplemental Figure 2A**). Increased colocalization between IRE1 α and HIF1 α was detected in COS-7 cells upon hypoxic stimulus (**Figure 2B**).

To investigate which functional domain of IRE1 α is important for the HIF1 α /IRE1 α hypoxia-induced interaction, we assessed the effects of IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c and kinase inhibitor KIRA6²² (**Figure 2C**). The inhibition of IRE1 α kinase domain following KIRA6 treatment greatly reduced hypoxia-induced HIF1 α protein expression/stabilization and also led to a reduced interaction with IRE1 α during hypoxia (**Figure 2D**). However, IRE1 α endoribonuclease inhibition with 4 μ 8c had no effect on hypoxia-induced HIF1 α protein expression/stabilization (**Figure 2D**). We next investigated if the kinase activity of IRE1 α could affect HIF1 α cellular localization, which can vary due to its role as a transcription factor. Subcellular fractionation of KIRA6-pretreated macrophages under hypoxic conditions confirmed that HIF1 α expression/stabilization was affected. In both the cytoplasm and nucleus, the kinase activity of IRE1 α is required for HIF1 α protein expression and stability in myeloid cells under hypoxic conditions (**Figure 2E**). Given the importance of phosphorylation in HIF1 α regulation^{23,24}, we performed co-immunoprecipitation using a pan-serine/threonine antibody in hypoxic and normoxic macrophages. Our results showed immunoprecipitated HIF1 α in hypoxic macrophages in control or 4 μ 8c pretreated conditions (**Supplemental Figure 2B**). Using a pan-tyrosine antibody did not reveal any HIF1 α co-immunoprecipitation (data not shown). This result suggests that HIF1 α could be serine and/or threonine phosphorylated by IRE1 α , and that IRE1 α kinase activity is needed for HIF1 α stabilization during hypoxia. We then focused on investigating how the kinase activity of IRE1 α induces the loss of HIF1 α protein expression under hypoxic conditions. Given the well-described ubiquitin-dependent process responsible for HIF1 α degradation³⁻⁶, we sought to determine if the IRE1 α kinase domain plays a role in protecting HIF1 α from ubiquitination and subsequent proteasomal degradation (**Supplemental Figure 2C**). We used the proteasome inhibitor MG132 and performed immunoprecipitation of

HIF1 α followed by an immunoblot of a monoclonal ubiquitin antibody in hypoxic macrophages treated with IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 (**Supplemental Figure 2C**). Our results showed that the reduced expression of HIF1 α protein during hypoxia in presence of KIRA6 could not be explained by the ubiquitination process followed by proteasomal degradation. In KIRA6 conditions, low levels of ubiquitinated HIF1 α were observed compared to controls (**Supplemental Figure 2C**). This strongly suggested that the kinase domain of IRE1 α does not affect HIF1 α degradation *via* ubiquitination, advancing the possible regulation of HIF1 α gene expression transcripts. We therefore investigated if the loss of HIF1 α stabilization during hypoxia in presence of KIRA6 could be explained by the downregulation of HIF1 α transcript levels. We performed reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) to measure HIF1 α mRNA transcripts in J774 macrophages treated with IRE1 α inhibitors (4 μ 8c and KIRA6) under hypoxic conditions. We observed that HIF1 α hypoxia-upregulated expression was blunted in hypoxic J774 macrophages treated with IRE1 α inhibitors compared to the untreated controls (**Figure 2F**). To further consolidate our observation, we used LysM-cre driver mice bred with *IRE1 α* or *HIF1 α* floxed mice. Collected peritoneal macrophages from transgenic mice with myeloid-specific ablation of IRE1 α (LysM-cre *IRE1 α* ^{-/-}) or HIF1 α (LysM-cre *HIF1 α* ^{-/-}), were subjected to hypoxic conditions. We assessed protein and gene expression in peritoneal macrophages HIF1 α and IRE1 α deficient. Similarly to our results obtained with J774 macrophages treated with KIRA6, hypoxic IRE1 α -deficient peritoneal macrophages harbored reduced levels of HIF1 α protein levels (**Figure 2G**) and mRNA levels (**Figure 2H**) compared to hypoxic LysM-cre controls. Furthermore, we did not observe any effect of HIF1 α depletion on IRE1 α phosphorylation (pIRE1 α ^{S724}, **Figure 2G**) or gene expression (*Ern1*, **Figure 2I**) in hypoxic LysM-cre *HIF1 α* ^{-/-} peritoneal macrophages compared to LysM-cre hypoxic controls. These results strongly support a regulatory role for IRE1 α on HIF1 α transcription upon hypoxic stress.

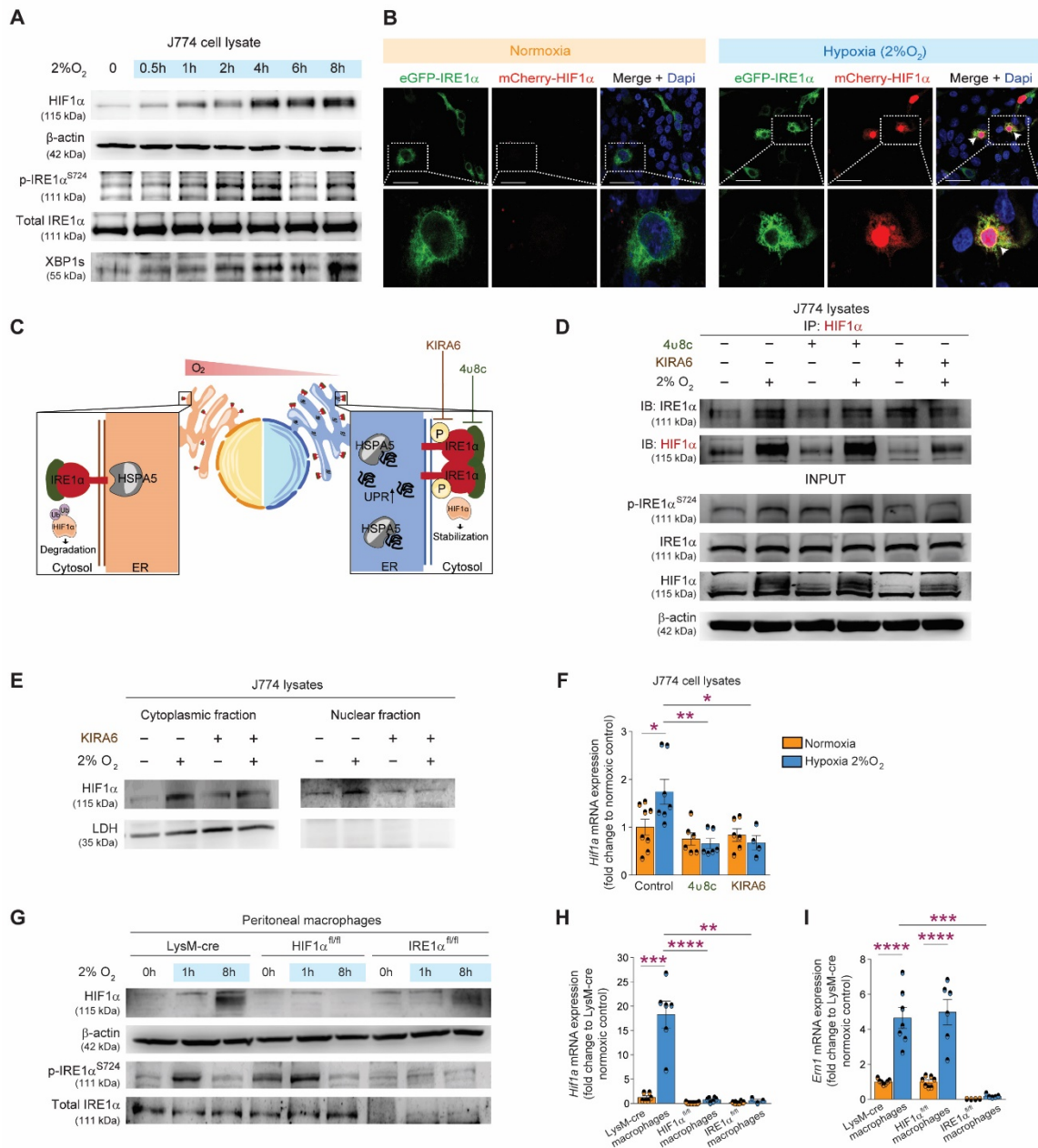


Figure 2. IRE1 α kinase activity is important for HIF1 α production in macrophage response to hypoxia. (A) Immunoblot time course from J774 macrophage cell lysates under hypoxia probed for HIF1 α stabilization, IRE1 α phosphorylation and expression (n= 3 independent experiments). **(B)** Representative confocal microscopy images of COS-7 cells transiently transfected with plasmids for HIF1 α (pFuse-HIF1 α _mcherry) and IRE1 α (pFuse-

IRE1 α _eGFP) under hypoxia (2% O₂) showing a colocalization between HIF1 α and IRE1 α compared to normoxia (21% O₂). Scale bars: 50 μ m. Insets are high-magnification images of the outlined areas (white arrows). **(C)** Schematic model of IRE1 α and HIF1 α signaling in hypoxic macrophages. **(D)** Co-immunoprecipitation of HIF1 α and IRE1 α in hypoxic (2% O₂ for 1h) J774 macrophages preincubated for 1h with IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c 100 μ M or IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 1 μ M (n= 3 independent experiments). **(E)** Immunoblots showing HIF1 α stabilization in cytosolic and nuclear fractions of hypoxic (2% O₂ for 1h) J774 cells pretreated with IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 1 μ M for 1h. LDH antibody was used as a positive control to assess the purity of the cytosolic fraction. (n= 3 independent experiments). **(F)** RT-qPCR analysis of *Hif1 α* mRNA expression in hypoxic (2% O₂ for 8h) J774 cells preincubated for 1h with IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c (100 μ M) or IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 (1 μ M). n=3-8 per condition, unpaired two-tailed t-test. **(G)** Immunoblots for HIF1 α stabilization, IRE1 α activation and expression in peritoneal macrophages from myeloid-specific *HIF1 α* -deficient (LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}*) or myeloid-specific *IRE1 α* -deficient (LysM-cre/*IRE1 α ^{fl/fl}*) mice and their control LysM-cre/*HIF1 α ^{+/+}*/*IRE1 α ^{+/+}* mice under normoxia (21% O₂) or hypoxia (2% O₂ for 1h and 8h) conditions (n= 3 independent experiments). **(H)** RT-qPCR analysis of *Hif1 α* and **(I)** *Ern1* mRNA expression in LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}* or LysM-cre/*IRE1 α ^{fl/fl}* peritoneal macrophages and their control LysM-cre/*HIF1 α ^{+/+}*/*IRE1 α ^{+/+}* mice under normoxic (21% O₂) or hypoxic (2% O₂ for 8h) conditions. n= 3-12 per condition. Data expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis: unpaired two-tailed t test (****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05).

IRE1 α /XBP1 and HIF1 α collaboration is important for myeloid inflammatory response secondary to a hypoxic stimulus.

XBP1 is a key transcription factor that regulates the mammalian unfolded protein response downstream of the IRE1 α branch ^{11,19,20}. Given the importance of IRE1 α kinase activity on the efficiency of its endoribonuclease activity ²², we next verified the effect of IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 on the splicing of XBP1 mRNA to produce XBP1s. We observed a significant

decrease in the production of XBP1s in hypoxic J774 macrophages pretreated with KIRA6 compared to the untreated hypoxic controls (**Figure 3A-B**). The IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c was used as a positive control confirming the reduction of XBP1 splicing (**Figure 3A-B**). To evaluate the potential contribution of IRE1 α /XBP1 signaling in a pathological context, we analyzed the expression of XBP1s in the vitreous and leukocytes from patients suffering from proliferative diabetic retinopathy (PDR) compared to controls. Compared to healthy patients, PDR samples displayed increased XBP1s expression (**Figure 3C, Supplemental Figure 3B and Supplemental Table 2**). The increased presence of XBP1s in PDR patient samples confirmed the relevance of assessing the IRE1 α /XBP1 pathway and its impact on HIF1 α signaling in the context of ischemic retinopathies.

Of interest, a recent study showed evidence in a tumoral context, where hypoxia is present, of an association between HIF1 α and XBP1 to enhance HIF1 α transcriptional activity²⁵. We set out to determine if this cooperation occurs in oxygen-deprived MNP. Co-immunoprecipitation results showed an interaction between HIF1 α and XBP1s both in the cytoplasmic and nuclear compartments under the hypoxic condition (**Supplemental Figure 3A**). As IRE1 α /XBP1 and HIF1 α signaling pathways partake in hypoxia-induced expression of pro-inflammatory genes⁴, we sought to assess how the interaction of these pathways affect the inflammatory response in hypoxic myeloid cells. We hypothesized that the crosstalk between IRE1 α /XBP1 and HIF1 α signaling pathways could enhance hypoxia-induced pro-inflammatory gene expression. We therefore measured the mRNA expression levels of pro-inflammatory cytokines (*Il6*, *Il1 β* and *Tnf α*) in hypoxic J774 macrophages (**Figure 3D**). In contrast to the non-treated hypoxic macrophages, the 4 μ 8c and KIRA6 pretreated hypoxic cells displayed a significant decrease of pro-inflammatory cytokine expression (**Figure 3E**). Interestingly, *Vegfa* mRNA transcripts expression still increased in hypoxic macrophage where IRE1 α endoribonuclease activity was inhibited (**Figure 3E**). We speculated that the levels of *Vegfa* mRNA transcripts could still be increased in the absence of IRE1 α via another compensatory mechanism during conditions of low oxygen tension. To further explore the IRE1 α /HIF1 α signaling pathways crosstalk, we collected IRE1 α and HIF1 α -deficient microglial cells (a cell type relevant in the context of ischemic proliferative retinopathies) from brains of transgenic mouse pups at postnatal day P3-

P5, and subjected them to hypoxia (**Figure 3F**). We analysed the levels of mRNA transcripts implicated in the inflammatory response. In agreement with our previous results on hypoxic J774 macrophages, RT-qPCR on hypoxic LysM-cre *IRE1 α* ^{-/-} or LysM-cre *HIF1 α* ^{-/-} microglia, where the cooperation between IRE1 α and HIF1 α is absent, revealed a significant decrease in the expression of major pro-inflammatory cytokines *Il6*, *Il1 β* (**Figure 3G**). *Tnf α* , another important cytokine involved in inflammation process, also had a reduced mRNA expression in hypoxic KIRA6-pretreated LysM-cre *IRE1 α* ^{-/-} microglia but was still induced in LysM-cre *HIF1 α* ^{-/-} microglia (**Figure 3G**). The pro-angiogenic factor *Vegfa* expression was not compromised in HIF1 α and IRE1 α deficient microglia (**Figure 3G**). These results show that in the absence of HIF1 α or IRE1 α likely some inflammatory cytokines could still be produced *via* compensatory mechanisms²⁶.

We next investigated the effect of IRE1 α -selective loss of endoribonuclease or kinase activities on the transcription of HIF1 α target genes during hypoxia by using ChIP-qPCR (**Figure 3H**). As expected, we found a significant increase in the expression of HIF1 α target genes including *Vegfa*, *Il6* and *Il1 β* in hypoxic J774 macrophages (**Figure 3H**). However, IRE1 α blockade of either endoribonuclease or kinase domains with 4 μ 8c or KIRA6, respectively, suppressed *Vegfa*, *Il6* and *Il1 β* expression induced by HIF1 α under hypoxic conditions (**Figure 3H**). Taken together, these findings strongly support the regulatory role of IRE1 α in driving HIF1 α -induced inflammatory gene transcription in myeloid cells during hypoxia.

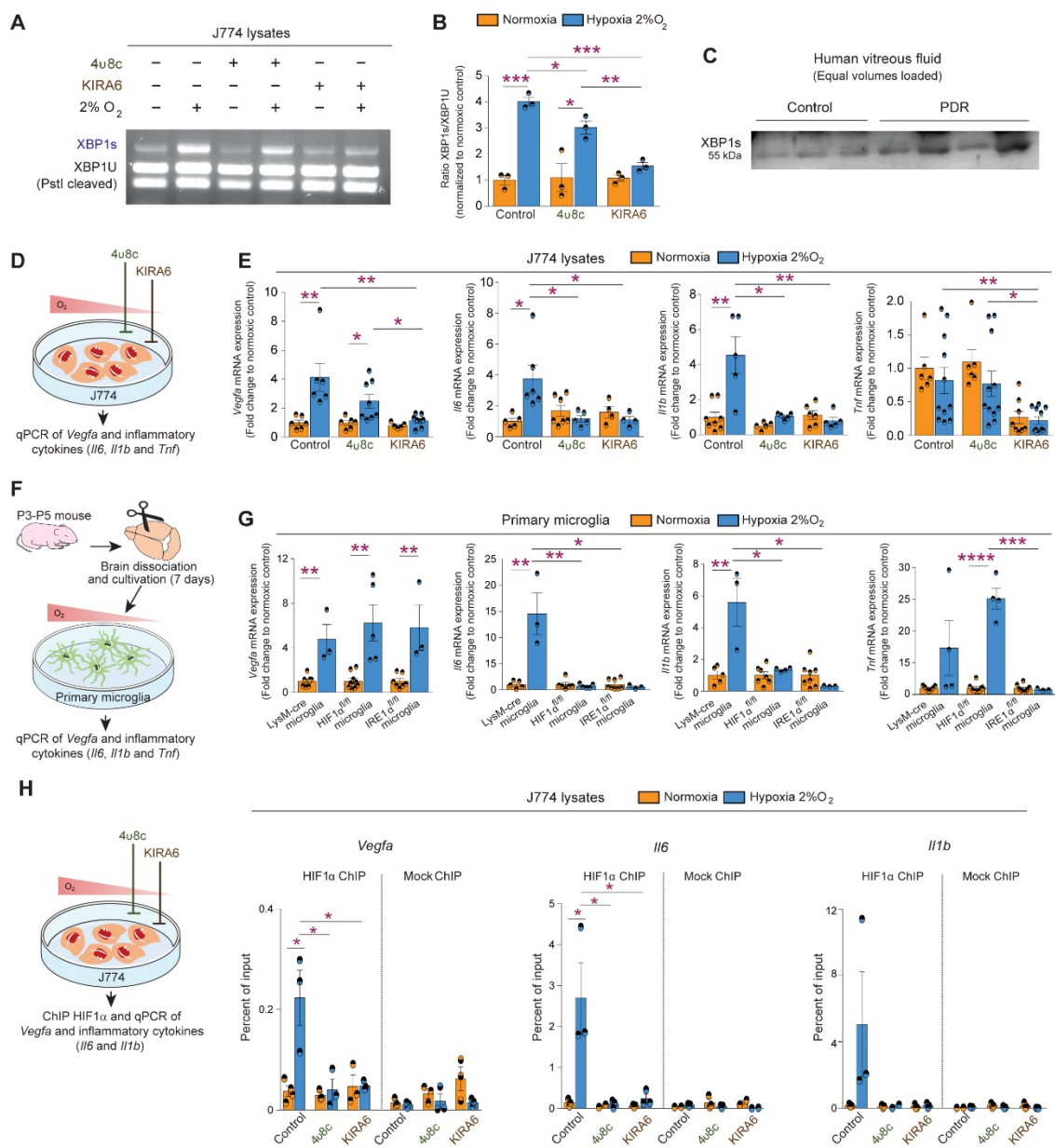


Figure 3. IRE1 α /XBP1 and HIF1 α collaboration is important for myeloid inflammatory response secondary to a hypoxic stimulus. (A) Agarose gel of PstI-cleaved *Xbp1* cDNA amplicons from hypoxic (2% O₂ for 8h) J774 cells pretreated with IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c or IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 for 1h followed by (B) a ratiometric quantification of spliced to total *Xbp1* cDNAs. n= 3 per condition, unpaired two-tailed t test. (C) Immunoblot for XBP1s expression on equal volume (10 μ L) of vitreous humor from patients with proliferative diabetic retinopathy and their control (n=3 control and n= 4 PDR patients).

(D-E) RT-qPCR analysis of *VegfA*, *Il1b*, *Il6* and *Tnf* mRNA expression in hypoxic (2% O₂ for 8h) J774 cells preincubated for 1h with IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c or IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 and **(F-G)** in microglia cells from LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}* or LysM-cre/*IRE1 α ^{fl/fl}* mice and their control LysM-cre/*HIF1 α ^{+/+}*/*IRE1 α ^{+/+}* mice under normoxic (21% O₂) or hypoxic (2% O₂ for 8h) conditions. n= 3-8 per condition. **(H)** ChIP-qPCR of *VegfA*, *Il6* and *Il1b* in hypoxic (2% O₂ for 8h) J774 macrophages preincubated for 1h with IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c (100 μ M) or IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 (1 μ M) (n= 3 independent experiments). ChIP assay was performed using anti-HIF1 α polyclonal antibody for the detection of enriched DNA fragments. Percent of input represents the signals obtained from the HIF1 α ChIP over the signals of the respective input sample. Data expressed as mean \pm SEM. Statistical analysis: unpaired two-tailed t test (****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05).

Myeloid-resident HIF1 α and IRE1 α regulate the inflammatory response during ischemic retinopathy.

Given the prominent role of myeloid cells in vascular remodeling during ischemic retinopathies, we investigated the contribution of myeloid-resident IRE1 α and HIF1 α cooperation in the inflammatory profiles of ischemic retinas. We found that the retinas of the LysM-cre/*IRE1 α ^{fl/fl}* or LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}* mice displayed significantly less inflammatory and angiogenic cytokines such as *Il1 β* , *Il6*, *Tnf α* and *Vegfa* at P14 and P17 OIR compared to LysM-cre control retinas **(Figure 4A-B)**.

We next sought to evaluate the OIR-induced vascular phenotype in our transgenic mice: LysM-cre/*IRE1 α ^{fl/fl}*, LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}* and double knockout LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}*/*IRE1 α ^{fl/fl}* mice. We collected and flatmounted retinas at P14 and P17 and incubated them with isolectinB4 to determine the extent of avascular areas at P14 and P17, and we assessed pre-retinal neovascularization at P17 using ImageJ with the SWIFT-NV method. The avascular areas in ischemic retinas at P14 showed no difference **(Figure 4C-D)**. Importantly, at P17, the phase of pathologic neovascularization identified by formation of tufts, the depletion of IRE1 α , HIF1 α or both, in myeloid-resident cells profoundly reduced the destructive retinal neovascularization associated with ischemic retinopathy **(Figure 4E-H)**. Interestingly, myeloid depletion of IRE1 α alone drove a prompter revascularization in the retina at P17 OIR, as revealed by the

significant decrease of the avascular area (**Figure 4E-H**). This result consolidates the pivotal role of the IRE1 α -UPR axis in ischemic retinopathy ²⁷.

Collectively, our findings suggest that myeloid cells, through the crucial contribution of the UPR sensor IRE1 α and the HIF1 α -mediated hypoxia response, may partake in the progression of ischemic proliferative retinopathy. Our data also suggest that the hypoxic setting relevant to ischemic proliferative retinopathies drives an activation and collaboration between HIF1 α and IRE1 α pathways in myeloid cells. We speculate that HIF1 α and IRE1 α could act as primary candidate co-regulators of the pathogenic activities of mononuclear phagocytes through their contribution to the inflammatory response during ischemic retinopathy.

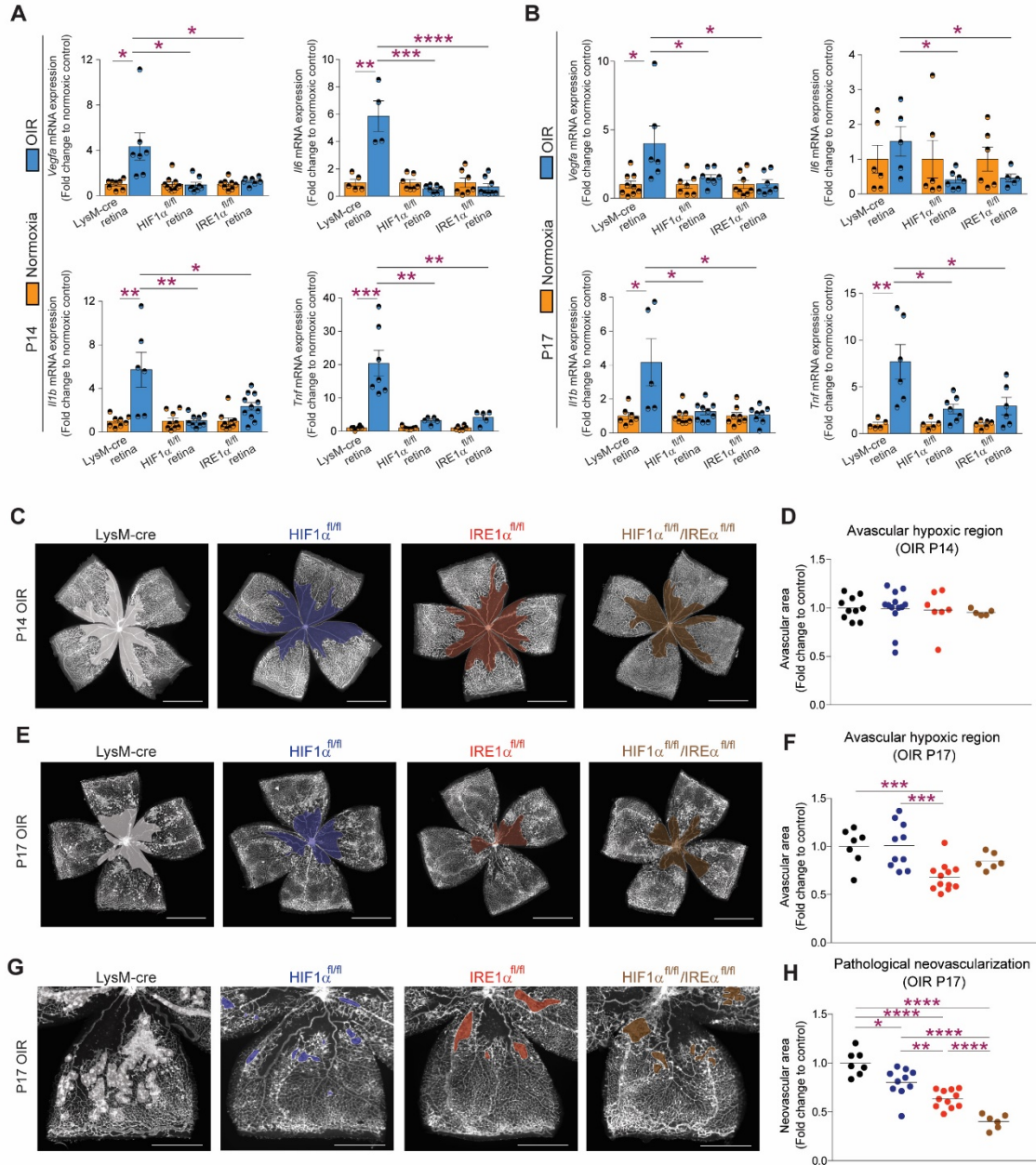


Figure 4. Myeloid-resident HIF1 α and IRE1 α regulate the inflammatory response during ischemic retinopathy. (A) RT-qPCR analysis of *VegfA*, *Il1b*, *Il6* and *Tnf* mRNA expression in retinas from LysM-cre/*HIF1 α ^{fl/fl}* or LysM-cre/*IRE1 α ^{fl/fl}* mice and their control LysM-cre/*HIF1 α ^{+/+}*/*IRE1 α ^{+/+}* mice conditions at P14 and (B) P17 under normoxia and OIR conditions. n=5-8 retinas per condition, unpaired two-tailed t test. Results are shown as a fold change relative to respective normoxia control for each time point \pm SEM. (C-H) LysM-

cre/*HIF1α*^{fl/fl}, LysM-cre/*IRE1α*^{fl/fl}, LysM-cre/*HIF1α*^{fl/fl}/*IRE1α*^{fl/fl} mice and their control LysM-cre/*HIF1α*^{+/+}/*IRE1α*^{+/+} mice were subjected to OIR, and retinas were collected at P14 and P17, flat mounted, and stained with isolectin B4. **(C-D)** LysM-cre/*HIF1α*^{fl/fl}, LysM-cre/*IRE1α*^{fl/fl} and LysM-cre/*HIF1α*^{fl/fl}/*IRE1α*^{fl/fl} mice showed no difference in the avascular hypoxic region at P14 compared to the control LysM-cre/*HIF1α*^{+/+}/*IRE1α*^{+/+} mice. **(E-F)** Only LysM-cre/*IRE1α*^{fl/fl} mice had reduced avascular hypoxic region at P17 and **(G-H)** LysM-cre/*HIF1α*^{fl/fl}, LysM-cre/*IRE1α*^{fl/fl} and LysM-cre/*HIF1α*^{fl/fl}/*IRE1α*^{fl/fl} mice showed a reduced preretinal pathological neovascularization at P17 compared to the control LysM-cre/*HIF1α*^{+/+}/*IRE1α*^{+/+} mice. n=5-13 retinas per group. Scale bars :10μm (for the whole flatmount of retina) and 5μm (for one petal of retina flatmount). Data expressed as mean ± SEM. Statistical analysis: unpaired two-tailed t test (****p < 0.0001, ***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.05).

DISCUSSION

We recently demonstrated the critical role of a subset of myeloid-derived mononuclear phagocytes (MNP) in ischemic-driven pathological angiogenesis¹⁵. To better understand the hypoxic response in MNPs during low oxygen conditions, we immunoprecipitated *HIF1α* and performed tandem mass spectrometry (MS/MS) to gain new insights on its binding partners²⁸. One interesting candidate was the Heat Shock Protein Family A member 5 (HSPA5). HSPA5 known also as GRP78 is an ER stress chaperone, which plays an important role in the UPR signaling⁸⁻¹⁰. In ischemic/hypoxic conditions, cellular metabolism is compromised and endoplasmic reticulum (ER) homeostasis is disturbed by the accumulation of misfolded proteins in its lumen. Cells trigger a set of conserved pathways known as ER stress, or unfolded protein response, initiated by three axes: the protein kinase RNA-like ER kinase/ activating transcription factor 4 (PERK/ATF4) axis, the inositol-requiring enzyme-1α/X-box binding protein-1 (*IRE1α* / XBP1) axis, and the activating transcription factor 6 (ATF6) axis⁸⁻¹⁰. Co-immunoprecipitation experiments of *HIF1α* performed on J774 macrophages under hypoxic conditions revealed an interaction with the ER stress sensor *IRE1α*, but not PERK or ATF6. Considering the fact that a previous study has shown the *HIF1α*/XBP1 association in tumoral and low oxygen conditions

²⁵, our results in hypoxic conditions not only consolidate this interactive downstream relationship, but show for the first time that HIF1 α interacts with IRE1 α , upstream of XBP1. Our data also established that this critical interaction in oxygen-deprived myeloid cells is important for the regulation of inflammatory targets in ischemic retinopathy. Consequently, myeloid deficiency of IRE1 α and HIF1 α is beneficial for proper retinal vascular regrowth in proliferative ischemic retinopathies.

As our understanding of the mechanisms driving the pathogenesis of ocular diseases broadens by virtue of human tissues, primary human cell lines and animal models, it has become clear that the UPR response is involved. Indeed, its activation has been detected in human glaucomatous cells and tissues ²⁹, and mouse models of diabetic retinopathy ³⁰, retinopathy of prematurity ²⁷, and retinal degeneration ³¹. The retinal cell populations driving this UPR response are diverse, including neurons ^{27, 32}, Müller glia ³³, pericytes ^{34, 35} and trabecular meshwork cells ²⁹. Although immune cells are always implicated in the process of inflammation secondary to UPR activation, this study is the first (to our knowledge) to implicate the primary UPR response within retinal immune cells. We found a collaboration between two primordial adaption mechanisms, a more primitive that to oxygen sensing, and one to noxious environmental stressors, the innate immune response. Our work uncovered a new paradigm associating HIF1 α -induced hypoxia response to IRE1 α /XBP1 signaling in myeloid cells. IRE1 α function is typically associated with the unfolded protein response. In our study, we showed that IRE1 α regulates HIF1 α , allowing cytokine production. Our study suggests that IRE1 α acts as a stabilizer of HIF1 α and that the kinase domain of IRE1 α is needed in this interaction. We speculate that this interaction further contributes to engaging macrophages in their HIF1 α -hypoxia adaptive response, which includes the release of inflammatory cytokines. Future work should emphasize on finding whether the IRE1 α /HIF1 α association is direct or not and determine the sequence of amino-acids residues involved in their interaction. The interplay of the UPR in cellular response to hypoxia consolidates its role as a major factor partaking in the progression of vascular pathologies that are linked to hypoxia. This approach would surely be relevant in developing therapeutic strategies in order to modulate CNS pathological inflammation which is detrimental in ocular diseases such as ischemic proliferative retinopathies but also other ischemic vascular diseases.

METHODS

Animals

All studies were performed according to the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and were approved by the Animal Care Committee of the University of Montreal in agreement with the guidelines established by the Canadian Council on Animal Care. C57BL/6J, LysM-cre and *HIF1 α* floxed mice were purchased from The Jackson Laboratory and CD1 nursing mothers from Charles River Laboratory. *IRE1 α* floxed mice were a kind gift from Dr R J Kaufman (University of Michigan Medical Center).

Human samples and vitrectomy

Patients with proliferative diabetic retinopathy and controls (macular hole or epiretinal membrane detachment) were followed and operated by a single vitreoretinal surgeon (F.A. Rezende; HMR). The study protocol conforms to the Helsinki tenets and the institutional human clinical protocol. Informed consent was obtained from Maisonneuve-Rosemont Hospital (HMR) ethics committee (Ref CER:13082).

O₂-induced retinopathy

Mouse pups (LysM-Cre/*HIF1 α* ^{+/+}/*IRE1 α* ^{+/+}, LysM-cre/*HIF1 α* ^{fl/fl}, LysM-cre /*IRE1 α* ^{fl/fl} or LysM-cre/*HIF1 α* ^{fl/fl} /*IRE1 α* ^{fl/fl}) and their fostering mothers (CD1, Charles River) were exposed to 75% O₂ from postnatal day (P)7 to P12 and returned to room air. This model serves as a proxy to human ocular neovascular diseases such as diabetic retinopathy, which is characterized by a late phase of destructive pathological angiogenesis. Upon return to room air, hypoxia-driven neovascularization develops from P14 onward. We enucleated eyes at different time points and dissected the retinas for FACS analysis or mRNA analysis. In other experiments, dissected retinas were flat-mounted and incubated overnight with Fluorescein Lectin (#ZD0118, Vector Labs, 1:100) in PBS1x to determine the extent of avascular area or neovascularization area at P17 using ImageJ and the SWIFT-neovascularization method. Avascular areas are calculated by dividing the central capillary free area by the total retinal area. The percentage of

neovascularization is calculated by dividing the area of neovascular tufts (saturated lectin-stained vasculature on the surface of the retina) by the total area of the retina.

Cell culture and transfection studies

J774 cells were cultured in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2.0 mM L-glutamine, 1.5 mg/mL sodium bicarbonate, 1% streptomycin/penicillin. For stimulation experiments, cells were previously starved for 5 hours in the basal medium (without fetal bovine serum). Pre-treatment with 100 μ M 4 μ 8c (#412512, EMD Millipore) or 1 μ M KIRA6 (#532281, Calbiochem) was done 1h prior to stimulation with 2%O₂ (1h for co-immunoprecipitation experiments and 8h for MS/MS experiment, RNA isolation and XBP1 splicing analysis).

COS-7 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum, 2.0 mM L-glutamine, 1% streptomycin/penicillin. COS-7 cells were transfected with expression plasmids HIF1 α _mcherry and IRE1 α _eGFP using PEI (#764604, Sigma) according to manufacturer's instructions. 48 h post-transfections, cells were stimulated 10min with 2%O₂.

FACS and cell sorting of digested retinas

Retinas from WT mice were homogenized and incubated in a solution of 750U/mL DNase I (#69182, Sigma) and 0.5mg/mL collagenase D (# 11088882001, Roche) for 15 minutes at 37°C with gentle shaking. Homogenates were then filtered with a 70 μ m cell strainer and washed in PBS1x 3% FBS. Retina cell suspension was incubated with LEAF purified anti-mouse CD16/32 (# 101301, Biolegend) for 15 minutes at room temperature to block Fc receptors. Cells were then incubated for 30 minutes at room temperature with the following antibodies: FITC anti-mouse/human CD11b (# 101206, Biolegend), PE/CY7 anti-mouse Ly-6G/Ly-6C (Gr-1; #108416, Biolegend), Pacific Blue anti-mouse F4/80 (#122612, Biolegend) and 7AAD (# 559925, BD Bio-sciences). Microglia/macrophages cells were sorted on a BD ARIA III and processed for western blot assay.

Isolation of Primary Microglia

Brains from P1-P4 pups were homogenized in ice-cold L15 medium (GIBCO) and incubated for 15 min in 0.05% trypsin-EDTA (#59417C, Sigma) at 37°C. The reaction was stopped by addition of equal volumes of fetal bovine serum. We added 75 U/mL of DNase I (#69182, Sigma) before filtering through a 70 mm cell strainer. After 9 days of incubation in DMEM media (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin/streptomycin, 0.2% fungizone and GM-CSF. Microglia were detached from the plates by gentle shaking (150 rpm for 5h at 37°C) and plated for hypoxic experiments (8h with 2%O₂) and RT-PCR analysis.

Primary peritoneal macrophages culture

Adult LysM-Cre/*HIF1α*^{+/+}/*IRE1α*^{+/+}, LysM-cre/*HIF1α*^{fl/fl} or LysM-cre/*IRE1α*^{fl/fl} mice (8-12 weeks old) were anesthetized with 2% isoflurane in oxygen 2 l/min and then euthanized by cervical dislocation. Then, a small incision in abdominal skin of mouse was performed. Skin was pulled to each size of the mouse, and the peritoneal cavity was washed with 5 ml PBS1x 3% FBS for 2 minutes. Then, the harvested cells were centrifuged for 5 minutes at 100 g, resuspended in medium (DMEM F12 plus 10% FBS and 1% streptomycin/penicillin), and plated. After 1h of culture at 37°C in a humidified incubator with 5% CO₂, the medium was changed and cells were cultured for the next 24 hours in the same conditions before their hypoxic stimulation (8h with 2%O₂) and RT-PCR assay.

Immunoprecipitation

For immunoprecipitations, cells were lysed in lysis buffer containing 1% NP- 40, 0.1% SDS, 0.1% Deoxycholic acid, 50 mM Tris (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 20 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate and 1 mM sodium orthovanadate. Soluble proteins were incubated with primary antibodies (2 μg) at 4°C overnight with agitation. The following antibodies were used: Rabbit anti-HIF1α (#100479, Novus Biologicals), Rabbit anti-GRP78 (or HSPA5; #21685, Abcam) and Rabbit anti-XBP1 (#sc-7160, Santa-cruz). 50 μL Protein A-Sepharose (#P9424, Sigma) were added and incubated for 2h at 4°C with agitation. The immune complexes were precipitated by centrifugation, washed 4 times with lysis buffer, boiled 5min in Laemmli sample buffer (#1610737, BioRad), separated by SDS-PAGE, transferred onto a

nitrocellulose membrane and western blotted. Antibody detection was performed by a chemiluminescence-based detection system (ECL, #32106, ThermoFisher scientific).

Western blotting

J774 cells and peritoneal macrophages were cultured under hypoxia (2%O₂) at different time points. Protein concentration from cell lysates was assessed by bicinchoninic acid assay (#BCA1, Sigma). Protein lysates were prepared in Laemmli sample buffer (#1610737, BioRad) followed by boiling at 95°C for 5 minutes. The proteins were separated by SDS-PAGE and western blotting was performed by transferring proteins onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked in 5% milk or 5% BSA in TBST.

The primary antibodies used in this study are: anti-HIF1 α (#100479, Novus Biologicals); anti-p^{ser724} IRE1 α (#48187, Abcam), anti-total IRE1 α (#14C10, Cell signaling), anti-XBP1(#sc-7160, Santa-cruz), anti-PERK (#377400, Santa-cruz), anti-ATF6 (#166659, Santa-cruz), anti-phosphoSerine/Threonine (#9631, Cell signaling) and anti-ubiquitin (#sc-8017, Santa-cruz). Secondary antibodies used in this study are: Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate (#1706515, BioRad) and Goat Anti-mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate (#1706516, BioRad). HRP-conjugated blots were developed by using a chemiluminescence-based detection system (ECL, #32106, ThermoFisher scientific).

Preparation of samples for tandem MS/MS

J774 cells were cultured under hypoxia for 8 hrs. Cells lysates concentrations were assessed by bicinchoninic acid assay (#BCA1, Sigma), and then 2mg of protein was immunoprecipitated with HIF1 α antibody. The immunoprecipitate was loaded on an SDS-PAGE gel. Gel fragments were cut and sent for peptide identification by tandem mass spectrometry at the IRIC proteomics center (<https://capca.iric.ca/proteomics>).

Immunofluorescence

COS-7 were cultured on 0.1% gelatin-coated coverslips and transfected as indicated above. Cells were stimulated 10 min with hypoxia 2%O₂, washed briefly with cold PBS1x and fixed

for 15 minutes in PBS1x containing 4% paraformaldehyde. Cells were rinsed with PBS1x and stained with DAPI (#62248, ThermoFisher scientific) for 5 minutes. Coverslips were mounted using Fluoromount (#F4680, Sigma) and observed using a confocal microscope.

For visualization of pan-retinal vasculature, flat-mount retinas were stained with Fluorescein Lectin (#ZD0118, Vector Labs, 1:100) and observed with an epifluorescence microscope.

Real Time PCR analysis

RNA extraction was performed with TRIzol® Reagent (#15596026, ThermoFisher scientific) as suggested by manufacturer protocol. DNase digestion to prevent amplification of genomic DNA was then performed (#18068015, Invitrogen). 5X all in one RT mastermix (#G490, ABM) was used to generate cDNA from 1µg of total RNA. qPCR was performed to quantify gene expression using Bright green 2X qPCR mastermix (#Mastermix-LR, ABM) and was processed with an ABI 7500 Real-Time PCR machine. β - actin was used as a reference gene. Primers are listed in the key resources table.

Xbp1 splicing analysis

We investigated the splicing of XBP1 by incubating the XBP1 semiquantitative PCR product (the primers used are: forward:5'- AAA CAG AGT AGC AGC GCA GAC TGC -3' and reverse:5'- TCC TTC TGG GTA GAC CTC TGG GAG -3') with 0.4 U/mL of PstI enzyme for 5 hrs at 37°C followed by separation on 2.5% agarose gel. Densitometry was performed using ImageJ by comparing the ratio of spliced *versus* unspliced transcript.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

Approximately 1 million of cells were used for each ChIP experiment. Cells were fixed in 1% formaldehyde for 8 minutes at room temperature. 0.125M Glycine was added to stop the fixation, then cells were scraped in ice cold 1X PBS. Cells were pelleted, lysed in a Farnham lysis buffer (5mM PIPES,85mM KCl,0.5% NP-40) supplemented with 100mM PMSF. The lysed cells were sonicated in a sonication buffer (1mM EDTA, 10mM Tris,0,1% SDS supplemented with 100mM PMSF) using a COVARIS machine until a fragment size of 150-500bp was obtained. Sheared chromatin was immunoprecipitated with 2 µg of antibody overnight at 4°C with rotation. The next day, magnetic beads (Magna ChIP Protein A+G

Magnetic Beads; #16663, Sigma) were added to the antibody-chromatin mixes and incubated at 4°C with rotation for 2h. The protein-bound magnetic beads were washed 5X with LiCl IP wash buffer and 1X with TE1x buffer. Cross-links were reversed in 120µL of IP elution buffer (1% SDS and 0.1M NaHCO₃) at 65°C overnight in a PCR cycler. DNA was purified using QIAquick PCR Purification Kit (#28106, Qiagen). qPCR was performed using Bright green 2X qPCR mastermix (#Mastermix-LR, ABM) and was processed with an ABI 7500 Real-Time PCR machine. Anti-IgG immunoprecipitation and 10% input were used as controls. Antibodies used in this study are: anti-HIF1α antibody ChIP Grade (#2185, Abcam) and rabbit IgG polyclonal isotype control ChIP grade (#171870, Abcam).

RNA-seq samples preparation and sequencing

Total RNA was isolated from retinas using the RNeasy Mini Kit (#74104, Qiagen). The mRNA was then purified from 1 µg of total RNA using the Dynabeads mRNA DIRECT Micro Kit (#61021, Thermo Fisher Scientific). Whole-transcriptome libraries were prepared using the Ion Total RNA-Seq Kit v2. The yield and size distribution of the amplified libraries were assessed with Agilent Bioanalyzer using the DNA 1000 Kit. Sequencing was performed on the Ion Chef Instrument (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific).

Gene set enrichment analysis

GSEA was conducted using the GSEA v2.2.1 software provided by the Broad Institute of Massachusetts Institute of Technology and Harvard University. We used GSEA to validate correlation between molecular signatures in the phenotype of interest. Enrichment analysis was conducted with log₂-normalized FPKM data generated by the TopHat/Cuffdiff command pipeline: FPKM values were converted as ratios (FPKM_x/[FPKM_{Normoxia}] mean), then log₂-normalized (log₂[ratio]), and median-centered (log₂ ratio – [log₂ratio_{Normoxia}] mean).

Default parameters were changed as follows: gene sets of interest were found in a catalog of functional annotated gene sets from the Molecular Signature Database; phenotype was permuted 1000 times; phenotype label was defined as “OIR” versus “Normoxia”; gene sets smaller than 15 and larger than 500 were excluded from the analysis; statistic used to score hits was defined as “weighted p2”; and the class separation metric used was “t test.”

Statistical analyses

We used Student's *t* test. *P* values <0.01 and <0.05 were considered statistically significant using Prism software version 5 (GraphPad).

KEY RESOURCES TABLE

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
anti-HIF1 α	Novus Biologicals	Cat# 100479
anti-total IRE1 α	Cell signaling	Cat# 14C10
anti-p ^{ser724} IRE1 α	Abcam	Cat# 48187
anti-XBP1 (M-186)	Santa-cruz	Cat# sc-7160
anti- β actine (8H10D10)	Cell Signaling	Cat# 3700
anti-PERK (B-5)	Santa-cruz	Cat# 377400
anti-ATF6 (F-7)	Santa-cruz	Cat# 166659
anti-GRP78 (HSPA5)	Abcam	Cat# 21685
anti-LDH (H-10)	Santa-cruz	Cat# 133123
anti-Ubiquitin (P4D1)	Santa-cruz	Cat# sc-8017
anti-phosphoSerine/Threonine	Cell signaling	Cat# 9631
CD11b-FITC	Biolegend	Cat# 101206
GR-1-PE/Cy7	Biolegend	Cat# 108416
F4-80-Pacific Blue	Biolegend	Cat# 122612
7AAD	BD-biosciences	Cat# 559925
LEAF purified anti-mouse CD16/32	Biolegend	Cat# 101301
Rabbit IgG, polyclonal - Isotype Control (ChIP Grade)	Abcam	Cat# 171870
anti-HIF1 α antibody ChIP Grade	Abcam	Cat# 2185
Reagents		

4μ8c	EMD Millipore	Cat# 412512
KIRA6	Calbiochem	Cat# 532281
Fluorescein Lectin	Vector Labs	Cat# ZD0118
Trizol	ThermoFisher scientific	Cat# 15596026
DAPI	ThermoFisher scientific	Cat# 62248
Protein A-Sepharose® 4B	Sigma	Cat# P9424
GM-CSF	Peprotech	Cat# 315-03
DNaseI	Sigma	Cat# 69182
Invitrogen™ DNase I, Amplification Grade	Invitrogen	Cat#18068015
Collagenase D	Roche	Cat# 11088882001
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher scientific	Cat# 32106
Laemmli sample buffer	BioRad	Cat#1610737
Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination	Sigma	Cat# BCA1
Pst I restriction enzyme	New England Biolabs	Cat# R0140S
5X all in one RT mastermix	ABM	Cat#G490
Bright green 2X qPCR mastermix	ABM	Cat# MasterMix- LR
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Cat# 74104
Dynabeads™ mRNA DIRECT™ Micro Purification Kit	ThermoFisher scientific	Cat# 61021
Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium	Sigma	Cat# F4680
Polyethylenimine (PEI)	Sigma	Cat#764604
Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)-HRP Conjugate	BioRad	Cat# 1706515
Goat Anti-mouse IgG (H + L)-HRP Conjugate	BioRad	Cat# 1706516

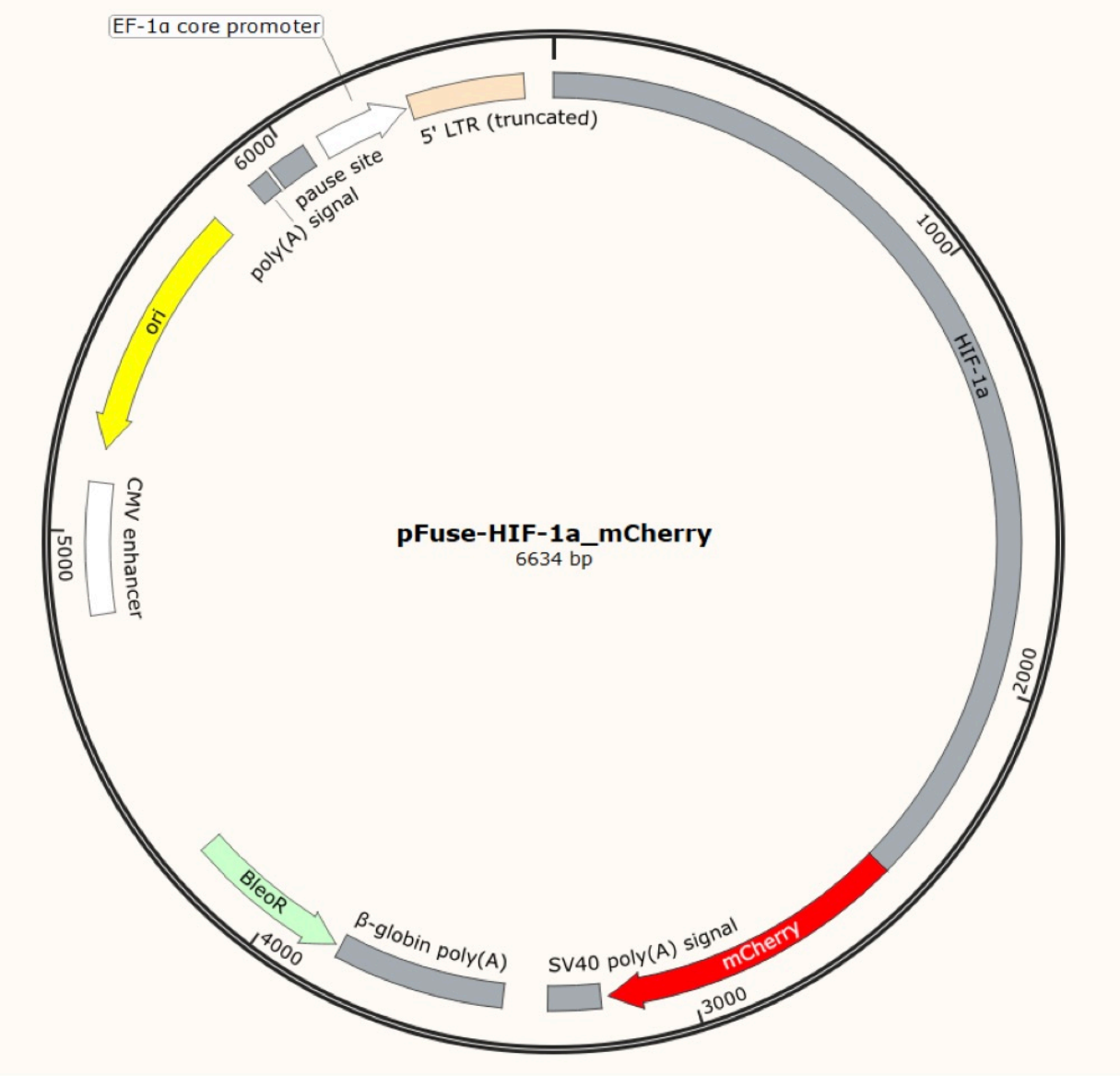
Trypsin-EDTA Solution 1X	Sigma	Cat# 59417C
Magna ChIP Protein A+G Magnetic Beads	Sigma	Cat# 16663
Experimental Models: Cell Lines		
J774A.1	ATCC	Cat# TIB-67
COS7	ATCC	Cat# CRL-1651
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: C57BL/6J	The Jackson Laboratory	# 00064
Mouse: B6.129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J	The Jackson Laboratory	# 004781
Mouse: IRE1alpha ^{fl/fl}	Kind gift from R.J Kaufman	https://www.embo.org/doi/10.1038/emboj.2011.52
Mouse: HIF1alpha ^{fl/fl}	The Jackson Laboratory	# 007561
Oligonucleotides for qPCR		
Mouse β actine Forward	This paper	5'-GAC GGC CAG GTC ATC ACT ATT G-3'
Mouse β actine Reverse	This paper	5'-CCA CAG GAT TCC ATA CCC AAG A-3'

Mouse HIF1 α Forward	This paper	5'- CGAGAACGAG AAGAAAAAGA TGAG-3'
Mouse HIF1 α Reverse	This paper	5'- AAGCCATCTAG GGCTTTCAG-3'
Mouse IRE1 α Forward	This paper	5'-ATG GCA GGA TCA AGG CGA TG-3'
Mouse IRE1 α Reverse	This paper	5'-CTT CAC TCA GCA TCT CTG GGG-3'
Mouse Il6 Forward	This paper	5'-CTT CCA TCC AGT TGC CTT C- 3'
Mouse Il6 Reverse	This paper	5'-ATT TCC ACG ATT TCC CAG AG-3'
Mouse Il1 β Forward	This paper	5'-CTG GTA CAT CAG CAC CTC ACA-3'
Mouse Il1 β Reverse	This paper	5'-GAG CTC CTT AAC ATG CCC TG-3'
Mouse VegfA Forward	This paper	5'-GCC CTG AGT CAA GAG GAC AG-3'

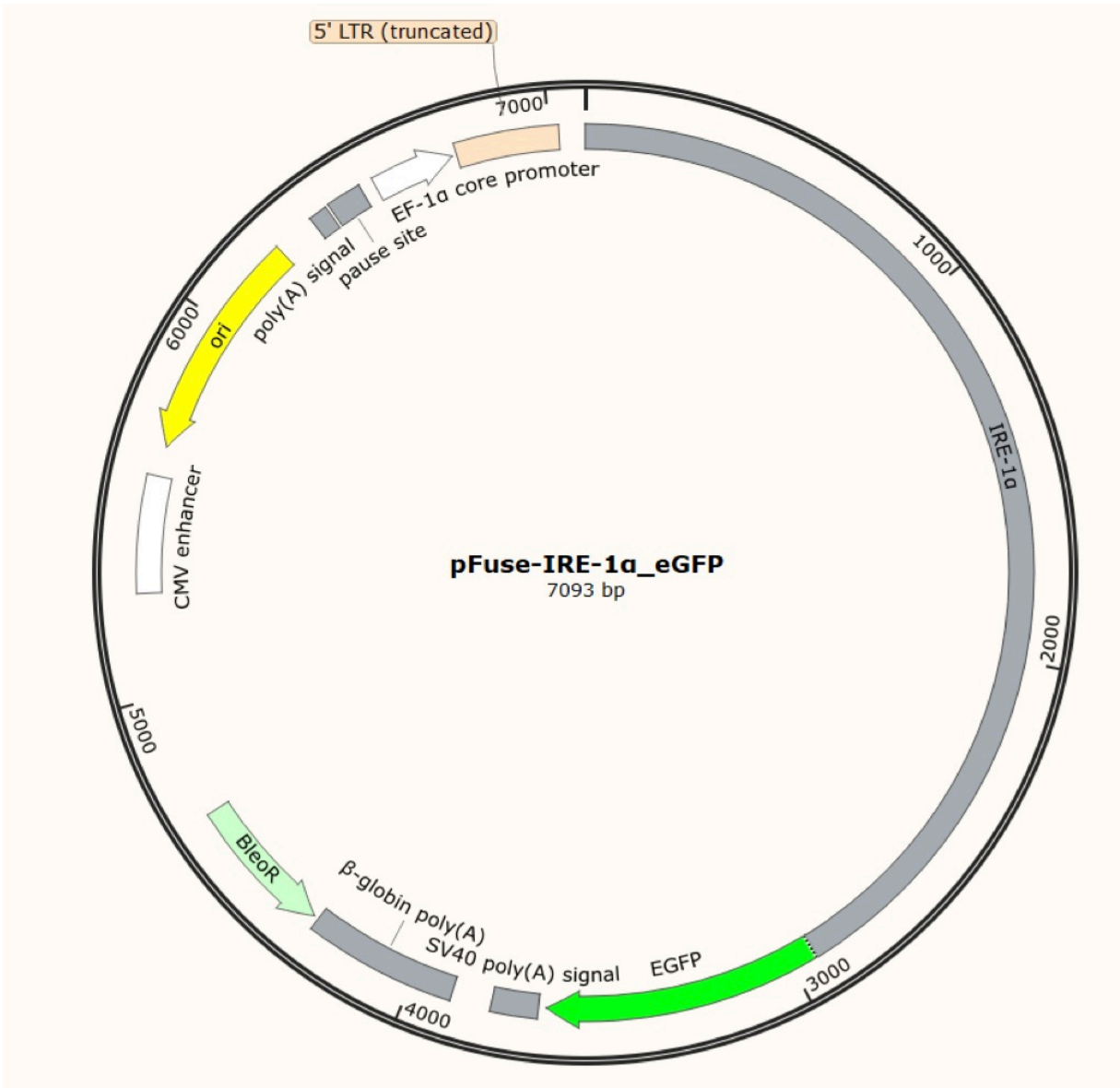
Mouse VegfA Reverse	This paper	5'-CTC CTA GGC CCC TCA GAA GT-3'
Mouse Tnf α Forward	This paper	5'-CGC GAC GTG GAA CTG GCA GAA-3'
Mouse Tnf α Reverse	This paper	5'-CTT GGT GGT TTG CTA CGA CGT GGG-3'
Mouse XBP1u Forward for PCR	This paper	5'-AAA CAG AGT AGC AGC GCA GAC TGC-3'
Mouse XBP1u Reverse for PCR	This paper	5'-TCC TTC TGG GTA GAC CTC TGG GAG-3'
Oligonucleotides for ChIP-qPCR		
Mouse VegfA Forward	This paper	5'- CCTCTGTCGTC GTACGTG-3'
Mouse VegfA Reverse	This paper	5'- GTACGTGCGGT GACTCT-3'
Mouse Il6 Forward	This paper	5'- GAGGGAGTGTG TGTCTTTGTAT G-3'
Mouse Il6 Reverse	This paper	5'GAGAAAGAG AAGCTAAAGCT GATG-3'

Mouse I11 β Forward	This paper	5'- ATACCTGCATA CTGTGTGTGCC- 3'
Mouse I11 β Reverse	This paper	5'- AAGTCAGGATG TGCGGAACAAA G-3'
Plasmids		
pFuse-HIF1 α _mCherry	Addgene	
pFuse-IRE1 α _eGFP	Addgene	
Software and Algorithms		
Prism	Graphpad	https://www.graphpad.com

PLASMID MAP for pFuse-HIF1α _mCherry



PLASMID MAP for pFuse-IRE1 α _eGFP



REFERENCES

1. Li, Q.Y. & Barres, B.A. Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology* 18, 225-242 (2018).
2. Sitkovsky, M. & Lukashev, D. Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol* 5, 712-721 (2005).
3. Semenza, G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology* 13, 167-171 (2001).
4. Semenza, G.L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology* 88, 1474-1480 (2000).
5. Semenza, G.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell* 148, 399-408 (2012).
6. Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res* 356, 116-121 (2017).
7. Cramer, T. *et al.* HIF-1 alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation (vol 112, pg 648, 2003). *Cell* 113, 419-419 (2003).
8. Brodsky, J.L. & Skach, W.R. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 464-475 (2011).
9. Araki, K. & Nagata, K. Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3 (2011).
10. Bettigole, S.E. & Glimcher, L.H. Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu Rev Immunol* 33, 107-138 (2015).
11. Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J. & Blumberg, R.S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 16, 469-484 (2016).
12. Smith, L.E.H. *et al.* Oxygen-Induced Retinopathy in the Mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 35, 101-111 (1994).
13. Reyes, N.J., O'Koren, E.G. & Saban, D.R. New insights into mononuclear phagocyte biology from the visual system. *Nature Reviews Immunology* 17, 322-332 (2017).
14. Karlstetter, M., Ebert, S. & Langmann, T. Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology* 215, 685-691 (2010).
15. Dejda, A. *et al.* Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk. *Journal of Clinical Investigation* 124, 4807-4822 (2014).
16. Szklarczyk, D. *et al.* STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 47, D607-D613 (2019).
17. Welsh, S.J., Bellamy, W.T., Briehl, M.A. & Powis, G. The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 alpha protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res* 62, 5089-5095 (2002).

18. Jassal, B. *et al.* The reactome pathway knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 48, D498-D503 (2020).
19. Romero-Ramirez, L. *et al.* XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Research* 64, 5943-5947 (2004).
20. Lindholm, D., Korhonen, L., Eriksson, O. & Koks, S. Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease. *Front Cell Dev Biol* 5 (2017).
21. Han, D. *et al.* IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* 138, 562-575 (2009).
22. Ghosh, R. *et al.* Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell* 158, 534-548 (2014).
23. Mennerich, D., Dimova, E.Y. & Kietzmann, T. Direct phosphorylation events involved in HIF-alpha regulation: the role of GSK-3beta. *Hypoxia (Auckl)* 2, 35-45 (2014).
24. Kietzmann, T., Mennerich, D. & Dimova, E.Y. Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Front Cell Dev Biol* 4, 11 (2016).
25. Chen, X. *et al.* XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 alpha pathway. *Nature* 508, 103-+ (2014).
26. Rattner Amir, A. Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. *The Journal of clinical investigation* 129, 3807-3820 (2019).
27. Binet, F. *et al.* Neuronal ER Stress Impedes Myeloid-Cell-Induced Vascular Regeneration through IRE1 alpha Degradation of Netrin-1. *Cell Metabolism* 17, 353-371 (2013).
28. Semenza, G.L. A compendium of proteins that interact with HIF-1 alpha. *Exp Cell Res* 356, 128-135 (2017).
29. Peters, J.C., Bhattacharya, S., Clark, A.F. & Zode, G.S. Increased Endoplasmic Reticulum Stress in Human Glaucomatous Trabecular Meshwork Cells and Tissues. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 56, 3860-3868 (2015).
30. Li, J., Wang, J.J., Yu, Q., Wang, M. & Zhang, S.X. Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Lett* 583, 1521-1527 (2009).
31. Chan, P., Stolz, J., Kohl, S., Chiang, W.C. & Lin, J.H. Endoplasmic reticulum stress in human photoreceptor diseases. *Brain Res* 1648, 538-541 (2016).
32. Binet, F. & Sapiha, P. ER Stress and Angiogenesis. *Cell Metabolism* 22, 560-575 (2015).
33. Zhong, Y. *et al.* Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Muller cell-derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes* 61, 492-504 (2012).
34. Zhong, Y., Wang, J.J. & Zhang, S.X. Intermittent but not constant high glucose induces ER stress and inflammation in human retinal pericytes. *Adv Exp Med Biol* 723, 285-292 (2012).
35. Ikesugi, K. *et al.* Induction of endoplasmic reticulum stress in retinal pericytes by glucose deprivation. *Curr Eye Res* 31, 947-953 (2006).

36. Caprara, C. *et al.* HIF1A is essential for the development of the intermediate plexus of the retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52, 2109-2117 (2011).
37. Kurihara, T. Roles of Hypoxia Response in Retinal Development and Pathophysiology. *Keio J Med* 67, 1-9 (2018).

SUPPLEMENTARY FIGURES

Accession Number

Q3TFD9

TBB4B_MOUSE

Q58E70

Q3UA81

A1L0V4

GRP78_MOUSE

CH60_MOUSE

ENOA_MOUSE

STML2_MOUSE

Q7TSZ0

Q3TH47

RL7_MOUSE

Q3TE85

PPIA_MOUSE

Q3TT41

ATPA_MOUSE

Q3UCH0

HNRPK_MOUSE

Q0VG47

ENPL_MOUSE

Q1WWK3

Q3U5P8

TKT_MOUSE

Q5SQB7

TCPB_MOUSE

TPM4_MOUSE

TMOD3_MOUSE

PAIRB_MOUSE

Q3U6P5

HNRPU_MOUSE

Q5M6Y2

CH10_MOUSE

Q3UAT9

ODP2_MOUSE

Alternate ID

Vim

Tubb4b

Tpm3

Elongation factor 1-alpha

Hist1h3i

Hspa5

Hspd1

Eno1

Stoml2

Hspa9

Ubc

Rpl7

Hmga1

Ppia

Ncl

Atp5a1

Rpl6

Hnrnpk

Hnrnpa3

Hsp90b1

H1f5

Rps3a1

Tkt

Npm1

Cct2

Tpm4

Tmod3

Serbp1

Hnrnpc

Hnrnpu

Cct4

Hspe1

Impdh2

Dlat

Q3U1F0
Q8CB58_MOUSE
F120C_MOUSE
PGK1_MOUSE
LDHB_MOUSE
DSG1A_MOUSE
ACTBL_MOUSE
Q6ZQB7
HNRPD_MOUSE
EFHD2_MOUSE
HIF1A_MOUSE
DDX5_MOUSE
P11984
THIO_MOUSE
PROF1_MOUSE
PCNA_MOUSE
RBMX_MOUSE
COR1A_MOUSE

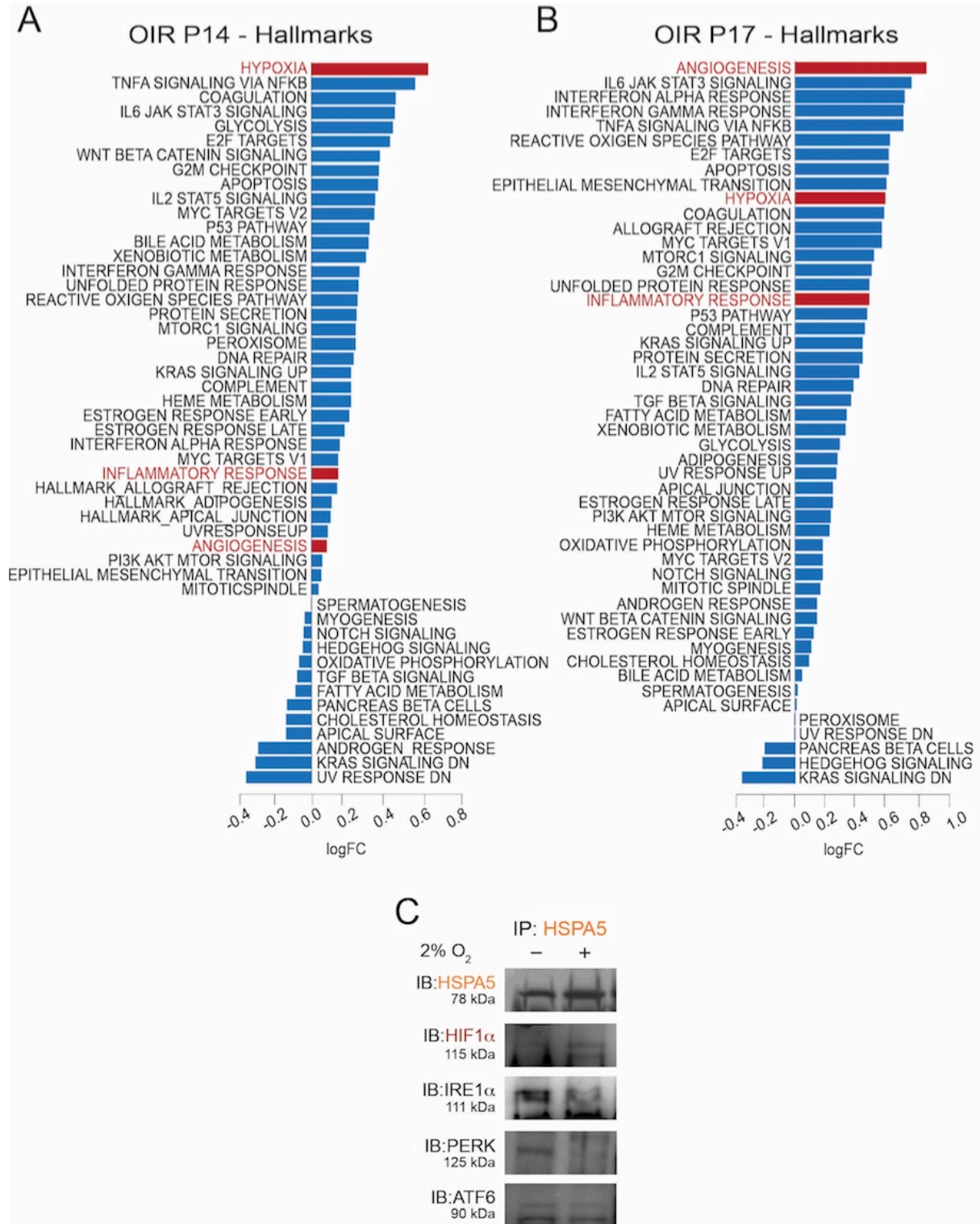
Lig3
Ptbp1
Fam120c
Pgk1
Ldhb
Dsg1a
Actbl2
Mtss1
Actbl2
Efhd2
Hif1a
Ddx5
Tcp1
Txn
Pfn1
Pcna
Rbmx
Coro1a

Supplemental Table 1. List of the proteins obtained after tandem mass spectrometry (MS/MS) analysis of immunoprecipitation of HIF1 α from J774 macrophages under hypoxia (2%O₂ for 8h).

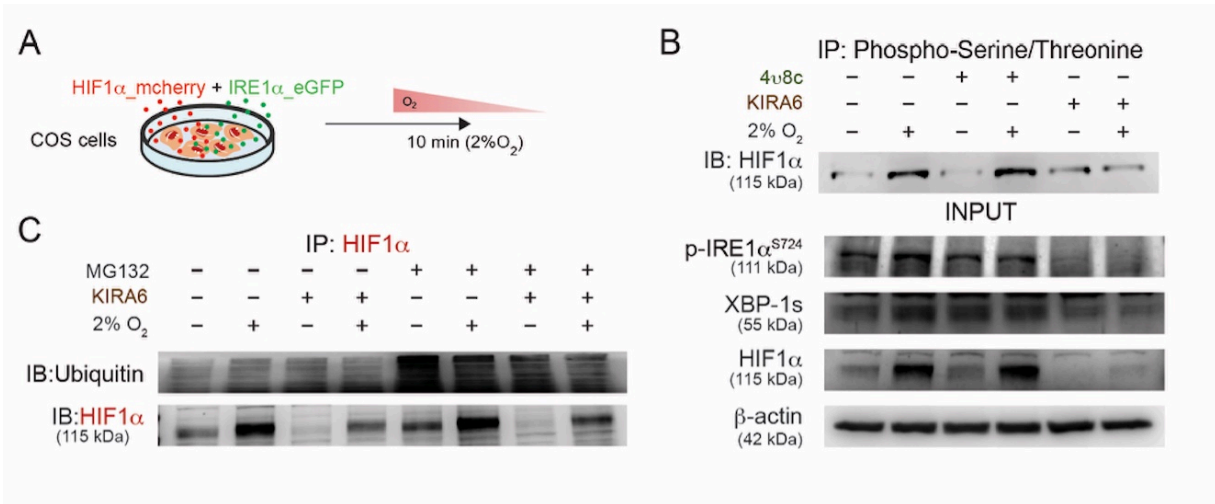
Pathology	Age (yr)	Type de diabetes	Analysis
Control patients			
ERM	79	-	WB
ERM	70	-	WB
ERM	81	-	WB
ERM	70	-	WB
Diabetic patients			
PDR	80	-	WB
PDR	74	-	WB
PDR	78	-	WB
PDR	72	-	WB

ERM: Epiretinal membrane; PDR : Proliferative diabetic retinopathy

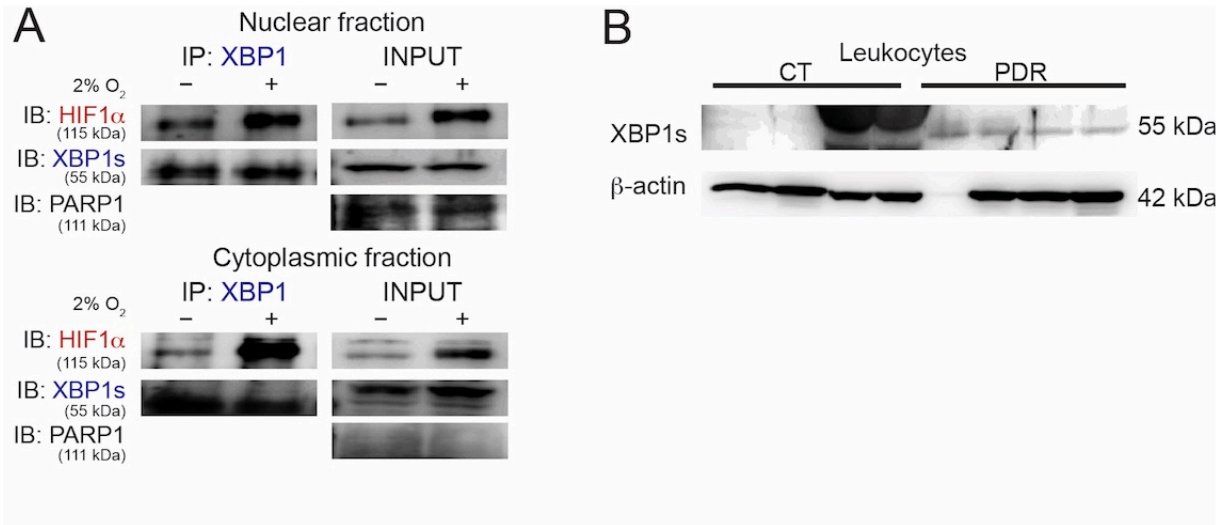
Supplemental Table 2. Characteristics of patients control and PDR used for the study.



Supplemental Figure 1. (A) Gene set variation analysis (GSVA) of RNA-seq data from P14 and (B) P17 normoxic and OIR retinas indicates significantly different pathways affected and the main hits. n=2-3 mice per condition. For P14, $p < 0.05$ and > 0.2 logFC and for P17, $p_{adj} < 0.05$ and > 0.2 logFC). (C) Co-immunoprecipitations of HSPA5 (or GRP78) in J774 macrophages cells under normoxia (21% O₂) and hypoxia (2% O₂ for 1h) followed by immunoblotting (IB) for HIF1 α and UPR sensors IRE1 α , PERK and ATF6 (n= 2 independent experiments).



Supplemental Figure 2. (A) Schematic representation of COS-7 cells transiently transfected with pFuse-HIF1 α _mCherry and pFuse-IRE1 α _eGFP fluorescent plasmids and subjected to hypoxia (2% O₂) for 10min. (B) Co-immunoprecipitation of phospho Serine/Threonine and HIF1 α in hypoxic (2% O₂ for 1h) J774 cells preincubated for 1h with IRE1 α endoribonuclease inhibitor 4 μ 8c or IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 (n= 2 independent experiments). (C) Co-immunoprecipitation of HIF1 α and Ubiquitin in hypoxic (2% O₂ for 1h) J774 cells pretreated for 1h with proteasome-inhibitor MG132 and IRE1 α kinase inhibitor KIRA6 (n= 3 independent experiments).



Supplemental Figure 3. (A) Co-immunoprecipitation of XBP1 and HIF1α in nuclear and cytosolic fractions of hypoxic (2% O₂ for 1h) J774 cells (n= 2 independent experiments). **(B)** Immunoblot for XBP1s expression on equal quantity of leukocytes cells from patients with proliferative diabetic retinopathy and their control (n=4 control and n= 3 PDR patients).

CHAPITRE 4: DISCUSSION ET PERSPECTIVES

SECTION 1 : IMPACT DU RECRUTEMENT IMMUNITAIRE DANS LES PATHOLOGIES DE LA RÉTINE : RÔLE DU RÉCEPTEUR NRP1 AU NIVEAU DES PHAGOCYTES MONONUCLÉAIRES

La notion de l'importance des phagocytes mononucléaires (microglies/macrophages) dans la progression des rétinopathies (plus particulièrement dans la néovascularisation pathologique) n'est pas un fait nouveau et a été bien établie à travers les dernières années. Les mécanismes régulant leur recrutement dans les zones de dommages à la rétine demeuraient toutefois indéfinis.

Les microglies sont la population immunitaire du parenchyme rétinien et sont importantes pour former son réseau vasculaire physiologique. Des études ont révélé qu'il y a très peu de cellules immunitaires dérivées de la moelle osseuse (les macrophages) dans une rétine de souris WT, suggérant un rôle mineur de cette population dans la formation de la vasculature normale rétinienne (Kataoka et al., 2011). Cependant, un plus grand nombre de cellules immunitaires (microglies/macrophages) a été observé dans la rétine durant la condition de rétinopathie induite à l'oxygène (RIO) caractérisée par une vascularisation pathologique, comme nous le montrons dans le premier article de ce manuscrit. La prochaine question était de savoir quel récepteur exprimé à la surface de ces phagocytes mononucléaires (PMs) pourrait expliquer cette grande mobilisation de cellules immunitaires. Des études avaient démontré auparavant la sécrétion de ligands tels que VEGF et Sémaphorine3A par la rétine neuronale en situation de stress (Joyal et al., 2011). NRP1 s'est avéré être un candidat potentiel vu sa capacité à se lier aux deux ligands libérés (VEGF et Sémaphorine3A) par les neurones ischémiques de la rétine. Nos résultats de FACS ont ainsi montré non seulement une augmentation du nombre de PMs durant la progression de la condition RIO mais aussi un enrichissement proportionnel de PMs exprimant NRP1. Les phagocytes mononucléaires NRP1 positifs représentaient un sous-groupe de cellules immunitaires mobilisées dans la rétine ischémique et dont la localisation se concentrait au niveau des touffes vasculaires pathologiques. Nous montrons aussi que cette mobilisation de PMs provenait d'une infiltration de cellules immunitaires de la circulation sanguine et non d'une prolifération cellulaire dans la rétine. Lorsqu'on inhibait l'expression de

NRP1 au niveau des cellules myéloïdes, on perdait cet influx de PMs et encore plus important, on assistait à une réduction de la dégénérescence vasculaire et de la néovascularisation pathologique associées aux rétinopathies ischémiques prolifératives. D'un point de vue thérapeutique, ce résultat bénéfique a été récapitulé de façon similaire en utilisant des trappes de NRP1 (NRP1 soluble recombinant de souris capable de séquestrer les ligands Sémaphorine3A et VEGF induits en RIO) qui ont montré une diminution de l'infiltration des PMs et des vaisseaux sanguins pathologiques.

Ensemble nos résultats ont permis d'identifier NRP1 comme un récepteur obligatoire et nécessaire pour le recrutement et l'accumulation de PMs dans la rétine ischémique. Nous montrons aussi comment la rétine neuronale en stress est capable de moduler sa réponse immunitaire *via* NRP1 et sa liaison aux ligands Sémaphorine3A et VEGF. Cette découverte permet d'offrir une base pour une avenue clinique alternative à la thérapie anti-VEGF où, au lieu de cibler VEGF (important pour l'homéostasie vasculaire rétinienne), on viserait plutôt NRP1. Cette stratégie apporterait plus d'avantages et une toxicité moindre pour la rétine à long terme par rapport au blocage du facteur de croissance VEGF pour le traitement des rétinopathies ischémiques prolifératives.

SECTION 2 : LA RÉGULATION DES PHAGOCYTES MONONUCLÉAIRES PAR LA TENSION LOCALE EN OXYGÈNE -SIGNALISATION CONVERGENTE ENTRE LES VOIES D'HIF1 α ET D'IRE1 α /XBP-1

La néovascularisation pathologique, propulsée par la sécrétion de VEGF, est une propriété commune des rétinopathies ischémiques prolifératives. Des évidences dans la littérature ont montré le rôle de l'hypoxie rétinienne dans la libération de ce facteur proangiogénique. Il faudrait toutefois se rappeler que la libération de VEGF est le résultat d'une cascade de signalisation. Une des voies les plus étudiées à la base de l'expression de VEGF est la signalisation d'HIF1 α . L'importance de la voie d'HIF1 α a été démontrée par les travaux d'Ozaki et al qui ont trouvé des niveaux élevés d'HIF1 α dans la rétine ischémique. Ils ont aussi montré que cette induction d'HIF1 α corrélait avec une augmentation de l'expression de VEGF dans le modèle de RIO (Ozaki et al., 1999). Notre prochaine étape a été d'aller dans un contexte cellulaire en lien avec notre premier article investiguer le mécanisme d'adaptation activé par les PMs dans la rétine hypoxique. Nous avons ainsi regardé dans notre deuxième article si ces cellules induisaient HIF1 α . Nos résultats ont validé l'augmentation de l'expression d'HIF1 α dans les PMs triés par FACS en condition RIO. Pour mieux comprendre comment HIF1 α agissait dans ces cellules en condition hypoxique, nous avons identifié ses partenaires d'interaction par immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Notre étude a ainsi fourni pour la première fois l'évidence d'une collaboration en HIF1 α et la voie de l'UPR, plus particulièrement la branche d'IRE1 α . L'activation de l'UPR et surtout d'IRE1 α dans la rétine hypoxique ainsi que son rôle dans la progression des rétinopathies avaient déjà été démontrés dans notre laboratoire (Binet et al., 2013). Il était impératif face à cette découverte, d'explorer plus en profondeur le mécanisme à la base de l'interaction entre HIF1 α et IRE1 α au niveau des PMs hypoxiques. À travers nos expériences d'immunoprécipitation d'HIF1 α en présence d'inhibiteurs 4 μ 8c et KIRA6 (démontrés pour leur capacité à inhiber respectivement les activités endoribonucléase et kinase d'IRE1 α) sur des macrophages déficients en oxygène, nous avons pu établir le rôle sans équivoque de l'activité kinase d'IRE1 α

sur l'induction d'HIF1 α en hypoxie. Nous avons emprunté un chemin alternatif pour vérifier cette observation en utilisant des macrophages péritonéaux mis en hypoxie *in vitro*, issus de souris transgéniques avec un système myéloïde dépourvu d'IRE1 α . Nous avons observé des résultats similaires c'est-à-dire la perte de l'induction transcriptionnelle d'HIF1 α en absence d'IRE1 α . Nous avons ensuite exploré comment la synergie entre HIF1 α et IRE1 α se traduisait au niveau du comportement des PMs en situation de stress hypoxique. Nos résultats ont montré que la collaboration entre ces deux voies favorisait une augmentation de l'expression de cytokines proinflammatoires par les PMs hypoxiques en comparaison à des macrophages/microglies *HIF1 α -/-* ou *IRE1 α -/-* qui en sécrétaient moins. Nous démontrons aussi que ce comportement proinflammatoire des PMs favorisait la formation de vaisseaux sanguins pathologiques dans le contexte de la rétinopathie induite par l'oxygène. On observait ainsi une réduction de la vascularisation pathologique dans les rétines des souris transgéniques ayant une inhibition d'IRE1 α et/ou HIF1 α dans leurs cellules myéloïdes.

En résumé, nos travaux soulignent pour la première fois la synergie entre les voies d'IRE1 α et HIF1 α dans les PMs hypoxiques pour stimuler leur capacité sécrétoire de cytokines proinflammatoires. Nos résultats soulignent le rôle régulateur d'IRE1 α qui, outre sa fonction bien établie dans l'UPR, apporte une facette encore méconnue de son importance dans la signalisation d'HIF1 α comme mécanisme d'adaptation des PMs face à la baisse de la tension locale en oxygène. Notre étude met en lumière un nouveau mécanisme où IRE1 α modulerait la réponse hypoxique induite par HIF1 α . Cette découverte pourrait être à la base du développement d'autres alternatives thérapeutiques intéressantes pour le traitement de maladies oculaires où l'hypoxie est un des facteurs initiateurs.

SECTION 3 : PERSPECTIVES

Potentiel clinique de Neuropiline-1 comme cible thérapeutique pour le traitement des maladies oculaires

La thérapie anti-VEGF est la 1^{re} ligne de traitement des maladies ischémiques prolifératives rétinienne. Il est bien vrai que le blocage de VEGF permet d'améliorer la vision après plusieurs années de traitement mais il faut aussi considérer ses effets secondaires. En effet, comme la plupart des molécules anti-VEGF séquestrent les isoformes de VEGF, la perte du support neurotrophique apporté par ce facteur important de croissance vasculaire entraîne une dégénérescence de la neurorétine. Ceci contribue à la réversion de l'amélioration de la vision après un traitement à long terme. De plus, il y a certains patients qui ne répondent pas à la monothérapie anti-VEGF. Une stratégie alternative qui offrirait moins de dommages systémiques serait nécessaire à développer.

Une approche thérapeutique basée sur la Neuropiline-1 offre plus de versatilité grâce à son rôle de corécepteur dans plusieurs mécanismes vitaux cellulaires. NRP1 est impliquée dans l'angiogenèse, la perméabilité vasculaire induite par de multiples signaux incluant VEGF, la matrice extracellulaire et les Sémaphorines. De plus, les travaux présentés dans le premier article de cette thèse ont montré que NRP1 participe au recrutement de phagocytes mononucléaires. Nous avons aussi montré qu'en inhibant NRP1 au niveau de ces cellules immunitaires ou en utilisant des bloqueurs pharmacologiques de NRP1, une réduction notable de la néovascularisation pathologique était observée en condition RIO. Plusieurs approches ciblant la signalisation de NRP1 existent : cibler les voies de NRP1 médiées par VEGF, cibler les voies de NRP1 indépendantes de VEGF et induites par les Sémaphorines ou les composants de la matrice extracellulaire, co-inhiber les voies de NRP1 induites par SEMA3A et VEGF ou utiliser des microARNs (miR-338 et miR-320) pour moduler l'expression de NRP1 (C. Raimondi et al., 2016).

1) Cibler la liaison entre VEGF et NRP1

Les agents étudiés ciblant l'interaction entre VEGF et NRP1 comprennent : des anticorps monoclonaux, des peptides et des petites molécules inhibitrices (C. Raimondi et al., 2016).

L'entreprise Genentech a développé 2 anticorps monoclonaux NRP1^A ciblant les domaines a1-a2 pour contrer la liaison de SEMA3A et NRP1^B ciblant les domaines b1-b2 pour contrer la liaison de VEGF (Liang et al., 2007; Pan, Chantry, et al., 2007; Pan, Chantry, et al., 2007). Il est important de noter que même si en théorie NRP1^A et NRP1^B ciblent différentes régions de la structure de NRP1, les 2 anticorps monoclonaux sont capables d'inhiber *in vitro* la migration des cellules endothéliales et le bourgeonnement angiogénique induits par VEGF164 (isoforme principale active de VEGF chez la souris) (C. Raimondi et al., 2016). De ce fait, chacun de ces 2 anticorps monoclonaux est capable d'empêcher à la suite de la liaison de VEGF164, la formation du complexe NRP1/VEGFR2 d'où leur inhibition de la signalisation de VEGF164 au niveau des cellules endothéliales (Pan, Chantry, et al., 2007). Les auteurs Pan et al montrent aussi l'effet synergique du traitement avec les anticorps bloquants de NRP1 combiné au traitement anti-VEGF pour l'inhibition de la croissance tumorale (Pan, Chantry, et al., 2007). Un autre anticorps monoclonal, MNRP1685A, équivalent à NRP1^B (reconnaissant NRP1 chez l'humain, le rat, la souris et le singe) a été évalué dans des études cliniques de phase I pour le traitement de tumeurs solides humaines (Patnaik et al., 2014). Cependant des problèmes de protéinurie (maladie rénale caractérisée par la présence d'une quantité anormale de protéines dans l'urine) ont été détectés et ont empêché la poursuite d'autres tests cliniques (Patnaik et al., 2014). MNRP1685A n'a pas encore été testé pour le traitement des maladies néovasculaires rétinienues (C. Raimondi et al., 2016). Considérant les effets secondaires néfastes sur le rein, le développement de stratégies alternatives est nécessaire.

Les peptides développés ciblant NRP1 incluent les peptides « C-end rule », l'heptapeptide A7R (ou ATWLPPR) et les peptides bicycliques. Ils ciblent le domaine de liaison de VEGF à NRP1 afin d'interférer dans la signalisation VEGF-dépendante de NRP1 (C. Raimondi et al., 2016).

Les molécules inhibitrices de NRP1 offrent une meilleure rentabilité et possèdent des propriétés pharmacologiques supérieures aux peptides bloquants de NRP1 (C. Raimondi et al., 2016). Les molécules inhibitrices (antagonistes de la liaison NRP1/VEGF) les plus prometteuses comprennent l'inhibiteur EG00229 et le N- [5-(1H-benzimidazol-2-yl) -2-méthylphényl] -N'- (2,3-dihydro-1,4- benzodioxin-6-ylcarbonyl) thio-urée (C. Raimondi et al., 2016).

2) Cibler les signalisations de NRP1 indépendantes de VEGF

- Avenue thérapeutique du blocage de la signalisation de SEMA3A à travers NRP1

Les recherches basées sur le modèle de rétinopathie induite à l'oxygène (RIO) ont montré l'effet bénéfique de l'injection intravitréale d'une protéine recombinante de SEMA3A ou d'un lentivirus shSEMA3A sur la réduction de la néovascularisation pathologique (Joyal et al., 2011). Cette SEMA3A exogène (qui entre en compétition avec la SEMA3A endogène) vient neutraliser les effets néfastes de la SEMA3A (Joyal et al., 2011). Les auteurs n'ont toutefois pas déterminé si cet apport exogène de SEMA3A avait un effet sur la perméabilité vasculaire, considérant des évidences montrant le rôle de SEMA3A dans l'hyperperméabilité vasculaire dans la rétinopathie proliférative diabétique (Cerani et al., 2013). De plus, SEMA3A est un facteur pro-apoptotique pour les cellules endothéliales *in vitro*; ce qui suggère que le blocage de SEMA3A pourrait être bénéfique pour la survie des cellules endothéliales dans les maladies comme la rétinopathie diabétique (C. Raimondi et al., 2016).

Toutefois des études additionnelles sont nécessaires pour bien évaluer l'étendue des mécanismes impliqués dans le blocage de la signalisation de SEMA3A, soit au niveau du ligand ou du récepteur, et l'effet systémique de l'injection intravitréale de la SEMA3A exogène.

- Avenue thérapeutique du blocage de la signalisation des composants de la matrice extracellulaire à travers NRP1

Selon des études basées sur le modèle de RIO, NRP1 favorise l'activation d'ABL1 (une tyrosine kinase liée au remodelage de l'actine) induite par la signalisation de la matrice extracellulaire (Claudio Raimondi et al., 2014). En utilisant la petite molécule inhibitrice d'ABL1, Imatinib (approuvée par la FDA pour la prolifération des cellules tumorales dans certaines leucémies), les auteurs ont observé une diminution de l'angiogenèse pathologique observée dans la condition RIO (Claudio Raimondi et al., 2014). Ils ont ainsi montré que NRP1 régulait l'angiogenèse *via* son complexe avec ABL1 et de façon indépendante de VEGF ou VEGFR2 (Claudio Raimondi et al., 2014).

3) Co-inhiber la signalisation de NRP1 induite par SEMA3A et VEGF

L'utilisation d'une protéine NRP1 soluble permet d'inhiber la signalisation de NRP1 induite par SEMA3A et VEGF. Cette approche a été utilisée dans le 1^{er} article de ce manuscrit. En effet, nous avons administré de façon intravitréale une trappe de NRP1 (effective pour

séquestrer les ligands SEMA3A et VEGF164) à nos souris en condition RIO. Nous avons observé une réduction de l'infiltration des phagocytes mononucléaires et une diminution de la néovascularisation pathologique (Dejda, Mawambo, et al., 2014). Des travaux supplémentaires avec des co-cultures de cellules endothéliales et de phagocytes mononucléaires sont requis pour déterminer si cette inhibition combinatoire des processus de SEMA3A et VEGFA et l'effet bénéfique sur la réduction de la vascularisation pathologique proviendraient de la normalisation des cellules endothéliales et/ou des phagocytes mononucléaires (C. Raimondi et al., 2016).

4) Utiliser les microARNs pour réguler l'expression de NRP1

De plus récentes études commencent à s'intéresser aux microARNs pour cibler NRP1. Les microARNs sont des petits ARNs non codants qui régulent l'expression génique en s'hybridant aux ARN messagers et en entraînant leur dégradation ou le blocage de la traduction (C. Raimondi et al., 2016). Les microARNs miR-338 et miR-320 sont connus pour leur inhibition de l'expression de NRP1 et leur expression dans les cellules endothéliales est associée à la diminution de l'angiogenèse *in vitro* dans des modèles de tumeurs (Peng, Liu, Li, Wang, & Wu, 2014; Wu et al., 2014). La technologie des microARNs nécessite de plus amples recherches sur leur mécanisme de régulation de l'expression génique dans la cellule afin de pouvoir utiliser cette technologie dans le futur avec le moins d'effets secondaires.

Potentiel clinique d'HIF1 α et IRE1 α comme cibles thérapeutiques pour le traitement des maladies oculaires

Les inhibiteurs d'HIF1 α commencent à prendre de l'ampleur comme perspective intéressante dans plusieurs contextes pathologiques incluant le cancer et les maladies cardiovasculaires (Subhani, Vavilala, & Mukherji, 2016). Avec les évidences multiples montrant le rôle majeur d'HIF1 α dans la progression des rétinopathies, les molécules inhibitrices d'HIF1 α pourraient être utiles dans leur traitement. Des études de criblage de drogues inhibant l'activité transcriptionnelle d'HIF1 α ont identifié plusieurs molécules dont la digoxine, l'honokiole, les glycosides cardiaques et les agents anthracyclines thérapeutiques doxorubicine et daunorubicine (Subhani et al., 2016). Les travaux de Yoshida et al ont démontré que la digoxine agit en bloquant l'expression d'HIF1 α induite par l'hypoxie dans la rétine et supprime aussi ses cibles transcriptionnelles (Yoshida et al., 2010). De plus, ils ont montré qu'en injectant la digoxine de façon systémique ou intraoculaire, une réduction significative de la vascularisation pathologique était observée dans les conditions de rétinopathie induite par l'oxygène et de néovascularisation choroïdienne (modèle animal de la dégénérescence maculaire liée à l'âge de type néovasculaire) (Yoshida et al., 2010). La doxorubicine et la daunorubicine n'ont quant à elles pas d'effets sur les niveaux d'expression d'HIF1 α , mais agissent en empêchant sa liaison à l'ADN. Similairement à la digoxine, elles sont impliquées dans la suppression de la néovascularisation pathologique oculaire. Des études utilisant un shRNA ciblant HIF1 α ont aussi observé des résultats équivalents (Xia, Xiong, Xu, Jiang, & Li, 2008). De plus, les travaux effectués par Vavilala et al ont montré que l'honokiole exhibait un meilleur potentiel thérapeutique comparé aux inhibiteurs digoxine et doxorubicine. Ils ont observé qu'une administration intrapéritonéale de l'honokiole dans le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène : 1) inhibait la néovascularisation pathologique rétinienne, 2) prévenait la vaso-oblitération et 3) favorisait une revascularisation physiologique dans la rétine (Vavilala et al., 2013). Des études plus récentes ont identifié le rôle de l'acriflavine, molécule réduisant l'activité transcriptionnelle d'HIF1 α et HIF2 α , dans la diminution de la néovascularisation pathologique oculaire (M. Zeng et al., 2017). La deuxième étude de ce manuscrit consolide aussi le rôle pathogénique de la signalisation d'HIF1 α au niveau des phagocytes mononucléaires hypoxiques. Le développement d'inhibiteurs d'HIF1 α (si possible sélectifs au niveau des

cellules myéloïdes) offrirait ainsi une alternative intéressante pour le traitement de maladies oculaires prolifératives.

Il existe une ample littérature montrant le rôle du stress dans le RE et l'activation de l'UPR dans l'angiogenèse pathologique associée aux rétinopathies ischémiques prolifératives (Binet et al., 2013; Li Liu et al., 2013; Sankrityayan, Oza, Kulkarni, Mulay, & Gaikwad, 2019). En effet, l'UPR, activée par l'hypoxie, est une autre source potentielle du facteur pro-angiogénique VEGF. Plusieurs molécules inhibitrices du stress dans le RE ont été identifiées (**Tableau 3**) et ont montré des résultats prometteurs pour leurs propriétés antitumorales (Lindholm et al., 2017). On dénote toutefois des problèmes de spécificité de ces composés qui sont à résoudre avant de considérer leur exploitation comme molécules thérapeutiques (Tashiro, 2019). Des inhibiteurs plus sélectifs ont été développés et incluent le composé KIRA qui inhibe l'activité kinase d'IRE1 α , le clivage de XBP-1 et le processus de RIDD (IRE1-dependent decay of mRNA) (Ghosh et al., 2014; Lindholm et al., 2017). Un autre inhibiteur, spécifique au domaine kinase de PERK est le GSK2656157 dont l'effet antitumoral a été montré dans des modèles précliniques d'adénocarcinome pancréatiques et de myélome multiple. Il y'a toutefois des effets secondaires avec l'usage de ces composés, par exemple la perte des cellules β pancréatiques et le diabète avec l'utilisation des inhibiteurs de PERK (Tashiro, 2019). Les autres molécules inhibitrices utilisées dans le contexte tumoral, ciblant la branche d'IRE1 α /XBP-1 incluent la toyocamycine, 4 μ 8c, MKC-3946, STF-083010 et APY-29 (Tashiro, 2019). Des études additionnelles sont toutefois nécessaires afin de déterminer les fonctions précises et le mécanisme d'action de ces différents composés pour éviter des effets secondaires. Considérant le rôle d'IRE1 α dans l'adaptation en hypoxie des phagocytes mononucléaires induite par HIF1 α (démonstré dans le deuxième article de cette thèse), le potentiel thérapeutique des inhibiteurs du stress dans le RE (surtout d'IRE1 α) au niveau du traitement des maladies oculaires est à vivement explorer.

Disorder	Chemical compound	UPR branch/target	Effects	References
ALS	Sephin1	Inhibition of stress-induced phosphatase p-eIF2 α is increased	Neuroprotection	Das et al., 2015
Excitotoxicity Brain ischemia	Salubrinal	Inhibits GADD34 p-eIF2 α increased	Neuroprotection	Sokka et al., 2007; Anuncibay-Soto et al., 2016
PD	Salubrinal	p-eIF2 α increased	Neuroprotection in α .synuclein mouse model	Colla et al., 2012
Drug abuse	ISRIB	Increase in the eIF2B guanine nucleotide exchange factor	Increase p-eIF2 α translation and Induction of LTP by cocaine	Placzek et al., 2016
Prion disease	GSK2606414	PERK inhibitor p-eIF2 α reduced	Increase in synaptic proteins and reduced neurodegeneration	Moreno et al., 2013
Inflammation arthritis	4 μ 8C	IRE1 pathway/ inhibits XBP-1 splicing	reduced cytokines improvement of model of rheumatoid arthritis	Qiu et al., 2013
Multiple myelom	MKC-3946	inhibits XBP-1 splicing	Growth inhibition	Mimura et al., 2012
Pancreatic cancer cell	STF-083010	IRE1 inhibition	Growth retardation	
Tumor cells	Irestin	IRE1-RNase inhibitor, blocks XBP1 effects	Tumor cell survival reduced	
Hepatocellular carcinoma	GSK2656157 or 4 μ 8C +oprozomib	PERK inhibitor IRE inhibitor Proteasome inhibitor	Antitumor effects	Vandewynckel et al., 2016
Cultured cells	Compound 147	ATF6 activators	Reduced secretion of misfolded protein protein	Plate et al., 2016b
Osteosarcoma cells	Ceapins	ATF6 inhibitor	Sensitizes cells to ER stress	Gallagher et al., 2016

Tableau 3. Composés ciblant la signalisation du stress dans le RE. (Tiré de l'article (Lindholm et al., 2017))

Conclusion

Dans ce manuscrit nous avons résumé les rôles physiologiques et pathologiques des phagocytes mononucléaires dans le développement d'une rétine normale et une rétine au réseau vasculaire compromis comme ce qui est observé dans les rétinopathies ischémiques prolifératives. Nous avons mis en évidence deux volets moléculaires impliqués dans l'activité des phagocytes mononucléaires et stimulant leur comportement pathologique. D'une part, nous montrons comment le récepteur Neuropiline-1, de concert avec la molécule de guidage Sémaphorine-3A et le VEGF, attire une population de cellules immunitaires (phagocytes mononucléaires) qui participe à la progression de la pathologie. Nous avons aussi observé d'autre part que ces phagocytes mononucléaires expriment des niveaux élevés d'HIF1 α dans la rétine ischémique. En poussant notre recherche plus loin dans les partenaires d'activité d'HIF1 α , nous avons découvert une collaboration encore inexplorée entre HIF1 α et IRE1 α . Cette synergie entre les deux signalisations adaptatives en hypoxie joue un rôle clé dans la capacité sécrétoire d'agents inflammatoires par les phagocytes mononucléaires; ce qui participe à la progression de la pathologie. Mis ensemble, nos résultats proposent une nouvelle stratégie pharmacologique visant IRE1 α de concert avec HIF1 α pour contrecarrer l'inflammation destructive associée à la croissance vasculaire pathologique observée dans les maladies oculaires rétiniennes. D'un autre côté, une approche idéale à considérer serait une trithérapie ciblant NRP1 (pour couper l'influx de cellules immunitaires exprimant NRP1 dans la rétine pathologique) combinée à des molécules inhibitrices d'IRE1 α et/ou HIF1 α pour contrer l'inflammation excessive rencontrée dans les rétinopathies. On pourrait aussi tester ces différentes combinaisons inhibitoires en présence de la thérapie actuelle anti-VEGF pour déterminer si on obtient une meilleure amélioration de la vision avec le moins d'effets secondaires possible. Toutefois de plus amples études sur l'exact temps d'intervention de chaque voie de signalisation (NRP1, IRE1 α et HIF1 α) dans le comportement pathologique des phagocytes mononucléaires seraient importantes à réaliser avant d'aller sur ce terrain thérapeutique.

Bibliographie

- Acevedo, L. M., Barillas, S., Weis, S. M., Gothert, J. R., & Cheresh, D. A. (2008). Semaphorin 3A suppresses VEGF-mediated angiogenesis yet acts as a vascular permeability factor. *Blood*, *111*(5), 2674-2680. doi:10.1182/blood-2007-08-110205
- Ahn, G. O., Seita, J., Hong, B. J., Kim, Y. E., Bok, S., Lee, C. J., . . . Brown, J. M. (2014). Transcriptional activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in myeloid cells promotes angiogenesis through VEGF and S100A8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *111*(7), 2698-2703. doi:10.1073/pnas.1320243111
- Aiello, L. P. L. (1995). Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(23), 10457-10461.
- Akhtar Schäfer, I., Wang, L., Krohne, T., Xu, H., & Langmann, T. (2018). Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases. *Embo Molecular Medicine*, *10*(10).
- Anderson, D. H., & Fisher, S. K. (1976). The photoreceptors of diurnal squirrels: outer segment structure, disc shedding, and protein renewal. *Journal of ultrastructure research*, *55*(1), 119-141.
- Araki, K., & Nagata, K. (2011). Protein Folding and Quality Control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *3*(11). doi:ARTN a007526
10.1101/cshperspect.a007526
- Barber, A. J., Antonetti, D. A., Kern, T. S., Reiter, C. E., Soans, R. S., Krady, J. K., . . . Bronson, S. K. (2005). The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *46*(6), 2210-2218. doi:10.1167/iovs.04-1340
- Baylor, D. (1996). How photons start vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(2), 560-565.
- Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annual Review of Immunology Vol 33*, *33*, 107-138. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112116
- Binet, F., **Mawambo, G.**, Sitaras, N., Tetreault, N., Lapalme, E., Favret, S., . . . Sapiéha, P. (2013). Neuronal ER Stress Impedes Myeloid-Cell-Induced Vascular Regeneration

through IRE1 alpha Degradation of Netrin-1. *Cell Metabolism*, 17(3), 353-371. doi:10.1016/j.cmet.2013.02.003

- Binet, F., & Sapieha, P. (2015). ER Stress and Angiogenesis. *Cell Metabolism*, 22(4), 560-575. doi:10.1016/j.cmet.2015.07.010
- Boycott, B. B., Dowling, J. E., & Kolb, H. (1969). Organization of Primate Retina - Light Microscopy - a Second Type of Midget Bipolar Cell in Primate Retina. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 255(799), 109-&. doi:DOI 10.1098/rstb.1969.0004
- Brodsky, J. L., & Skach, W. R. (2011). Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Current Opinion in Cell Biology*, 23(4), 464-475. doi:10.1016/j.ceb.2011.05.004
- Butovsky, O., & Weiner, H. L. (2018). Microglial signatures and their role in health and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(10), 622-635. doi:10.1038/s41583-018-0057-5
- Caprara, C., Thiersch, M., Lange, C., Joly, S., Samardzija, M., & Grimm, C. (2011). HIF1A is essential for the development of the intermediate plexus of the retinal vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(5), 2109-2117. doi:10.1167/iovs.10-6222
- Cavallaro, G., Filippi, L., Bagnoli, P., La Marca, G., Cristofori, G., Raffaelli, G., . . . Mosca, F. (2014). The pathophysiology of retinopathy of prematurity: an update of previous and recent knowledge. *Acta Ophthalmologica*, 92(1), 2-20.
- Cerani, A., Tetreault, N., Menard, C., Lapalme, E., Patel, C., Sitaras, N., . . . Sapieha, P. (2013). Neuron-Derived Semaphorin 3A Is an Early Inducer of Vascular Permeability in Diabetic Retinopathy via Neuropilin-1. *Cell Metabolism*, 18(4), 505-518. doi:10.1016/j.cmet.2013.09.003
- Chen, J., & Smith, L. E. H. (2007). Retinopathy of prematurity. *Angiogenesis*, 10(2), 133-140.
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q. Z., Greenblatt, M. B., Hatziapostolou, M., . . . Glimcher, L. H. (2014). XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 alpha pathway. *Nature*, 508(7494), 103-+. doi:10.1038/nature13119
- Connor, K. M., SanGiovanni, J. P., Lofqvist, C., Aderman, C. M., Chen, J., Higuchi, A., . . . Smith, L. E. H. (2007). Increased dietary intake of omega-3-polyunsaturated fatty acids reduces pathological retinal angiogenesis. *Nature Medicine*, 13(7), 868-873. doi:10.1038/nm1591

- Dejda, A., **Mawambo, G.**, Cerani, A., Miloudi, K., Shao, Z., Daudelin, J. F., . . . Sapieha, P. (2014). Neuropilin-1 mediates myeloid cell chemoattraction and influences retinal neuroimmune crosstalk. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(11), 4807-4822. doi:10.1172/Jci76492
- Dejda, A., **Mawambo-Tagne, G. S.**, Daudelin, J. F., Akla, N., Patel, C., Miloudi, K., . . . Sapieha, P. (2014). Myeloid cell-resident neuropilin-1 is dispensable for retinal vascular development. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(13). Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000433205503180
- Eltzschig, H. K., Bratton, D. L., & Colgan, S. P. (2014a). Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, *13*(11), 852-869. doi:10.1038/nrd4422
- Eubank, T., Roda, J., Liu, H., O'Neil, T., & Marsh, C. (2011). Opposing roles for HIF-1 α and HIF-2 α in the regulation of angiogenesis by mononuclear phagocytes. *Blood*, *117*(1), 323-332.
- Fantin, A., Vieira, J., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhodzhiy, S., . . . Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, *116*(5), 829-840.
- Fisher, C., & Ferrington, D. (2018). Perspective on AMD Pathobiology: A Bioenergetic Crisis in the RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *59*(4), AMD41-AMD47.
- Flaxel, C., Adelman, R., Bailey, S., Fawzi, A., Lim, J., Vemulakonda, G. A., & Ying, G.-S. (2019). Diabetic Retinopathy Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*.
- Forrester, J., McMenamin, P., & Dando, S. (2018). CNS infection and immune privilege. *Nature Reviews Neuroscience*, *19*(11), 655-671.
- Funatsu, H., Yamashita, H., Noma, H., Mimura, T., Yamashita, T., & Hori, S. (2002). Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. *Am J Ophthalmol*, *133*(1), 70-77. doi:10.1016/s0002-9394(01)01269-7
- Furukawa, T., Ueno, A., & Omori, Y. (2019). Molecular mechanisms underlying selective synapse formation of vertebrate retinal photoreceptor cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Gao, X., Li, Y., Wang, H., Li, C., & Ding, J. (2017). Inhibition of HIF-1 α decreases expression of pro-inflammatory IL-6 and TNF- α in diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol*, *95*(8), e746-e750. doi:10.1111/aos.13096

- Gardiner, T., Gibson, D., de Gooyer, T., de la Cruz, V. F., McDonald, D., & Stitt, A. (2005). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha improves physiological angiogenesis and reduces pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *The American journal of pathology*, *166*(2), 637-644.
- Gariano Ray, F. R. (2005). Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, *438*(7070), 960-966.
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E. S., Perera, B. G., Igarria, A., Morita, S., . . . Papa, F. R. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1alpha RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*, *158*(3), 534-548. doi:10.1016/j.cell.2014.07.002
- Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordao, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., . . . Prinz, M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nature Immunology*, *17*(7), 797-+. doi:10.1038/ni.3423
- Gomez Perdiguer, E., Schulz, C., & Geissmann, F. (2013). Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia*, *61*(1), 112-120. doi:10.1002/glia.22393
- Goto, Y., Kakizaki, M., & Masaki, N. (1976). Production of spontaneous diabetic rats by repetition of selective breeding. *Tohoku J Exp Med*, *119*(1), 85-90. doi:10.1620/tjem.119.85
- Goto, Y., Suzuki, K., Ono, T., Sasaki, M., & Toyota, T. (1988). Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Oxygen Sensing: Molecule to Man*, *246*, 29-31. doi:10.1007/978-1-4684-5616-5_4
- Guillonneau, X., Eandi, C., Paques, M., Sahel, J.-A., Sapieha, P., & Sennlaub, F. (2017). On phagocytes and macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, *61*, 98-128.
- Han, D., Lerner, A. G., Vande Walle, L., Upton, J. P., Xu, W., Hagen, A., . . . Papa, F. R. (2009). IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*, *138*(3), 562-575. doi:10.1016/j.cell.2009.07.017
- Hartnett, M. (2017). Advances in understanding and management of retinopathy of prematurity. *Survey of ophthalmology*, *62*(3), 257-276.
- Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., . . . Merad, M. (2013). Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity*, *38*(4), 792-804. doi:10.1016/j.immuni.2013.04.004

- Hellstrom, A., Smith, L. E. H., & Dammann, O. (2013). Retinopathy of prematurity. *Lancet*, 382(9902), 1445-1457. doi:10.1016/S0140-6736(13)60178-6
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D., & Glimcher, L. H. (2011). THE UNFOLDED PROTEIN RESPONSE: INTEGRATING STRESS SIGNALS THROUGH THE STRESS SENSOR IRE1 alpha. *Physiological Reviews*, 91(4), 1219-1243. doi:10.1152/physrev.00001.2011
- Hollien, J., & Weissman, J. (2006). Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science*, 313(5783), 104-107.
- Hong, S., Beja-Glasser, V. F., Nfonoyim, B. M., Frouin, A., Li, S. M., Ramakrishnan, S., . . . Stevens, B. (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*, 352(6286), 712-716. doi:10.1126/science.aad8373
- Ito, Y., & Di Polo, A. (2017). Mitochondrial dynamics, transport, and quality control: A bottleneck for retinal ganglion cell viability in optic neuropathies. *Mitochondrion (Amsterdam. Print)*, 36, 186-192.
- Jefferies, A. L., Canadian Paediatric Society, F., & Newborn, C. (2016). Retinopathy of prematurity: An update on screening and management. *Paediatr Child Health*, 21(2), 101-108. doi:10.1093/pch/21.2.101
- Joyal, J. S., Sitaras, N., Binet, F., Rivera, J. C., Stahl, A., Zaniolo, K., . . . Sapielha, P. (2011). Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood*, 117(22), 6024-6035. doi:10.1182/blood-2010-10-311589
- Jurczak, M. J., Lee, A. H., Jornayvaz, F. R., Lee, H. Y., Birkenfeld, A. L., Guigni, B. A., . . . Shulman, G. I. (2012). Dissociation of Inositol-requiring Enzyme (IRE1 alpha)-mediated c-Jun N-terminal Kinase Activation from Hepatic Insulin Resistance in Conditional X-box-binding Protein-1 (XBP1) Knock-out Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 287(4), 2558-2567. doi:10.1074/jbc.M111.316760
- Karlstetter, M., Ebert, S., & Langmann, T. (2010). Microglia in the healthy and degenerating retina: insights from novel mouse models. *Immunobiology*, 215(9-10), 685-691. doi:10.1016/j.imbio.2010.05.010
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W., Provis, J., & Langmann, T. (2015). Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 30-57.
- Kataoka, K., Nishiguchi, K. M., Kaneko, H., van Rooijen, N., Kachi, S., & Terasaki, H. (2011). The roles of vitreal macrophages and circulating leukocytes in retinal

neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(3), 1431-1438. doi:10.1167/iovs.10-5798

- Kaul, K., Hodgkinson, A., Tarr, J. M., Kohner, E. M., & Chibber, R. (2010). Is inflammation a common retinal-renal-nerve pathogenic link in diabetes? *Curr Diabetes Rev*, 6(5), 294-303. doi:10.2174/157339910793360851
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*, 77(1), 10-18. doi:10.1016/j.neuron.2012.12.023
- Kietzmann, T., Mennerich, D., & Dimova, E. Y. (2016). Hypoxia-Inducible Factors (HIFs) and Phosphorylation: Impact on Stability, Localization, and Transactivity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, 11. doi:10.3389/fcell.2016.00011
- Kim, Y., Nam, H., Lee, J., Park, D., Kim, C., Yu, Y., . . . Baek, S. (2016). Methylation-dependent regulation of HIF-1 α stability restricts retinal and tumour angiogenesis. *Nature communications*, 7, 10347.
- Kolb, H. (1970). Organization of Outer Plexiform Layer of Primate Retina - Electron Microscopy of Golgi-Impregnated Cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 258(823), 261-+. doi:DOI 10.1098/rstb.1970.0036
- Kolb, H. (1997). Amacrine cells of the mammalian retina: Neurocircuitry and functional roles. *Eye*, 11, 904-923. doi:DOI 10.1038/eye.1997.230
- Kolb, H. (2003). How the retina works - Much of the construction of an image takes place in the retina itself through the use of specialized neural circuits. *American Scientist*, 91(1), 28-35. doi:Doi 10.1511/2003.1.28
- Kolb, H., Fernandez, E., & Nelson, R. (1995). *Simple Anatomy of the Retina Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*.
- Kolb, H., Linberg, K. A., & Fisher, S. K. (1992). Neurons of the Human Retina - a Golgi-Study. *Journal of Comparative Neurology*, 318(2), 147-187. doi:DOI 10.1002/cne.903180204
- Krady, J. K., Basu, A., Allen, C. M., Xu, Y., LaNoue, K. F., Gardner, T. W., & Levison, S. W. (2005). Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes*, 54(5), 1559-1565. doi:10.2337/diabetes.54.5.1559
- Kumanogoh, A., & Kikutani, H. (2013). Immunological functions of the neuropilins and plexins as receptors for semaphorins. *Nat Rev Immunol*, 13(11), 802-814.

- Kurihara, T. (2018). Roles of Hypoxia Response in Retinal Development and Pathophysiology. *Keio J Med*, 67(1), 1-9. doi:10.2302/kjm.2017-0002-IR
- Ladeby, R., Wirenfeldt, M., Garcia-Ovejero, D., Fenger, C., Dissing-Olesen, L., Dahnau, I., & Finsen, B. (2005). Microglial cell population dynamics in the injured adult central nervous system. *Brain Research Reviews*, 48(2), 196-206. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.12.009
- Lechner, J., O'Leary, O. E., & Stitt, A. W. (2017). The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*, 139, 7-14. doi:10.1016/j.visres.2017.04.003
- Lee, A. H., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Molecular and Cellular Biology*, 23(21), 7448-7459. doi:10.1128/Mcb.23.21.7448-7459.2003
- Lerner, A., Upton, J.-P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igbaria, A., . . . Papa, F. (2012). IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metabolism*, 16(2), 250-264.
- Li, J., Wang, J. J., Yu, Q., Wang, M., & Zhang, S. X. (2009). Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *Febs Letters*, 583(9), 1521-1527. doi:10.1016/j.febslet.2009.04.007
- Li, Q. Y., & Barres, B. A. (2018). Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Reviews Immunology*, 18(4), 225-242. doi:10.1038/nri.2017.125
- Liang, W. C., Dennis, M. S., Stawicki, S., Chanthery, Y., Pan, Q., Chen, Y., . . . Wu, Y. (2007). Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J Mol Biol*, 366(3), 815-829. doi:10.1016/j.jmb.2006.11.021
- Liegl, R., Hellstrom, A., & Smith, L. E. H. (2016). Retinopathy of prematurity: the need for prevention. *Eye and Brain*, 8, 91-102. doi:10.2147/Eb.S99038
- Lin, M., Chen, Y., Jin, J., Hu, Y., Zhou, K. K., Zhu, M., . . . Ma, J. X. (2011). Ischaemia-induced retinal neovascularisation and diabetic retinopathy in mice with conditional knockout of hypoxia-inducible factor-1 in retinal Müller cells. *Diabetologia*, 54(6), 1554-1566.
- Lindholm, D., Korhonen, L., Eriksson, O., & Koks, S. (2017). Recent Insights into the Role of Unfolded Protein Response in ER Stress in Health and Disease. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. doi:UNSP 48 10.3389/fcell.2017.00048

- Lipson, K., Ghosh, R., & Urano, F. (2008). The role of IRE1alpha in the degradation of insulin mRNA in pancreatic beta-cells. *PLoS One*, *3*(2), e1648-e1648.
- Liu Chi-Hsiu, C. H. (2017). Animal models of ocular angiogenesis: from development to pathologies. *FASEB Journal, The*, *31*(11), 4665-4681.
- Liu, L., Qi, X., Chen, Z., Shaw, L., Cai, J., Smith, L. H., . . . Boulton, M. E. (2013). Targeting the IRE1alpha/XBP1 and ATF6 arms of the unfolded protein response enhances VEGF blockade to prevent retinal and choroidal neovascularization. *American Journal of Pathology*, *182*(4), 1412-1424. doi:10.1016/j.ajpath.2012.12.020
- Luty Gerard, A. G. (2018). Development of the hyaloid, choroidal and retinal vasculatures in the fetal human eye. *Progress in Retinal and Eye Research*, *62*, 58-76.
- Majmundar, A., Wong, W., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*, *40*(2), 294-309.
- Marchetti, V., Yanes, O., Aguilar, E., Wang, M., Friedlander, D., Moreno, S., . . . Friedlander, M. (2011). Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy. *Scientific Reports*, *1*, 76-76.
- Meleth, A. D., Agron, E., Chan, C. C., Reed, G. F., Arora, K., Byrnes, G., . . . Chew, E. Y. (2005). Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *46*(11), 4295-4301. doi:10.1167/iovs.04-1057
- Mennerich, D., Dimova, E. Y., & Kietzmann, T. (2014). Direct phosphorylation events involved in HIF-alpha regulation: the role of GSK-3beta. *Hypoxia (Auckl)*, *2*, 35-45. doi:10.2147/HP.S60703
- Miltner, A., & La Torre, A. (2019). Retinal Ganglion Cell Replacement: Current Status and Challenges Ahead. *Developmental Dynamics*, *248*(1), 118-128.
- Mowat, F., Luhmann, U. F. O., Smith, A., Lange, C., Duran, Y., Harten, S., . . . Bainbridge, J. W. B. (2010). HIF-1alpha and HIF-2alpha are differentially activated in distinct cell populations in retinal ischaemia. *PLoS One*, *5*(6), e11103-e11103.
- Nathans, J., Thomas, D., & Hogness, D. S. (1986). Molecular genetics of human color vision: the genes encoding blue, green, and red pigments. *Science*, *232*(4747), 193-202.
- Oikawa, D., Tokuda, M., & Iwawaki, T. (2007). Site-specific cleavage of CD59 mRNA by endoplasmic reticulum-localized ribonuclease, IRE1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *360*(1), 122-127.
- Omri, S., Behar-Cohen, F., de Kozak, Y., Sennlaub, F., Verissimo, L. M., Jonet, L., . . . Crisanti, P. (2011). Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier

by a transcellular route in diabetic retinopathy: role of PKCzeta in the Goto Kakizaki rat model. *American Journal of Pathology*, 179(2), 942-953. doi:10.1016/j.ajpath.2011.04.018

- Ozaki, H., Yu, A. Y., Della, N., Ozaki, K., Luna, J. D., Yamada, H., . . . Campochiaro, P. A. (1999). Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(1), 182-189.
- Pan, Q., Chanthery, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., . . . Watts, R. J. (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell*, 11(1), 53-67. doi:10.1016/j.ccr.2006.10.018
- Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R. K., Peale, F., . . . Watts, R. J. (2007). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 24049-24056. doi:10.1074/jbc.M703554200
- Patnaik, A., LoRusso, P. M., Messersmith, W. A., Papadopoulos, K. P., Gore, L., Beeram, M., . . . Weekes, C. D. (2014). A Phase Ib study evaluating MNRP1685A, a fully human anti-NRP1 monoclonal antibody, in combination with bevacizumab and paclitaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 73(5), 951-960. doi:10.1007/s00280-014-2426-8
- Peet, D. J., Kittipassorn, T., Wood, J. P., Chidlow, G., & Casson, R. J. (2017). HIF signalling: The eyes have it. *Experimental Cell Research*, 356(2), 136-140. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.030
- Pellet Many, C., Frankel, P., Jia, H., & Zachary, I. (2008). Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochemical Journal*, 411(2), 211-226.
- Peng, Y., Liu, Y. M., Li, L. C., Wang, L. L., & Wu, X. L. (2014). MicroRNA-338 inhibits growth, invasion and metastasis of gastric cancer by targeting NRP1 expression. *PLoS One*, 9(4), e94422. doi:10.1371/journal.pone.0094422
- Perez-Cerda, F., Sanchez-Gomez, M. V., & Matute, C. (2015). Pio del Rio Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9. doi:ARTN 92 10.3389/fnana.2015.00092
- Pierce, E. A. E. (1995). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(3), 905-909.

- Prud'homme, G. J., & Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget*, 3(9), 921-939.
- Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J. (2017). New horizons in hypoxia signaling pathways. *Experimental Cell Research*, 356(2), 116-121. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.008
- Raimondi, C., Brash, J. T., Fantin, A., & Ruhrberg, C. (2016). NRP1 function and targeting in neurovascular development and eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 52, 64-83. doi:10.1016/j.preteyeres.2016.02.003
- Raimondi, C., Fantin, A., Lampropoulou, A., Denti, L., Chikh, A., & Ruhrberg, C. (2014). Imatinib inhibits VEGF-independent angiogenesis by targeting neuropilin 1-dependent ABL1 activation in endothelial cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 211(6), 1167-1183.
- Rathnasamy, G., Foulds, W. S., Ling, E. A., & Kaur, C. (2019a). Retinal microglia - A key player in healthy and diseased retina. *Progress in Neurobiology*, 173, 18-40. doi:10.1016/j.pneurobio.2018.05.006
- Rattner Amir, A. (2019). Roles of HIFs and VEGF in angiogenesis in the retina and brain. *The Journal of clinical investigation*, 129(9), 3807-3820.
- Reyes, N. J., O'Koren, E. G., & Saban, D. R. (2017). New insights into mononuclear phagocyte biology from the visual system. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 322-332. doi:10.1038/nri.2017.13
- Ritter, M. R., Banin, E., Moreno, S. K., Aguilar, E., Dorrell, M. I., & Friedlander, M. (2006). Myeloid progenitors differentiate into microglia and promote vascular repair in a model of ischemic retinopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 116(12), 3266-3276. doi:10.1172/JCI29683
- Rivera, J. C., Sitaras, N., Noueihed, B., Hamel, D., Madaan, A., Zhou, T., . . . Chemtob, S. (2013). Microglia and interleukin-1beta in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(8), 1881-1891. doi:10.1161/ATVBAHA.113.301331
- Romero-Ramirez, L., Cao, H. B., Nelson, D., Hammond, E., Lee, A. H., Yoshida, H., . . . Koong, A. C. (2004). XBP1 is essential for survival under hypoxic conditions and is required for tumor growth. *Cancer Research*, 64(17), 5943-5947. doi:Doi 10.1158/0008-5472.Can-04-1606
- Rosen, D. A., Seki, S. M., Fernandez-Castaneda, A., Beiter, R. M., Eccles, J. D., Woodfolk, J. A., & Gaultier, A. (2019). Modulation of the sigma-1 receptor-IRE1

pathway is beneficial in preclinical models of inflammation and sepsis. *Science Translational Medicine*, 11(478). doi:ARTN eaau5266
10.1126/scitranslmed.aau5266

- Saint-Geniez, M., Ghelfi, E., Liang, X., Yu, C., Spencer, C., Abend, S., . . . Cataltepe, S. (2014). Fatty acid binding protein 4 deficiency protects against oxygen-induced retinopathy in mice. *PLoS One*, 9(5), e96253. doi:10.1371/journal.pone.0096253
- Sankrityayan, H., Oza, M., Kulkarni, Y., Mulay, S., & Gaikwad, A. (2019). ER stress response mediates diabetic microvascular complications. *Drug Discovery Today*, 24(12), 2247-2257.
- Sano, R., & Reed, J. C. (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, 1833(12), 3460-3470. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.06.028
- Sapiaha, P., Hamel, D., Shao, Z., Rivera, J. C., Zaniolo, K., Joyal, J. S., & Chemtob, S. (2010). Proliferative retinopathies: Angiogenesis that blinds. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(1), 5-12. doi:10.1016/j.biocel.2009.10.006
- Sapiaha, P., Stahl, A., Chen, J., Seaward, M. R., Willett, K. L., Krah, N. M., . . . Smith, L. E. H. (2011). 5-Lipoxygenase Metabolite 4-HDHA Is a Mediator of the Antiangiogenic Effect of omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. *Science Translational Medicine*, 3(69). doi:ARTN 69ra12
10.1126/scitranslmed.3001571
- Seifi Alan, M., Shams, R., Bandehpour, M., Mirfakhraie, R., & Ghafouri Fard, S. (2018). Neuropilin-1 expression is associated with lymph node metastasis in breast cancer tissues. *Cancer management and research*, 10, 1969-1974.
- Selvam Senthil, S. (2018). Retinal vasculature development in health and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 63, 1-19.
- Semenza, G. L. (2000). HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 88(4), 1474-1480. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000086312900043
- Semenza, G. L. (2001). HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current Opinion in Cell Biology*, 13(2), 167-171. doi:Doi 10.1016/S0955-0674(00)00194-0
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*, 148(3), 399-408. doi:10.1016/j.cell.2012.01.021
- Semenza, G. L. (2017). A compendium of proteins that interact with HIF-1 alpha. *Experimental Cell Research*, 356(2), 128-135. doi:10.1016/j.yexcr.2017.03.041

- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(12), 5447-5454. doi:10.1128/mcb.12.12.5447
- Shimizu, E., Funatsu, H., Yamashita, H., Yamashita, T., & Hori, S. (2002). Plasma level of interleukin-6 is an indicator for predicting diabetic macular edema. *Jpn J Ophthalmol*, *46*(1), 78-83. doi:10.1016/s0021-5155(01)00452-x
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J. P., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., . . . Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia Shape Adult Hippocampal Neurogenesis through Apoptosis-Coupled Phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 483-495. doi:10.1016/j.stem.2010.08.014
- Siskova, Z., & Tremblay, M. E. (2013). Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration. *Neural Plast*, *2013*, 425845. doi:10.1155/2013/425845
- Smith, L. E. H., Wesolowski, E., Mclellan, A., Kostyk, S. K., Damato, R., Sullivan, R., & Damore, P. A. (1994). Oxygen-Induced Retinopathy in the Mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *35*(1), 101-111. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:A1994MU70300010
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 7-35. doi:10.1007/s00401-009-0619-8
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., & Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, *92*(6), 735-745.
- Sorrentino, F. S., Alikabes, M., Salsini, G., Bonifazzi, C., & Perri, P. (2016). The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sciences*, *162*, 54-59. doi:10.1016/j.lfs.2016.08.001
- Steinberg, R. H. (1985). Interactions between the retinal pigment epithelium and the neural retina. *Documenta Ophthalmologica*, *60*(4), 327-346.
- Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, *154*(2), 204-219.
- Stratoulis, V., Venero, J. L., Tremblay, M. E., & Joseph, B. (2019). Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *Embo Journal*, *38*(17), e101997. doi:10.15252/embj.2019101997

- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological Reviews*, 85(3), 845-881.
- Strauss, O. (2009). [The role of retinal pigment epithelium in visual functions]. *Der Ophthalmologe*, 106(4), 299-304.
- Subhani, S., Vavilala, D., & Mukherji, M. (2016). HIF inhibitors for ischemic retinopathies and cancers: options beyond anti-VEGF therapies. *Angiogenesis*, 19(3), 257-273.
- Talia, D. M., Deliyanti, D., Agrotis, A., & Wilkinson-Berka, J. L. (2016). Inhibition of the Nuclear Receptor RORgamma and Interleukin-17A Suppresses Neovascular Retinopathy: Involvement of Immunocompetent Microglia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36(6), 1186-1196. doi:10.1161/ATVBAHA.115.307080
- Tang, J., & Kern, T. S. (2011). Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 30(5), 343-358. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.05.002
- Tashiro, E. (2019). Screening and identification of inhibitors of endoplasmic reticulum stress-induced activation of the IRE1 α -XBP1 branch. *The Journal of Antibiotics*, 72(12), 899-905.
- Tata, M., Ruhrberg, C., & Fantin, A. (2015). Vascularisation of the central nervous system. *Mechanisms of development*, 138 Pt 1, 26-36.
- Tay, T. L., Bechade, C., D'Andrea, I., St-Pierre, M. K., Henry, M. S., Roumier, A., & Tremblay, M. E. (2017). Microglia Gone Rogue: Impacts on Psychiatric Disorders across the Lifespan. *Front Mol Neurosci*, 10, 421. doi:10.3389/fnmol.2017.00421
- Tay, T. L., Carrier, M., & Tremblay, M. E. (2019). Physiology of Microglia. *Oxygen Sensing: Molecule to Man*, 1175, 129-148. doi:10.1007/978-981-13-9913-8_6
- Tordjman, R., Lepelletier, Y., Lemarchandel, V., Cambot, M., Gaulard, P., Hermine, O., & Roméo, P.-H. (2002). A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nature Immunology*, 3(5), 477-482.
- Tsang, S., & Sharma, T. (2018). Retinal Histology and Anatomical Landmarks. *Oxygen Sensing: Molecule to Man*, 1085, 3-5.
- Upton, J. P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., . . . Oakes, S. A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science*, 338(6108), 818-822. doi:10.1126/science.1226191
- Vavilala, D., O'Bryhim, B., Ponnaluri, V. K. C., White, R. S., Radel, J., Symons, R. C. A., & Mukherji, M. (2013). Honokiol inhibits pathological retinal neovascularization in

oxygen-induced retinopathy mouse model. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(4), 697-702.

- Vessey, K. A., Wilkinson-Berka, J. L., & Fletcher, E. L. (2011). Characterization of retinal function and glial cell response in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Journal of Comparative Neurology*, 519(3), 506-527. doi:10.1002/cne.22530
- Vieira, J., Schwarz, Q., & Ruhrberg, C. (2007). Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Development*, 134(10), 1833-1843.
- Voskuhl, R. R., Peterson, R. S., Song, B., Ao, Y., Morales, L. B., Tiwari-Woodruff, S., & Sofroniew, M. V. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *Journal of Neuroscience*, 29(37), 11511-11522. doi:10.1523/JNEUROSCI.1514-09.2009
- Vujosevic, S., Micera, A., Bini, S., Berton, M., Esposito, G., & Midena, E. (2016). Proteome analysis of retinal glia cells-related inflammatory cytokines in the aqueous humour of diabetic patients. *Acta Ophthalmol*, 94(1), 56-64. doi:10.1111/aos.12812
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, 334(6059), 1081-1086. doi:10.1126/science.1209038
- Weidemann, A., Krohne, T., Aguilar, E., Kurihara, T., Takeda, N., Dorrell, M., . . . Johnson, R. (2010). Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *GLIA*, 58(10), 1177-1185.
- Wilkinson-Berka, J. L., Deliyanti, D., Rana, I., Miller, A. G., Agrotis, A., Armani, R., . . . Schmidt, H. H. (2014). NADPH oxidase, NOX1, mediates vascular injury in ischemic retinopathy. *Antioxid Redox Signal*, 20(17), 2726-2740. doi:10.1089/ars.2013.5357
- Wu, Y. Y., Chen, Y. L., Jao, Y. C., Hsieh, I. S., Chang, K. C., & Hong, T. M. (2014). miR-320 regulates tumor angiogenesis driven by vascular endothelial cells in oral cancer by silencing neuropilin 1. *Angiogenesis*, 17(1), 247-260. doi:10.1007/s10456-013-9394-1
- Xia, X.-b., Xiong, S.-q., Xu, H.-z., Jiang, J., & Li, Y. (2008). Suppression of retinal neovascularization by shRNA targeting HIF-1alpha. *Current eye research*, 33(10), 892-902.
- Xu, H., & Chen, M. (2017). Diabetic retinopathy and dysregulated innate immunity. *Vision Research*, 139, 39-46. doi:10.1016/j.visres.2017.04.013
- Xu Hui-Zhuo, H. Z. (2013). HIF-1a siRNA reduces retinal neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Translational pediatrics*, 2(1), 14-20.

- Yamasaki, R., Lu, H. Y., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A. M., Cialic, R., . . . Ransohoff, R. M. (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *Journal of Experimental Medicine*, *211*(8), 1533-1549. doi:10.1084/jem.20132477
- Yoshida, T., Zhang, H., Iwase, T., Shen, J., Semenza, G., & Campochiaro, P. (2010). Digoxin inhibits retinal ischemia-induced HIF-1alpha expression and ocular neovascularization. *The FASEB journal*, *24*(6), 1759-1767.
- Yu, W., Bai, Y., Han, N., Wang, F., Zhao, M., Huang, L., & Li, X. (2013). Inhibition of pathological retinal neovascularization by semaphorin 3A. *Molecular Vision*, *19*, 1397-1405.
- Zeng, H.-y., Green, W., & Tso, M. O. M. (2008). Microglial activation in human diabetic retinopathy. *Archives of Ophthalmology (1960)*, *126*(2), 227-232.
- Zeng, M., Shen, J., Liu, Y., Lu, L., Ding, K., Fortmann, S., . . . Campochiaro, P. (2017). The HIF-1 antagonist acriflavine: visualization in retina and suppression of ocular neovascularization. *Journal of Molecular Medicine*, *95*(4), 417-429.
- Zhao, L., Ma, W., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2009). Retinal vascular repair and neovascularization are not dependent on CX3CR1 signaling in a model of ischemic retinopathy. *Exp Eye Res*, *88*(6), 1004-1013. doi:10.1016/j.exer.2008.12.013
- Zhao, Y., & Singh, R. P. (2018). The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy. *Drugs Context*, *7*, 212532. doi:10.7573/dic.212532

