

Université de Montréal

**Mécanisme régulateur et potentiel thérapeutique des
micro-ARNs durant la vaso-oblitération dans
la rétinopathie du prématuré**

Par

Maëlle Wirth

Département des sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.) en
Sciences Biomédicales, option médecine expérimentale

Avril, 2023

© Maëlle Wirth, 2023

Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

**Mécanisme régulateur et potentiel thérapeutique des
micro-ARNs durant la vaso-oblitération dans
la rétinopathie du prématuré**

Présentée par :

Maëlle Wirth

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Sophie Tremblay, Présidente-rapporteuse

Dr Sylvain Chemtob, Directeur de recherche

Dr Michel Desjarlais, Codirecteur

Dre Elvire Vaucher, Membre du jury

Dr Pedro Miguel Geraldès, Examineur externe

Résumé

La rétinopathie du prématuré, modélisée par les modèles de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR), est l'une des principales causes de cécité dans l'enfance. Elle est constituée d'une première phase de vaso-oblitération rétinienne et choroïdienne suivie d'une phase de néovascularisation post-ischémique rétinienne. La phase de dégénérescence vasculaire est entre autres liée d'une part à une baisse de l'expression des facteurs pro-angiogéniques et d'autre part à une inflammation rétinienne excessive. Toutefois, les mécanismes post-transcriptionnels à l'origine de ces phénomènes demeurent peu connus. La dérégulation des microARNs (miRs), des ARNs non codants régulant négativement l'expression des gènes, est impliquée dans la modulation de multiples processus physiologiques et pathologiques dont l'angiogenèse et l'inflammation. Cependant, le rôle des miRs dans l'angiogenèse et l'inflammation au cours de l'OIR reste à explorer. Basé sur l'établissement préalable d'un profil de modulation de l'expression des miRs au cours de l'OIR, nous avons sélectionné et caractérisé dans cette thèse le rôle d'un miR sur la fonction angiogénique puis d'un miR sur la fonction inflammatoire dans l'OIR.

Nous avons caractérisé dans un premier temps, le miR-96. L'expression du miR-96 était significativement diminuée *in vivo* dans la rétine et la choroïde lors de la phase de vaso-oblitération du modèle murin de l'OIR. *In vitro*, le miR-96 était régulé négativement par l'hyperoxie dans les cellules endothéliales rétiniennes. La supplémentation en miR-96 avait un effet pro-angiogénique sur les cellules endothéliales rétiniennes soumises à l'hyperoxie par la préservation de la signalisation de facteurs angiogéniques, tels que VEGF et Ang2, leur permettant de maintenir leur capacité de migration et de tubulogenèse. *In vivo*, la supplémentation intravitréenne en miR-96 exerçait également ces fonctions vaso-protectives et permettait de préserver la microvascularisation rétinienne et choroïdienne par le maintien du niveau d'expression physiologique de VEGF et Ang2. Dans un second temps, nous avons caractérisé le miR-125a. L'expression du miR-125a était significativement diminuée *in vivo* dans la rétine lors de la phase de vaso-

oblitération du modèle murin de l'OIR, mais également *in vitro* dans les cellules microgliales soumises à l'inflammation par hyperoxie ou LPS, ce qui était inversement corrélé à une augmentation de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-6 et IL-16. Le miR-125a a été caractérisé comme anti-inflammatoire et sa supplémentation dans les cellules microgliales activées diminuait significativement l'expression de ces marqueurs pro-inflammatoires. La modification du sécrétome des cellules microgliales permettait une récupération des capacités angiogéniques des cellules endothéliales rétinienne avec amélioration de leur prolifération et de leur tubulogénèse. *In vivo*, la supplémentation intravitréenne en mir-125a permettait de maintenir une expression physiologique de TNF- α , IL-6 et IL-16, ce qui était associé à une diminution de la vaso-oblitération rétinienne.

Collectivement, ces travaux ont permis d'identifier et de caractériser le rôle du miR-96 dans la dysfonction angiogénique et du miR-125a dans la dysfonction inflammatoire lors de l'OIR. Cette thèse démontre pour la première fois qu'une thérapie basée sur la modulation de miRs spécifiques permettait de prévenir la dégénérescence vasculaire de l'OIR. Ces résultats pourraient constituer la base de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement précoce des rétinopathies ischémiques comme la rétinopathie du prématuré.

Mots-clés : Rétinopathie du prématuré (ROP), angiogenèse, inflammation, micro-ARN (miR), cellule endothéliale, cellule microgliale.

Abstract

Retinopathy of prematurity is one of the leading causes of blindness in childhood and is represented by oxygen-induced retinopathy (OIR) models. It's characterized by a first phase of retinal and choroidal vasoobliteration followed by a retinal neovascularization. The vascular degeneration is partly linked to a decrease in the expression of pro-angiogenic factors and to an excessive retinal inflammation. However, the post-transcriptional mechanisms implicated remain poorly understood. microRNAs (miRs) are non-coding RNAs that negatively regulate gene expression. Dysregulation of miRs is involved in the modulation of multiple physiological and pathological processes including angiogenesis and inflammation. However, the role of miRs in angiogenesis and inflammation during OIR remains to be explored. Based on the prior establishment of the modulation profile of miRs expression during OIR, we selected and characterized in this thesis the role of a miR on the angiogenic function then another miR on the inflammatory function in OIR.

We first characterized the miR-96. *In vivo*, miR-96 expression was significantly downregulated in the retina and choroid during the vaso-obliteration phase of OIR rat. *In vitro*, miR-96 was downregulated by hyperoxia in retinal endothelial cells. miR-96 overexpression had a pro-angiogenic effect on retinal endothelial cells subjected to hyperoxia by preserving the signaling of angiogenic factors including VEGF and Ang2. This allowed to maintain their capacity for migration and tubulogenesis. *In vivo*, intravitreal supplementation with miR-96 also exerted these vasoprotective functions and preserved retinal and choroidal microvasculature by maintaining the physiological expression level of VEGF and Ang2.

Secondly, we characterized the miR-125a. *In vivo*, the expression of miR-125a was significantly reduced in the retina during the vaso-obliteration phase of the OIR rat. *In vitro*, miR-125a was downregulated in microglial cells subjected to inflammation by hyperoxia or LPS, which was inversely correlated with an increase in pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 and IL-16. miR-125a was characterized as anti-inflammatory and its overexpression in activated microglial cells significantly decreased the expression

of these pro-inflammatory markers. The modification of the secretome of the microglial cells allowed a recovery of the angiogenic capacities of the retinal endothelial cells with improvement of their proliferation and their tubulogenesis. *In vivo*, intravitreal supplementation with mir-125a maintained a physiological expression of TNF- α , IL-6 and IL-16, which was associated with a decrease in retinal vaso-obliteration.

Collectively, these tasks identified and characterized the role of miR-96 in angiogenic dysfunction and miR-125a in inflammatory dysfunction during OIR. This thesis demonstrates for the first time that a therapy based on the modulation of specific miRs can prevent the OIR vascular degeneration. These results could form the basis of new therapeutic strategies in the early treatment of ischemic retinopathies such as retinopathy of prematurity.

Key words: Retinopathy of prematurity (ROP), angiogenesis, inflammation, micro-RNA (miR), endothelial cell, microglial cell.

Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	5
Table des matières.....	7
Liste des tableaux.....	14
Liste des figures.....	15
Liste des abréviations, signes et acronymes.....	18
Remerciements.....	25
I. Introduction.....	27
Chapitre 1. L'œil : rôle, structure et fonction.....	27
1.1 Fonction visuelle.....	27
1.2 Embryogenèse de l'œil et de la rétine.....	28
1.3 Anatomie de l'œil.....	29
1.4 Organisation morphologique de la rétine.....	30
1.4.1 Anatomie de la rétine.....	30
1.4.2 Histologie de la rétine.....	31
1.5 Fonctionnement rétinien.....	34
1.5.1 Généralités.....	34
1.5.2 Physiologie rétinienne.....	35
1.5.2.1 La phototransduction.....	35
1.5.2.2 Le cycle visuel.....	36
1.5.3 Métabolisme énergétique rétinien.....	37
1.6 Vascularisation rétinienne.....	39
1.6.1 Caractérisation de la vascularisation rétinienne.....	39
1.6.2 Développement vasculaire in utero.....	40
1.6.3 La microvascularisation rétinienne.....	41
1.7 Résumé.....	43
Chapitre 2. Développement vasculaire.....	44
2.1 Système circulatoire.....	44
2.1.1 Généralités.....	44
2.1.2 Les vaisseaux sanguins.....	45
2.1.2.1 Artères et artérioles.....	45
2.1.2.2 Veines et veinules.....	48

2.1.2.3	Capillaires	49
2.2	La néovascularisation	49
2.2.2	La vasculogénèse	50
2.2.2.1	Genèse des vaisseaux	50
2.2.2.2	Place de la vasculogénèse dans la néovascularisation post-ischémique.....	51
2.2.3	Artériogénèse.....	53
2.2.4	Angiogénèse	56
2.2.4.1	Description générale de l'angiogénèse.....	56
2.2.4.2	L'hypoxie à l'origine de l'induction du processus angiogénique.....	59
2.2.4.3	La phase d'activation de l'angiogénèse.....	59
2.2.4.4	La phase de maturation de l'angiogénèse.....	60
2.2.4.5	La phase de résolution de l'angiogénèse.....	62
2.2.4.6	Le phénomène de switch angiogénique.....	64
2.2.5	Régulation de la néovascularisation	66
2.2.5.1	Principaux facteurs clés pro-angiogéniques dans la néovascularisation oculaire.....	66
2.2.5.1.1	Le <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> , VEGF, acteur essentiel de l'angiogénèse	66
2.2.5.1.2	Autres facteurs angiogéniques d'intérêt	69
2.2.5.2	Principaux facteurs clés anti-angiogéniques.....	70
2.3	Rôles supplémentaires de l'endothélium vasculaire.....	71
2.3.1	Rôle dans la perméabilité vasculaire	73
2.3.2	Rôle dans la motricité vasculaire.....	73
2.3.3	Rôle dans la coagulation	76
2.3.4	Rôle dans le processus inflammatoire.....	76
2.4	Résumé.....	78
Chapitre 3. Inflammation		79
3.1	Inflammation : généralités	79
3.2	Cellules impliquées dans l'inflammation.....	80
3.2.1	Les Toll Like Receptors.....	80
3.2.2	Les cellules de l'immunité innée	81
3.2.2.1	Les mastocytes	81
3.2.2.2	Les polynucléaires neutrophiles.....	82
3.2.2.3	Les monocytes et les macrophages	84

3.2.2.4	Les polynucléaires basophiles	86
3.2.2.5	Les polynucléaires éosinophiles	88
3.2.2.6	Les lymphocytes Natural Killer	89
3.2.3	Les cellules de l'immunité adaptative.....	89
3.2.3.1	Les lymphocytes T	90
3.2.3.2	Les lymphocytes B.....	91
3.3	Particularités de la microglie dans la rétine	91
3.4	Les médiateurs de l'inflammation	92
3.4.1	Les cytokines	93
3.4.1.1	Généralités	93
3.4.1.2	L'interleukine 1 β , IL-1 β	95
3.4.1.3	L'interleukine 6, IL-6.....	96
3.4.1.4	Le Tumor Necrosis Factor α , TNF- α	97
3.4.1.5	L'interleukine 16, IL-16	98
3.4.1.6	Autres cytokines pro-inflammatoires.....	100
3.4.1.7	Cytokines anti-inflammatoires.....	100
3.4.1.8	Les cytokines mixtes	101
3.4.1.9	Les chimiokines	102
3.4.2	Les médiateurs lipidiques.....	103
3.4.3	Les molécules d'adhésion cellulaire	106
3.4.4	Régulation de la signalisation moléculaire inflammatoire médiée par les cytokines	108
3.5	Impact de l'inflammation sur l'angiogenèse et la fonction des cellules endothéliales	111
3.6	Résumé.....	113
Chapitre 4.	La rétinopathie de la prématurité.....	114
4.1	La prématurité : naître trop tôt	114
4.2	La rétinopathie de la prématurité comme complication ophtalmologique majeure de la prématurité	115
4.3	Diagnostic de la rétinopathie de la prématurité.....	116
4.4	Dépistage de la ROP	119
4.5	Modèles de rétinopathie induites par l'oxygène (OIR) pour l'étude animale de la ROP	120
4.5.1	Comparaison des différents modèles d'OIR chez les rats.....	121
4.5.1.1	Différences sur le développement de la vasculopathie	121

4.5.1.2	Comparaison structurelle et fonctionnelle des différents modèles .	122
4.5.2	Impact de la souche de rat dans les modèles OIR	125
4.5.3	Réponse de la rétine des souris aux modèles OIR	126
4.5.4	Choix du modèle animal	128
4.6	Physiopathologie de la rétinopathie de la prématurité.....	129
4.6.1	Pathogénèse de la ROP	129
4.6.2	Mécanismes impliqués dans cette rétinopathie ischémique.....	131
4.6.2.1	Hyperoxie environnementale initiale	131
4.6.2.1.1	Induction des perturbations angiogéniques initiales par l'hyperoxie	131
4.6.2.1.2	Mécanismes moléculaires liés à l'état d'ischémie rétinienne... ..	132
4.6.2.1.3	Stress oxydant et nitro-oxydant.....	133
4.6.2.1.4	Voies identifiées dans la phase de néovascularisation post-ischémique.....	136
4.6.2.2	Rôle de l'inflammation.....	139
4.6.2.3	Rôle de la sénescence	144
4.6.2.4	Rôle de l'hyperglycémie.....	145
4.6.2.5	Rôle de l'Insulin-like growth factor-1 (IGF-1).....	145
4.7	Complications visuelles associées au long terme.....	146
4.8	Prise en charge actuelle.....	150
4.8.1	Prévention.....	150
4.8.2	Traitements curatifs	151
4.9	Thérapeutiques d'avenir.....	152
4.10	Résumé et perspectives	154
Chapitre 5.	Les micro-ARNs	155
5.1	Les ARNs non codants.....	155
5.2	ARNs non codants régulateurs	156
5.3	Les micro-ARNs.....	158
5.3.1	Généralités.....	158
5.3.2	Mécanisme d'action des miRs.....	159
5.3.3	Localisation des miRs	162
5.3.4	Études des miRs comme biomarqueurs en clinique	163
5.3.5	Évaluation des cibles potentielles des miRs candidats à visée thérapeutique.....	164
5.3.6	Les miRs thérapeutiques	165

5.3.7	Balance bénéfique/risque des miRs à visée thérapeutique.....	167
5.4	Rôle des miRs dans l'inflammation.....	168
5.5	Rôle des miRs dans l'angiogenèse	169
5.6	Rôle des miRs dans le développement de l'OIR.....	170
5.7	Résumé et perspectives	171
II.	Hypothèses et objectifs de recherche.....	172
1	Problématique et hypothèse générale	172
2	Axe 1 : Rôle des miRs dans la régulation de l'angiogenèse dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR.....	173
2.1	Mise en contexte et hypothèses spécifiques au projet	173
2.2	Objectifs de recherche.....	173
3	Axe 2 : Rôle des miRs dans la régulation de l'inflammation dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR.....	174
3.1	Mise en contexte et hypothèses spécifiques au projet	174
3.2	Objectifs de recherche.....	174
III.	Méthodes	175
1.	Sélection des miRs candidats.....	175
1.1	Modulation des miRs dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR chez le rat.....	175
1.2	Rôles imputés de l'effet régulateur des miRs candidats	175
2.	Études <i>in vitro</i>	176
2.1	Culture cellulaire pour les essais <i>in vitro</i> sur l'inflammation	176
2.2	Culture cellulaire pour les essais <i>in vitro</i> sur l'angiogenèse	176
2.3	Transfection <i>in vitro</i> des miRs candidats.....	177
3.	Études <i>in vivo</i>	178
3.1	Soins aux animaux	178
3.2	Modèle de vaso-oblitération à exposition continue d'oxygène.....	178
3.3	Modèle d'inflammation induite par LPS chez le rat	179
3.4	Modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) par cycling 50/10 chez le rat.....	179
3.5	Extraction des yeux et isolation des rétines et des choroïdes.....	181
4.	Analyses.....	181
4.1	Analyses moléculaires par qRT-PCR	181
4.2	Analyses protéiques en Western Blot	183
4.3	Immunohistochimie des vaisseaux rétiens	184

4.4	Immunohistochimie des vaisseaux choroïdiens	185
4.5	Test de germination microvasculaire des explants choroïdiens du modèle de vaso-oblitération (Hyperoxie continue à 80%)	185
4.6	Essais de tubulogenèse des HMRECs sur Matrigel.....	186
4.7	Test de migration des cellules endothéliales	187
4.8	Étude de la prolifération des cellules endothéliales.....	187
5.	Analyses statistiques.....	187
IV.	Résultats	188
1.	Caractérisation d'un miR modulant l'angiogenèse dans l'OIR	188
1.1	Sélection du miR-96	188
1.2	Validation de la modulation du miR-96 dans le modèle de vaso-oblitération	188
1.3	Validation de la modulation du miR-96 dans les cellules endothéliales en condition d'hyperoxie.....	190
1.4	Validation de l'efficacité de transfection du miR-96 mimic et de l'antago-miR-96	191
1.5	Modulation de l'expression de facteurs angiogéniques dans les cellules endothéliales par le miR-96	192
1.6	Régulation de la tubulogenèse des cellules endothéliales rétiniennees soumises à l'hyperoxie par le miR-96	193
1.7	Impact du miR-96 sur la migration des cellules endothéliales rétiniennees soumises à l'hyperoxie	195
1.8	Régulation des facteurs angiogéniques <i>in vivo</i> après la supplémentation intravitréenne de miR-96 en condition d'OIR	196
1.9	Modulation de la vaso-oblitération rétinienne par l'injection intravitréenne de miR-96 en condition d'OIR.....	198
1.10	Modulation de la vaso-oblitération choroïdienne par l'injection intravitréenne de miR-96 en condition d'OIR	199
1.11	Conclusion sur le rôle du miR-96 dans l'OIR.....	201
2.	Caractérisation d'un miR modulant l'inflammation dans l'OIR.....	202
2.1	miRs modulés en phase de vaso-oblitération de l'OIR dans le modèle cyclique et rôle potentiel sur l'inflammation.....	202
2.2	Sélection du miR-125a.....	204
2.3	Validation de la modulation du miR-125a en condition OIR	206
2.4	Confirmation de la modulation du miR-125a par l'inflammation.....	207
2.5	Modulation du miR-125a <i>in vitro</i> dans les cellules microgliales soumises à inflammation.....	208

2.6	Modulation de l'inflammation par le miR-125a dans les cellules microgliales.....	209
2.7	Modulation de l'inflammation par la supplémentation intravitréenne de miR-125a <i>in vivo</i> dans la rétine de rats soumis à l'OIR.....	212
2.8	Effet de la modulation inflammatoire par le miR-125a mimic sur la vaso-oblitération en condition OIR.....	213
2.9	Évaluation de l'effet direct du miR-125a sur l'angiogenèse.....	214
2.10	Évaluation de l'impact du miR-125a sur les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales rétinienne soumises à l'inflammation via le sécrétome des cellules microgliales.....	215
2.11	Conclusion sur le rôle du miR-125a dans la phase de vaso-oblitération rétinienne de l'OIR.....	217
V.	Discussion.....	219
1.	miRs et OIR.....	219
2.	miR-96 angiogenèse.....	220
3.	miR-125a et inflammation.....	223
4.	Impact du miR-125a sur l'angiogenèse.....	227
5.	Variabilité d'expression des miRs <i>in vivo</i>	232
6.	Rôle du stress oxydatif.....	234
7.	Autres impacts potentiels des miR-125 et miR-96 sur la vision.....	235
8.	Variabilité de la modulation des miR-96 et miR-125 selon les différentes localisations et conditions.....	237
9.	Variabilité d'expression des miR-125 et miR-96 selon la période de vie.....	239
10.	Forces et difficultés liées à l'étude des miRs.....	242
11.	Voie thérapeutique.....	245
12.	Extrapolation clinique.....	246
VI.	Conclusion.....	248
VII.	Références bibliographiques.....	250
VIII.	Annexes.....	313
1.	Contribution des auteurs.....	313
2.	Article <i>MicroRNA-96 promotes vascular repair in oxygen-induced retinopathy – A novel uncovered vasoprotective function.</i>	315
3.	Article <i>Nutraceutical targeting of inflammation-modulating microRNAs in severe forms of COVID-19: A novel approach to prevent the cytokine storm</i>	330

Liste des tableaux

Tableau 1: Autres facteurs angiogéniques et leurs rôles.....	69
Tableau 2: Exemples de cytokines pro-inflammatoires.....	100
Tableau 3: miRs modulés durant l’OIR et leur rôle dans l’inflammation.....	203

Liste des figures

Figure 1: Anatomie de l'œil.	29
Figure 2 : Structure et histologie de la rétine.....	33
Figure 3: Réseau vasculaire rétinien.	39
Figure 4: Structure des vaisseaux..	47
Figure 5: Étapes de la vasculogénèse.	51
Figure 6: Phases de l'artériogénèse.....	53
Figure 7: Angiogénèse.....	58
Figure 8 : Le switch angiogénique.....	65
Figure 9 : Voies de signalisation du VEGFR-1 dans les cellules endothéliales menant à l'angiogénèse.....	68
Figure 10 : Les différentes fonctions de l'endothélium vasculaire.....	72
Figure 11: Multiples rôles des neutrophiles lors de l'inflammation.....	83
Figure 12:La polarisation macrophagique et son rôle dans le processus inflammatoire.	85
Figure 13:Le réseau cytokinique.....	94
Figure 14: Les principales familles de chimiokines et leurs ligands.	103
Figure 15: Infiltration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire.....	106
Figure 16: La voie de signalisation NF-κB.....	109
Figure 17: Les différents stades de ROP.....	118
Figure 18: Zones permettant de localiser la ROP.	119
Figure 19: Physiopathologie de la ROP	130
Figure 20: Biogénèse des miRs.	161
Figure 21: Exemple de modulation des miRs dans diverses pathologies humaines.....	163
Figure 22: Modèle d'OIR cyclique.....	180
Figure 23: Réduction de l'expression du miR-96 dans le modèle OIR de vaso-oblitération (Oxygénothérapie continue à 80% de P5 à P10).	189

Figure 24: Modulation négative de l'expression du miR-96 dans les cellules endothéliales microvasculaires rétiniennes humaines soumises à l'hyperoxie (80% d'oxygène).....	190
Figure 25: Efficacité de la transfection sur l'expression du miR-96.	191
Figure 26: Régulation positive concomitante de l'expression de VEGF, FGF-2 et Ang2 par le miR-96 dans les cellules endothéliales rétiniennes	192
Figure 27: Effet protecteur du miR-96 vis-à-vis de la tubulogenèse des cellules endothéliales.	194
Figure 28: Effet protecteur du miR-96 vis-à-vis de la migration des cellules endothéliales.	195
Figure 29: Expression moléculaire et protéique de VEGF et Ang2 dans les rétines de rats soumis au modèle de vaso-oblitération (hyperoxie continue à 80%) et supplémentée ou non par le miR-96 mimic par voie intravitréenne.	197
Figure 30: Modulation de la vaso-oblitération rétinienne centrale et périphérique de l'OIR par supplémentation intravitréenne en miR-96..	199
Figure 31: Modulation de la vaso-oblitération choroïdienne de l'OIR par supplémentation intravitréenne en miR-96.....	200
Figure 32: Modulation de l'expression du miR-125a dans le modèle cyclique d'OIR (Alternance d'oxygène entre 50% et 10% aux 24h)	207
Figure 33: Modulation rétinienne du miR-125a à P10 en condition d'inflammation systémique.	208
Figure 34: Modulation de l'expression du miR-125a dans les cellules microgliales soumises à l'inflammation.	209
Figure 35: Régulation négative des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-16 par le miR-125a dans les cellules microgliales.	211
Figure 36: Modulation des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-16 par le miR-125a dans la rétine en OIR à P10.....	212
Figure 37: Modulation de la vaso-oblitération par supplémentation intravitréenne de miR-125a mimic.	214

Figure 38: Impact direct du miR-125a sur les capacités angiogéniques des cellules endothéliales..... 215

Figure 39: Impact du miR-125a sur les cellules endothéliales via le sécrétome des cellules microgliales..... 216

Liste des abréviations, signes et acronymes

ADN	Acide désoxyribonucléique
ALK	<i>Activin-Like Kinase</i>
AMPc	Adénosine Monophosphate cyclique
Ang	Angiopoïétine
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNnc	ARN non codant
ATP	Adénosine triphosphate
BDNF	<i>Brain-Derived Neurotrophic factor</i>
BH4	Tétrahydrobioptérine
BMPR	<i>Bone Morphogenic Protein Receptor</i>
BN	Brown Norway (rats)
CCL	<i>C-C motif Chemokine Ligand</i>
CCN1	<i>Cellular Communication Network Factor 1</i>
CCR	<i>C-C Chemokine Receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CE	Cellule endothéliales
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
circARN	ARN circulant
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
CO2	Dioxyde de carbone
COUP-TFII	<i>COUP transcription factor 2</i>
COX	<i>Cyclooxygenase</i>
CREB	<i>C-AMP Response Element-binding protein</i>
CSM	Cellule Souche Mésoenchymateuse
CXCL	<i>CXC motif Chemokine Ligand</i>

CXCR	<i>C-X-C chemokine receptor</i>
DHA	<i>Docosahexaenoic acid</i>
DLL4	<i>Delta-like ligand 4</i>
DVL1	<i>Dishevelled 1</i>
ECFC	<i>Endothelial colony-forming cell</i>
EDCF	<i>Endothelium Dependant Contracting Factor</i>
EDHF	<i>Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
eIF	<i>Eukaryotic Initiation Factor</i>
eNOS	<i>Endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
EPO	Érythropoïétine
EPR	Épithélium pigmentaire rétinien
ERG	Électrorétinogramme
ERK	<i>Extracellular signal Regulating Kinase</i>
ET	Endothéline
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
FOX	<i>Forhead box</i>
GCL	<i>Ganglion cell layer</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor</i>
GMPc	Guanosine monophosphate cyclique
GPR	<i>G-Protein-Coupled Receptor</i>
GRP78	<i>Glucose Regulated Protein 78</i>
GSH	<i>Glutathione</i>
HRMEC	Cellules endothéliales microvasculaires rétinienne humaines
HEY	<i>Hairy and Enhancer of split-related with YRPW motif</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
ICAM	<i>Intracellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunoglobuline
IGF	<i>Insuline-like Growth Factor</i>

IFN	Interféron
IL	Interleukine
<i>INL</i>	<i>Inner Nuclear Layer</i>
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
IRAK	<i>Interleukine Receptor Associated Kinase 1</i>
IRE1 α	<i>Inositol-requiring enzyme 1α</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
<i>IS</i>	<i>Inner segment of photoreceptors</i>
JAK	<i>Janus Kinase</i>
JAM	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
JNK	<i>c-Jun amino terminal kinase</i>
KLF	<i>Krüppel-like factor</i>
LE	Long-Evans (rats)
lncARN	ARNs non codants long
LPS	Lipopolysaccharide
LRP6	<i>Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 6</i>
LTB4	Leucotriène B4
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>
MCP	<i>Monocyte Chemoattractant Protein</i>
MEC	Matrice Extra-Cellulaire
METTL3	<i>Methyltransferase-like 3</i>
miR	micro-ARN
MMP	<i>Membrane-bound Matrix Metalloproteinase</i>
NADPH	<i>Nicotamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NCK	<i>Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptator protein</i>
NEAT	<i>Nuclear-Enriched Abundant Transcript</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>

NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NFL	<i>Nerve fiber layer</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NLRP3	<i>NOD-Like Receptor family Pyrin domain containing-3</i>
nNOS	<i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
NOS	<i>Nitric Oxide Synthase</i>
NOX	<i>Nicotamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase</i>
NRP	<i>Neuropilin</i>
OIR	<i>Oxygen-Induced Retinopathy</i>
ONL	<i>Outer nuclear layer</i>
OPL	<i>Outer plexiform layer</i>
OS	<i>Outer segment of photoreceptors</i>
P	<i>Year postnatal</i>
PA	<i>Plasminogen activator</i>
PAC	<i>Proangiogenic cell</i>
PAF	<i>Platelet activating factor</i>
PAK	<i>P21-activated kinase</i>
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PECAM	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PFA	<i>Paraformaldéhyde</i>
PG	<i>Prostaglandine</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3 Kinase</i>
PIGF	<i>Placenta Growth Factor</i>
PLA2	<i>Phospholipase A2</i>
pO2	<i>Pression partielle en oxygène</i>

PPAR	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor</i>
PPP1CA	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-alpha catalytic subunit</i>
PPR	<i>Pattern-Recognition Receptor</i>
PTPN	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor</i>
pVHL	<i>von Hippel Lindau Protein</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
ROP	<i>Retinopathy Of Prematurity</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S1P	<i>Sphingosine-1-phosphate</i>
S1PR	<i>Sphingosine-1-phosphate receptor</i>
SA	<i>Semaines d'aménorrhée</i>
SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
SD	<i>Sprague Dawley (rats)</i>
SDF	<i>Stromal Cell-Derived Factor</i>
Sema3a	<i>Sémaphorine-3A</i>
siARN	<i>Petit ARN interférent</i>
SIM-A9	<i>Cellules microgliales SIM-A9</i>
SpO2	<i>Saturation périphérique en oxygène</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TET	<i>Ten-Eleven Translocation</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGFBR	<i>Transforming Growth Factor beta receptor</i>
Th	<i>T-helper</i>
TIMPs	<i>Tissue Inhibitors of Metalloproteinases</i>
Tie	<i>Tyrosine kinase with Immunoglobulin like and Epidermal growth factor like domains</i>
TIR	<i>Toll/Interleukin-1 Receptor</i>

TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TNFR	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i>
TRAF	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
TrxR	<i>Thioredoxin reductase</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>

À mes parents,

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu mes amis dont le soutien moral et matériel sans faille m'aura permis d'avancer et de terminer ce doctorat.

Je tiens également à remercier ma famille, mes collègues bienveillants du laboratoire de recherche, du service de néonatalogie du CHU-Sainte Justine ainsi que du service de néonatalogie de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont pour leur soutien. Merci également à toutes les personnes qui m'ont supportée de près ou de loin et de manière temporaire ou durable.

Je tiens ensuite à remercier mon directeur de recherche Dr Sylvain Chemtob de m'avoir permis de découvrir et d'expérimenter le domaine de la rétinopathie de prématuré en recherche fondamentale.

Un grand merci à Michel, mon co-directeur, de m'avoir ouvert la porte du monde des micro-ARNs, de m'avoir appris les bases, ainsi que pour ses conseils, son soutien et sa supervision.

Je tiens aussi à remercier les membres du jury d'avoir accepté de lire et d'évaluer cette thèse.

Je souhaite également remercier le département d'ophtalmologie dont l'appui financier du FROUM m'aura permis de débiter ce travail, ainsi que le FRQS dont le soutien financier pour le fellowship m'aura permis de le poursuivre.

Je tiens à avoir une pensée pour ma grand-mère, qui m'a toujours soutenue et qui n'aura malheureusement pas pu voir la complétion de ce doctorat.

Enfin, merci à Raphaëlle, mon petit soleil, qui illumine ma vie chaque jour un peu plus, qui donne des doses d'amour sans compter et qui parfois, du haut de ses 8 ans, a un regard sur la vie bien plus sage que les adultes.

Avant-propos

« Ce que l'on obtient en atteignant nos objectifs n'est pas aussi important que ce que l'on devient en les atteignant », Zig Ziglar.

Pédiatre néonatalogiste de formation française, je me suis très tôt intéressée à la rétinopathie du prématuré. Désireuse de pouvoir améliorer la prise en charge de mes patients, je me suis formée en recherche et ai obtenu ma maîtrise en sciences parallèlement à mon cursus médical, ce qui m'a permis de réaliser des travaux de recherche clinique et translationnelle sur le développement visuel du nouveau-né prématuré et la rétinopathie du prématuré. Je pensais qu'il était important d'avoir une vision globale des sciences pour pouvoir appréhender la recherche dans son entièreté et que bien que n'ayant pas eu de réelle formation en sciences fondamentales dans mon cursus, je me devais d'explorer ce domaine. Ainsi débuta cette aventure.

Ce doctorat aura été un vrai challenge sur fond de pandémie et d'expatriation avec la réalisation conjointe d'un fellowship en médecine néonatale et périnatale. Néanmoins, il m'aura beaucoup apporté. Bien sûr, j'ai énormément appris sur les sciences fondamentales, tant sur le fond que sur les aspects techniques. J'ai aussi énormément appris sur le plan humain et sur moi-même.

Le challenge permet d'avancer et de se dépasser. Et un jour, on comprend où est sa juste place pour continuer à avancer. D'autres aventures m'appellent désormais, au sein d'une équipe de néonatalogie d'une part et en recherche translationnelle d'autre part. La réalisation de ce doctorat m'aura permis d'approfondir mes connaissances et d'identifier les connexions manquantes à faire entre les recherches fondamentales et cliniques actuelles. Il m'aura également donné les moyens d'établir de nouveaux projets pour tisser ces liens et contribuer à l'amélioration de la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la rétinopathie du prématuré et de la prise en charge des patients. Ces derniers restent l'élément moteur de mes travaux de recherche.

I. Introduction

Chapitre 1. L'œil : rôle, structure et fonction

1.1 Fonction visuelle

Cicéron a dit : « Car si le visage est le miroir de l'âme, les yeux en sont les interprètes ». L'œil est un organe sensoriel complexe qui permet le lien entre le monde visible et les réflexions qui en découlent, tant au niveau scientifique que philosophique. Guy de Maupassant mentionnait l'importance de cet organe par « L'œil... Tout l'univers est en lui, puisqu'il voit, puisqu'il reflète ». L'œil est le lien entre le monde matériel et la pensée, entre le visible et l'esprit. Il a une portée différente selon les êtres humains et quelle que soit l'étendue de cette portée, son importance est majeure pour chaque individu. En effet, la vue est l'un des 5 sens essentiels. Elle permet de voir, de distinguer les formes, les couleurs, la stéréoscopie et également ce qui permettra de s'adapter à son environnement. Elle a un rôle perceptif, sensoriel et aussi cognitif. Elle a donc un impact considérable sur la vie de tous les jours et les capacités et habiletés des êtres humains. Par ailleurs, de par ses tenants et aboutissants, la vision a également un rôle majeur sur le neuro-développement des enfants. D'un point de vue plus scientifique, l'œil est un organe que le rôle et la complexité rendent captivant. En effet, il est composé de plusieurs structures et milieux spécialisés qui sont traversés par des ondes lumineuses parfois d'origines très lointaines; il est capable de capter ce signal et de le transformer pour l'analyser et en créer une image dans notre cerveau. Il est par ailleurs considéré comme un prolongement du cerveau, rendant son étude d'autant plus intéressante.

1.2 Embryogenèse de l'œil et de la rétine

Le développement de l'œil et plus particulièrement du segment postérieur se fait en parallèle du système nerveux central. Les ébauches oculaires se mettent en place dès la troisième semaine post-conceptionnelle. À ce stade, l'embryon est un disque tridermique composé de l'ectoblaste, du mésoblaste et de l'endoblaste. L'ectoblaste conduira d'une part à l'ectoderme qui sera à l'origine de l'enveloppe cutanée et des tissus superficiels et d'autre part au système nerveux central. La surface de la plaque neurale s'invagine ensuite pour former le tube neural bordé des crêtes neurales. De cette manière, à la cinquième semaine post-conceptionnelle, le cerveau a la forme d'un tube dont la partie antérieure laisse place à deux fossettes optiques qui vont s'évagner pour former les vésicules optiques puis les cupules optiques, ce qui aboutira à l'accolement de deux couches cellulaires, externe et interne, qui donneront naissance respectivement à l'épithélium pigmentaire et à la neurorétine. Ainsi, la neurorétine a une origine neuroectodermique, dérivée du diencephale qui se développe précocement au cours de la vie intra-utérine. La différenciation précoce de la neurorétine est caractéristique de l'espèce humaine et va se poursuivre au-delà de la naissance. L'évolution structurelle de la neurorétine se fait du centre vers la périphérie et de la profondeur du globe vers sa superficie. La cupule optique présente par ailleurs une fente radiaire par laquelle passe l'artère hyaloïde, branche de l'artère ophtalmique qui occupe l'axe optique, laissant place au vitré primitif. Les branches supérieure et inférieure de l'artère hyaloïde donneront naissance aux vaisseaux et capillaires rétiniens pour former un réseau superficiel dans la couche de cellules ganglionnaires et un réseau profond dans la couche nucléaire interne. A la fin du sixième mois, les vaisseaux n'auront atteint que la région équatoriale, tandis que la vascularisation plus antérieure ne se développera qu'au dernier trimestre de grossesse. L'uvée, la sclère, le segment antérieur ont pour origine principale les crêtes neurales et sont la conséquence de plusieurs migrations cellulaires successives (Caputo et al, 2011)

1.3 Anatomie de l'œil

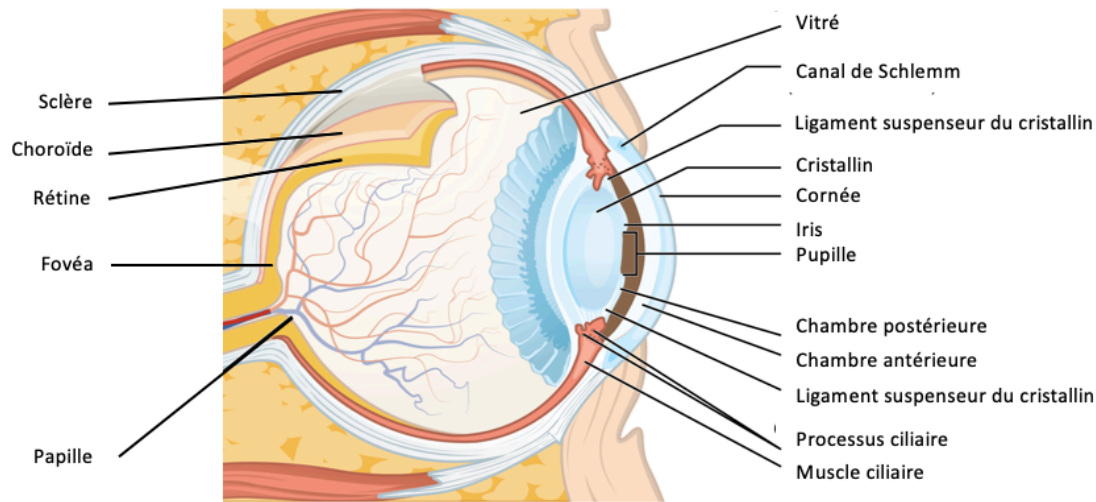


Figure 1: Anatomie de l'œil. L'œil est un organe sensoriel composé de différentes structures et de différents milieux. Voir texte pour la description des structures. Figure adaptée de "OpenStax AnatPhys fig.14.15 - Structure of the Eye - English labels" by OpenStax, license: CC BY.

L'œil est un globe constitué de membranes, de milieux transparents et de plusieurs autres structures internes mais aussi de protection (Figure 1).

La sclérotique, ou sclère, est une membrane blanche qui permet le maintien de la forme de l'œil. Elle est poursuivie en antérieure par la cornée, première structure à être traversée par la lumière. Celle-ci est transparente, innervée et avasculaire de forme bombée, lui permettant de faire converger les rayons lumineux entrant dans l'œil. Les rayons traversent ensuite le cristallin, une lentille transparente biconvexe dont la forme est modulable, lui permettant l'accommodation afin d'ajuster la convergence des rayons lumineux entrant. Entre la cornée et le cristallin se trouve l'humeur aqueuse, liquide, et en arrière du cristallin, le corps vitré, plus gélatineux. Ils permettent en outre à l'œil de conserver sa forme en exerçant une pression interne. Ils ont également une fonction nourricière de l'œil grâce aux nutriments qu'ils contiennent et une fonction d'épuration de l'œil de par leur renouvellement régulier. Une fois que les rayons lumineux ont passé

ces milieux et structures transparents, ils atteignent la rétine, où se trouvent les cellules permettant de capter le signal lumineux et de le transformer en influx nerveux qui sera acheminé au cerveau par le nerf optique. En arrière de la rétine et devant la sclérotique se trouve la choroïde, une structure essentiellement vascularisée permettant l'apport en nutriments et oxygène à la sclérotique et à la rétine profonde. L'œil comporte également d'autres structures, aidant à sa fonctionnalité : l'iris, de couleur variable selon les individus, qui comporte une ouverture en son centre, la pupille. Elle a pour particularité d'avoir une ouverture variable qui permet d'ajuster la luminosité entrante dans l'œil. Les corps ciliaires et leurs muscles associés permettent quant à eux de moduler la courbure du cristallin dans le mécanisme d'accommodation. Les muscles latéraux qui entourent le globe oculaire et permettent l'oculomotricité. En outre, l'œil est protégé par la paupière, les cils et les sourcils; tandis que les glandes lacrymales sécrètent des larmes afin de lubrifier, hydrater et nettoyer l'œil en permanence (Ansari et al, 2016).

1.4 Organisation morphologique de la rétine

1.4.1 Anatomie de la rétine

La rétine recouvre le fond de l'œil et mesure moins de 500 μm . Elle s'étend de l'ora serrata en avant jusqu'au nerf optique, ou papille, à la partie postérieure de l'œil. C'est une membrane fine très vascularisée, qui se prolonge à la face postérieure du corps ciliaire et de l'iris par une rétine dépourvue de photorécepteurs. On distingue la rétine centrale, correspondant à un cercle de 5 à 6 mm de diamètre situé entre les branches temporales supérieure et inférieure de l'artère centrale de la rétine au pôle postérieur de l'œil et la rétine périphérique. La rétine centrale est composée de la fovéola, une dépression centrale, de 200 à 300 μm de diamètre, située à deux diamètres papillaires du bord temporal du nerf optique. La fovéola est intégrée au centre de la fovéa, une zone elliptique de 2mm par 1 mm, ces deux parties composant la région maculaire, une zone normalement avasculaire (Caputo et al, 2011; Behar-Cohen et al. 2020).

1.4.2 Histologie de la rétine

La neurorétine est un tissu stratifié qui repose sur l'épithélium pigmentaire rétinien. Elle est constituée de 6 sortes de cellules neuronales : les photorécepteurs cônes, les photorécepteurs bâtonnets, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires; et de 3 sortes de cellules gliales : les cellules gliales de Müller, les astrocytes et les cellules microgliales. Les cellules gliales de la rétine jouent des rôles physiologiques importants tels que le transport de nutriments, l'homéostasie du milieu extra-cellulaire, la régulation immunitaire, ou encore la neurotrophicité (Behar-Cohen et al. 2020).

Les premières cellules à capter le signal lumineux pour le transformer en signal électrochimique sont les photorécepteurs, et ce notamment dans les disques de leur segment externe (Arshavsky et al 2014). La rétine est constituée de plus de 120 millions de photorécepteurs divisés en deux catégories : les cônes, responsables de la vision diurne, précise, en couleur et les bâtonnets, responsables de la vision nyctémérale, périphérique et de la vision en noir et blanc. Les cônes prédominent dans la région centrale de la rétine et sont les seuls photorécepteurs présents dans la macula et plus précisément dans la dépression fovéolaire, où la lumière se focalise et qui permet la précision de la vision diurne et qui est la zone permettant l'acuité visuelle maximale. La macula est quant à elle pathognomonique de l'humain et des primates supérieurs. Les bâtonnets sont quant à eux situés en circonférence. (Hildebrand et al 2011; Mannu, 2014).

La rétine est classiquement structurée en 10 couches (Figure 2) : (Behar-Cohen et al, 2020; Caputo et al, 2011)

- L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) : c'est une couche unistratifiée de 10 à 20 μm d'épaisseur, constituée de cellules hexagonales contenant des grains de mélanine et des phagosomes, correspondant aux articles externes des photorécepteurs

phagocytés. Ces cellules sont solidarisées entre elles par la *zonula occludens* et la *zonula adherens*. Outre le fait qu'il s'agit d'une zone de phagocytose des segments externes des photorécepteurs, l'épithélium pigmentaire est également une zone d'échanges hydroélectrolytiques, d'échanges d'oxygène et de stockage de la vitamine A. L'épithélium pigmentaire borde la choroïde et adhère à la membrane de Bruch. Les cellules de l'EPR contiennent des pigments formés de grains de mélanine et lipofuscine, sensibles à la lumière bleue et capables d'induire la production d'espèces réactives à l'oxygène à l'origine du stress oxydatif.

- Les segments internes et externes des photorécepteurs : ce sont des cellules hautement polarisées. Cette couche compte environ 120 millions de bâtonnets pour 7 millions de cônes. Les cônes prédominent dans la zone fovéolaire, tandis que les bâtonnets commencent à être retrouvés à partir de 500 μm de la fovéola. Ce sont les premières cellules qui réagissent aux rayons lumineux par réactions biochimiques au niveau des segments externes, formés d'un empilement de disques constitués de replis de la membrane plasmique. Le segment interne contient quant à lui le noyau et les organites responsables du fonctionnement cellulaire, telles que les mitochondries.
- La membrane limitante externe : elle correspond à une zone de branchement entre les cellules gliales de Müller et les segments internes des photorécepteurs. Les photorécepteurs ont également pouvoir y établir des connexions entre eux.
- La couche nucléaire externe : c'est la couche où l'on va trouver les noyaux des photorécepteurs.
- La couche plexiforme externe : c'est l'étage renfermant les synapses entre les photorécepteurs, les cellules bipolaires ainsi que les cellules horizontales, leur permettant d'interagir entre elles. Dans la zone maculaire, cette couche contient également des cellules gliales de Müller, formant une couche plus épaisse, la couche des fibres de Henle.
- La couche nucléaire interne : on va y trouver les noyaux des cellules horizontales, des cellules bipolaires, des cellules amacrines et des cellules gliales de Müller. Les cellules horizontales et amacrines permettent une diffusion latérale des informations reçues,

tandis que les cellules de Müller ont un rôle nourricier, de soutien et de cohérence, avec une disposition radiale.

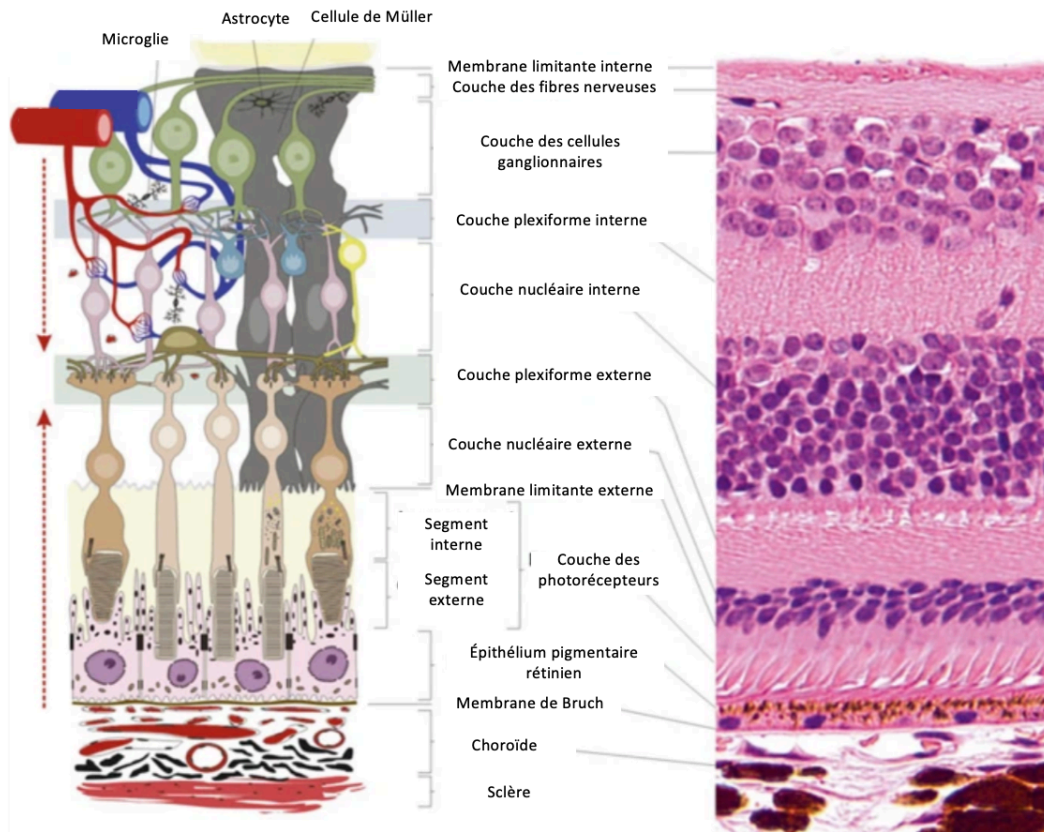


Figure 2 : Structure et histologie de la rétine. La rétine est un tissu stratifié composé de 10 couches : l'épithélium pigmentaire rétinien, la couche des photorécepteurs, la membrane limitante externe, la couche nucléaire externe, la couche plexiforme externe, la couche nucléaire interne, la couche plexiforme interne, la couche des cellules ganglionnaires, la couche des fibres nerveuses et enfin la membrane limitante interne. Voir texte pour la description des structures.

Figure adaptée de Prada et al, 2019.

- La couche plexiforme interne est une zone regroupant les dendrites des cellules ganglionnaires, des cellules amacrines et des axones des cellules bipolaires. Les cellules ganglionnaires y ont des connexions synaptiques via leurs dendrites avec les cellules bipolaires et amacrines.
- La couche de cellules ganglionnaires contient leurs axones particulièrement longs qui vont atteindre le nerf optique afin de transmettre l'information visuelle au corps géniculé latéral, puis au cortex occipital.
- La couche de fibres nerveuses contient les axones des cellules ganglionnaires. Ceux-ci vont être enlacés par les prolongements gliaux des cellules de Müller pour former le nerf optique. Tandis que les fibres maculaires forment un réseau rectiligne interpapillomaculaire, les autres fibres présentent une orientation radiaire.
- La membrane limitante interne : c'est la strate la plus interne qui correspond à une membrane basale et qui va contenir les pieds internes des cellules gliales de Müller.

1.5 Fonctionnement rétinien

1.5.1 Généralités

L'œil est considéré comme un prolongement du cerveau et le système nerveux central consomme environ 20% de l'oxygène du corps pour un poids corporel de 2% chez l'adulte (Wong-Riley, 2010). Les photorécepteurs réagissent aux rayons lumineux par phénomènes biochimiques via le cycle de la rhodopsine contenu dans les disques de leurs articles externes (Caputo et al. 2011) L'information lumineuse arrivant aux photorécepteurs va être transformée et conduite par l'intermédiaire des interneurons à l'aide des cellules horizontales, bipolaires, amacrines et interplexiformes jusqu'aux cellules ganglionnaires dans la partie la plus interne où elle sera convertie en potentiel d'action et transmise au nerf optique via les axones de ces cellules (Hidelbrand, 2011).

1.5.2 Physiologie rétinienne

1.5.2.1 La phototransduction

Les photorécepteurs vont devoir transformer l'énergie lumineuse en potentiel de membrane pour envoyer un signal dans le cortex visuel. Les cônes diffèrent des bâtonnets par leurs segments externes et leurs photopigments. En effet le segment externe des cônes consiste en des replis de sa membrane plasmique tandis que celui des bâtonnets contient des disques cytoplasmiques, produits par la partie interne de l'article externe puis empilés dans l'article externe du photorécepteur. Les photopigments sont situés dans l'article externe. Il existe un photopigment spécifique pour les bâtonnets, la rhodopsine, et trois différents pour les cônes, correspondant aux couleurs rouge (cône L), verte (cône M) et bleue (cône S). Ces différences de photopigments étant liées à une courbe de sensibilité spectrale propre à chacun. Pour décrire plus clairement le phénomène de transduction, nous allons nous concentrer sur la phototransduction des bâtonnets, qui a été mieux étudiée (Caputo et al, 2011; Salesse, 2017).

La rhodopsine est constituée de l'association d'une protéine opsine et du 11-cis-retinal, un dérivé de la vitamine A. Lors de la stimulation lumineuse, le photon va être absorbé par la rhodopsine, ce qui va transformer le 11-cis-rétinal en tout-trans-rétinal, engendrer la formation de métarhodopsine II et enclencher la phototransduction avec activation de la transducine pour enfin activer la phosphodiesterase. Le tout aboutissant à l'hydrolyse du GMP cyclique, qui entrainera la fermeture des canaux cationiques à sodium, calcium et magnésium entrants dans le segment externe du photorécepteur et donc un arrêt de sécrétion de glutamate au niveau de leur synapse. Ceci entraîne une hyperpolarisation du segment externe qui inhibera la sortie de potassium au niveau du segment interne dont résultera une réduction de la concentration potassique dans le compartiment sous-rétinien, ce qui entrainera une réponse compensatrice par les cellules de Müller et par l'épithélium pigmentaire. Dans la couche plexiforme externe, l'hyperpolarisation du

photorécepteur va diminuer la libération de glutamate, ce qui permettra la transmission de l'information aux cellules bipolaires. Les interneurons ou cellules bipolaires, horizontales et amacrines vont contribuer au traitement et à la compression de l'information qui atteindra les cellules ganglionnaires puis les voies visuelles rétrobulbaires par le nerf optique et enfin le cortex visuel primaire (Caputo et al, 2011; Salesse, 2017).

1.5.2.2 Le cycle visuel

Une fois la cascade de phototransduction effectuée, le photorécepteur doit se renouveler pour pouvoir être utilisé à nouveau. L'adhérence entre l'épithélium pigmentaire et le photorécepteur permet le renouvellement du segment externe de ce dernier. C'est un phénomène actif, entretenu par une absorption constante de liquide sous-rétinien via un transport transépithélial de chlore et de bicarbonate hors de l'espace sous-rétinien. Tandis que l'épithélium pigmentaire assure le catabolisme de ces disques par phagocytose, le cycle visuel assure quant à lui le renouvellement du photopigment. En effet, l'isomérisation du 11-cis rétinol en tout-trans rétinol provoque sa séparation avec l'opsine. La régénération du 11-cis-rétinal fait intervenir plusieurs étapes enzymatiques et se fait via l'épithélium pigmentaire rétinien. Le tout-trans-rétinal va être réduit en tout trans rétinol par ses enzyme rétinol déshydrogénases. Celui-ci va être transporté dans l'EPR où la lécithine rétinol acyltransférerase le transformera en tout-trans rétinyl ester, qui sera métabolisé par l'isomérohydrolase pour en faire du 11-cis-rétinol, qui sera à son tour oxydé en 11-cis-rétinal par des enzymes rétinol déshydrogénase. Il sera alors transporté dans le segment externe du bâtonnet pour être intégré au sein de l'opsine et former la rhodopsine. Pour les cônes, la régénération du 11-cis-rétinal suit les mêmes étapes et se fait dans l'épithélium pigmentaire et dans les cellules de Müller (Caputo et al, 2011, Salesse, 2017).

1.5.3 Métabolisme énergétique rétinien

Il semble que la rétine dépasse la consommation en oxygène du cerveau (Wong-Riley, 2010). L'homme présente une rétine vascularisée.

Dans les modèles de rétine avasculaire, tel que celle du lapin, les besoins de base de la rétine en condition d'obscurité sans stimulation lumineuse sont élevés avec une consommation importante d'oxygène et de glucose et une forte production d'acide lactique ainsi qu'une haute génération d'ATP. Les réserves énergétiques sont quant à elles faibles dans la rétine, la rendant vraiment dépendante des apports externes. En effet, le fonctionnement rétinien nécessite des apports suffisants. Par exemple, l'électrorétinogramme est altéré lorsque les apports glucidiques sont coupés ou lorsque le métabolisme glycolytique est induit en condition d'hypoxie. Tandis que la neurotransmission dans la rétine interne semble dépendante de la glycolyse, la phototransduction semble quant à elle plutôt impliquer le métabolisme oxydatif, qui sera partiellement compensé par la glycolyse en condition d'hypoxie. Une grande partie de l'énergie générée par les deux types de métabolisme semble impliquée dans le transport NaK-ATPase. Il existe également une partie de l'énergie générée par le métabolisme oxydatif ne correspondant pas aux fonctions précédemment citées ou encore au métabolisme végétatif (Ames 3d et al, 1992). Bien que ces résultats ne puissent pas être extrapolés au fonctionnement des rétines vascularisées quant aux besoins métaboliques, il est clair que la rétine consomme énormément d'énergie et que les apports en oxygène et en glucose sont nécessaires à sa fonction.

Dans la rétine vascularisée, le métabolisme de l'oxygène est complexe compte-tenu des différents composants cellulaires répartis dans différentes strates. L'augmentation de la pression en oxygène est plus importante dans la choroïde que dans la rétine interne durant la ventilation hyperoxique normocapnique. Le fait que la pO₂ reste à un niveau basal dans la rétine interne malgré une condition d'hyperoxie montre que la circulation rétinienne fournit un apport plafonné à la rétine. Ceci pourrait être expliqué par une

augmentation de la consommation de l'oxygène dans la rétine interne et à une réduction du débit sanguin rétinien induit par l'hyperoxie. Cette atténuation du gradient dans la rétine interne en condition hyperoxique par rapport à la choroïde est cependant moins marquée en présence de CO₂. Comparée à une rétine avasculaire où les fluctuations d'oxygène sont les mêmes que dans la circulation systémique, la rétine vascularisée présente une meilleure régulation de ces fluctuations par rapport à la circulation systémique, cette régulation étant meilleure dans la rétine interne par rapport à la choroïde. Ceci peut être expliqué par d'une part une absorption accrue et d'autre part une réduction de l'apport en oxygène par la vascularisation rétinienne. Une consommation d'oxygène accrue en condition d'hyperoxie n'est pas typique pour des cellules aérobies. De plus, les mitochondries présentent un niveau de saturation d'oxygène relativement bas au-dessus duquel un lien entre le niveau d'oxygène et son absorption n'est pas attendu. Il semble exister une préférence pour le métabolisme oxydatif par rapport au métabolisme anaérobie qui existe également dans les rétines vascularisées en condition d'hyperoxie. Les besoins les plus importants en oxygène semblent se trouver au niveau des segments internes des photorécepteurs, de la couche plexiforme externe et de la partie la plus profonde de la couche plexiforme interne. En condition d'hyperoxie induite sur une rétine ischémique, la majorité de l'absorption de l'oxygène se fait dans les couches plexiformes. Dans la rétine ischémique chronique, chaque augmentation de niveau d'oxygène choroïdien produit une augmentation équivalente au niveau rétinien, sans néanmoins réussir à vasculariser toute l'épaisseur de la rétine ischémique. Ainsi, une ventilation hyperoxique majore le niveau d'oxygène rétinien de manière bien supérieure sur une rétine ischémique, avec comme résultante un amincissement de chaque couche rétinienne et une perte presque totale de la couche plexiforme externe. La durée de l'insulte ischémique est donc importante à considérer pour la réponse de la rétine à l'hyperoxie. La consommation d'oxygène est quant à elle plus faible dans la couche nucléaire interne, la couche de cellules ganglionnaires et dans la partie interne de la couche plexiforme interne (Yu et al, 2001).

La rétine est donc un tissu fonctionnellement très actif avec un haut besoin énergétique. La vascularisation rétinienne va avoir un rôle clé en apportant à la rétine de l'oxygène et des nutriments pour pouvoir assurer sa fonction.

1.6 Vascularisation rétinienne

1.6.1 Caractérisation de la vascularisation rétinienne

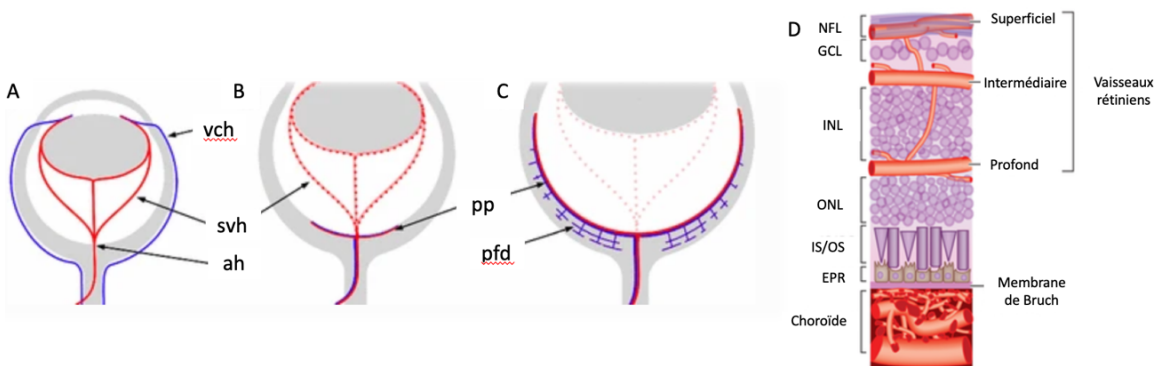


Figure 3: Réseau vasculaire rétinien. Le réseau vasculaire à l'intérieur de l'œil est remodelé au cours du développement fœtal. (A) Le système vasculaire hyaloïde (svh) vascularise l'œil en formation par l'artère hyaloïde (ah) et le draine dans le filet veineux choroïdien (vch) (le filet choroïdien n'est pas représenté en B et C mais est présent). (B) Le système vasculaire hyaloïde régresse parallèlement au développement du plexus primaire (pp) dans la rétine. Le plexus primaire est constitué d'artères et de veines. (C) Le plexus plus profond (pfd) du système vasculaire rétinien se développe à partir des veines du plexus primaire. (D) Le réseau vasculaire rétinien mature comprend les plexus superficiel, intermédiaire et profond. La choroïde alimente la rétine externe par les choriocapillaires. NFL: couche des fibres nerveuses; GCL: couche des fibres ganglionnaires; INL: couche nucléaire interne; ONL: couche nucléaire externe; IS: segment interne des photorécepteurs; OS: segment externe des photorécepteurs; EPR: épithélium pigmentaire rétinien.

Figure adaptée d'après (Fruttiger, 2007 et Sun et al, 2018).

Le réseau vasculaire alimentant la rétine interne et externe est représenté dans la Figure 3.D. La vascularisation de la rétine se fait par deux réseaux bien distincts, provenant tous deux de l'artère ophtalmique issue elle-même de l'artère carotide interne. L'artère ophtalmique se divise d'une part en artère centrale de la rétine qui est responsable de la vascularisation de la rétine interne, et d'autre part en artères ciliaires qui vont donner un réseau capillaire choroïdien afin de nourrir la partie externe de la rétine à travers l'épithélium pigmentaire rétinien (*Behar-Cohen et al, 2020; kiel, 2010; Kur et al, 2012*).

La vascularisation rétinienne interne est composée de quatre plexus différenciables : un plexus superficiel au sein de la couche de cellules ganglionnaires divisé en un réseau vasculaire superficiel et en des capillaires péripapillaires radiaires, puis plus profondément un plexus vasculaire capillaire intermédiaire situé à la limite supérieure de la couche nucléaire interne et un plexus vasculaire capillaire profond situé quant à lui à la limite inférieure de la couche nucléaire interne (Burns et al, 2021; Campbell et al, 2017). Cette vascularisation peut également être caractérisée de manière topographique : nasale, temporale, supérieure, inférieure (*Behar-Cohen et al, 2020*). Il est important de noter que la fovéola, zone la plus centrale de la macula, est exempte de toute vascularisation rétinienne interne et dépend de la vascularisation externe de la rétine et donc de l'intégrité vasculaire choroïdienne (Hidelbrand 2011). La circulation choroïdienne est quant à elle composée de vaisseaux d'une couche profonde de vaisseaux de grosse taille, suivie d'une couche de vaisseaux de taille intermédiaire et enfin de choriocapillaires, correspondants à un maillage dense de gros capillaires fenestrés, adjacents à l'épithélium pigmentaire rétinien, qu'elle vascularisera (Burns et al, 2021).

1.6.2 Développement vasculaire in utero

Le réseau vasculaire apporte à la rétine l'oxygène et les nutriments et est donc nécessaire au bon développement des organes in utero. Il subit plusieurs modifications durant le développement rétinien (Figure 3.A, B et C). Lors du début de la grossesse, les apports

nutritifs à la partie interne de l'œil sont supportés par l'artère hyaloïde, une branche de l'artère centrale de la rétine, qui vient de la papille optique pour traverser le corps vitré primitif et finir en un réseau vasculaire annulaire entourant le cristallin primaire. Dans l'espèce humaine, elle régresse à partir du milieu de la grossesse pour laisser place à la vascularisation artério-veineuse rétinienne (Fruttiger, 2007).

La vascularisation de la rétine en tant que telle débute entre la 14^{ème} et la 16^{ème} semaine d'aménorrhée et se poursuit jusqu'à 36 semaines d'aménorrhée (SA) pour l'ora serrata nasale et 40 SA pour l'ora serrata temporale. La vitesse de croissance vasculaire du centre vers la périphérie est d'environ 0.1mm par jour (Darwich et al, 2020; Graziosi et al, 2020). Ce développement vasculaire est précédé d'une invasion d'astrocytes qui vont migrer de manière centrifuge au sein de la rétine. Ces astrocytes, encore immatures, ont une morphologie bipolaire et allongée. Lorsqu'ils atteindront la périphérie rétinienne, ils établiront un réseau en mailles. Du fait de l'hypoxie par la condition in utero, ils vont exprimer fortement le VEGF afin de permettre l'angiogenèse et donc la formation des vaisseaux sanguins (Fruttiger, 2007). L'expression de VEGF semble constante dans la choroïde au cours du développement. L'expression de VEGF par les astrocytes précède la formation des vaisseaux dans la rétine interne et celle des cellules de Müller précède la formation de vaisseaux dans la couche nucléaire interne. L'hypoxie induit l'expression de VEGF dans les cellules gliales (Stone et al, 1995).

1.6.3 La microvascularisation rétinienne

Compte-tenu du fait que la rétine est un tissu neural métaboliquement très actif, la microvascularisation rétinienne est essentielle à l'apport des nutriments et de l'oxygène et au drainage des déchets métaboliques et possède des caractéristiques spécifiques pour le maintien de l'homéostasie intrarétinienne. Notamment, on y trouve la barrière hémato-rétinienne qui protège le tissu neural fragile de l'accès direct du sang, et particulièrement de molécules de poids moléculaire élevé. On trouve donc une unité neuro-vasculaire à part entière au sein de la rétine, faisant interagir les neurones, les

cellules vasculaires et les cellules gliales (Huang, 2020). La microvascularisation rétinienne est composée de cellules endothéliales et de péricytes qui vont partager la même membrane basale et interagir avec des plaques d'adhésion enrichies de matrice extracellulaire. Les communications et interactions entre tous ces éléments sont nécessaires à la formation, la maturation et la stabilisation de la vascularisation rétinienne et aux propriétés spécifiques de barrières durant le développement puis à l'âge adulte. Les péricytes, qui sont des cellules d'origine mésodermique au niveau rétinien sont multifonctionnelles et ont des capacités d'adaptabilité et de régénération, leur permettant de contribuer à la formation et l'entretien de la barrière hémato-rétinienne, participer à la réponse immunitaire, et contribuer à l'angiogenèse en modulant la prolifération et la migration des cellules endothéliales, le tout leur donnant un rôle primordial pour contribuer à l'homéostasie de la barrière hémato-rétinienne et la réponse en cas d'injure. Dans la rétine, les péricytes peuvent être transdifférenciés en cellules myoblastiques, cellules souches mésenchymateuses et peuvent être reprogrammés au sein des neurones et des cellules gliales. La densité des péricytes dans la microvascularisation rétinienne est élevée avec environ 1 péricyte pour 1 cellule endothéliale et ils aident au maintien de l'intégrité et de la fonction des cellules endothéliales (Caporarello et al, 2019; Huang, 2020).

En plus des mécanismes de néovascularisation connus et dont nous discuterons dans le prochain chapitre, la voie de signalisation Norrin/Frizzled4 est nécessaire à différentes étapes du développement vasculaire rétinien, tels que la prolifération des cellules endothéliales, la différenciation artério-veineuse, le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne et de sa fonction. De plus, les signaux d'origine neuronaux, tels qu'avec la sémaphorine-3A (Sema3A) ou les éphréines sont des régulateurs importants dans la néovascularisation, particulièrement dans la genèse des filopodes des *tip cells*. Les cellules ganglionnaires ont ainsi un rôle crucial dans le développement de la vascularisation rétinienne (Huang, 2020).

1.7 Résumé

L'œil est donc un organe composé de différentes structures et milieux. La rétine est un élément essentiel à la fonction visuelle. En effet, c'est un tissu composé de différentes cellules bien différenciées et bien organisées qui permettent la phototransduction par transformation de l'influx lumineux arrivant aux photorécepteurs en signal nerveux transporté à travers les cellules neurologiques de la rétine vers le nerf optique puis vers les aires visuelles corticales afin d'intégrer le signal, former une image et pouvoir répondre à ce signal par une action adaptée. Toutes ces étapes requièrent une forte demande énergétique. Le métabolisme rétinien, pour répondre à cette demande, est très élevé et a un système de régulation limité, le rendant sensible aux injures environnementales. Les apports en oxygène et nutriments dépendent des apports vasculaires. Afin de répondre à cette haute demande énergétique, la vascularisation rétinienne et choroïdienne est importante à comprendre, tant pour le développement que pour l'homéostasie tissulaire et fonctionnelle. Nous allons maintenant discuter des éléments et étapes clés impliquées dans la vascularisation.

Chapitre 2. Développement vasculaire

2.1 Système circulatoire

2.1.1 Généralités

Le système vasculaire sanguin transporte le sang dans les différents organes et tissus du corps humain via la circulation systémique afin de répondre à leurs besoins métaboliques de base. La pérennité des apports est permise par le fait que le système circulatoire est en circuit fermé avec la circulation pulmonaire. En effet, les poumons assurent l'équilibre gazeux du sang en l'oxygénant et le décarboxylant au niveau de la membrane alvéolo-capillaire, à l'aide de la respiration. Le sang oxygéné est ensuite dirigé dans le cœur par les veines pulmonaires au sein de l'oreillette gauche, puis vers le ventricule gauche. Il est ensuite envoyé dans la circulation systémique par l'aorte, l'artère principale du corps humain, de laquelle naissent plusieurs artères, puis des artérioles et enfin des capillaires. Les capillaires sont les interfaces d'échange entre le sang et les organes, et entre les vaisseaux artériels et veineux. Le sang désoxygéné passe ensuite dans les veinules puis les veines pour remonter dans l'oreillette droite au niveau du cœur par les veines caves supérieures et inférieures, transiter dans le ventricule droit et être envoyé aux poumons par les artères pulmonaires afin d'être ré-oxygéné au niveau de la membrane alvéolo-capillaire. Ceci formant un cycle perpétuel. Le système circulatoire comprend également le système lymphatique, qui permet de drainer l'excès de liquide tissulaire de la plupart des organes vers la circulation sanguine (Jain et al, 2022; Matienzo et al, 2022). Ainsi, les vaisseaux sont importants pour l'homéostasie et la vitalité tissulaire.

2.1.2 Les vaisseaux sanguins

2.1.2.1 Artères et artérioles

Les artères ont pour fonction de transporter le sang oxygéné et riche en nutriments du cœur vers les tissus dans la circulation systémique et le sang appauvri du cœur vers les poumons. Elles sont poursuivies par les artérioles avant que le sang n'atteigne les capillaires.

La paroi vasculaire est constituée de trois différentes tuniques (Figure 4A) :

- L'*intima*, le feuillet le plus interne adjacent à la lumière vasculaire, qui est composé d'une monocouche de cellules endothéliales jointives et est directement en contact avec le sang circulant. Elle est séparée du sous-endothélium par une fine couche de tissu conjonctif nommée lame basale. L'intima des grosses artères contient également des cellules musculaires lisses et parfois des lymphocytes et des monocytes (Six et al, 2020; Tenant et al, 1990).

- La *media*, une tunique composée de cellules musculaires lisses fusiformes en organisation concentrique associées à du tissu conjonctif. La media est impliquée dans la vasomotricité de par ses capacités de contraction et de dilatation. La contraction est par ailleurs assurée par des filaments d'actine et de myosine. Elle est séparée de l'intima par la limitante élastique interne (Six et al, 2020). Les cellules musculaires lisses artérielles sont plurifonctionnelles et ont des capacités sécrétoires et contractiles, dépendamment du phénotype qu'elles expriment. Elles peuvent avoir un phénotype dédifférencié, auquel cas elles seront sécrétrices ou un phénotype mature contractile ou myo-différencié. En situation physiologique chez l'adulte, la majeure partie de ces cellules ont un phénotype contractile (Six et al, 2020). En situation pathologique, le phénotype s'oriente vers la fonction sécrétoire (Six et al, 2020).

- L'*adventice*, la couche la plus externe, correspondant à une matrice conjonctive composée de fibroblastes qui permettront la synthèse de collagène et fibronectine. Cette

couche sert à la régulation de la vasomotricité et de la trophicité vasculaire, de par la présence d'un système nerveux adrénergique en son sein, des *vaso vasorum*, correspondant à une microvascularisation spécialisée qui va irriguer également la partie externe de la media, ainsi que d'un réseau lymphatique, de cellules du système immunitaire et de cellules progénitrices. Elle est séparée de la media par la limitante élastique externe (Six et al, 2020; Mullingan-Kehoe et al, 2014).

On peut différencier des grosses artères, telle que l'aorte, dont le but est le maintien du flux sanguin. L'aorte a un diamètre d'environ 25 mm avec une épaisseur de paroi de 2mm. Elle fait partie des gros vaisseaux de l'organisme et contient donc beaucoup de tissu fibreux. C'est le vaisseau contenant la plus grande proportion de tissu élastique avec une quantité modérée de cellules musculaires. Elle va donc pouvoir fonctionner en conditions de haute pression et stocker l'énergie lors de la systole puis de la libérer lors de la diastole. Les autres artères vont avoir un diamètre d'environ 4mm pour une épaisseur de paroi de 1mm. Elles sont constituées d'une quantité modérée de tissu élastique et de tissu fibreux d'une quantité élevée de cellules musculaires, cela leur donnant une capacité de haute résistance vasculaire. Les arterioles, quant à elles vont avoir un diamètre d'environ 30 μm pour une épaisseur de paroi de 20 μm . Elles possèdent légèrement moins de tissu élastique mais plus de tissu fibreux que les artères. Elles possèdent légèrement moins de cellules musculaires que les artères mais en possèdent plus que l'aorte, ce qui, rapporté à la surface sectionnelle, leur donne une très haute résistance vasculaire et vont pouvoir avoir un effet important sur la pression artérielle sous régulation neuro-hormonale (Burton et al, 1954; Kibble, 2020).

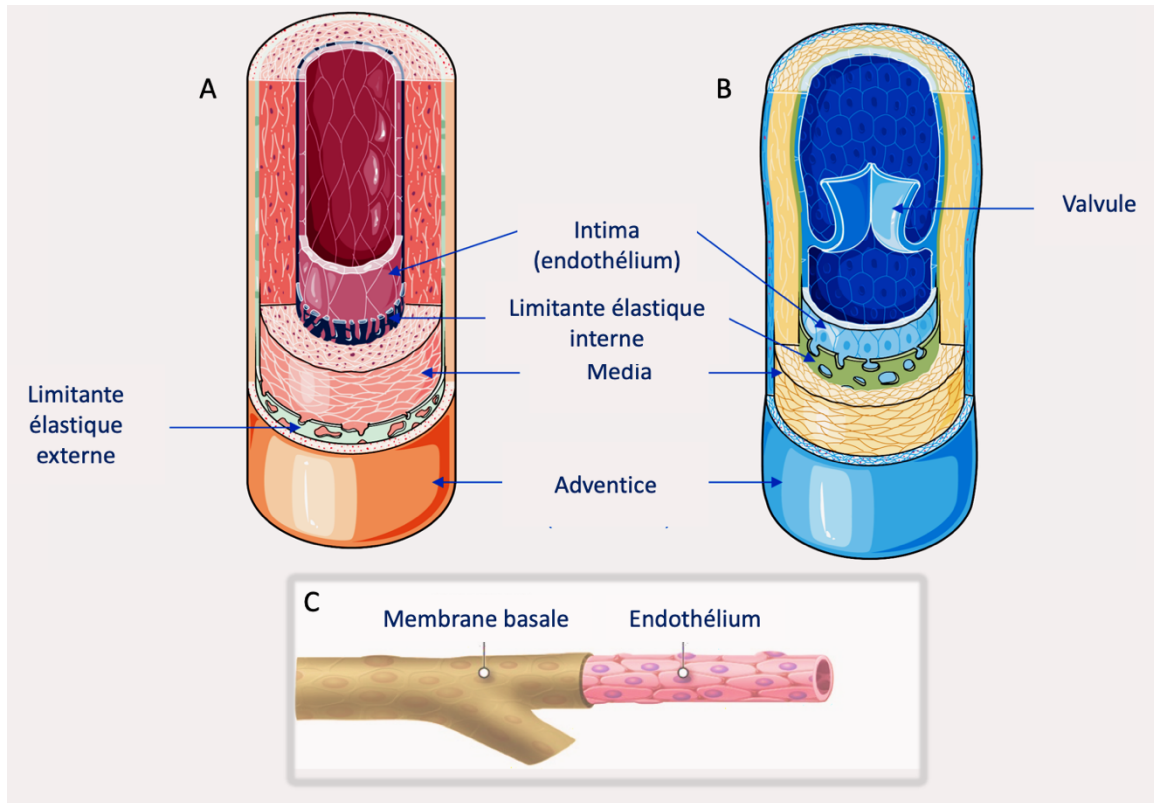


Figure 4: Structure des vaisseaux. (A) Artère; (B) Veine; (C) Capillaire; De la lumière vasculaire vers l'extérieur : L'intima est constituée de l'endothélium et la membrane basale. Bien que non représentée ici, la membrane basale recouvre également l'endothélium de l'artère et de la veine. Dans les artères et les veines, l'intima est recouverte de la limitante élastique interne puis la media et enfin l'adventice. Dans les artères, ces deux dernières couches sont séparées par la limitante élastique externe. Voir texte pour la description des structures.

Figure adaptée de "OLI - Drawing Walls of arteries, arterioles and capillaries - English labels" by Open Learning Initiative, license: CC BY-NC-SA et "Servier - Drawing Layers of vein and artery - English labels" by Servier Medical Art, license: CC BY

2.1.2.2 Veines et veinules

Ces vaisseaux possèdent la même structure que les vaisseaux artériels, à l'exception de l'absence de limitante élastique (Figure 4B). Dans la circulation systémique, les veinules vont recevoir le sang des capillaires pour le drainer dans les veines qui transporteront le sang consommé en nutriments et oxygène par les tissus jusqu'au cœur. Dans la circulation pulmonaire, les veines pulmonaires vont transporter le sang enrichi des poumons jusqu'au cœur. Le système veineux contient la majeure partie du volume sanguin circulant. La veine cave, faisant partie des gros vaisseaux de l'organisme, mesure 30 mm de diamètre pour une épaisseur pariétale de 1,5 mm. Tout comme l'aorte, elle contient beaucoup de tissu fibreux. En revanche elle contient une quantité modérée de tissu élastique et une quantité relativement plus importante de cellules musculaires. Les veines ont quant à elles un diamètre de 5mm pour une paroi mince de 0,5 mm d'épaisseur. Elles contiennent une quantité modérée de tissu élastique, de cellules musculaires et de tissu fibreux. Ces caractéristiques leur permettent de se distendre et de se dilater pour accueillir plus de volume sanguin sans subir d'augmentation de la pression intravasculaire. Les veinules ont un diamètre de 20 μm pour une épaisseur de 2 μm et contiennent du tissu fibreux en faible quantité et pas de tissu élastique ou de cellules musculaires. Ainsi, les veines et veinules ne présentent que peu de résistance vasculaire, leur permettant de fonctionner à basse pression. Le retour veineux est aidé par les capacités musculaires des petites veines. En outre, leur intima présente des replis à intervalles réguliers formant des valvules, qui empêcheront de manière mécanique le flux rétrograde (Burton et al, 1954; Kibble, 2020, Mitrovic I, 2019). Par ailleurs, dans la rétine, les cellules endothéliales ont la capacité de contribuer à la contraction veineuse en générant une force de contraction, de par la présence intrinsèque de protéines contractiles (Yu et al, 2023).

2.1.2.3 Capillaires

Les capillaires ont été objectivés pour la première fois dans les années 1840 par Thomas Schwann (Bikfalvi, 2017). Ce sont des vaisseaux de 7 μm de diamètre dont l'épaisseur de la paroi est de 1 μm . Ils sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales, qui offre la plus grande surface du système vasculaire pour l'échange de gaz de nutriments et de déchets entre le sang et les tissus (Figure 4C). Les cellules endothéliales sont entourées par des péricytes, impliqués dans la signalisation de la régulation, la prolifération et la migration des cellules endothéliales, le support mécanique, la régulation de la diffusion des protéines et l'extravasation cellulaire. Ces péricytes possèdent également des propriétés de cellules souches. La vitesse d'écoulement est nettement plus faible dans les capillaires, le flux sanguin étant dispatché en circulation parallèle de d'autres vaisseaux du réseau capillaire. Ils forment une grande plateforme d'échange pour les gaz, les liquides, les nutriments, les hormones entre le sang et les espaces interstitiels au niveau systémique et entre le sang et les alvéoles pulmonaires dans la circulation pulmonaire. Différents types de capillaires existent dans l'organisme : les capillaires continus, retrouvés dans les muscles squelettiques et des capillaires fenestrés (Burton et al, 1954; Kibble, 2020, Mitrovic I, 2019).

Les vaisseaux ont été présentés ici selon leur rôle fonctionnel. Il est à noter qu'on peut les différencier également selon leur taille. En effet, les capillaires, les artérioles et les veinules, qui se situent au niveau tissulaire et sont invisibles à l'œil nu et constituent la microvascularisation.

2.2 La néovascularisation

La néovascularisation correspond à la formation de nouveaux réseaux microvasculaires. Nous allons décrire dans cette partie les différents mécanismes impliqués dans la formation de ces nouveaux vaisseaux.

2.2.2 La vasculogénèse

2.2.2.1 Genèse des vaisseaux

La vasculogénèse est un processus permettant la formation de vaisseaux sanguins à partir de cellules endothéliales progénitrices. Durant l'embryogenèse, les vaisseaux se forment grâce à l'assemblage de cellules endothéliales progénitrices dérivées du mésoderme, les angioblastes pour la formation d'un réseau vasculaire primitif (Figure 5) (Potente et al, 2011; Eelen et al, 2017; Yoder, 2012).

Les cellules endothéliales progénitrices vont se différencier en cellules endothéliales de phénotype artériel ou veineux, possédant des identités moléculaires spécifiques, pour former respectivement les réseaux artériels et veineux (Potente et al, 2011). La voie Notch est essentielle dans la différenciation artério-veineuse. En effet, elle est hautement exprimée dans les artères contrairement aux veines et sa perte entraîne une régression du réseau artériel pour favoriser le phénotype veineux. Cela s'explique entre autres par le fait que l'Ephrin-B2 exprimée par les cellules endothéliales artérielles augmente en réponse à Notch, permettant ainsi la différenciation artérielle. La voie Notch réprime en revanche le récepteur EphB4 exprimé par les cellules endothéliales veineuses, permettant ainsi le phénotype veineux (Potente et al, 2011). Le VEGF et son cofacteur la neuropiline-1 contribuent également à la différenciation artérielle. FOXC1 et FOXC2 vont également contribuer au développement artériel en interagissant avec le VEGF et la voie Notch en impliquant DLL4, HEY2 et CXCR4. La répression de la voie Notch dans le réseau veineux passe par le récepteur nucléaire spécifique des veines COUP-TFII (Potente et al, 2011). Des facteurs mécaniques tels que la pression artérielle et le flux sanguin vont également contribuer à la différenciation artério-veineuse (Potente et al, 2011).

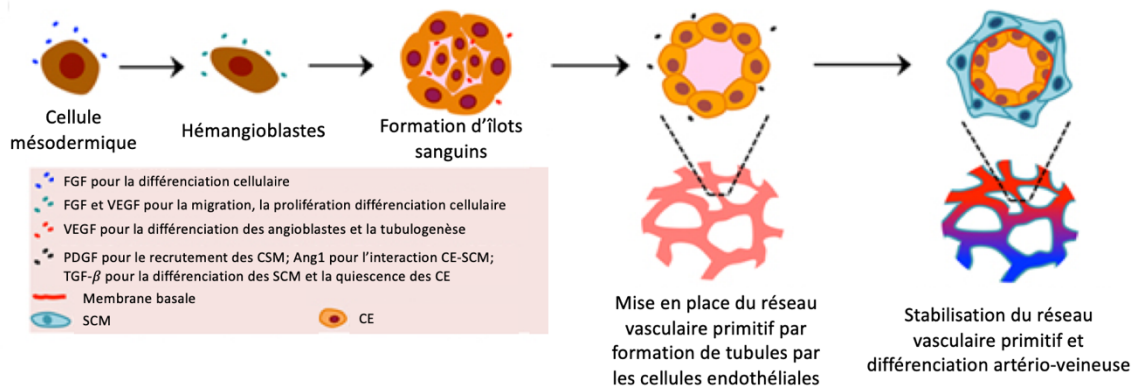


Figure 5: Étapes de la vasculogénèse. La cellule progénitrice mésodermique va se différencier en hémangioblastes. Ceux-ci vont permettre la formation d'îlots sanguins composés d'angioblastes. Les angioblastes vont ensuite se différencier en cellules endothéliales (CEs) qui formeront des tubules et créer le réseau vasculaire primitif. Ce réseau va ensuite être stabilisé par les cellules souches mésenchymateuses qui se différencieront par la suite en péricytes.

Figure adaptée d'après (Wang et al, 2019).

2.2.2.2 Place de la vasculogénèse dans la néovascularisation post-ischémique

Bien qu'initialement considérée comme un mécanisme de développement vasculaire foetal, la découverte de cellules endothéliales progénitrices dans le sang périphérique chez l'adulte dans les années 1990 a été le point de départ de nombreux travaux ayant permis de dévoiler que la vasculogénèse est également un mécanisme de croissance vasculaire postnatale. Parmi ces cellules endothéliales progénitrices, on peut distinguer les cellules endothéliales formant des colonies (ECFCs) ou cellules progénitrices endothéliales tardives et les cellules hématopoïétiques pro-angiogéniques (PACs), aussi appelées cellules myéloïdes angiogéniques, cellules angiogéniques circulantes, cellules progénitrices hématopoïétiques pro-angiogéniques circulantes ou cellules endothéliales progénitrices précoces. Ces deux types cellulaires sont capables de participer à la

croissance vasculaire post-ischémique (Banno et al, 2018; Díaz Del Moral et al, 2020, Yoder, 2012; Paschalaki et al, 2018).

L'origine des ECFCs est controversée, elles sont probablement issues de la paroi vasculaire mais aussi du sang de cordon, du sang périphérique circulant et des cellules souches pluripotentes humaines induites ont été évoquées. Les PACs quant à elle sont issues de la moelle osseuse. Ces cellules expriment des marqueurs hématopoïétiques, tel que CD34 et endothéliaux, tels que CD31 et VEGFR-2. Les PACs vont soutenir la régénération vasculaire au sein des sites endothéliaux altérés par le biais de mécanismes paracrines. Les ECFCs quant à elles ont un potentiel de prolifération clonale intrinsèque et vont contribuer à la formation de novo des vaisseaux sanguins. Ces deux types cellulaires vont coopérer dans les processus de revascularisation. On ne trouve que peu de ces cellules dans la circulation périphérique en condition physiologique (Banno et al, 2018; Díaz Del Moral et al, 2020, Yoder, 2012).

En condition pathologique par injure endothéliale ou condition d'ischémie tissulaire, ces cellules d'origine hématopoïétique vont augmenter dans la circulation périphérique pour être recrutées et incorporées au sein des sites de néovascularisation. Les PACs vont être impliquées dans un premier temps. En effet, elles vont proliférer en réponse au stimulus pathologique et sous la dépendance de la signalisation pro-angiogénique, notamment via FGF-2 et VEGF, se différencier en angioblastes, précurseurs de l'endothélium vasculaire ou en cellules rondes qui engendreront les cellules sanguines. Ensuite, elles seront mobilisées dans la circulation sanguine et migreront jusqu'au site de néovascularisation pour contribuer à la réparation vasculaire et la formation de nouveaux vaisseaux. Elles ne donneront pas de cellules endothéliales matures mais useront d'un mécanisme paracrine pour recruter les ECFCs et pour stimuler les voies de signalisation pro-angiogéniques (Banno et al, 2018; Ribatti et al, 2015; Murasawa et al, 2005; Paschalaki et al, 2018). A ce jour, les cellules progénitrices sont investiguées dans diverses pathologies telles que le cancer, les maladies hématologiques, les pathologies ischémiques, les maladies thrombo-emboliques veineuses et leurs capacités sont étudiées sur le plan thérapeutique pour la réparation vasculaire, la thérapie génique, la bio-ingénierie (Paschalaki et al, 2018).

2.2.3 Artériogénèse

L'artériogénèse correspond à la modification des artérioles pré-existantes par déploiement de leur lumière et leur épaisseur de paroi par épaissement de leur couche musculaire et acquisition de capacités visco-élastiques et vasomotrices. Elle sert à l'accroissement physiologique du réseau artériel par remaniement des artérioles pré-existantes en artère d'une part et au contrebalancement d'une atteinte ischémique pour maintenir le flux sanguin du territoire atteint d'autre part (Figure 6).

L'histoire de l'artériogénèse commence au XVIII^{ème} siècle où Sir John Hunter met en évidence que la discontinuation d'une artère est compensée par la formation d'artères collatérales fonctionnelles pour maintenir le flux sanguin (Rizzi et al, 2017).

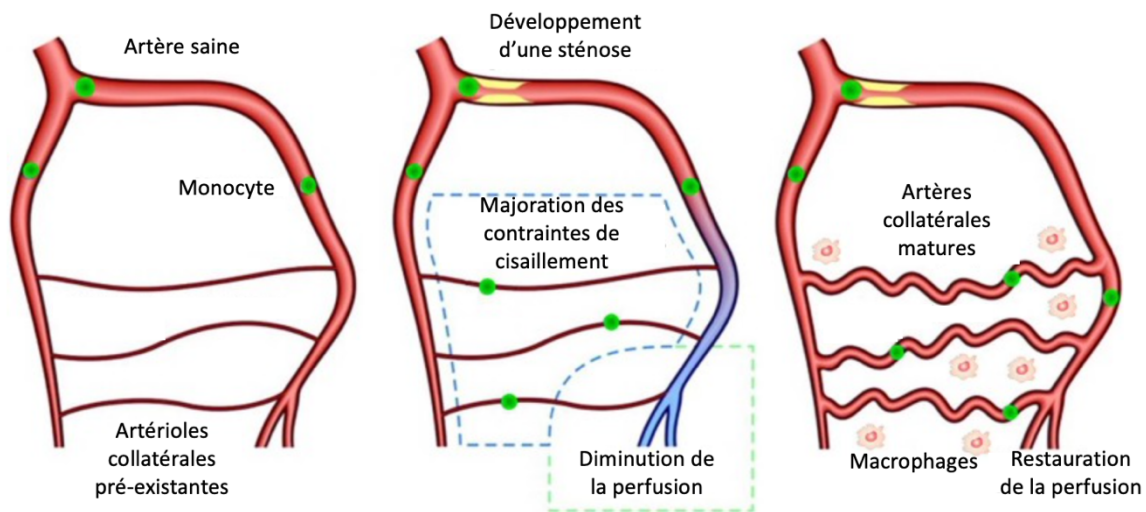


Figure 6: Phases de l'artériogénèse. Dans le cadre d'une diminution de la perfusion vasculaire, les contraintes de cisaillement vont être majorées au niveau des artérioles collatérales pré-existantes, conduisant à une prolifération de l'endothélium vasculaire. Secondairement aura lieu une phase de remodelage, le tout entraînant la constitution d'artères collatérales matures. Voir texte pour la description des différentes étapes.

Figure adaptée de (Hendrikx et al, 2016).

La première phase de l'artériogénèse est une phase de prolifération. Initialement, l'endothélium vasculaire va proliférer et être accompagné d'une multiplication des cellules musculaires lisses par mitose, d'une rupture de la lame élastique interne, d'une migration des cellules musculaires lisses pour former une nouvelle intima. Associé à cela, la lyse des tissus et la mort cellulaire du tissu périvasculaire permettra de faire la place nécessaire à la mise en place et la croissance de la nouvelle artère. La seconde phase de l'artériogénèse est une phase de remodelage (Rizzi et al, 2017).

Contrairement à l'angiogénèse, l'artériogénèse se déroule dans les tissus normoxiques et se fait en présence constante du flux sanguin. Elle va être induite mécaniquement par des contraintes de cisaillement (Rizzi et al, 2017).

Deux types d'anastomoses existent dans l'artériogénèse. Des anastomoses d'artères à artères ne vont pas prendre en compte la vascularisation capillaire et vont conduire le flux sanguin au territoire impacté par une occlusion artérielle. Ces anastomoses vont être minimalement tortueuses et ne verrons pas leur diamètre intraluminal majoré. On va les retrouver dans les situations d'ischémie d'artères coronariennes ou d'autres artères majeures du corps humain. Il existe également des anastomoses d'artéiole à artéiole, qui vont augmenter l'arbre artériolaire. Celles-ci sont présentes dans des tissus sains, comme le cerveau, la moelle épinière et les muscles squelettiques où elles auront un diamètre moyen inférieur à 100 μm , et le myocarde où leur diamètre sera supérieur à 150 μm . Elles peuvent être en revanche absentes de certains tissus, comme la rétine. Ces anastomoses vont être tortueuses et, bien qu'elles diminuent en nombre, elles vont voir augmenter leur diamètre et leur épaisseur pariétale par épaissement de la couche musculaire. Ce processus a lieu de manière physiologique en période postnatale précoce et en cas de majoration de la masse musculaire impliquant un accroissement du réseau artériolaire (Rizzi et al, 2017).

En condition pathologique, l'artériogénèse va impliquer une dégradation de la membrane basale, un switch du phénotype contractile des cellules musculaires lisses en phénotype

contractile et prolifératif. Cela va être associé à des réactions inflammatoires locales (Rizzi et al, 2017).

Comme dans la vasculogénèse, les cellules endothéliales artérielles expriment Ephrin-B2 et mettent en cause la voie Notch/DLL4. La voie de signalisation VEGF/VEGFR-2 est impliquée dans la régulation de l'artériogénèse. Le VEGF va activer la voie *extracellular signal regulating kinase 1/2* (ERK 1/2) et entraîner ainsi la prolifération des cellules endothéliales, l'agrandissement du réseau artériolaire et l'augmentation de la lumière vasculaire. Des facteurs vont être sécrétés en réponse aux contraintes de cisaillement pulsatile et aux contraintes circonférentielles pour entraîner une prolifération cellulaire endothéliale et un agrandissement de la lumière vasculaire : la *platelet endothelial cell adhesion molecule* (PECAM-1), la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), la *intracellular adhesion molecule* (ICAM-1) et la *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1). De ce fait, l'endothélium vasculaire va devenir hyperperméable et laisser passer les protéines plasmatiques, les globules rouges et les plaquettes dans la paroi vasculaire. La sécrétion de MCP-1 et de *granulocyte/macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) par les cellules endothéliales va favoriser le recrutement des monocytes circulants dans les collatérales pour venir adhérer à l'endothélium. Leur activation va stimuler la production de TNF- α , qui amplifiera le recrutement monocyttaire local. Ces monocytes vont évoluer en macrophages qui vont contribuer au processus par sécrétion de métalloprotéinases pour dégrader la membrane basale, de chimiokines (MCP-1) pour maintenir l'environnement inflammatoire et de facteurs de croissance (FGF-b) pour la prolifération des cellules endothéliales. Par ailleurs le GM-CSF va prévenir l'apoptose des monocytes et potentialiser le processus. Le Transforming Growth Factor beta (TGF- β), le GM-CSF, la monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) et le FGF-b vont également promouvoir la prolifération des cellules musculaires lisses (Buschmann et al, 2001; Rizzi et al, 2017).

2.2.4 Angiogenèse

2.2.4.1 Description générale de l'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus correspondant à la formation de nouveaux vaisseaux à partir des capillaires pré-existants. Ainsi, le remodelage et la croissance ultérieure du plexus primaire implique l'angiogenèse (Potente et al, 2011, Eelen et al, 2018). Nous comprendrons alors que chez l'adulte, le réseau vasculaire étant formé et l'organisme n'étant plus en croissance, l'angiogenèse est un mécanisme quasiment inexprimé en condition physiologique. C'est un processus qui s'appliquera sur les réseaux vasculaires nécessitant une croissance pour établir une oxygénation tissulaire favorable, en condition pathologique, telles que dans les pathologies ischémiques ou tumorales ou en condition plus physiologique comme le développement de la masse musculaire du sportif, les menstruations féminines ou encore la grossesse.

Au XIX^{ème} siècle, Carl Thiersh a démontré pour la première fois la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. En 1907, Ernst Goldmann expose le processus de bourgeonnement des capillaires impliqués dans un processus tumoral. En 1972, Michael Gimbrone et Judah Folkman montrent que l'angiogénèse est indispensable à la croissance tumorale et que des facteurs angiogéniques tumoraux sont impliqués. En 1986, l'équipe de Harold Fisher Dvorak décrit le facteur de perméabilité vasculaire, qui sera plus tard appelé VEGF. Bien d'autres facteurs pro-angiogéniques ont été découverts par a suite (Bikfalvi, 2017).

L'angiogenèse est présentement connue sous différents types de mécanismes tels que la division des vaisseaux déjà formés, appelé intussuception ou le bourgeonnement des vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants (Potente et al, 2011, Eelen et al, 2018).

Brièvement, la croissance intussusceptive (Figure 7A) élargit le lit capillaire en divisant un capillaire en deux vaisseaux adjacents. Les parois opposées du capillaire vont s'invaginer au sein de la lumière capillaire et leurs cellules endothéliales vont pouvoir se mettre en contact pour former une bicouche endothéliale qui sera ensuite séparée par une réorganisation de jonctions intracellulaires. L'intussusception a été beaucoup moins étudiée que l'angiogenèse par bourgeonnement, que nous allons détailler ici, ce d'autant que c'est un des mécanismes principaux qui est impliqué en cas d'ischémie-revascularisation qui est une étape clé dans la physiopathologie de la rétinopathie du prématuré, dont nous discuterons dans un chapitre suivant (Eelen et al, 2018).

Dans l'angiogenèse par bourgeonnement, un type de cellules endothéliales, les *tip cells*, va être activé et va changer son morphotype en vue de l'initiation du bourgeonnement. Ces cellules vont ainsi être à l'origine de la migration cellulaire pour créer et orienter de nouveaux bourgeonnements vasculaires et vont optimiser leur environnement en vue du développement vasculaire. Les cellules adjacentes aux *tip cells*, les *stalk cells*, vont permettre quant à elles d'allonger les bourgeons, de créer une lumière vasculaire et d'aider à la prolifération cellulaire pour la formation des vaisseaux à partir du bourgeonnement (Potente et al, 2011, Eelen et al, 2018). Ces nouveaux embranchements et nouveaux vaisseaux vont ensuite être stabilisés pour donner des vaisseaux consolidés (Potente et al, 2011). Ensuite le remodelage vasculaire permettra d'obtenir un plexus vasculaire mature par retour en un phénotype quiescent, recouvrement par des péricytes, formation de la membrane basale (Figure 7B) (Potente et al, 2011).

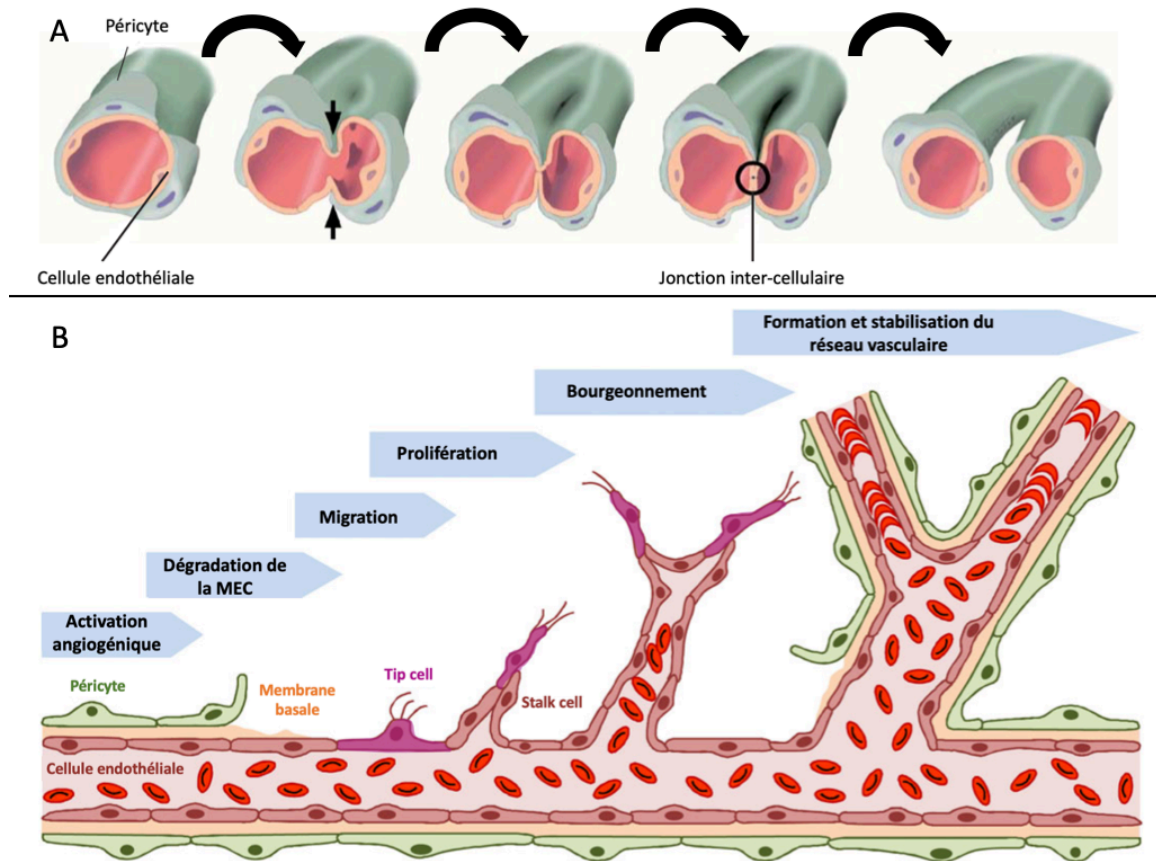


Figure 7: Angiogenèse. (A) Par intussusception : Invagination de la paroi du capillaire permettant de former un pilier intraluminal où se réarrangeront les cellules endothéliales accompagnées de la mise en place de jonctions inter-cellulaires. Finalement, la poursuite de la croissance à l'aide du flux vasculaire permettra la séparation en deux vaisseaux distincts; (B) Par bourgeonnement avec la phase d'activation angiogénique conduisant à la dégradation de la membrane basale, puis la phase de maturation avec la migration des tip cells, la prolifération des stalk cells permettant la formation du nouveau réseau vasculaire, et finalement la phase de stabilisation avec formation de la membrane basale et recouvrement par les péricytes. MEC : matrice extra-cellulaire.

Figure adaptée d'après (De Spiegelaere et al, 2012; Laschke et al, 2022).

Nous allons maintenant développer plus précisément l'angiogenèse par bourgeonnement.

2.2.4.2 L'hypoxie à l'origine de l'induction du processus angiogénique

Dans l'histoire de l'angiogenèse, Isaac Claude Michaelson met au point une technique permettant de visualiser la vascularisation rétinienne en 1948, ce qui permettra à Kate Isabel Campbell, en 1951, de décrire que l'environnement hypoxique induit le bourgeonnement des capillaires (Bikfalvi, 2017). Cette induction est contrôlée par le système HIF (*Hypoxia Inducible Factor*). Le premier facteur à être déclenché par l'hypoxie est HIF-1 et sa signalisation va conduire à la transcription de différents gènes impliqués dans l'angiogenèse et la prolifération cellulaire. HIF-1 est constitué de deux sous-unités : HIF-1 β et HIF-1 α , qui est la sous-unité régulée par l'oxygène. HIF-1 α est instable en condition normoxique, de par l'hydroxylation de deux résidus prolines et l'acétylation d'un résidu lysine situés sur le domaine de dégradation dépendant de l'oxygène, ce qui va conduire à une reconnaissance et une liaison avec le complexe d'ubiquitination pVHL (*von Hippel Lindau protein*), menant à la dégradation rapide de HIF-1 α par la voie du protéasome. Par contre, en condition hypoxique, cette hydroxylation n'a plus lieu et HIF-1 α se stabilise et interagit avec des éléments coactivateurs, telle que la protéine CREB (*C-AMP Response Element-binding protein*), ce qui lui permettra de réguler l'expression de gènes ciblant l'angiogenèse. Par ailleurs, l'HIF-1 α stabilisé va être transloqué dans le noyau, où elle va se dimériser avec la sous-unité HIF-1 β pour former le complexe HIF, qui va contribuer à la transcription de gènes pro-angiogéniques (Ke et al,2006).

2.2.4.3 La phase d'activation de l'angiogenèse

La membrane basale, constituée de protéines de la matrice extra-cellulaire, recouvre les cellules endothéliales et est elle-même recouverte par des péricytes. En condition basale, elle permet le maintien des cellules endothéliales entre elles.

Suite à un signal pro-angiogénique médié par le VEGF, les cellules endothéliales exprimant le récepteur VEGFR-2 vont s'activer et dégrader la membrane basale à l'aide de la métalloprotéase matricielle MT-MMP1 ainsi que détacher les péricytes. La dégradation

de la membrane basale par les métalloprotéases va également contribuer au bourgeonnement par libération de facteurs pro-angiogéniques contenus dans la matrice extra-cellulaire. Paradoxalement, mais dans un but d'équilibre, elles vont générer des molécules anti-angiogéniques pour permettre un bourgeonnement approprié, sans excès. Le détachement des péricytes est stimulé par l'angiopoïétine-2 (Ang2), un facteur de croissance contenu dans les cellules endothéliales et sécrété pour l'occasion (Potente et al, 2011).

2.2.4.4 La phase de maturation de l'angiogenèse

Dans l'angiogenèse par bourgeonnement, un type de cellules endothéliales, les *tip cells*, est exposé à un haut niveau de VEGF. Suite au signal pro-angiogénique médié par le VEGF, ces cellules endothéliales exprimant le VEGFR-2, les cellules endothéliales activées, vont prendre le phénotype *tips cells*, en changeant de morphotype avec le développement de filopodes, leur permettant de capter les signaux attractifs et répulsifs de l'environnement pour donner à ces cellules des capacités de motilité et d'invasivité en vue du bourgeonnement (Potente et al, 2011).

La voie de signalisation Notch/DLL4 (*Notch/delta like ligand 4*) contrôle cette étape en sélectionnant les *tip cells* par inhibition latérale des cellules adjacentes. Sous stimulation par le VEGF sur VEGFR-2, les *tips cells* vont exprimer fortement DLL4 par rapport aux autres cellules endothéliales. DLL4 va alors se fixer sur le récepteur Notch1 des cellules adjacentes, les *stalk cells*. L'activation de la voie de signalisation Notch dans les *stalk cells* va bloquer les récepteurs VEGFR-2 et NRP1 au profit de l'augmentation de VEGFR-1, le tout inhibant le phénotype *tip cells*. Grâce à l'activité de NRP-1 et VEGFR-2 en leur sein, les cellules endothéliales initiatrices, appelées *tip cells*, vont ainsi être à l'origine de la migration pour créer et orienter de nouveaux bourgeonnements vasculaires et vont optimiser leur environnement en vue du développement vasculaire. Suite à la stimulation par la Notch, les cellules endothéliales artérielles vont majorer leur expression d'éphrine-B2. En revanche, les cellules endothéliales veineuses sont porteuses du récepteur à

l'éphrine EphB4, qui va quant à lui être réprimé par Notch. L'activité subséquente est indispensable à la qualité du bourgeonnement et à la différenciation artérioveineuse (Potente et al, 2011).

Les *stalk cells* quant à elles ont des propriétés prolifératives, vont former la lumière vasculaire, établir des jonctions entre les cellules et produire les composants de la membrane basale. La voie Notch est indispensable pour la spécification et la stabilisation des *stalk cells*. Elles servent ensuite à la formation de la lumière vasculaire par coalescence de vacuoles pinocytaires qui vont s'interconnecter avec celles des cellules voisines. D'autres mécanismes de formation luminale ont également été décrits, notamment la rétraction du cytosquelette après exposition à des glycoprotéines chargées négativement au niveau des jonctions des cellules endothéliales. La lumière est ensuite étendue sous l'influence du VEGF et de ROCK (*Rho-associated protein kinase*) (Potente et al, 2011).

Les tips cells vont par ailleurs fusionner entre elles et créer des anastomoses vasculaires, sous support de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les macrophages, pour agrandir le maillage vasculaire. Les VE-cadhérines contenues dans les jonctions vont ensuite solidifier les connexions entre les tips cells (Potente et al, 2011, Eelen et al, 2018). Durant cette phase, les cellules endothéliales vont devoir adopter des propriétés de survie pour maintenir l'intégrité vasculaire. Des signaux de survie cellulaire autocrines et paracrines vont être émis de la part des cellules endothéliales et des cellules de support pour protéger le vaisseau contre les facteurs de stress environnementaux. Par ailleurs, la sécrétion de TGF- β par les péricytes va leur permettre d'augmenter leur expression de VEGF et VEGFR-1. Le VEGF va activer la voie de survie cellulaire PI3K/AKT dans les cellules endothéliales mais aussi induire une stimulation de la voie Ang1/Tie-2 et de l'augmentation de l'expression de Ang2 pour médier l'angiogenèse. Quand il est produit comme facteur intracrine par celles-ci, il les protège de l'apoptose en condition physiologique; Le facteur de croissance fibroblastique FGF est également impliqué dans le maintien de l'intégrité vasculaire par renforcement des jonctions adhérentes. Par

ailleurs, l'Ang1 regroupe Tie2 aux jonctions situées entre les cellules endothéliales pour favoriser la survie et leur état quiescent (Caporarello et al, 2019; Potente et al, 2011). Les *tip cells* et *stalk cells* sont des phénotypes transitoires et les cellules endothéliales vont repasser en phénotype quiescent dans la phase de résolution.

2.2.4.5 La phase de résolution de l'angiogénèse

La stabilité vasculaire et la régulation de la perfusion subséquente est permise par le recrutement de péricytes et de cellules musculaires lisses vasculaires qui vont envelopper les cellules endothéliales ayant formé des tubules.

Les vaisseaux nouvellement formés vont nécessiter une stabilisation par mise en place de matrice extracellulaire pour former la membrane basale, recrutement de péricytes, réduction de la prolifération endothéliale et augmentation de la formation de jonctions cellulaires (Caporarello et al, 2019; Huang, 2020; Potente et al, 2011).

L'apparition du flux sanguin intraluminal va aider au remodelage vasculaire et activer le facteur transcriptionnel *Krüppel-like factor 2* (KLF2) en réponse à la contrainte de cisaillement, qui va induire le remodelage vasculaire par modulation de la voie PI3K MAPK puis promouvoir le phénotype quiescent et la formation de vaisseaux permanents avec un recouvrement endothélial anti-thrombogène. Par ailleurs, l'apport sanguin en oxygène et nutriment va réduire l'expression de VEGF et rendre les cellules endothéliales en phénotype quiescent (Caporarello et al, 2019; Huang, 2020; Potente et al, 2011).

Les péricytes établissent des contacts directs avec les cellules endothéliales dans les capillaires et les vaisseaux immatures. L'induction, la différenciation, la prolifération et la migration des péricytes est sous la régulation de TGF- β . TGF- β a une réelle fonction dans la phase de stabilisation puisqu'il contribue également à la production de matrice extracellulaire. Le recrutement des péricytes est quant à lui contrôlé par le PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor β). En effet, le PDGF- β sécrété par les cellules endothéliales va induire d'une part une relaxation des péricytes et d'autre part la signalisation du PDGFR- β exprimé sur les péricytes pour stimuler leur prolifération et leur

migration afin d'assurer la maturation vasculaire. Les péricytes vont également sécréter la métalloprotéase-9 (MMP-9) pour améliorer la perméabilité vasculaire. Le recrutement des péricytes est également conduit par l'éphrine B2, qui est nécessaire à leur adhésion aux cellules endothéliales. La signalisation via le *Sphingosine-1-phosphate receptor* (S1PR) entraîne des changements du cytosquelette, d'adhésion et de jonction, affectant la migration, la prolifération et la survie cellulaire. L'angiopoïétine-1 va activer le récepteur endothélial Tie2 pour stabiliser les vaisseaux, promouvoir l'adhésion des péricytes, et améliorer leur perméabilité en resserrant les jonctions endothéliales. La stabilisation des vaisseaux met également en jeu la formation de jonctions N-cadhérine. Le dépôt de la membrane basale est quant à lui favorisé par les TIMPs, des inhibiteurs de protéases (Caporarello et al, 2019; Huang, 2020; Potente et al, 2011).

Les *phalanx cells* sont les cellules endothéliales en quiescence et vont exprimer des capteurs sensibles à l'oxygène pour réguler la perfusion vasculaire. Elles sont plus matures et vont relier le bourgeonnement vasculaire au vaisseau pré-existant pour former une lumière et permettre la circulation sanguine (Potente et al, 2011, Eelen et al, 2017). Les cellules endothéliales quiescentes vont former une barrière entre le sang et les tissus environnants pour contrôler les échanges de fluides, molécules et la migration de cellules immunes à travers les jonctions adhérentes contrôlées par les VE-cadhérine et N-cadhérine, et les jonctions serrées via la famille des molécules d'adhésion jonctionnelles (JAM). La VE-cadhérine, complexée avec le VEGFR-2 va contribuer au maintien de la quiescence des cellules endothéliales par recrutement de phosphatases qui vont déphosphoryler VEGFR-2 et diminuer la signalisation du VEGF. L'activation de Tie-2 par Ang1 va par ailleurs renforcer l'imperméabilité vasculaire en inhibant la capacité du VEGF à induire une endocytose des VE-cadhérines, le tout contribuant à la maturation et la stabilisation vasculaire (Caporarello et al, 2019; Potente et al, 2011). A noter que le VEGF exprimé par les péricytes et préférentiellement l'isoforme VEGF-A165 qui a l'avantage par rapport aux isoformes plus solubles de contribuer à la survie endothéliale et la stabilisation des néovaisseaux sans induire de migration cellulaire endothéliale. Par

ailleurs, les péricytes sont porteurs du VEGFR-1, qui va leur permettre de lier le VEGF préférentiellement au VEGFR-2 des cellules endothéliales afin de s'opposer à l'initiation de l'angiogenèse dans les vaisseaux matures (Caporarello et al, 2019).

2.2.4.6 Le phénomène de switch angiogénique

Les vaisseaux sanguins transportant les nutriments et l'énergie nécessaires aux besoins énergétiques des tissus, les vaisseaux, tout comme les signaux pro ou anti-angiogéniques peuvent affecter le métabolisme. Ainsi, l'angiogenèse va pouvoir stimuler la croissance du tissu adipeux, promouvoir la morphogenèse et la régénération des tissus impliqués dans le métabolisme tels que le foie ou le pancréas. Les facteurs de croissance angiogénique, tels que le VEGF vont quant à eux contrôler l'absorption des lipides et la biogenèse mitochondriale. Ainsi, les vaisseaux normaux ont un phénotype quiescent.

Inversement, dans certaines conditions comme l'ischémie ou les processus tumoraux, certains signaux métaboliques vont activer les vaisseaux et stimuler l'angiogenèse et la biogenèse mitochondriale pour préparer un tissu ischémique au métabolisme oxydatif lors de la réplétion d'oxygène et de nutriments après un phénomène de revascularisation. Il existe donc un switch angiogénique entre un environnement hypoxique où les facteurs métaboliques vont promouvoir l'angiogenèse pour préparer le métabolisme oxydatif qui prendra place dans un environnement hyperoxique relatif d'un tissu revascularisé (Potente et al, 2011).

Contrairement au réseau normal, le réseau formé par switch angiogénique va être instable, désordonné, hétérogène, anarchique, hyperperméable et va pouvoir engendrer des complications comme les hémorragies (Favier et al, 2002).

En d'autres termes, le switch angiogénique a lieu lorsque la balance des facteurs pro- et anti-angiogéniques, normalement à l'équilibre, se déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogéniques.

Ce phénomène de switch angiogénique se retrouve en conditions pathologiques, dans les processus tumoraux mais aussi dans le cadre de la revascularisation post-ischémique, telle que dans la rétinopathie du prématuré, dont un des prochains chapitres fera l'objet.

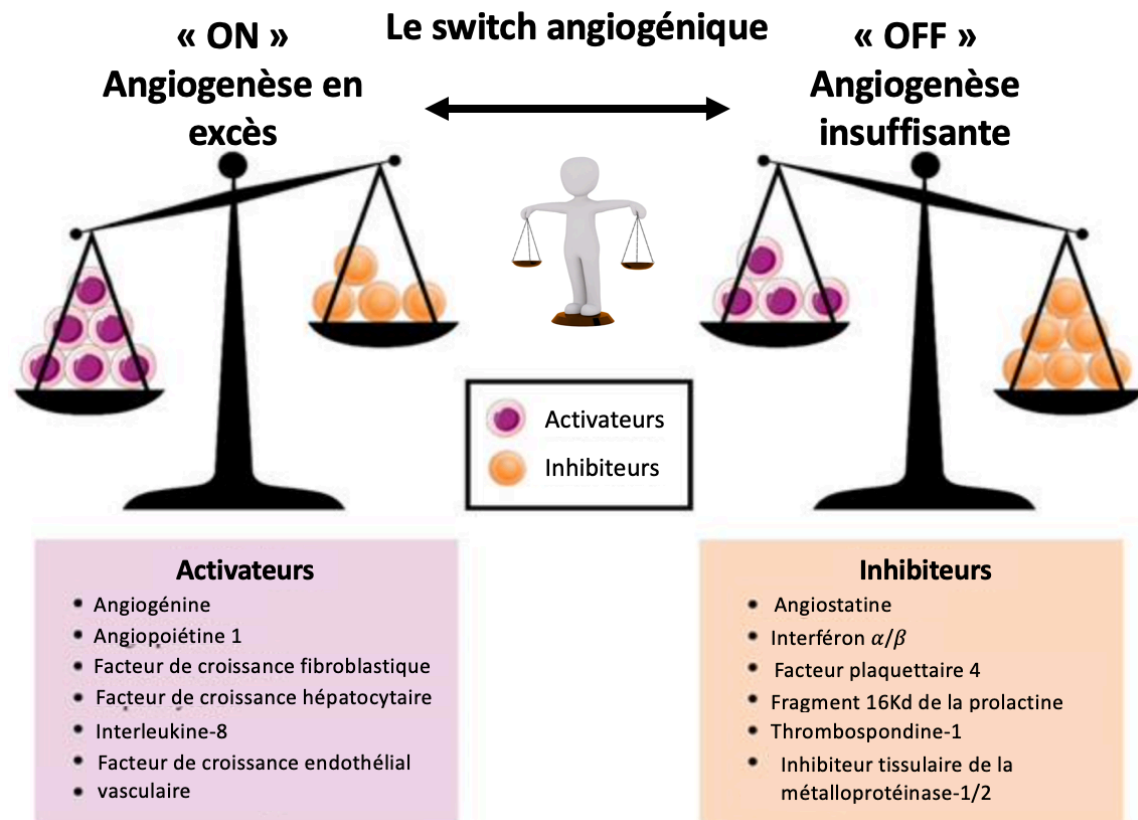


Figure 8 : Le switch angiogénique. Débalancement de l'état d'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques menant à une angiogenèse en excès ou insuffisante (Liste de facteurs pro- et anti-angiogéniques non exhaustive). Figure adaptée d'après (Madu et al, 2020).

2.2.5 Régulation de la néovascularisation

2.2.5.1 Principaux facteurs clés pro-angiogéniques dans la néovascularisation oculaire

Nous avons mentionné certains facteurs pro-angiogéniques et certaines voies de signalisation dans les sections précédentes. Nous allons résumer ici différents facteurs pro-angiogéniques impliqués dans l'angiogenèse oculaire et leurs fonctions. Nous allons dans un premier temps détailler le VEGF, celui-ci étant le plus important facteur de croissance angiogénique, puis nous parlerons brièvement des autres principaux facteurs pro-angiogéniques connus.

2.2.5.1.1 Le *Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF, acteur essentiel de l'angiogénèse

La famille des VEGF moléculaires comprend le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D et le PlGF. Cette famille contribue à la prolifération et la migration endothéliales, ainsi qu'au bourgeonnement, à la formation de tubules et à l'hyperperméabilité nécessaires à l'angiogénèse. Le VEGF-A est le plus présent dans la rétine et est souvent celui que l'on nomme VEGF. On peut le trouver sous 9 isoformes différents, dont l'isoforme VEGF₁₆₅, qui est prédominant et soluble. Le VEGF B possède lui 2 isoformes. Le VEGF-C et le VEGF-D sont surtout investis dans la lymphangiogénèse (Bali et al, 2013; Apte et al, 2019; Huang, 2020).

L'expression du VEGF est induite majoritairement par le système HIF. Son induction peut également être réalisée par d'autres facteurs, notamment l'*Epidermal growth factor* (EGF), le *platelet derived growth factor* (PDGF) et certaines mutations oncogéniques telles que les signalisations ras, chl ou wnt-kras (Apte et al, 2019). Le monoxyde d'azote (NO) endogène contribue également à la synthèse de VEGF (Dulak et al, 2000). En condition inflammatoire, l'expression de VEGF par les macrophages est dépendante de NF-κB (Kiriakidis et al, 2003).

Le VEGF possède 5 récepteurs individualisables : le *VEGF-receptor 1* (VEGFR-1 ou Flt1), le *VEGF-Receptor 2* (VEGFR-2 ou Flk1), le *VEGF-Receptor 3* (VEGFR3 ou Flt4), la neuropiline 1 (NRP1) et la neuropiline 2 (NRP2) (Bali et al, 2013).

Le VEGF-A va se fixer préférentiellement aux VEGFR-1, VEGFR-2, NRP1 et NRP2 pour contribuer à la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Le VEGF-B a pour récepteurs VEGFR-1 et NRP-1 afin d'augmenter la migration et la prolifération des cellules endothéliales. Les VEGF-C et VEGF-D ont pour récepteurs VEGFR-3 et VEGFR-2, ce qui leur permettra d'accroître l'expression de VEGF-A et la réponse des cellules endothéliales à celui-ci. Le PlGF va se fixer sur VEGFR-1 pour contribuer à la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Bali et al, 2013). La signalisation du VEGFR-1 est illustrée dans la Figure 9.

Le VEGFR-2 a une affinité plus faible pour le VEGF que le VEGFR-1 qui est le récepteur dominant de la signalisation du VEGF. Par la voie canonique, il va réguler la prolifération, la migration, la survie et la perméabilité vasculaire de l'endothélium. Il permet également la sélection des *tip cells* et des *stalk cells* (Apte et al, 2019). Via la voie de signalisation VEGF-A/VEGFR-2, les péricytes vont pouvoir moduler la prolifération endothéliale et le bourgeonnement (Huang, 2020).

La signalisation VEGFR-1 va dépendre du contexte, de son ligand et de l'activité VEGFR-2. VEGFR-1 est un régulateur négatif de la néovascularisation fœtale et postnatale physiologique. En revanche en condition de stress, il a une activité pro-angiogénique et encourage la survie cellulaire. Il permet également de contrôler le chimiotactisme des cellules inflammatoires. Lorsqu'il est induit par le VEGF-B, il peut contribuer à la résistance à l'insuline. Lorsqu'il est exprimé par les péricytes, il va participer à leur croissance et leur migration (Huang, 2020).

L'activité paracrine du VEGF stimule l'angiogénèse, tandis que l'activité intracrine contribue à la survie cellulaire en condition physiologique (Potente et al, 2011).

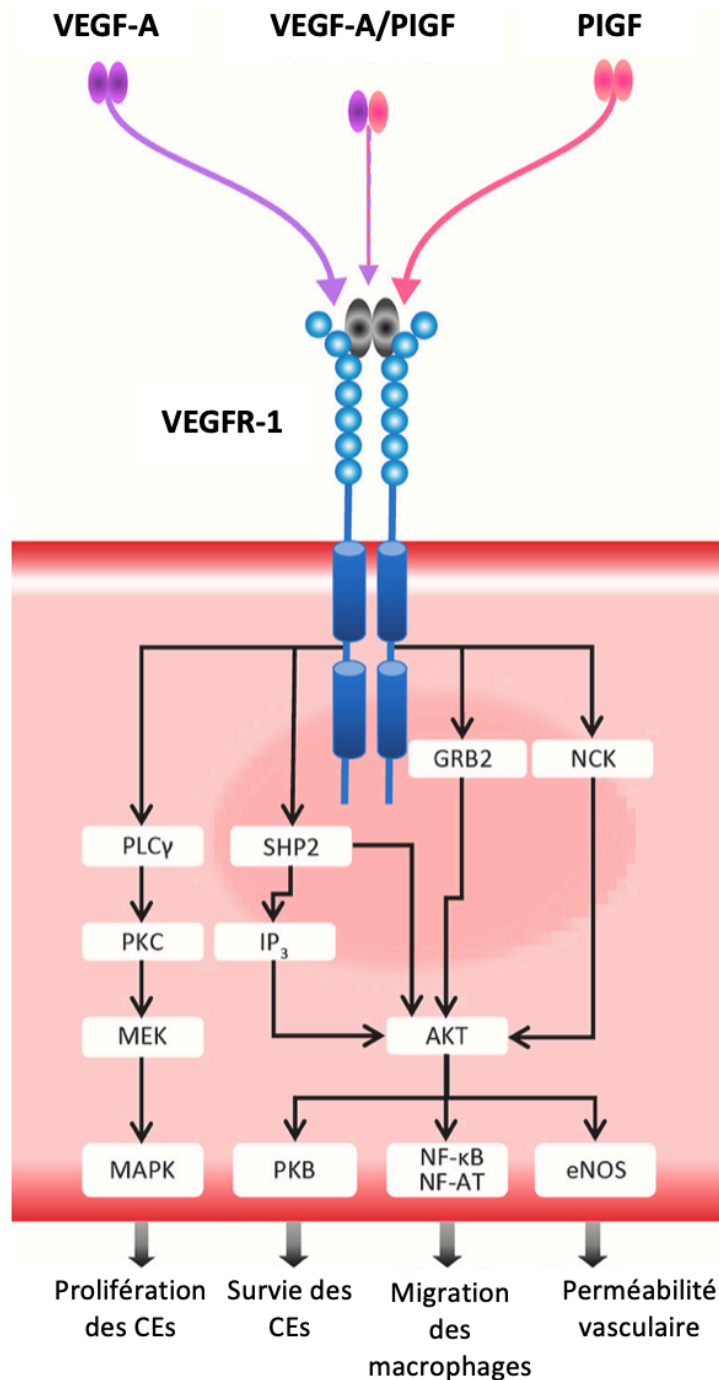


Figure 9 : Voies de signalisation du VEGFR-1 dans les cellules endothéliales menant à l'angiogenèse. La signalisation du VEGFR-1, dont l'induction est décrite dans le texte, peut faire intervenir différentes voies pour moduler les fonctions endothéliales telles que la prolifération des CEs, la survie des CEs, la migration des macrophages ou encore la perméabilité vasculaire. CEs : cellules endothéliales.

Figure adaptée de (Uemura et al, 2021).

2.2.5.1.2 Autres facteurs angiogéniques d'intérêt

Nom	Abréviation	Rôles dans :
Angiopoïétine 1	Ang1	- Recrutement des péricytes - Formation des néovaisseaux
Angiopoïétine 2	Ang2	- Seule : activité anti-angiogénique par inhibition de Tie2 - En présence de VEGF : activité pro-angiogénique par prolifération et migration des cellules endothéliales
<i>Transforming growth factors</i>	TGF- α , TGF- β	- Prolifération et migration des cellules endothéliales, - Remodelage de la matrice extra-cellulaire
<i>Epidermal growth factor</i>	EGF	- Prolifération et migration des cellules endothéliales
<i>Platelet-derived growth factor</i>	PDGF	- Recrutement des péricytes - Stabilisation des néovaisseaux
<i>Tumor necrosis factor</i>	TNF α	- Prolifération et migration des cellules endothéliales - Formation des tubules
Interleukines 1, 8, 13	IL-1, -8, -13	- Prolifération endothéliale
<i>Insulin-like growth factor</i>	IGF-1	- Prolifération cellulaire - Production de VEGF
<i>Vascular endothelial cadherin</i>	VE-cadherin	- Prolifération des cellules endothéliales - Adhésion des cellules endothéliales
<i>Fibroblast growth factors a et b</i>	FGF-a, FGF-b	- Prolifération des cellules endothéliales - Migration des cellules endothéliales - Remodelage de la matrice extra-cellulaire
Métalloprotéases 1, 2 et 9	MMP-1, MMP-2, MMP-9	- Dégradation de la membrane basale et de la matrice extra-cellulaire, en réponse à la stimulation par les FGFs, le VEGF et aux faibles doses de TGF- β
<i>Hypoxia inducible factors</i>	HIF-1 α , HIF-1 β , HIF-2 α	- Production de VEGF
<i>C-C Motif Chemokine Ligand 1</i>	CCL-1	- Différenciation des cellules endothéliales - Modulation de l'environnement par chimiotactisme pour favoriser l'angiogenèse
<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 6 et 12</i>	CXCL-6, CXCL-12	- Prolifération des cellules endothéliales
<i>Delta Like Canonical Notch Ligand 4</i>	DDL4	- Différenciation des tips cells et des stalk cells
<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>	PECAM-1	- Formation des filopodes des tip cells - Formation des tubules - Adhésion cellulaire (expression préférentielle dans les jonctions intercellulaires)
Prostaglandines 1 et 2	PGE-1, PGE-2	- Prolifération endothéliale
Activateur du plasminogène	PA-1	- Migration endothéliale
<i>Sphingosine-1-phosphate</i>	S1P	- Recouvrement de l'endothélium vasculaire par les péricytes via la régulation de la N-Cadhérine

Tableau 1: Autres facteurs angiogéniques et leurs rôles. Ici sont décrits d'autres facteurs angiogéniques d'intérêt autre que le VEGF. D'après Bali et al, 2013 et Huang et al, 2020.

L'angiogenèse fait impliquer de nombreux facteurs en plus du VEGF. D'autres facteurs angiogéniques d'intérêt sont exposés dans le Tableau 1 (liste non exhaustive).

2.2.5.2 Principaux facteurs clés anti-angiogéniques

Il existe des facteurs anti-angiogéniques dérivés de la matrice extra-cellulaire, tels que l'arresten, la canstatine, l'endorépelline, l'endostatine, le fibuline, les thrombospondine-1, thrombospondine-2 et la tumstatine (Ribatti, 2009).

L'arresten est dérivé du collagène de type IV et va inhiber la prolifération des cellules endothéliales induite par le FGF-b, ainsi que la formation des tubules et la migration induite par le VEGF. L'arresten est également décrit pour diminuer l'expression d'HIF-1 α et le VEGF en contexte d'hypoxie par inhibition de la voie ERK1/2 et l'activation de p38 (Ribatti, 2009). La canstatine provient également du collagène de type IV et inhibe la prolifération, la migration et la formation de tubules. Il contribue également à l'apoptose des cellules endothéliales (Ribatti, 2009). L'endorépelline est issue du protéoglycane perlécan et inhibe la migration des cellules endothéliales, la constitution des tubules et la croissance vasculaire (Ribatti, 2009). L'endostatine provient du collagène de type XVIII et inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et induit leur apoptose. Elle possède également un effet indirect par modulation négative de MMP-2, blocage du VEGFR-2 vis-à-vis du VEGF et effet stabilisateur des adhésions inter-cellulaires et des adhésions des cellules endothéliales à la matrice (Ribatti, 2009). Le fibulin est un fragment issu de la digestion de la membrane basale et est un antagoniste de la signalisation du VEGF permettant de contrer le bourgeonnement et de majorer l'expression de thrombospondine-1 (Ribatti, 2009). La thrombospondine-1 a été le premier facteur anti-angiogénique reconnu et en est un des plus puissants. C'est une glycoprotéine liant l'héparine capable d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales et de perturber les adhérences entre les cellules (Ribatti, 2009). La thrombospondine-2 inhibe quant à elle la migration des cellules endothéliales et la tubulogénèse et contribue à l'apoptose des

cellules endothéliales (Ribatti, 2009). La tumstatine est dérivée du collagène de type IV et inducteur de l'apoptose des cellules endothéliales en prolifération (Ribatti, 2009).

D'autre part, des facteurs anti-angiogéniques d'origine sanguine ou cellulaire ont été identifiés, tels que les interférons, certaines interleukines, le *pigment epithelium-derived factor*, l'angiostatine, l'antithrombine III et la *prothrombin kringle-2* et le facteur plaquettaire 4.

L'interféron- α inhibe la migration des cellules endothéliales et l'angiogénèse tumorale par diminution du FGF-b (Ribatti, 2009). Certaines interleukines ont une activité anti-angiogénique indirecte. IL-1 β et IL-4 inhibent le FGF, IL-12, IL-18 induisent l'interféron- γ (Ribatti, 2009). Le *pigment epithelium-derived factor* est sécrété par l'épithélium pigmentaire rétinien et possède une activité angiostatique (Ribatti, 2009). L'angiostatine inhibe la prolifération des cellules endothéliales (Ribatti, 2009). Le facteur plaquettaire 4 est issu des plaquettes et inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Ribatti, 2009).

2.3 Rôles supplémentaires de l'endothélium vasculaire

Nous avons vu le rôle de l'endothélium vasculaire dans la formation des nouveaux vaisseaux mais il dispose d'autres fonctions (Figure 10). Les cellules endothéliales ont des capacités sécrétoires. Elles ont un rôle important dans l'homéostasie vasculaire, la vasomotricité et la perméabilité (Six et al, 2020).

En condition physiologique, les cellules endothéliales ont des propriétés angiogéniques, anti-thrombotiques, anti-inflammatoires et anti-oxydantes. Elles peuvent en revanche, en cas d'insulte pathologique, prendre un phénotype pro-thrombotique, pro-inflammatoire et pro-oxydant (Six et al, 2020).

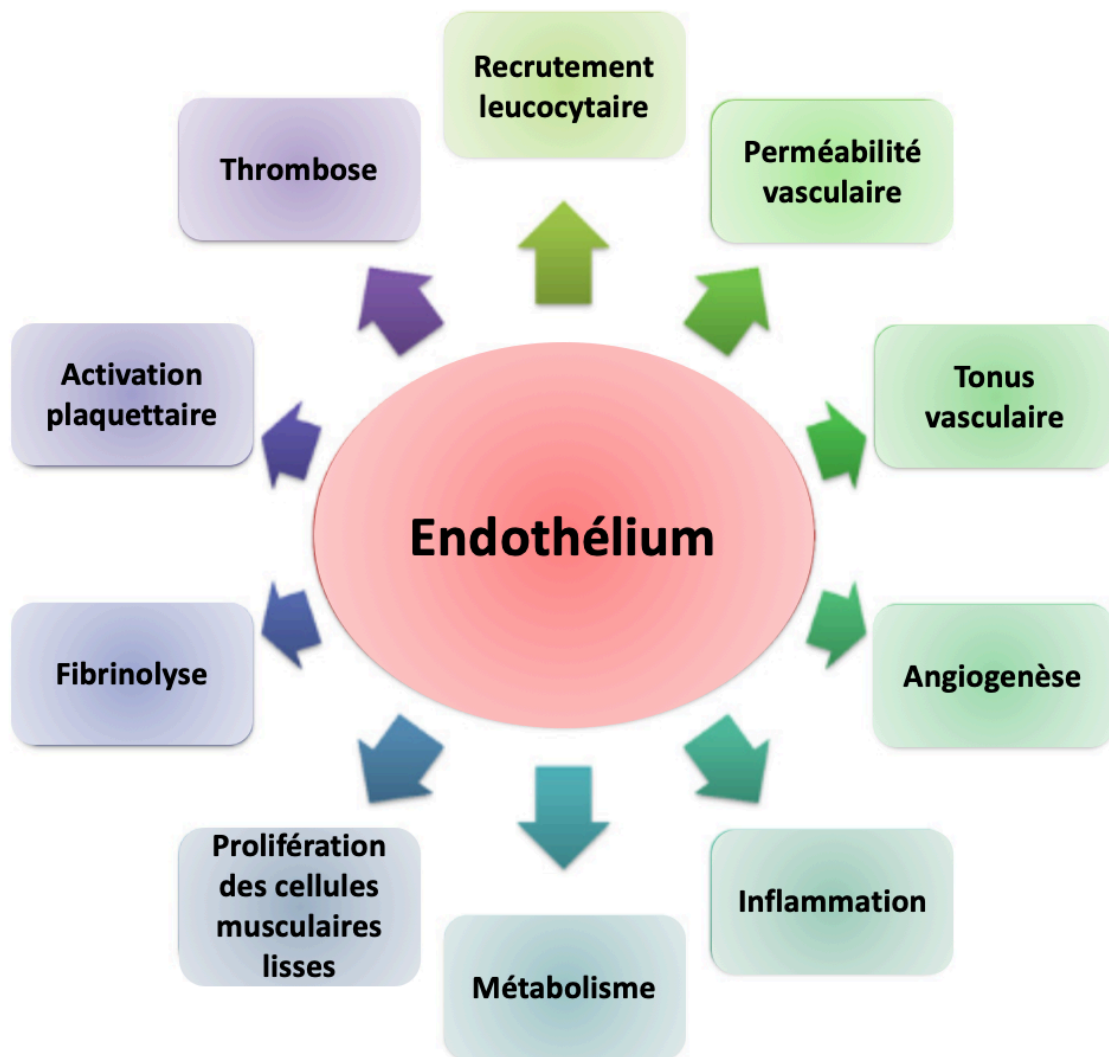


Figure 10 : Les différentes fonctions de l'endothélium vasculaire. L'endothélium vasculaire a différents rôles, tant au niveau vasculaire, immunitaire, inflammatoire, métabolique que de la coagulation. Voir texte pour la description des fonctions de l'endothélium vasculaire.

Figure adaptée de (Sena et al, 2013).

2.3.1 Rôle dans la perméabilité vasculaire

Les cellules endothéliales sont de forme polygonale. Leur aspect varie selon leur localisation et leur orientation se fait parallèlement à l'axe défini par le courant circulant. L'endothélium vasculaire est maintenu par différents types de jonctions (Six et al, 2020) : Les jonctions inter-endothéliales permettant la gestion de la perméabilité vasculaire; les jonctions communicantes sont responsables quant à elles des échanges intercellulaires; les jonctions adhérentes, autrement nommées *zona adherens*, permettent l'attachement des cellules entre elles; et enfin les jonctions serrées, également appelées *zona occludens*, permettent l'étanchéité entre les milieux sus et sous-jacents.

La perméabilité vasculaire correspond à la capacité des molécules à traverser les vaisseaux sanguins pour atteindre les tissus. Les molécules liposolubles et les gaz diffusent rapidement tandis que les molécules non liposolubles, comme les protéines, sont dépendantes d'un passage par l'ouverture entre les cellules adjacentes ou d'un transport par voie vésiculaire. Il existe également un flux transcapillaire dépendant de la pression de filtration et de la perméabilité capillaire, pour le passage du liquide interstitiel entre l'interstitium et le plasma. Parfois en conditions pathologiques, ces paramètres sont altérés et peuvent conduire à de l'œdème tissulaire, pouvant contribuer à une dysfonction d'organe (Félétou, 2011; Kibble, 2020, Mitrovic I, 2019)

2.3.2 Rôle dans la motricité vasculaire

L'endothélium vasculaire perçoit des stimuli chimiques (hormones, cytokines etc.) et physiques (contraintes de cisaillement, étirements), ce qui va entraîner des réponses biologiques qui seront entre autres transmises aux cellules musculaires lisses pour la gestion de la vasomotricité (Six et al, 2020).

La vasoconstriction est contrôlée par des facteurs contractants dérivés de l'endothélium EDCF, parmi lesquels on peut nommer les dérivés de l'acide arachidonique à l'origine des

endoperoxydes, du thromboxane A₂, des prostaglandines H₂, E₂, F₂ et I₂. La cellule endothéliale peut également produire l'endothéline, une molécule à double effet ambivalent puisqu'elle a une action directe contractile sur les cellules musculaires lisses et une action myorelaxante via le monoxyde d'azote (Six et al, 2020). En effet, les cellules endothéliales vont produire l'endothéline-1 (ET-1), qui reste à ce jour le plus puissant agent vasoconstricteur mais vont également exprimer le récepteur B de l'endothéline, qui va stimuler l'*endothelial Nitric Oxide Synthase* (eNOS) et induire une relaxation des cellules musculaires lisses (Mitrovic I, 2019). Les cellules endothéliales peuvent également produire des espèces réactives à l'oxygène qui vont avoir une action vasoconstrictrice soit directe, soit par inhibition de la vasodilatation induite par le NO. Par ailleurs, au sein du système rénine-angiotensine, l'angiotensine est un vasoconstricteur important. L'angiotensine II va se fixer au niveau des récepteurs de l'angiotensine 1 dans la cellule endothéliale afin de libérer de l'endothéline-1 (Six et al, 2020). La thromboxane A₂ va entraîner une agrégation plaquettaire en plus de la vasoconstriction (Mitrovic I, 2019)

Les trois molécules vasodilatatrices principales produites par l'endothélium sont la prostaglandine I₂ (ou prostacycline), le NO et l'EDHF. La prostaglandine I₂ est dérivée de l'acide arachidonique sous l'action d'enzymes *Cyclooxygénases* (COX). Un fois sécrétée, elle va diffuser vers la cellule musculaire lisse où elle se lie à son récepteur IP (*prostaglandine I₂ receptor*), ce qui va activer l'adénylate cyclase et entraîner la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), qui entrainera une myorelaxation.

Le NO est issu de l'action de la *Nitric Oxide Synthase* (NOS) sur la L-arginine. On peut retrouver plusieurs isoformes de NOS, qui peuvent être constitutives telles que l'isoforme endothéliale eNOS et l'isoforme neuronale *neuronal Nitric Oxide Synthase* (nNOS), ou encore la iNOS, isoforme inducible qui serait induit après stimulation par des cytokines notamment. Le stimulus principal de la production de NO est lié au frottement du sang sur l'endothélium, qui va être modulé selon le débit et les conditions d'écoulement. Le NO peut également être libéré par d'autres stimuli chimiques, tels que l'acétylcholine, la

sérotonine, la bradykinine. Parallèlement à la voie de l'AMPc, le NO va avoir une action relaxante via la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) après action de la guanylate cyclase (Six et al, 2020). Le NO inhibe également l'adhésion leucocytaire (Endermann et al, 2004). L'EDHF est essentiellement responsable de la relaxation au niveau des microvaisseaux et des vaisseaux périphériques. Il va entraîner une relaxation des cellules musculaires lisses par l'intermédiaire des canaux potassiques, hyperpolarisation de la membrane plasmique et insensibilisation vis-à-vis des stimuli vasoconstricteurs (Six et al, 2020).

La dysfonction endothéliale fait intervenir de multiples mécanismes.

Le NO a un effet vasodilatateur, a une action anti-agrégante plaquettaire et inhibe la croissance et l'inflammation. Une réduction de NO, soit par réduction de l'activité de la NO synthase, soit par défaut d'apport, est souvent en lien avec une dysfonction endothéliale. Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont également connues pour altérer la biodisponibilité de NO par formation de peroxynitrites et par la nitration de protéines, dont les protéines en jeu dans la fonction endothéliale. Le stress oxydant sera décrit plus profondément dans un autre chapitre. Il représente néanmoins une composante essentielle dans la dysfonction endothéliale. D'ailleurs certains traitements anti-oxydants, tel que la vitamine C, ont permis d'améliorer la dysfonction endothéliale de la résistance artérielle dans les maladies rénales chroniques (Endermann et al, 2004). Par ailleurs, la dysfonction endothéliale précoce semble être un élément prédictif de maladie vasculaire ultérieure, y compris sur la vascularisation périphérique (Endermann et al, 2004), rendant sa prévention d'autant plus intéressante.

Les cellules endothéliales sont capables de produire du PDGF, ce qui entrainera une chimio-attraction, une mitogénicité et une activation de la synthèse de matrice extracellulaire (Tenant et al, 1990).

2.3.3 Rôle dans la coagulation

L'endothélium sain possède des caractéristiques anti-coagulantes et anti-thrombogéniques, permettant au sang circulant de rester fluide en situation physiologique. La lame basale a quant à elle des propriétés thrombogéniques. Ainsi quand les cellules endothéliales s'activent après une injure, la lame basale contribue à la formation de thrombus. L'endothélium vasculaire est donc le siège d'un équilibre de la coagulation (Félétou, 2011). En cas d'injure, les cellules endothéliales peuvent moduler l'hémostase en induisant la production du facteur de von Willebrand, permettant un recrutement massif de plaquettes et ainsi conduire à la thrombogenèse (Félétou, 2011; Tenant et al, 1990). Elles peuvent également synthétiser du *platelet activating factor* (PAF) en réponse à une stimulation par la thrombine, la bradykinine, l'histamine ou encore l'interleukine-1, ce qui entrainera des réponses pro-thrombotique et pro-inflammatoire (Tenant et al, 1990).

Les cellules endothéliales sont capables de synthétiser du NO et des prostacyclines, leur permettant ainsi d'inhiber l'adhésion et l'agrégation plaquettaire, d'induire une vasodilatation et de favoriser ainsi la fluidité vasculaire. Cette fluidité est également favorisée par leur expression de thrombomoduline, récepteur de la thrombine qui va permettre l'activation de la protéine C, ce qui contribuera à l'arrêt de la cascade de coagulation par inhibition des facteurs de coagulation Va et VIIIa. Parallèlement, les cellules endothéliales contiennent des molécules de glycosaminoglycanes sulfatés de type héparine qui vont bloquer la cascade de coagulation par inhibition de la thrombine et du facteur Xa (Félétou, 2011; Tenant et al, 1990).

2.3.4 Rôle dans le processus inflammatoire

Certaines cytokines, telles que l'interleukine-2 et l'interféron- γ , vont activer les cellules endothéliales et altérer leur morphologie et fonction. Celles-ci vont exprimer les

complexes majeurs d'histocompatibilité de type 1 et 2 sur la membrane cellulaire et présenter des antigènes aux lymphocytes T. Elles exprimeront aussi l'interleukine-1 à leur surface, qui permettra de se lier aux leucocytes. Le phénotype activé va également augmenter la perméabilité vasculaire (Tenant et al, 1990).

L'angiotensine II est également impliquée dans la dysfonction endothéliale, par contribution à la production de ROS en stimulant l'enzyme NADPH oxydase, favorisant l'inflammation vasculaire (Endermann et al, 2004).

L'hyperglycémie va entraîner une production accrue de produits de glycation avancés qui vont atténuer le NO et donc altérer la fonction endothéliale. Ils vont par ailleurs induire des ROS qui vont promouvoir l'inflammation vasculaire en augmentant l'expression de l'interleukine-6 (IL-6), VCAM-1 et MCP-1. De plus l'hyperglycémie importante peut réduire le NO (Endermann et al, 2004).

L'expression de VCAM-1, ICAM-1 et E-selectin va contribuer à l'induction d'un processus inflammatoire. En effet, VCAM-1 se lie aux monocytes et aux lymphocytes T, ce qui leur permettra d'envahir la paroi vasculaire. La réduction de MCP-1, quant à elle, permettra de recruter des phagocytes mononucléés (Endermann et al, 2004). L'expression de protéines d'adhésion (L-sélectine, P-sélectine et E-sélectine), des intégrines (VCAM-1, ICAM-1 et PECAM-1) par l'endothélium vasculaire va contribuer à la régulation de l'infiltration des leucocytes par modulation de leur recrutement, leur adhésion, leur arrêt et leur diapédèse pour contribuer à la réparation immunitaire et la régénération vasculaire (Féletou, 2011).

2.4 Résumé

Le système vasculaire a un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie et en réponse aux stress d'origines multiples, contribuant ainsi à certains mécanismes physiopathologiques. Le développement vasculaire fait intervenir de multiples mécanismes dont les principaux sont la vasculogénèse et l'angiogénèse. Il implique de multiples voies de signalisation et il est important d'en comprendre les mécanismes, tant pour la genèse physiologique des vaisseaux que pour la néovascularisation en condition pathologique et notamment post-ischémique. Ainsi on comprend qu'une perturbation du déroulement de l'angiogénèse peut induire une vascularisation exagérée et désordonnée. La rétine peut être soumise à de telles conditions, tant dans sa période mature chez l'adulte, qu'immature chez le nouveau-né prématuré. Ainsi, la néovascularisation, et notamment l'angiogénèse, est une composante importante dans la constitution de pathologies rétiniennes, et notamment de la rétinopathie du prématuré, comme nous le verrons prochainement. L'endothélium vasculaire a un rôle clé dans ce processus et peut devenir dysfonctionnel en cas d'injure sous-jacente, telle que l'inflammation, que nous allons explorer dans le chapitre suivant.

Chapitre 3. Inflammation

3.1 Inflammation : généralités

L'inflammation est une réaction du système immunitaire face à une agression pouvant toucher tous les tissus. Elle a un rôle dans de nombreux processus pathologiques, tels que les cancers, l'athérosclérose, les pathologies ischémiques, les pathologies auto-immunes, l'obésité. Elle met en jeu l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée permet une réaction rapide. C'est la première barrière de défense par reconnaissance des agents pathogènes et des signaux d'alerte associés. Certaines cellules de l'immunité innée vont agir comme des cellules présentatrices d'antigènes et vont ainsi permettre la reconnaissance de l'antigène en question par les cellules de l'immunité adaptative, ce qui contribuera à l'amplification de la réponse inflammatoire (Diegelmann et al, 2016).

On peut la catégoriser selon sa temporalité et sa localisation.

L'inflammation aiguë est une réponse rapide et localisée pour protéger un tissu soumis à une injure, en supprimant, diluant ou isolant l'agent néfaste d'une part et la partie tissulaire atteinte d'autre part pour réparer le tissu source (Diegelmann et al, 2016).

L'inflammation chronique survient en l'absence de disparition spontanée de l'inflammation aiguë et va donc être durable et persistante, et sera auto-entretenu par la production d'un nouveau tissu conjonctif. L'inflammation chronique contribue donc fortement à la physiopathologie de nombreuses maladies (Diegelmann et al, 2016).

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique est une agression inflammatoire diffuse de l'organisme qui va avoir une incidence vasculaire par vasodilatation et hyperperméabilité capillaire qui entrainera une altération de la fonction cardiaque et une hypoperfusion tissulaire sur hypovolémie (Diegelmann et al, 2016).

3.2 Cellules impliquées dans l'inflammation

Les cellules impliquées dans l'inflammation font partie de la famille des leucocytes ou globules blancs. Les cellules immunitaires aident à détecter le danger et à agir en conséquence pour rétablir un équilibre. On peut en distinguer différents types, dont nous allons parler maintenant. Avant de nous concentrer sur ces cellules, nous allons parler dans un bref paragraphe des récepteurs spécifiques présents sur leurs membranes et dont le rôle est important dans la reconnaissance des agents pathogènes.

3.2.1 Les Toll Like Receptors

La plupart des cellules immunitaires contiennent des récepteurs de type Toll (TLRs), leur permettant de détecter l'intrusion par des substances pathogènes par reconnaissance de petites portions appelées *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs) et d'initier une réponse appropriée. La détection des PAMPs va entraîner un changement structurel et une cascade de signalisation pour la réponse immunitaire aiguë. Il existe 9 TLRs. Les TLRs -1, -2, -4, -5 et -6 sont exprimés sur la surface cellulaire et permettent la détection des agents d'origine bactérienne et fongique. Tandis que le TLR-3 reconnaît l'ARN double brin viral au sein de la cellule, les TLRs -7 et -8 identifient l'ARN viral simple brin et le TLR-9 discerne l'ADN bactérien. Les TLRs ont également la capacité d'interagir avec des ligands engendrés par les cellules endommagées (Diegelmann et al, 2016).

Le lipopolysaccharide (LPS) est issu des bactéries à gram négatif et va être repéré par le TLR-4, ce qui entraînera une production de cytokines pro-inflammatoires pour renforcer le nombre de cellules immunitaires sur le site d'inflammation aiguë (Diegelmann et al, 2016).

3.2.2 Les cellules de l'immunité innée

3.2.2.1 Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules larges, contenant de nombreuses granulations dans leur cytoplasme, qui se trouvent au niveau tissulaire. Elles proviennent de progéniteurs immatures et mûrissent une fois qu'elles ont infiltré le tissu conjonctif des tissus, où leurs granulations contenant des médiateurs pro-inflammatoires, tels que des amines se formeront. Les mastocytes sont hétérogènes et vont se retrouver de manière numériquement plus importante aux endroits exposés à des stimuli externes, tels que la peau, le tractus digestif et le tractus respiratoire. Lors du processus inflammatoire, il peut y avoir un recrutement transitoire des mastocytes avoisinants sur le site en cause pour augmenter leur effectif et potentialiser leur action (Diegelmann et al, 2016).

L'activation des mastocytes dans les processus inflammatoires est hautement liée aux immunoglobulines E, en faisant des acteurs importants dans les réactions de type allergique. D'autres molécules pourront les activer. En effet, de par leur position pariétale, ils pourront également être activés en cas d'injure traumatique notamment. Lors d'atteinte pariétale vasculaire, la thrombine est libérée et peut stimuler les mastocytes. Ils ont également des récepteurs spécifiques aux fractions du complément C3a et C5a. Ils sont également bien sûr capables de reconnaître des pathogènes à l'aide de récepteurs spécifiques *Pattern recognition Receptors*. Les mastocytes peuvent également être activés par des stimuli environnementaux (Diegelmann et al, 2016).

Les granulations des mastocytes contiennent des amines biogènes, telles que l'histamine et la sérotonine, des prostaglandines, des protéases et des cytokines pro-inflammatoires. Ces granulations ne seront libérées qu'en cas d'activation et permettront de répondre rapidement aux injures. L'histamine joue un rôle important puisqu'elle va permettre aux cellules immunes circulantes de pénétrer dans le site atteint par augmentation de la perméabilité vasculaire (Diegelmann et al, 2016).

3.2.2.2 Les polynucléaires neutrophiles

Ce sont les globules blancs les plus nombreux dans l'organisme. Ils sont fabriqués et maturés dans la moelle osseuse à partir de précurseurs myéloïdes avant d'être envoyés dans la circulation, où ils auront une demi-vie d'environ 5 jours. Ils font partie de la catégorie des granulocytes et sont capables d'agir très rapidement en cas d'agression. Leurs granulations contiennent notamment l'enzyme myéloperoxydase, à l'origine de l'acide hypochloreux, ainsi que des hydrolases et des protéinases, le tout leur donnant un potentiel destructeur. Leur recrutement au site inflammatoire est effectué par leur reconnaissance des cellules endothéliales activées, leur interaction avec elles et leur migration jusqu'à l'espace extravasculaire. Une fois sur place, les neutrophiles ont des capacités de phagocytose, c'est-à-dire de reconnaître, d'ingérer, de digérer et d'expulser des éléments à nettoyer. L'étape de reconnaissance de la phagocytose est optimisée par le marquage des micro-organismes cibles par des anticorps spécifiques ou des fractions activées du complément. En effet, les neutrophiles ont des récepteurs aux fragments activés du complément et aux chimiokines qui seront libérés par les cellules sentinelles. L'ingestion se fait dans des vésicules membranaires appelées phagosomes. Le phagosome va ensuite s'assembler avec le lysosome pour former le phagolysosome, où aura lieu la digestion dans un environnement à haute activité enzymatique et en présence d'espèces réactives à l'oxygène, de protéases et de peptides anti-microbiens. Outre leur capacité de phagocytose, les neutrophiles activés vont majorer l'inflammation par sécrétion de facteurs pro-inflammatoires, tels que des eicosanoïdes, des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires (Diegelmann et al, 2016; Serhan et al, 2010). Les neutrophiles peuvent également agir par piégeage extracellulaire. Ils vont libérer un réseau de longs fragments d'ADN associés à des protéases pour capturer et détruire les pathogènes extracellulaires. Ils agissent donc par action anti-microbienne directe et immobilisation et isolation de ces pathogènes. Pour former ces piégeages extracellulaires, les neutrophiles seront activés par des cytokines, des chimiokines, en faisant également intervenir la NADPH oxydase et la myéloperoxydase (Diegelmann et al, 2016). Les neutrophiles

contiennent des granulations, qui lorsqu'elles ne sont pas internalisées dans le phagolysosome pour la phagocytose, vont être sécrétées dans l'espace extracellulaire et pourront ainsi conduire à une destruction de cellules saines par les espèces réactives à l'oxygène (Diegelmann et al, 2016). Les neutrophiles activés vont également pouvoir contribuer à l'initiation de la résolution de l'inflammation par production de récepteurs antagoniste de l'IL-1 (Serhan et al, 2010).

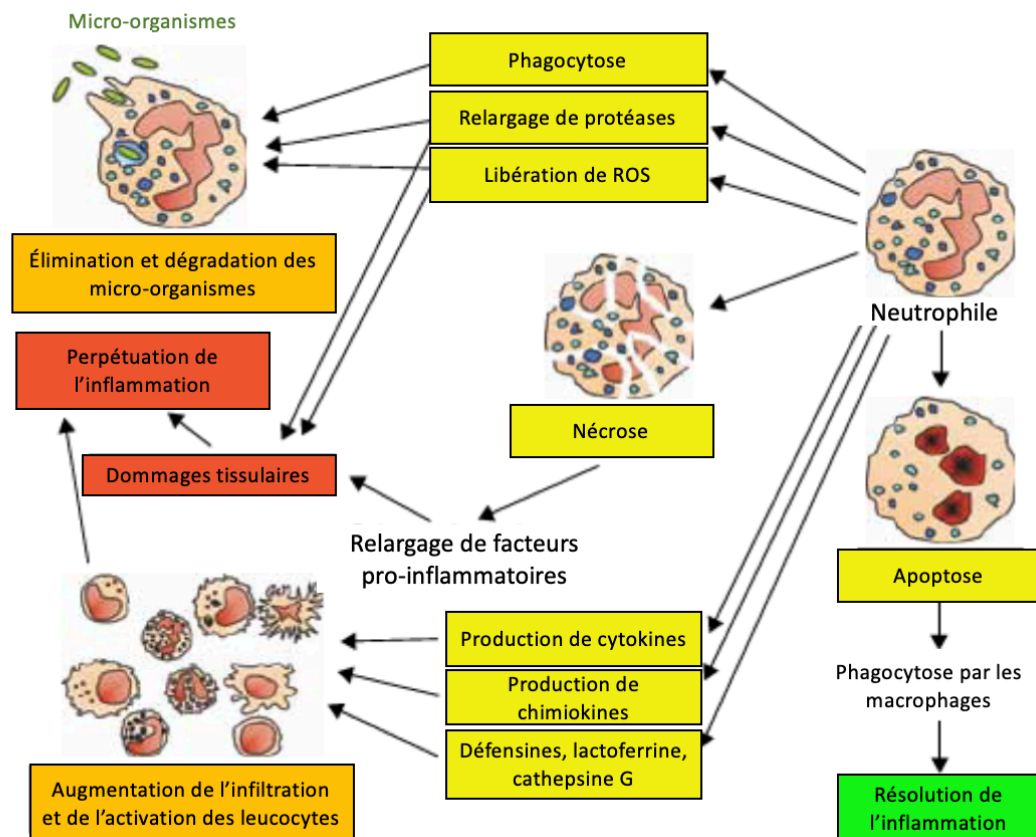


Figure 11: Multiples rôles des neutrophiles lors de l'inflammation. Les polynucléaires neutrophiles ont un rôle primordial et complexe dans l'inflammation et pourront d'une part y contribuer en éliminant et dégradant les micro-organismes pathogènes, voire en perpétuant l'inflammation, entraînant ainsi des dommages tissulaires, et d'autre part en résolvant l'inflammation.

Figure adaptée de (Serhan, 2010).

Une fois que les neutrophiles ont fini leur travail, ils passeront en phénotype sénéscent et apoptotique et pourront être phagocytés par les macrophages. Ceci contribuera à la restauration de l'homéostasie tissulaire et à la résolution du processus inflammatoire (Diegelmann et al, 2016). Les neutrophiles ont donc un rôle multiple dans l'inflammation (Figure 11).

3.2.2.3 Les monocytes et les macrophages

Les monocytes sont les précurseurs directs des macrophages et correspondent aux macrophages immatures. On les trouve dans la moelle osseuse et le sang sous forme circulante. Ils vont pouvoir être recrutés aux sites d'inflammation pour devenir des macrophages matures (Diegelmann et al, 2016; Serhan et al, 2010). Les monocytes peuvent également se différencier in situ en cellules dendritiques inflammatoires, qui sont des cellules présentatrices d'antigène (Segura et al, 2014).

Les macrophages sont des globules blancs granulocytes de grande taille à contour irrégulier, présentant différents phénotypes et différentes fonctions, qui vont coordonner la réponse inflammatoire. Ils ont des capacités de phagocytose, qui leur sera permise notamment grâce à leurs granulations. Bien qu'ayant un même précurseur commun que les neutrophiles, ils sont situés sous leur forme mature dans les tissus de manière constitutive et ne sont pas circulants. En condition physiologique, leur nombre est stable et leur renouvellement est lent.

Ils sont différenciables selon leur localisation et peuvent même prendre des noms différents selon les tissus où ils se trouvent. Par exemple, ils se nomment macrophages alvéolaires dans les poumons, microglie dans le système nerveux central, cellules de Langerhans dans la peau, cellules de Küpffer dans le foie et les ostéoclastes dans les os. Dans tous les cas, ils sont capables d'anéantir les pathogènes, de répondre aux cytokines

ainsi qu'à la destruction tissulaire afin de réguler la réponse inflammatoire. Lors de l'inflammation aiguë, leur nombre va augmenter par recrutement intratissulaire et maturation des monocytes en macrophages (Diegelmann et al, 2016, Serhan et al, 2010).

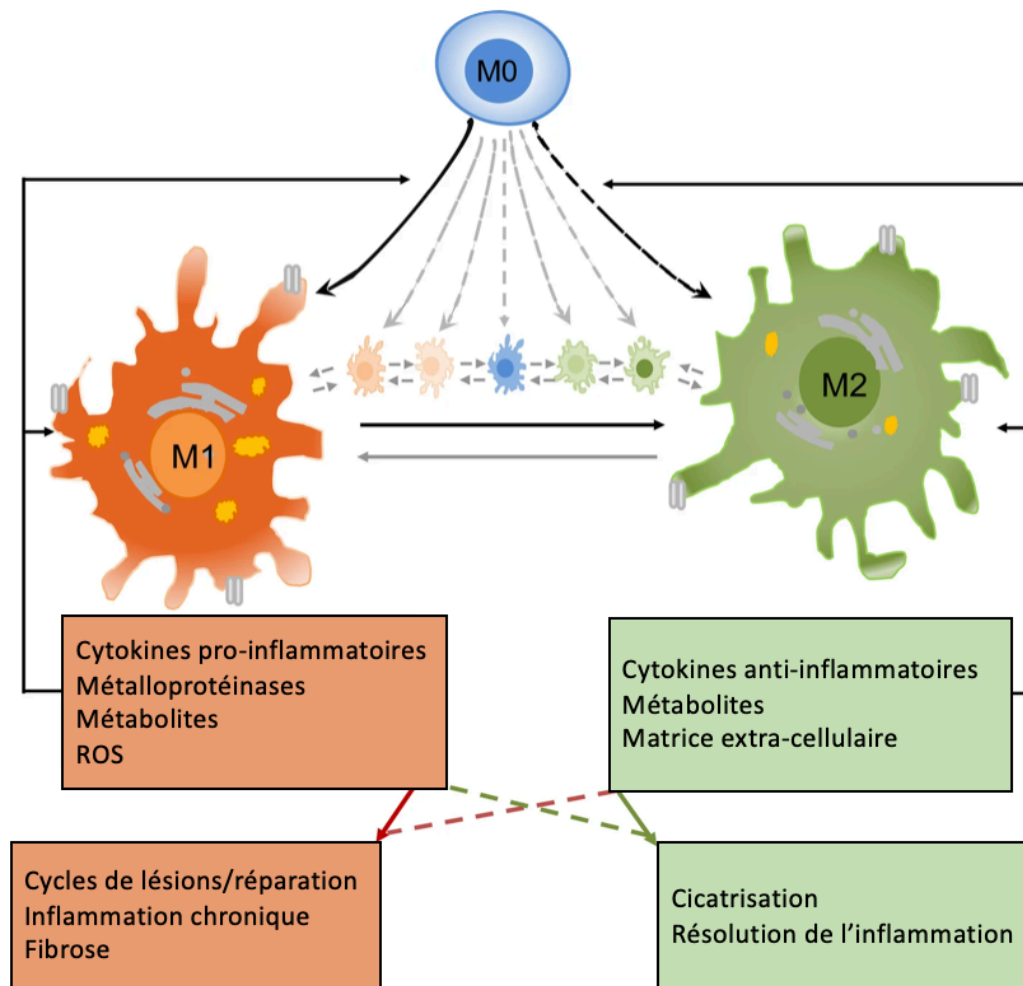


Figure 12: La polarisation macrophagique et son rôle dans le processus inflammatoire.

Les macrophages vont pouvoir se polariser en phénotype M1, pro-inflammatoire pour contribuer à l'inflammation chronique, ou en phénotype M2, anti-inflammatoire pour conduire à une résolution de l'inflammation et une cicatrisation des lésions tissulaires.

ROS : espèces réactives de l'oxygène.

Figure adaptée de (Lee et al, 2020).

La particularité des macrophages est qu'ils peuvent développer deux phénotypes contraires, le phénotype M1 qui est pro-inflammatoire et le phénotype M2 qui est réparateur. Durant la phase précoce de l'inflammation, sous stimulation par certaines cytokines, le complément activé ou les interférons, les macrophages vont prendre le phénotype M1 rapidement en s'activant et vont ainsi enclencher la phagocytose et la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires. Ils vont alors être capables de produire des lipoprotéines oxydées, des facteurs du complément, des enzymes, des espèces réactives de l'oxygène, des eicosanoïdes, des facteurs de coagulation, des cytokines pro-inflammatoires, de guider le recrutement d'autres leucocytes par chimio-attraction et d'induire la phagocytose. La phagocytose sera facilitée par l'opsonisation, c'est à dire la liaison d'anticorps ou de protéines spécifiques sur les pathogènes pour favoriser leur reconnaissance par les macrophages et leur élimination. L'adhésion sera favorisée par la liaison aux intégrines des cellules cibles. Lors de la résolution de l'inflammation, ils vont passer en phénotype M2 et sécréter des médiateurs anti-inflammatoires et des facteurs de croissance pour soutenir la réparation tissulaire. Ils vont notamment contribuer à l'induction de l'apoptose des neutrophiles et permettre l'efferocytose, c'est-à-dire l'élimination des neutrophiles apoptotiques en les phagocytant. L'élimination des macrophages se fait quant à elle par apoptose et par évacuation par le système lymphatique (Diegelmann et al, 2016; Serhan et al, 2010).

Une autre fonction importante est la présentation des antigènes aux cellules de l'immunité adaptative pour leur reconnaissance plus précoce lors d'un futur contact (Serhan et al, 2010).

3.2.2.4 Les polynucléaires basophiles

Les basophiles sont les granulocytes les moins nombreux de la circulation sanguine, représentant maximum 1,5% des globules blancs circulants. Ils sont impliqués dans les réactions de défense anti-parasitaire et dans les allergies, leur donnant une fonction

proche des mastocytes. Ils proviennent de la moelle hématopoïétique mais leurs étapes de développement est encore incertaine. Ils dériveraient soit d'un précurseur commun avec les mastocytes, soit d'un précurseur commun avec les éosinophiles. Leur caractéristique d'identification est qu'ils prennent le marquage alcalin après marquage standard en microscopie. Comme les autres granulocytes, ils possèdent de nombreuses granulations. Comme les mastocytes, ils présentent une haute affinité pour les IgE. Les basophiles vont produire de l'histamine qui sera contenue dans les granulations cytoplasmiques pour pouvoir être relâchée promptement dans la circulation après un stimulus. Les basophiles vont également produire des médiateurs lipidiques, des cytokines et des chimiokines. Lors de la stimulation IgE, leur principale cytokine produite est l'IL-4. Lorsqu'ils seront activés, ils pourront également relarguer, bien qu'en quantité faible, de la tryptase et de la lysophospholipase. Ils pourront également éliminer des cellules cibles par un mécanisme dépendant de la caspase induit par la sécrétion de la granzyme B, une protéase. Le récepteur de surface principal est FcεRI. Il contient un domaine de liaison spécifique avec les IgE permettant l'activation. Le récepteur au fragment du complément activé C5 contribuera à l'expulsion des granulations, à la production de cytokines mais aussi à la production de chimiokines. Le récepteur leukocyte immunoglobulin-like receptor A2 est également habituellement exprimé et contribue au relargage des granulations d'histamine et à la production d'IL-4. La particularité des basophiles est qu'ils possèdent des récepteurs à leur propres médiateurs produits, tels que l'histamine ou les leucotriènes, suggérant une action autocrine. Au-delà de la réaction allergique générale, où les basophiles auront un impact circulatoire avec vasodilatation et hypotension artérielle de par leur sécrétion de médiateurs, ils vont également pouvoir être recrutés dans des tissus atteints par des allergènes ou des parasites et entraîner des réactions inflammatoires locales. Les basophiles vont également avoir la capacité de moduler la fonction des éosinophiles et des lymphocytes sur les sites inflammatoires (Serhan et al, 2010).

3.2.2.5 Les polynucléaires éosinophiles

Les éosinophiles sont des granulocytes acidophiles et font partie des leucocytes minoritaires de la circulation sanguine. On les trouve essentiellement résidents de tissus muqueux. Ils ont une double casquette avec un potentiel réparateur et un potentiel destructeur. Comme les basophiles, ils sont connus pour le rôle dans les parasitoses et les allergies mais ils peuvent également intervenir dans des syndromes hyperéosinophiliques. Leur caractéristique cellulaire est que le noyau est circulaire et bilobé. Ils possèdent différents types de granulations pouvant contenir la peroxydase éosinophile, la neurotoxine dérivée des éosinophiles, la protéine cationique éosinophile, d'autres protéines cationiques, de l'arylsulfatase et de l'acide phosphatidique. De manière spécifique, ils contiennent des cristaux de Charcot-Leyden qui entraineront quand ils seront libérés auront une action cytolytique. Lorsque les éosinophiles seront activés, ils vont libérer le contenu de leurs granulations et contribuer au processus inflammatoire et à la dégradation tissulaire. Ils sont également capables de produire des ROS, des eicosanoïdes et des cytokines, leur permettant de contribuer à la régulation de la chimiotaxie et de la croissance cellulaire. La particularité des éosinophiles est qu'ils peuvent synthétiser des cytokines sans les relarguer immédiatement mais les garder dans leurs granulations, leur permettant de libérer instantanément des cytokines sur les sites inflammatoires. Classiquement, ils produisent essentiellement l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13. L'IL-5 va contribuer au maintien des éosinophiles en induisant la différenciation des progéniteurs myéloïdes en éosinophiles, et en favorisant leur recrutement et leur activation, permettant ainsi de maintenir le processus pro-inflammatoire. Les éosinophiles activés vont également avoir une action autocrine via le granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) pour limiter leur apoptose (Serhan et al, 2010).

3.2.2.6 Les lymphocytes Natural Killer

Les lymphocyte Natural Killer sont les lymphocytes les plus gros et ils sont d'aspect granulaire. Ils ont le même précurseur commun que les lymphocytes B et T mais ce sont des lymphocytes de l'immunité innée. Ils ont pour mission d'éliminer les cellules tumorales et les pathogènes. Ils vont être enrôlés et activés en réponse à différentes cytokines produites par les macrophages et à l'interféron lors des infections. Ils agissent à la phase précoce de l'infection en induisant l'apoptose des cellules cibles via une reconnaissance spécifique du récepteur *Killer Activating Receptor* et relargage des granulations. Ils vont par contre épargner les cellules avoisinantes via une reconnaissance spécifique des cellules saines par liaison au récepteur *Killer Inhibitor Receptor*. Ils vont par ailleurs produire des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance, mais aussi des cytokines anti-inflammatoires. Ils vont également pouvoir influencer l'activation des lymphocytes T (Serhan et al, 2010, Narni-Mancinelli et al, 2013).

3.2.3 Les cellules de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est la capacité de répondre plus rapidement à un pathogène qu'on l'on a déjà rencontré dans le passé et dont l'antigène aura été présenté aux cellules spécifiques par les cellules présentatrices d'antigènes comme les macrophages. Les lymphocytes sont issus d'un même précurseur de la moelle hématopoïétique et sont circulants. Ils sont moins nombreux que les cellules de l'immunité innée mais plus spécifiques et sont différenciés par leurs récepteurs de surface, leur contenu sécrétoire et leurs activités (Serhan et al, 2010).

3.2.3.1 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T, avec les lymphocytes B, sont les lymphocytes de petite taille. Les précurseurs des lymphocytes T vont migrer de la moelle osseuse vers le thymus où ils vont devenir des lymphocytes T matures. A ce point ils seront naïfs et vont devoir rencontrer des antigènes pour se différencier. Les lymphocytes T vont contribuer à la réponse immunitaire par sécrétion de cytokines et vont combattre les cellules rendues dysfonctionnelles par atteinte virale ou cancéreuse. Leur récepteur de surface spécifique est appelé *T-cell receptor* et il va reconnaître les peptides des pathogènes qui vont leur être exposés par les cellules présentatrices d'antigènes via le complexe majeur d'histocompatibilité (Serhan et al, 2010).

Les lymphocytes T matures peuvent prendre un phénotype *helper*, auquel cas les antigènes leur seront présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type 2, et vont alors être identifiables par leurs marqueurs de surface CD28, CD3 et CD4. Les lymphocytes T vont se différencier en plusieurs sous-catégories, de par leurs sécrétions cytokiniques spécifiques. Les lymphocytes T pourront activer les lymphocytes NK et les les cellules de l'immunité innée pour contribuer au processus inflammatoire qui va aider à l'élimination des pathogènes. Les cytokines qu'ils vont libérer vont également permettre de sélectionner le type d'anticorps spécifique des lymphocytes B (Serhan et al, 2010).

Les lymphocytes T matures peuvent également prendre le phénotype cytotoxique. Les antigènes vont leur être présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de type 1. Ils vont être identifiables par leurs marqueurs de surface CD28, CD3 et CD8. Ils vont être à l'origine de sécrétion de cytokines et de ciblage létal des pathogènes. Une fois la reconnaissance de celui-ci réalisée, un cluster d'activation supramoléculaire va se former, créant un remaniement du cytosquelette pour positionner les granulations, contenant de la perforine, des granzymes et des granzymes, au site de liaison, ce qui entrainera l'élimination du pathogène mais entrainera également des lésions sur les cellules proches (Serhan et al, 2010).

3.2.3.2 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont produits et deviennent matures dans la moelle hématopoïétique. A ce point, ils seront naïfs et leur spécification se fera après rencontre avec des antigènes. Ils vont sécréter des anticorps, qui vont leur permettre de discerner les éléments spécifiques libérés par les pathogènes ou présents sur leur surface. Leur récepteur de surface spécifique est appelé *B-cell receptor* et il va reconnaître spécifiquement et directement les pathogènes. Les lymphocytes B matures vont être identifiables par leur marqueur de surface CD40. Suite à leur activation, ils vont proliférer et se différencier pour sécréter des anticorps et des immunoglobulines spécifiques, responsables de l'immunité humorale. Les anticorps vont permettre une reconnaissance rapide, une neutralisation et une opsonisation des pathogènes, une sensibilisation des cellules à potentiel létal, tels que les NK ou les macrophages. Les immunoglobulines (Ig) produites vont être différentes selon le timing du processus. Les IgM vont être retrouvées en période précoce et activer le complément; les IgG vont être retrouvées à plus long terme et induire la neutralisation, l'opsonisation, l'activation du complément et l'activation des NK; les IgA auront une localisation spécifique dans les épithéliums des muqueuses et vont contribuer à la neutralisation; et les IgE qui auront une haute affinité pour les mastocytes et vont contribuer à la neutralisation (Serhan et al, 2010).

3.3 Particularités de la microglie dans la rétine

Les cellules microgliales sont des cellules équivalentes aux macrophages se situant dans le système nerveux central. Contrairement aux macrophages, elles proviennent d'une différenciation du sac vitellin. Elles se différencient des macrophages par leur renouvellement lent et leur réponse aux stimuli. Elles peuvent avoir un phénotype quiescent ou activé et maintenir leur fonction dans une longue durée. Contrairement aux macrophages, elles ont besoin d'être activées pour pouvoir réaliser les fonctions

macrophagiques telles que la phagocytose et la présentation d'antigènes. Elles ont des capacités de réponse rapide aux stimuli. Lors d'une stimulation inflammatoire accrue et/ou prolongée, leur activation va être néfaste pour leur environnement et cela va notamment entraîner la mort de cellules neuronales saines (Serhan et al, 2010; Jurga et al, 2020). Les cellules microgliales rétiniennes sont les principales cellules immunitaires résidentes de la rétine et sont rapidement activées lors d'une agression (Santos et al 2007, Chen et al 2002). En condition physiologique, la microglie se situe dans la rétine interne, notamment dans la couche des cellules ganglionnaires, la couche nucléaire interne et les couches plexiformes externe et interne. Elle contribue alors au maintien de l'homéostasie et à la vigilance immunitaire de la rétine, de par la surveillance constante des changements dans son micro-environnement. Lors d'une perturbation, les cellules microgliales vont s'activer, se ramifier, migrer au niveau du site atteint ainsi que dans la couche nucléaire externe, l'épithélium pigmentaire rétinien et l'espace sous-rétinien. Elles vont contribuer au processus inflammatoire par libération de médiateurs pro-inflammatoires. Les cellules microgliales activées sont cytotoxiques vis-à-vis de leur environnement, notamment contre les neurones et les photorécepteurs (Fan et al, 2021). Comme les macrophages, elles peuvent prendre un phénotype pro-inflammatoire M1 ou réparateur M2. La microglie a une fonction de phagocytose, de régulation de l'inflammation, de modulation de l'activation du système du complément, de présentation des antigènes (Fan et al, 2021).

3.4 Les médiateurs de l'inflammation

Les médiateurs vont orienter le type de réponse pro-inflammatoire ou réparatrice en termes de quantité et de qualité. Parmi eux on peut dénombrer les cytokines, les chimiokines, les médiateurs lipidiques et les molécules d'adhésion cellulaire. Ils permettront de réguler les cellules impliquées, de les mobiliser, de moduler leur adhérence et de réguler l'expression d'autres facteurs pouvant contribuer au processus. A l'état physiologique, les marqueurs pro-inflammatoires et anti-inflammatoires sont à

l'état d'équilibre. En cas d'injures, la balance va être modifiée pour y répondre et va évoluer selon les étapes d'initiation, d'amplification, de conditionnement et de résolution du processus inflammatoire. Néanmoins, en cas de déséquilibre prolongé, ils pourront engendrer des effets délétères sur les tissus.

3.4.1 Les cytokines

3.4.1.1 Généralités

Les cytokines sont des facteurs solubles qui contribuent à l'interaction cellulaire pour aider à la reconnaissance des cellules lésées et au recrutement des leucocytes, dont elles faciliteront l'adhésion à l'endothélium vasculaire via la sécrétion de molécules d'adhérence et leur infiltration transcapillaire pour atteindre les cellules cibles (Dinarello, 2007; Serhan et al, 2010). On peut différencier les cytokines selon leur rôle direct dans les cascades inflammatoires. Par ailleurs, lorsqu'elles joueront un rôle dans l'attraction des cellules immunitaires, on parlera de chimiokines. Les cytokines les plus pro-inflammatoires sont les interleukines (IL)-1, les IL-6 et les facteurs de croissance tumorale (TNF) (Diegelmann et al, 2016). Les cytokines ont une puissance d'action de par leur déclenchement de signalisation sur une base molaire faible. En effet, La concentration d'IL-1 induisant la transcription de COX-2 est de 10 pM et celle de l'IL-12 pour permettre la synthèse d'IFN γ est de 20 pM (Dinarello, 2011).

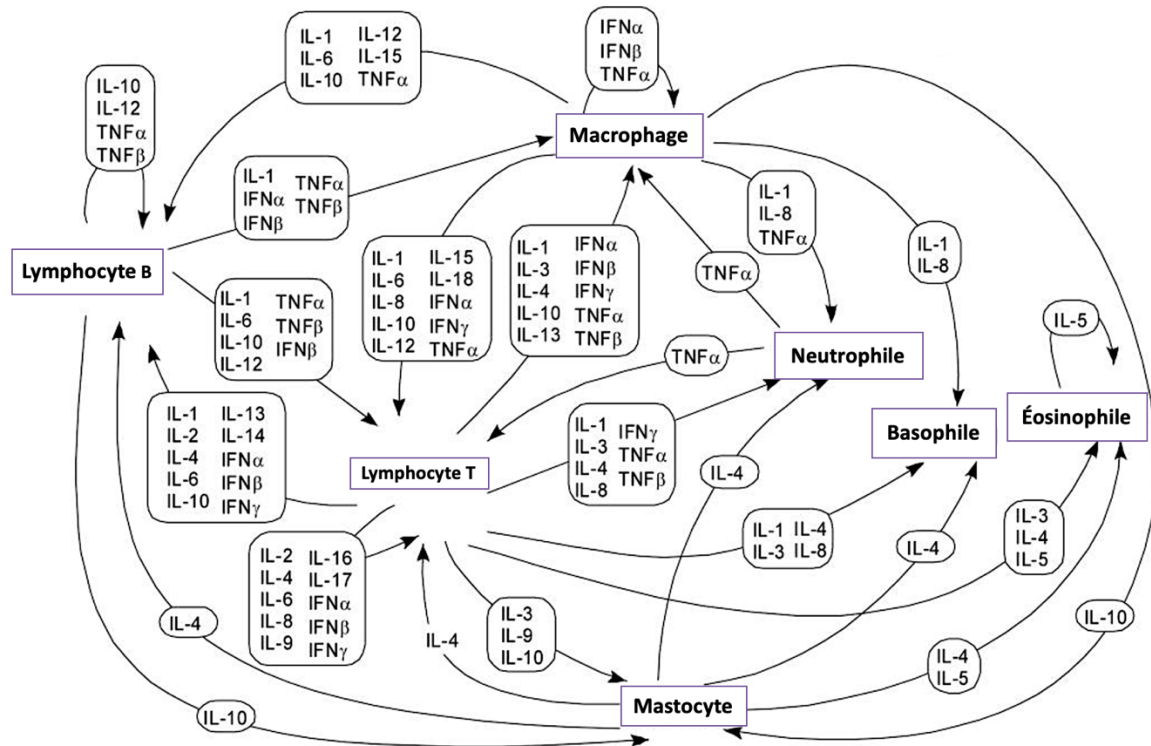


Figure 13:Le réseau cytokinique. Ce schéma illustre la complexité d'action du réseau cytokinique lors du processus inflammatoire, faisant intervenir différents leucocytes.

Figure adaptée de (Zhang et al, 2009).

Les cytokines sécrétées peuvent agir de manière autocrine, c'est à dire agir sur les récepteurs des cellules qui les ont sécrétées; mais aussi de manière paracrine, agissant sur les récepteurs des cellules voisines; ou encore de manière endocrine, sur les cellules à distance après avoir cheminé dans la circulation sanguine (Serhan et al, 2010). Elles vont agir sur des récepteurs spécifiques, qui possèdent leurs voies de signalisation spécifiques. Une cytokine ne peut pas agir sur tous les récepteurs et un récepteur peut être stimulé par différentes cytokines lui étant associées. Les récepteurs sont initialement constitués de deux sous-unités non liées. Une fois la cytokine liée au récepteur, les sous-unités de celui-ci vont se lier sous l'action des *Janus Kinases* (JAKs) et subir une phosphorylation sur leur partie cytosolique; ce qui va activer les activateurs de transcription *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT). Ceux-ci vont se sous-dimériser après avoir été phosphorylés et vont ensuite entrer dans le noyau et s'accumuler pour stimuler les

transcriptions des gènes cibles (Serhan et al, 2010). On peut également différencier les cytokines selon le type de lymphocytes T qui va les produire. Les cytokines de type T-helper 1 (Th1) vont avoir un objectif pro-inflammatoire et des conséquences délétères sur les cibles cibles et sur des tissus sains en cas d'hyperproduction. Les cytokines de type T-helper 2 (Th2) vont être associées à un phénotype anti-inflammatoire, ou aux réponses atopiques (Berger, 2000). La complexité d'interaction des cytokines est illustrée dans la Figure 13.

3.4.1.2 L'interleukine 1 β , IL-1 β

Historiquement, l'IL-1 a été découverte dans la seconde partie du XXème siècle et était également appelée « pyrogène leucocytaire » ou encore « facteur activateur des lymphocytes ». Il a ensuite été possible de distinguer deux protéines agissant sur les mêmes récepteurs et ayant les mêmes incidences sur le plan immunologique, IL-1 α et IL-1 β (Fields et al, 2019). Plus tard, il a été reconnu une similarité de seulement 25% entre ces deux formes et d'autres cytokines sont venues agrandir la famille IL-1 : IL-1Ra (aussi connue sous le nom anakinra), IL-18, IL-33, IL-36Ra, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ , IL-37 et IL-38. (Diegelmann et al, 2016; Fields et al, 2019). Les récepteurs primaires associés à cette famille sont IL-1RI (ou CD121a), IL-1RII (ou C β D121b), IL-1R4 (ou DT2, IL1-RL1, DER4, T1, IL-33R), IL-1R5 (ou IL-18R α , IL-1Rrp, IL-1Rrp1), IL-1R6 (ou IL-36R, IL-1RL2, IL-1Rrp2). Les récepteurs associés sont IL-1R3 (ou IL-1RAcP), IL-1Rb (ou IL-1RAP), IL-1R7 (ou IL-18R β , AcPL), IL-1R8 (ou SIGGIR, TIR8), IL-1R9 (ou IL-1RAPL1, OPHN4, TIGIRR-2) et enfin IL-1R10 (ou IL-1RAPL2, TIGIRR-1) (Fields et al, 2019). De manière intéressante, toutes les cytokines de cette famille ne sont pas pro-inflammatoires. En effet, IL-1Ra peut faire compétition à IL-1 β au niveau de son récepteur primaire IL-1RI et de son co-récepteur IL-1RAcP, pour inhiber ainsi la signalisation pro-inflammatoire induite par IL-1 β (Fields et al, 2019). L'IL-1 β va pouvoir contrôler le processus inflammatoire sur différentes étapes moléculaires comme la transcription des gènes, l'expression de cytokines préformées en état inactif, la sécrétion et la liaison à des récepteurs (Fields et al, 2019). Les cytokines

préformées de la famille IL-1 possèdent des domaines N-terminaux qui seront soustraits par des protéines pour créer les formes matures qui pourront être sécrétées pour se lier à leurs récepteurs et initier la signalisation (Fields et al, 2019). Lors de la liaison d'IL-1 β avec son récepteur IL-1RI, le co-récepteur IL-1RAcP vient couronner leur surface de liaison pour former un complexe ternaire, ce qui permettra le regroupement des domaines TIR cytoplasmique du récepteur pour induire une signalisation dépendante de Myd88 (Fields et al, 2019). L'expression d'IL-1 β est moins étendue que celle d'IL-1 α et contrairement à cette dernière, elle est d'abord exprimée sous une forme précurseuse inactive. Elle sera induite essentiellement par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques après stimulation de leur TLR ou signal pro-inflammatoire médié par les cytokines. L'IL-1 β peut également s'induire de manière autocrine (Fields et al, 2019).

3.4.1.3 L'interleukine 6, IL-6

Elle va être principalement sécrétée par les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques, les mastocytes et les lymphocytes B, mais aussi par les cellules endothéliales, épithéliales et les fibroblastes (Diegelmann et al, 2016; Serhan et al, 2010; Kang et al, 2020).

L'IL-6 a été nommée ainsi en 1988 mais été identifiée pour la première fois en 1976 et était initialement appelée « facteur de simulation des cellules B 2, BSF-2 » (Kang et al, 2020).

La famille des IL-6 est composée de 11 ligands ayant une structure commune.

La famille des IL-6 comprend l'IL-6 (ou BSF2, HGF, HSF), l'IL-11 (ou AGIF), l'oncostatine M OSM (ou MGC20461), le *leukemia inhibitory factor* LIF (ou CDF, DIA, HILDA), le *cardiotrophin-like cytokine factor 1* CLCF1 (ou NNT1, BSF3, CLC, NR6, CISS2), l'IL-27 (ou p28, IL27p28, IL-27A, MGC71873), le *Epstein-Barr virus-induced 3* EB13 (ou IL27B, IL35B), l'IL-12A (ou CLMF, p35, NFSK), l'IL-23A (ou SGRF, IL23P19, IL-23, IL-23A, p19), la cardiotrophine 1 CTF1 (ou CT1) et le facteur neurotrophique ciliaire CNTF (ou HCNTF) (Kang et al, 2020).

L'IL-6 est connue pour son rôle pro-inflammatoire dans les réponses inflammatoires aiguës, l'angiogénèse, l'ostéoclastogénèse, la différenciation des cellules B et des cellules T en phénotype Th17 et dans le métabolisme glucidique (Kang et al, 2020).

Le récepteur spécifique d'IL-6 est le IL-6R. Sa signalisation se fait initialement via la glycoprotéine 130 présente dans son récepteur et sera contrôlée par phosphorylation des JAK kinases et l'homodimérisation du facteur de transcription STAT3, permettant ainsi la translocation du signal et la transcription des gènes cibles. La glycoprotéine 130 est présente dans la plupart des organes, y offrant ainsi une potentialité d'action à l'IL-6 (Kang et al, 2020). L'IL-6 possède également un récepteur soluble, le sIL-6R, qui est issu du clivage protéolytique du récepteur présent à la surface des cellules ou par l'épissage alternatif de son récepteur, et qui permettra une trans-signalisation en allant stimuler les cellules possédant la glycoprotéine 130 pour une action identique à l'IL-6R. Il existe en revanche des récepteurs solubles porteurs de la glycoprotéine 130 et donc en capacité de signalisation, qui eux, auront une action antagoniste à l'IL-6R par inhibition de la trans-signalisation liée au sIL-6R (Kang et al, 2020). Ainsi, l'IL-6 est une cytokine mixte pouvant avoir une action pro- et anti-inflammatoire.

3.4.1.4 Le Tumor Necrosis Factor α , TNF- α

Le TNF, ou TNF- α , a été identifié en 1975. Sa production est réalisée dans les macrophages, les mastocytes, les neutrophiles, les lymphocytes, les cellules endothéliales et les lymphocytes *Natural Killer* (Diegelmann et al, 2016, Serhan et al, 2010).

Actuellement chez l'homme, 18 gènes sont connus pour la famille TNF et 29 pour la famille de ses récepteurs, tous exprimés de manière ubiquitaire. Parmi les autres ligands de la famille TNF, on peut notamment nommer le Fas ligand, le TNF-related apoptosis-inducing ligand TRAIL, le CD40 ligand, le Receptor activator of nuclear factor κ B ligand RANK (Wallach, 2018). La forme primaire est le pro-TNF, qui va être clivé sous l'action de l'enzyme TNF- α converting enzyme pour donner la forme soluble (Diegelmann et al, 2016). Le TNF α a une action pro-inflammatoire par induction de chimiokines et

contribution au recrutement des leucocytes mais peut également avoir une action vasculaire en favorisant la vasodilatation par augmentation de COX-2 et majoration de l'expression de PGI2 (Diegelmann et al, 2016). Plus spécifiquement, en se liant au TNFR1 (ou p55, CD120a), le TNF α va être un chef d'orchestre dans le processus inflammatoire et dans l'élimination cellulaire. Lorsqu'il se lie au TNFR2 (ou p75, CD120b), il va contribuer à la co-stimulation des lymphocytes T pour renforcer le processus inflammatoire (Wallach, 2018).

Le TNF α a été largement décrit dans les pathologies inflammatoires chroniques, d'où l'utilisation bien établies d'anti-TNF dans certaines de ces maladies. Le TNF α a un rôle dans toutes les étapes de l'inflammation. Pour ses autres effets, il peut parfois avoir des conséquences inverses telles que la mort et la survie cellulaire, mais aussi l'obstruction et la destruction des capillaires (Wallach, 2018).

Les membres de la famille du TNF et de son récepteur ont sauvé des motifs extracellulaires identiques, leur permettant d'interagir les uns avec les autres. Le TNF va pouvoir faciliter sa signalisation en aidant sa liaison avec son récepteur via ses capacités d'ancrage à la membrane. La voie de signalisation du TNF pourra faire grandement intervenir le facteur de transcription NF- κ B. D'autres voies de signalisation peuvent également être induites par le TNF, notamment via des kinases telles que l'extracellular signal-regulated kinase (ERK), la *c-Jun amino terminal kinase* (JNK) et la p38 MAPK, mais aussi des sérine/thréonine kinases avec la voie de la PI3K/Akt ou encore les tyrosines kinases Src (Wallach, 2018).

3.4.1.5 L'interleukine 16, IL-16

La première description de l'IL-16 remonte à 1982. Elle était à ce moment là nommée facteur chimio-attractant des lymphocytes du fait de son implication de la migration des lymphocytes T, l'incluant dans la sous-catégorie des chimiokines (Cruikshank et al, 1998). L'IL-16 est produite essentiellement par les lymphocytes T mais peut aussi l'être par les

neutrophiles, les éosinophiles, les mastocytes, les macrophages et d'autres cellules n'appartenant pas au système immunitaire (Cruikshank et al, 1998; Serhan et al, 2010; Zhang et al, 2021).

Au niveau des lymphocytes T, L'IL-16 y est sécrétée et stockée et pourra être libérée notamment après stimulation par des agents mitogènes, des antigènes ou encore des amines vasoactives endogènes (Cruikshank et al, 1998).

Pour induire sa signalisation, l'IL-16 va se lier au récepteur CD4, qui est un co-récepteur des récepteurs des lymphocytes T, à la surface des cellules et va entraîner une phosphorylation de CD4. Le signal sera ensuite transmis sous contrôle par des enzymes telles que la src-kinase, la PI3-kinase et la phospholipase C γ (Cruikshank et al, 1998). Il a également été décrit, plus récemment qu'IL-16 implique également les voies de signalisation NF- κ B, MAPK et SAPK (Zhang et al, 2021).

L'IL-16 a donc un rôle chimio-attractant direct envers toutes les cellules immunes exprimant le CD4, et donc notamment les lymphocytes, les monocytes et les éosinophiles, et va permettre de les mobiliser et d'améliorer leur adhésion à la matrice extra-cellulaire via l'induction d'autres chémokines. Elle possède par ailleurs des compétences de facteur de croissance cellulaire et va en outre augmenter l'expression du récepteur de l'IL-2 à la surface des cellules qu'elle cible. Par ailleurs elle a été initialement décrite comme étant capable de prévenir l'apoptose des lymphocytes T pour renforcer leur prolifération et leur action dans le processus inflammatoire mais il s'avère que son rôle au niveau de l'apoptose est plus complexe et pourrait être pro- ou anti-apoptotique, dépendamment du type de leucocyte impliqué, du contexte immunologique et du type d'activateur (Cruikshank et al, 1998, Wilson et al, 2004). Cependant, il a également été retrouvé un effet inhibiteur de l'IL-16 sur la chimio-attraction induite par les ligands CCR5 et CXCR4, cela permettant probablement de tempérer l'attraction de cellules immunitaires dans certains contextes inflammatoires (Wilson et al, 2004). Par ailleurs, l'IL-16 réprime l'antigène médiant le phénotype Th2 (Wilson et al, 2004). En outre, il a été montré qu'IL-16 contribue à l'infiltration des neutrophiles par amélioration de leur recrutement via l'induction de CXCL10 (Smith et al, 2018).

3.4.1.6 Autres cytokines pro-inflammatoires

Il existe beaucoup d'autres cytokines pro-inflammatoires, dont voici quelques exemples présentés dans le tableau ci-dessous.

Nom	Rôle	Référence
IL-12	Augmentation de l'expression d'IFN- γ	Dinarello, 2007; Negishi et al, 2018
IL-23	Stabilisation de la formation d'IL-17	Dinarello, 2007
IL-18	Induction de l'expression d'IFN- γ	Dinarello, 2007; Negishi et al, 2018
IL-2	Prolifération des lymphocytes T, facteur de croissance des lymphocytes T	Abbas et al, 2018
IL-7	Prolifération des lymphocytes, nécessaire à la survie des thymocytes, différenciation des lymphocytes	Winer et al, 2022
IL-36	Activation, prolifération et polarisation Th1 des lymphocytes T, Induction d'IL-2	Fields et al, 2019
IL-33	Amélioration de la survie des basophiles et contribution à la libération de leurs médiateurs	Serhan et al, 2010

Tableau 2: Exemples de cytokines pro-inflammatoires. Il existe une multitude de cytokines pro-inflammatoires. Ce tableau en décrit certaines avec leurs fonctions.

3.4.1.7 Cytokines anti-inflammatoires

Certaines cytokines sont en revanche anti-inflammatoires et nous allons en exposer brièvement quelques exemples.

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire majeure, révélée initialement pour sa capacité à inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. En effet, elle va pouvoir réprimer

l'expression de TNF- α , IL-6 et IL-1 des macrophages activés (Zhang et al, 2009; Wei et al, 2019). Elle est en outre capable de potentialiser ses effets anti-inflammatoires en majorant l'expression d'anti-cytokines et en affaiblissant l'expression de récepteurs aux cytokines pro-inflammatoires (Zhang et al, 2009). Elle va en outre pouvoir tempérer les macrophages activés en diminuant la synthèse des monokines et de NO (Diegelmann et al, 2016).

L'IL-4 et l'IL-13 vont induire une différenciation lymphocytaire Th2 et macrophagique M2. Leur signalisation via le récepteur médié par l'IL-4 inhibe la migration des neutrophiles et leurs rôles effecteurs (Heeb et al, 2020).

L'IL-1Ra a une action anti-inflammatoire par une inhibition de l'IL-1 β au niveau de son récepteur primaire IL-1RI et de son co-récepteur IL-1RAcP (Fields et al, 2019).

3.4.1.8 Les cytokines mixtes

Comme on a pu le voir pour l'IL-6, certaines cytokines ont un double fonctionnement, dépendamment du type cellulaire impliqué, du timing de l'inflammation et des concentrations de ligands et de récepteurs. Voici 3 autres exemples de cytokines à effets pro- et anti-inflammatoire.

L'IL-27 fait partie de la famille de l'IL-12 et est produite par les CPAs et va induire IFN- γ dans les lymphocytes T et *Natural Killer*, en collaboration avec IL-12 et IL-2. Elle va par ailleurs contribuer à la production d'IL-10 (Diegelmann et al, 2016).

L'interféron- γ , IFN- γ va avoir une action majoritairement pro-inflammatoire, notamment par induction de l'expression d'IRF1 et IRF8, promotion du phénotype Th1 et inhibition du phénotype Th2 par diminution d'IL-4 (Negishi et al, 2018). Cependant il a été montré que l'IFN- γ va également induire la transcription de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IL-1Ra et l'IL-18BP (Mühl et al, 2003).

TGF- β a un rôle chemoattractant vis-à-vis des neutrophiles et va potentialiser leurs sécrétions de cytokines pro-inflammatoires et auto-renforcer sa propre concentration par cette voie. A contrario, TGF- β joue également un rôle dans la résolution de l'inflammation

(Serhan et al, 2010). En effet, elle est capable d'inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires, telles qu'IL-1, IL-2, IL-6 et TNF dans les macrophages et les lymphocytes. Il va par ailleurs induire la transcription d'IL-1ra (Zhang et al, 2009).

3.4.1.9 Les chimiokines

Les chimiokines contribuent à l'interaction cellulaire pour aider à la reconnaissance des cellules immunitaires cibles et en favoriser l'adhésion et l'infiltration transcapillaire pour répondre à un stimulus (Serhan et al, 2010; Hughes et al, 2018). Elles vont ainsi avoir un rôle dans les réactions pro- et anti-inflammatoires.

Les chimiokines servent à attirer des cellules en réponse à un stimulus par chimiotactisme mais aussi à les activer et à contribuer à l'hématopoïèse et l'angiogénèse. Il peut y avoir une vaste production simultanée de chimiokines et elles vont pouvoir se lier à différents récepteurs qui auront le même effet et tout, comme les cytokines, différentes chimiokines pourront avoir le même récepteur (Serhan et al, 2010; Hughes et al, 2018). Les chimiokines peuvent également chapeauter les mouvements cellulaires par haptotaxie, chimiokinésie, haptokinésie mais également moduler l'adhésion et la prolifération cellulaire (Hughes et al, 2018). Il existe différentes sous-catégories de chimiokines, individualisées selon leurs conformations liées aux variations de leurs résidus cystéines : CC, CXC, CX₃C et XC (Figure 14).

La chimiokine CCL2 ou MCP-1, de la famille CC, est la plus pro-inflammatoire et est sécrétée par les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Elle va pouvoir cibler les monocytes, les lymphocytes T activés, les NK et les cellules dendritiques via son récepteur, CCR2. CCL2 est à l'origine d'un gradient lui permettant d'orienter la trajectoire des leucocytes (Diegelmann et al, 2016). La figure suivante résume les familles de chimiokines, leurs ligands et leurs récepteurs.

Famille	Récepteur	Ligands
CXC	CXCR1	IL-8, GCP-2
	CXCR2	IL-8, GCP-2, GRO α, β, γ , NAP-2, ENA78
	CXCR3	IP-10, MIG, I-TAC
	CXCR4	SDF-1 α, β, γ
	CXCR5	BLC/BCA
	CXCR6	CXCL16
CC	CCR1	MIP-1 α, δ , RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4, HCC-1, MPIF-1
	CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
	CCR3	Eotaxine, Eotaxine-2, Eotaxine-3, RANTES, MIP-3, MIP-1 δ , MCP-2, MCP-3, MCP-4
	CCR4	RANTES, MDC, TARC
	CCR5	RANTES, MCP-2, MIP-1 α, β
	CCR6	LARC
	CCR7	SLC, ELC
	CCR8	I-309, TARC, MIP-1 β
	CCR9	TECK
	CCR10	ESkine
CX₃C	CX3CR1	Fractalkine
XC	XCR1	Lymphotactine α, β

Figure 14: Les principales familles de chimiokines et leurs ligands. Ce tableau représente les principales familles de chimiokines, les récepteurs spécifiques qui leur sont associés, de même que leurs ligands.

Figure adaptée de (Banisadr et al, 2005).

3.4.2 Les médiateurs lipidiques

Les eicosanoïdes sont des médiateurs lipidiques impliqués dans l'initiation et le dénouement du processus inflammatoire.

Sous stimulation par des facteurs de croissance, des cytokines, des interférons et des rayons ultraviolets, l'enzyme phospholipase A2 (PLA2) va hydrolyser les phospholipides des membranes cellulaires pour libérer l'acide arachidonique et permettre le relargage d'acides gras libres pour former des lysophospholipides. Les lysophospholipides formés

vont servir de médiateurs intracellulaires directs ou vont aller interagir avec les cellules proches (Diegelmann et al, 2016).

L'activation de la PLA2 nécessite également du calcium ionisé intracellulaire et la présence du C2/CaLB domaine. Les canaux calciques jouent donc un rôle important en permettant l'augmentation du calcium intracellulaire. Parmi les autres stimulus externes de l'activation de PLA2, on peut nommer la phosphorylation par ERK et p38 kinase et la stimulation par les lipides anioniques phosphatidylinositol-4,5-biphosphate et le céramide-1-phosphate via une interaction directe avec le domaine C2/CaLB (Diegelmann et al, 2016).

L'acide arachidonique va ensuite pouvoir être métabolisé selon 3 voies de signalisation : les voies de la cyclo-oxygénase, de la lipoxygénase et du cytochrome P450 pour former des eicosanoïdes.

La voie de la cyclo-oxygénase fera intervenir les cyclo-oxygénases -1 et -2, elle permettra la formation de prostaglandines (dont la prostacycline), contribuant à l'inflammation et la vasodilatation, et de thromboxane, contribuant à l'hémostase. La PGD2 et la PGE2 aident à l'infiltration des neutrophiles. La PGE2 peut également avoir une activité anti-inflammatoire. La PGI2, ou prostacycline, agit sur les cellules endothéliales pour entraîner une vasodilatation et favoriser l'adhésion leucocytaire ainsi que la prolifération des cellules musculaires lisses, et inhiber l'agrégation plaquettaire. Dans certaines situations, notamment les allergies, la PGI2 peut favoriser la sécrétion d'IL-10 et donc l'activité anti-inflammatoire (Diegelmann et al, 2016, Pratt et al, 2014)

La voie de la lipoxygénase va contribuer à la fabrication d'une part de leucotriènes, qui vont prendre part à la perméabilité vasculaire et le recrutement des neutrophiles et éosinophiles, et d'autre part de lipoxines, résolvines et protectines, qui vont avoir une activité anti-inflammatoire. Les leucotriènes vont notamment avoir un rôle dans l'ischémie-reperfusion. Le LTB4, essentiellement créé par les neutrophiles, les lymphocytes B, les monocytes et les macrophages, est l'eicosanoïde le plus pro-inflammatoire. Il va contribuer au recrutement des globules blancs par chimiotactisme, à

leur activation et à l'amplification de leur adhérence sur l'endothélium (Diegelmann et al, 2016, Pratt et al, 2014).

La lipoxine va cibler les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les macrophages, les lymphocytes T. Elle a une activité anti-inflammatoire par inhibition de l'infiltration des neutrophiles sur le site du processus inflammatoire, inhibition de la sécrétion de TNF par les lymphocytes T, induction de la phagocytose. Les résolvines vont réduire l'infiltration des neutrophiles et favoriser leur apoptose, inhiber NF- κ B, réduire la production d'IL-12, renforcer la production de lipoxine et contribuer à l'élimination des agents pathogènes. La résolvine D est produite plus facilement dans la rétine, du fait de la haute teneur en acide docohexaénoïque (DHA). Elle agit particulièrement sur les neutrophiles, les macrophages et les cellules endothéliales et contribue au dérecrutement des neutrophiles, à la favorisation de la phagocytose, à la protection de la revascularisation post-ischémique aberrante, à la production de PGI₂ et de NO, à la sécrétion d'IL-10 et à la modulation de la fonction macrophagique. Les protectines vont agir sur les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules microgliales. Elles vont notamment impacter la migration des lymphocytes T, réduire la sécrétion de TNF, IFN γ , affaiblir l'activité NF- κ B et COX2 et favoriser l'expression de CCR5 des lymphocytes T et la neuroprotection par des agents stimulation d'agents spécifiques (Diegelmann et al, 2016).

La voie du cytochrome P450 permettra la formation d'acide hydroxyeicosatétraénoïque et d'acide epoxytriénoïque. L'acide hydroxyeicosatétraénoïque est surtout produit par les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes, les lymphocytes et les macrophages et a un rôle pro-inflammatoire. Il aide au regroupement des neutrophiles par chimiokinèse, chimiotaxie et mobilisation du calcium intracellulaire des neutrophiles. Il contribue également au recrutement des éosinophiles par chimiokinèse. L'acide epoxytriénoïque aura un rôle dans la vasodilatation, l'angiogénèse et la prolifération cellulaire (Diegelmann et al, 2016, Pratt et al, 2014)

3.4.3 Les molécules d'adhésion cellulaire

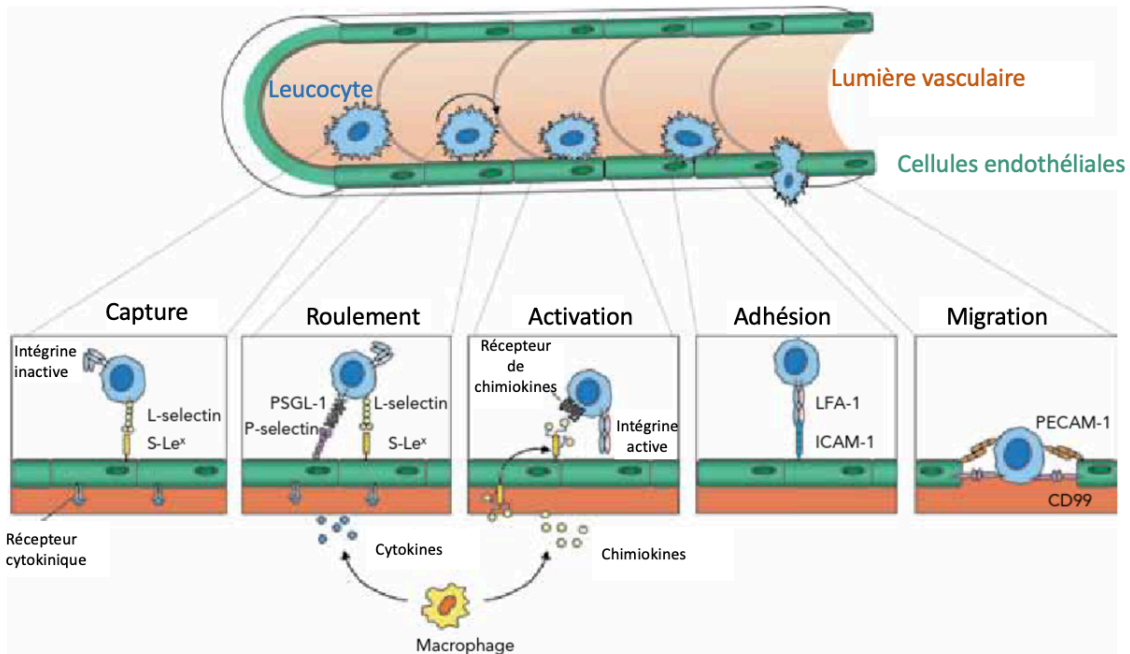


Figure 15: Infiltration leucocytaire à travers l'endothélium vasculaire. Ce processus commence par la capture du leucocyte circulant puis son roulement sur les cellules endothéliales aidé des sélectines. Ensuite les médiateurs pro-inflammatoires vont permettre l'activation de l'intégrine, entraînant son adhésion aux molécules d'adhésion exprimées à la surface des cellules endothéliales pour permettre la migration du leucocyte à travers la paroi du capillaire.

Figure adaptée de (Serhan et al, 2010).

Autant elles ont un rôle important pour renforcer les liaisons inter-cellulaires à but statique, autant elles l'ont également sur le plan dynamique pour le recrutement des cellules immunitaires sur les sites inflammatoires. L'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales passe par plusieurs étapes moléculaires. Dans un premier temps, les leucocytes vont être captés par les cellules endothéliales et rouler dessus. Cette étape implique les sélectines. Ensuite l'adhésion et l'infiltration vont faire intervenir les intégrines (Serhan et al, 2010) (Figure 15).

Parmi les sélectines, on peut différencier les L-sélectines, exprimées à la surface des leucocytes; les P-sélectines, exprimées à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales; et les E-sélectines, exprimées sur les cellules endothéliales activées, notamment via la stimulation par le TNF- α ou l'IL-1. Les sélectines sont des molécules monomériques constituées de facteur de croissance épidermique et de protéines contrôlant le système du complément (Walzog et al, 2000).

Les intégrines vont ensuite lier les leucocytes aux molécules d'adhésion de type immunoglobuline exposées par les cellules endothéliales. Les intégrines sont hétérodimérisées à la surface des leucocytes avec une sous-unité α et une sous-unité β , dont cette dernière permettra leur différenciation. Les intégrines nécessaires à l'adhésion leucocytaire sont les intégrines β 1, β 2, β 3 et β 7 (Walzog et al, 2000).

Les molécules d'adhésion des cellules endothéliales ICAMs et les VCAMs et les *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules* (PECAMs). Celles impliquées dans le processus inflammatoire sont ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3 et VCAM-1. Après activation cytokinique, les cellules endothéliales vont notamment hautement exprimer ICAM-1 à leur surface, tandis qu'ICAM-2 a une expression constante. ICAM-3 est en revanche exprimée à la surface des leucocytes. Ces trois molécules d'adhésion vont avoir une haute affinité avec l'antigène associé à la fonction lymphocytaire 1 et une intégrine β 2, contribuant à l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales mais également des leucocytes entre eux. VCAM-1 est exprimée à la surface des cellules endothéliales et est soumise à une régulation positive par les cytokines et les chimiokines et permet des interactions avec les intégrines β 1, β 2 et β 7. La PECAM-1 est exprimée par les cellules endothéliales et va se lier préférentiellement aux intégrines β 3 (Walzog et al, 2000).

3.4.4 Régulation de la signalisation moléculaire inflammatoire médiée par les cytokines

Plusieurs voies de signalisation sont impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire médiée par les cytokines, dépendamment du récepteur qu'elles activent. Il est important de comprendre que le tableau global est complexe et que ces voies sont individualisables mais peuvent également interagir les unes avec les autres. Nous allons aborder maintenant les principales voies de signalisation.

La voie de signalisation NF- κ B (Figure 16) : Le facteur de transcription NF- κ B est un élément majeur dans la régulation des réponses inflammatoires. Il va non seulement être à l'origine de l'expression de gènes codant pour les médiateurs de l'inflammation, tels que les cytokines et les chimiokines, mais également participer à la régulation de l'inflammasome et contribuer à l'apoptose et à la modulation des lymphocytes participants (Liu et al, 2017). La famille NF- κ B est composée de NF- κ B1 (ou p50), NF- κ B2 (ou p52), RelA (ou p65), RelB et c-Rel. Le NF- κ B est maintenu dans le cytoplasme par les protéines de la famille I κ B. L'activation du NF- κ B peut se faire par voie canonique ou la voie alternative, cette dernière semblant coopérer avec la première dans la modulation de fonctions particulières. La voie canonique va être activée par la liaison des cytokines sur leur récepteur, les *pattern-recognition receptors* (PRRs), les récepteurs de la famille du TNF, les récepteurs aux lymphocytes T et B. Dans un premier temps, les protéines I κ B vont être dégradées par phosphorylation. Cela permettra une translocation rapide de NF- κ B dans le noyau pour activer la transcription des gènes cibles. La voie alternative va être induite par certains TNFR spécifiques, tels que RANK ou CD40. Cette voie implique la phosphorylation du précurseur de NF- κ B2 pour lui donner sa forme mature et lui permettre d'être transloqué dans le noyau par le complexe p52/RelB (Liu et al, 2017).

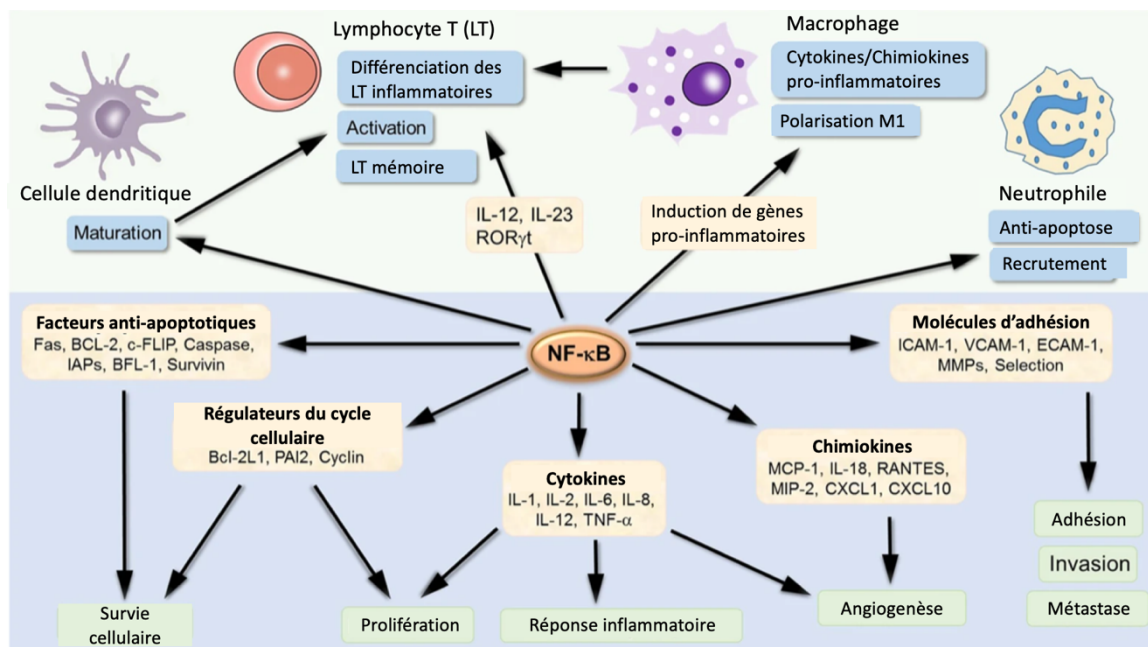


Figure 16: La voie de signalisation NF-κB. La voie NF-κB régle de nombreux processus dans le syndrome inflammatoire et va avoir un impact sur la survie cellulaire, la prolifération, la réponse inflammatoire, l'angiogenèse et l'adhésion leucocytaire.

Figure adaptée de (Liu et al, 2017).

La voie de signalisation MAPK : Les MAPKs sont des protéines kinases de résidus sérine et thréonine se trouvant dans le cytoplasme ou dans le noyau. Elles comprennent les enzymes extracellulaire signal-regulated kinases ERK, les MAP kinases p38 et les c-Jun N-terminal kinase JNK et vont avoir un rôle dans les réponses au stress osmotique, aux mitogènes, au choc thermique et aux stimulations par les cytokines. L'inflammation est le plus souvent responsable de l'activation des JNK et des p38. Cette voie de signalisation entraîne une cascade de phosphorylation des résidus sérine et thréonine. En effet, chaque MAPK va être phosphorylée et activée par une MAPK kinase, MAPKK, qui va être elle-même activée en amont par phosphorylation par une MAPK kinase kinase, MAPKKK. Les MAPKK sont propres à une seule ou à quelques MAPK, cela permettant de réguler la signalisation par des mécanismes spécifiques en prenant en compte les différents stimuli. Ainsi le signal pourra être amplifié ou modéré selon le besoin. La MAPK activée va induire le déclenchement de facteurs de transcription (Chen et al, 2018; Pearson et al, 2001).

La voie de signalisation JAK/STAT : Cette voie est également impliquée dans l'inflammation médiée par les cytokines et va permettre une réponse transcriptionnelle directe. Elle fait intervenir les Janus kinases (JAK) contenues dans le cytoplasme : JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2. Lors du stimulus, les récepteurs aux cytokines ont changé de conformation et les protéines JAK vont venir s'y associer puis vont s'autophosphoryler entre elles et phosphoryler le récepteur, permettant ainsi la liaison avec les facteurs cytoplasmiques STATs. Ces facteurs vont être alors phosphorylés à leur tour puis se dimériser pour être transloqués dans le noyau et permettre la transcription des gènes cibles (Chen et al, 2018; Garcia Moran et al, 2013).

La voie de signalisation phosphoinositide 3-kinase, PI3 kinase, PI3K : Cette voie est impliquée dans des étapes importantes du processus inflammatoire et comporte 4 isoformes de classe I, 3 de classe II et un unique de classe III. L'isoforme de classe 3 va permettre la synthèse du phospholipide PIP3, nécessaire aux récepteurs membranaires des cellules pour moduler la croissance, la survie, la différenciation et le déplacement cellulaire. Les isoformes de classe I PI3K γ , PI3K δ sont très exprimés dans les leucocytes et permettent la modulation du recrutement cellulaire médié par les chimiokines, l'activation leucocytaire médiée par les cytokines. Ces PI3Ks vont induire la phosphorylation, dans la position 3 de l'anneau inostol, de phosphatidylinositols contenus dans les membranes cellulaires. Elles créent ainsi un complexe de signalisation avec leurs protéines effectrices, parmi lesquelles on peut nommer Akt, et les activent par phosphorylation. Akt pourra notamment avoir des propriétés activatrices ou inhibitrices, dépendamment du substrat cible. Les PI3K de classe I vont toujours être imbriquées avec les autres voies de signalisation pour engendrer une réponse cellulaire spécifique au stimulus (Hawkins et al, 2015).

La voie de signalisation Src : La famille des Src kinases contient 9 enzymes agissant sur les résidus tyrosine et est impliquée dans la prolifération, l'inflammation, la survie cellulaire mais aussi dans dans la réponse inflammatoire médiée par les macrophages. Chaque Src

possède des domaines spécifiques SH2 et SH3, leur permettant d'interagir avec des régions spécifiques de substrats. Suite au stimulus, Src va changer de conformation par phosphorylation de certains résidus et déphosphorylation d'autres, permettant son activation et ainsi la transcription de gènes cibles ou l'activation d'autres facteurs de transcription. La Src peut être par ailleurs régulée par la *C-terminal Src kinase*, la *Csk homology kinase* et les *protein tyrosine phosphatases* (Byeon et al, 2012)

3.5 Impact de l'inflammation sur l'angiogenèse et la fonction des cellules endothéliales

La dysfonction endothéliale liée à l'inflammation est retrouvée dans de multiples pathologies, telles que l'athérosclérose, les maladies auto-immunes comme l'arthrite rhumatoïde, le lupus érythémateux disséminé, l'infarctus du myocarde, ou encore les accidents vasculaires cérébraux et la rétinopathie diabétique (Theofilis et al, 2021; Granger et al, 2010).

Habituellement, l'inflammation est connue pour induire l'angiogenèse par l'activation de différents types cellulaires, qui vont libérer des facteurs pro-angiogéniques (Granger et al, 2010). Certaines cytokines ont d'ailleurs été rapportées pour avoir des propriétés pro-angiogéniques, telle que TNF- α , IL-1, IL-6 ou encore IL-8 (Dinarello, 2007; Granger et al, 2010). Il est également intéressant de noter que les zones de bifurcation vasculaire sont plus à risque d'inflammation endothéliale. En effet, l'écoulement passant d'une allure laminaire à une allure oscillatoire, ces contraintes de cisaillement vont contribuer à une majoration de l'inflammation et de l'apoptose via l'induction de la voie de signalisation NF- κ B (Theofilis et al, 2021).

Néanmoins, la relation entre l'inflammation et l'angiogénèse est différente selon la durée de l'inflammation. En effet, autant une inflammation brève et restreinte semble favoriser la néovascularisation, autant une inflammation accrue et soutenue semble avoir l'effet contraire. L'inflammation soutenue va notamment entraîner l'augmentation des espèces

réactives à l'oxygène, ce qui va induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires qui pourront renforcer l'activation de l'inflammasome (Theofilis et al, 2021).

En outre, lors du processus inflammatoire, les cytokines, les PPRs, les PAMPs et d'autres stimuli peuvent entraîner une activation endothéliale, leur faisant ainsi subir des changements morphologiques et fonctionnels. Ce mécanisme sera amplifié lors d'une inflammation soutenue (Theofilis et al, 2021).

Par ailleurs, en cas de mise en situation de stress élevé, les cellules endothéliales vont induire l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines via la voie NF- κ B, ce qui renforcera le processus inflammatoire par recrutement des cellules immunitaires qui pourront à leur tour contribuer à la surexpression des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des facteurs de croissance et des ROS.

De plus, la chimiokine MCP-1 est produite par ces cellules endothéliales activées. Outre son rôle dans l'attraction des cellules immunitaires, il a été rapporté qu'elle pouvait induire l'apoptose sur les cellules endothéliales (Theofilis et al, 2021).

Les pièges extracellulaires des neutrophiles (NETs) produits en grande quantité sont à l'origine d'un phénomène de fuite vasculaire et d'activation du système du complément, le tout conduisant à des dommages endothéliaux (Theofilis et al, 2021).

Par ailleurs, l'inflammation en induisant la dysfonction endothéliale va promouvoir un état pro-coagulant. En effet, les cellules endothéliales activées vont pouvoir déclencher la coagulation par la voie extrinsèque après expression du facteur tissulaire à leur surface. Le phénomène pro-coaguloire sera amplifié par certaines cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α ou le CD40 ligand. Conjointement, le stimulus inflammatoire va diminuer l'expression de thrombomoduline, qui a un rôle anti-thrombotique. Les cellules endothéliales activées vont également relarguer le facteur von-Willebrand, et ainsi activer les plaquettes et la coagulation, ce qui va déclencher la constitution de thrombi. L'expression de ce facteur sera renforcée par les cytokines et les anions superoxydes (Theofilis et al, 2021).

Ainsi, l'inflammation accrue et soutenue entraîne un impact délétère non négligeable sur la microvascularisation.

3.6 Résumé

L'inflammation est un processus complexe faisant intervenir de multiples types cellulaires, médiateurs et voies de signalisation. Normalement, l'inflammation aiguë se résout rapidement, mais lorsque le stimulus se prolonge, la poursuite du phénomène inflammatoire va entraîner des dégâts sur les tissus et cellules environnantes. L'inflammation a notamment un impact sur l'angiogénèse et va contribuer aux processus pathologiques la concernant. Les cellules microgliales sont les cellules résidentes au niveau de la rétine et contribuent fortement au processus inflammatoire en son sein. De plus, il a été montré que dans la rétine en développement, la microglie est intimement liée aux vaisseaux sanguins, et notamment aux *tip cells* et aux *stalk cells* et elle est nécessaire au développement vasculaire (Checchin et al, 2006). Ainsi, elle contribuera fortement aux pathologies vasculaires de la rétine en développement, telle que la rétinopathie du prématuré.

Chapitre 4. La rétinopathie de la prématurité

4.1 La prématurité : naître trop tôt

Le terme normal d'une grossesse correspond à 41 semaines d'aménorrhée (SA). On considère qu'un nouveau-né naît prématurément avant 37 SA. Environ 15 millions de nouveau-nés naissent prématurément dans le monde chaque année, soit une incidence d'environ 11% (Walani, 2020)

L'OMS a défini la prématurité moyenne entre la 32^{ème} et la 37^{ème} semaine d'aménorrhée; la grande prématurité, entre la 28^{ème} et la 32^{ème} semaine d'aménorrhée; et la très grande prématurité, en dessous de 28 semaines d'aménorrhée (WHO, 2022). La prématurité, et ce d'autant plus qu'elle est importante, est associée à des complications pouvant toucher tous les systèmes et organes, de par l'apparition d'injures sur des structures immatures tant au niveau tissulaire que régulateur. Les nouveau-nés prématurés sont entre autres exposés de par leur parcours postnatal à plus de risque infectieux et donc d'insultes inflammatoires. Ainsi, la prématurité peut mener à des complications sur les différents organes et tissus du corps humain: la maladie des membranes hyalines et la bronchodysplasie pulmonaire sur le plan respiratoire, la persistance du canal artériel et l'hypertension artérielle pulmonaire sur le plan cardiovasculaire, les hémorragies intraventriculaires et la leucomalacie périventriculaire au niveau cérébral, l'entérocolite ulcéro-nécrosante sur le plan intestinal. Dans le cadre neurosensoriel, la vision est impactée, notamment de par la rétinopathie de la prématurité, mais aussi via des troubles de la réfraction, une baisse d'acuité visuelle à long terme (Costeloe et al, 2012; Hellgren et al, 2016). Outre le fait que la vision en tant que telle est importante pour le quotidien, il est d'autant plus important de s'atteler à la préserver chez les nouveau-nés prématurés dont le neuro-développement est fragile. Il semble d'ailleurs y avoir un réel impact de la prise en charge postnatale précoce dans le développement visuel. En effet, j'ai pu montrer que l'acuité visuelle au terme corrigé de la prématurité (c'est-à-dire au moment où les enfants auraient dû naître s'ils étaient nés à terme) des nouveau-nés nés avant 32

SA, était meilleure que celle des nouveau-nés à terme au moment de leur naissance, indépendamment du fait qu'ils aient présenté ou non une rétinopathie de la prématurité (ROP). Cela peut être expliqué par la stimulation visuelle exogène plus longue, dont on sait qu'elle contribue à la structuration neuronale. En revanche, il n'y avait pas d'effet de l'âge réel entre les différents âges gestationnels des nouveau-nés prématurés inclus. Cela signifie qu'il existe une période critique dans le développement visuel dans la période postnatale précoce, avant le terme corrigé de la prématurité (Wirth et al, 2018). Il est probable que cette période critique se situe vers 28 SA. En effet, les voies neurologiques de la rétine sont a priori actives à partir de 22 SA mais s'organisent lors des périodes de sommeil à partir de 28-30 SA et les paupières sont fermées 93% du temps vers 28 SA versus 55% à 26 SA ou encore 60% à 34 SA (Robinson et al, 1989, Graven, 2004). Ainsi, préserver la rétine en période postnatale précoce semble d'autant plus important.

Les progrès de la science et de la médecine permettent désormais de prendre en charge les nouveau-nés extrêmement prématurés nés à partir de 22 SA, laissant place à un risque majoré de complications.

4.2 La rétinopathie de la prématurité comme complication ophtalmologique majeure de la prématurité

La ROP est une des principales causes évitables de cécité dans l'enfance (De Verdier K, et al. 2018). Le faible âge gestationnel et le faible poids de naissance sont des facteurs de risque non modifiable de ROP. Plus la prématurité est sévère, plus il y a un risque de développer une ROP sévère; en effet, un nouveau-né d'âge gestationnel inférieur à 25 SA a 20 fois plus de risque de développer une rétinopathie qu'un nouveau-né d'âge gestationnel inférieur à 28 SA. Le poids de naissance a également un rôle important puisque le retard de croissance intra-utérin inférieur au 3^{ème} percentile est 4 fois plus à risque de développer une rétinopathie sévère par rapport aux nouveau-nés de poids de naissance compris entre le 25^{ème} et le 75^{ème} percentile. Il semble que le sexe masculin soit également un facteur de risque avec un odds ratio de 1.73 [Intervalle de confiance à 95% :

1.25 – 2.40] (Darlow et al, 2005). La ROP est quant à elle un facteur de risque de troubles visuels dans l'enfance (Rezar-Dreindl et al, 2021) et chez l'adulte jeune (Zhou et al, 2022).

En Europe, environ 30% des nouveau-nés prématurés de moins de 31 SA présentent une ROP, 6% nécessitant un traitement (*Chan H, et al. 2018; Holmström G, al. 2018*). Au Canada en 2019, 38% des nouveau-nés de mois de 33 SA présentaient une ROP et 42% des nouveau-nés de moins de 1500g à la naissance. Seulement 6% des nouveau-nés de moins de 33 SA ont été traités de leur ROP. Parmi les enfants traités, l'âge gestationnel de naissance était de moins de 31 SA (Canadian Neonatal Network, 2019). Dans les pays moins développés, l'incidence de ROP sévère est plus élevée et surtout chez des enfants avec un âge gestationnel plus élevé et un poids de naissance plus élevé par rapport aux pays développés (Gilbert et al, 2005). Cela montre bien l'impact des moyens mis en œuvre et l'importance des mesures préventives dans la prise en charge de la ROP. Par ailleurs, sur le plan sociétal, le dépistage et le traitement de la ROP ont un coût nettement inférieur à la prise en charge d'une cécité (Gyllensten et al, 2022), ceci appuyant l'importance du dépistage et de la prise en charge de cette pathologie.

4.3 Diagnostic de la rétinopathie de la prématurité

La gravité de la ROP dépend de son stade et de sa localisation topographique.

La ROP est classée d'une part par stades (Figure 17). Le stade 1 est une ligne de démarcation correspondant à une structure mince, plate et pâle, à la jonction vasculaire-avasculaire et pouvant être associée à une ramification anormale des vaisseaux à la partie postérieure (Chiang et al, 2021). Le stade 2 : un bourrelet correspondant à une surélévation et un épaissement de la ligne de démarcation. A ce stade, des petites touffes néovasculaires, les lésions « pop-corn », peuvent être présentes en arrière du bourrelet (Chiang et al, 2021). En angiographie à fluorescence, ces amas vasculaires correspondent à des taches bien délimitées, sans fuite de fluorescence, confirmant un caractère peu actif (Azad et al 2008). Néanmoins, ils apparaissent de manière plus

précoce dans les ROP finalement traitées (Xue et al 2020) et méritent d'être considérés comme indicateur de sévérité lors de leur apparition précoce. Ainsi, il semble exister deux phénotypes de touffes néovasculaires dans la ROP clinique, le plus fréquent étant bénin et accompagnant la régression de la ROP et la revascularisation et l'autre étant plus agressif conduisant à une évolution péjorative de la ROP. Le stade 3 associe le bourrelet avec une prolifération néovasculaire extra-rétinienne vers le vitré. Celle-ci se poursuit également à la face postérieure du bourrelet, lui donnant une apparence de plus en plus irrégulière. Il existe une forme particulière de stade 3, plus rare, correspondant à une néovascularisation extrarétinienne sans relief pouvant survenir dans la partie plus centrale de la rétine (zone I ou zone II postérieure) en l'absence de ligne de démarcation ou bourrelet (Chiang et al, 2021). Le stade 4 rapporte un décollement de rétine partiel. Celui-ci peut être évoqué sur un aspect en verre dépoli par rapport à la rétine encore adhérente. Il pourra y être associé une perte de l'observation de détails fins quant à la vascularisation choroïdienne ou à l'épithélium pigmentaire. La macula est préservée dans le stade 4A, alors qu'elle est atteinte dans le stade 4B. Les décollements peuvent être soit tractionnels, lors de l'évolution de la sévérité de la maladie, soit exsudatifs, lorsqu'ils surviennent après le traitement par laser (Chiang et al, 2021). Le stade 5 se rapporte au décollement de rétine total avec un aspect en entonnoir. On peut le catégoriser en trois sous-catégories selon l'observation au fond d'oeil : 5A, où le disque optique reste visualisable à l'examen du fond d'œil; 5B, où le disque optique n'est pas visible, de par la présence de tissu fibrovasculaire derrière le cristallin ou encore un aspect de détachement en entonnoir complètement fermé en antérieur et postérieur; 5C, qui correspond au stade 5B accompagné d'anomalies du segment antérieur (Chiang et al, 2021). Le stade pré-plus/plus est une classification parallèle, témoignant du caractère agressif de la maladie et pouvant être associé aux autres stades. Le stade plus correspond à une dilatation et une tortuosité vasculaire tandis que le pré-plus correspond à une dilatation vasculaire anormale et/ou une tortuosité vasculaire insuffisante pour être catégorisée en stade plus (Chiang et al, 2021).

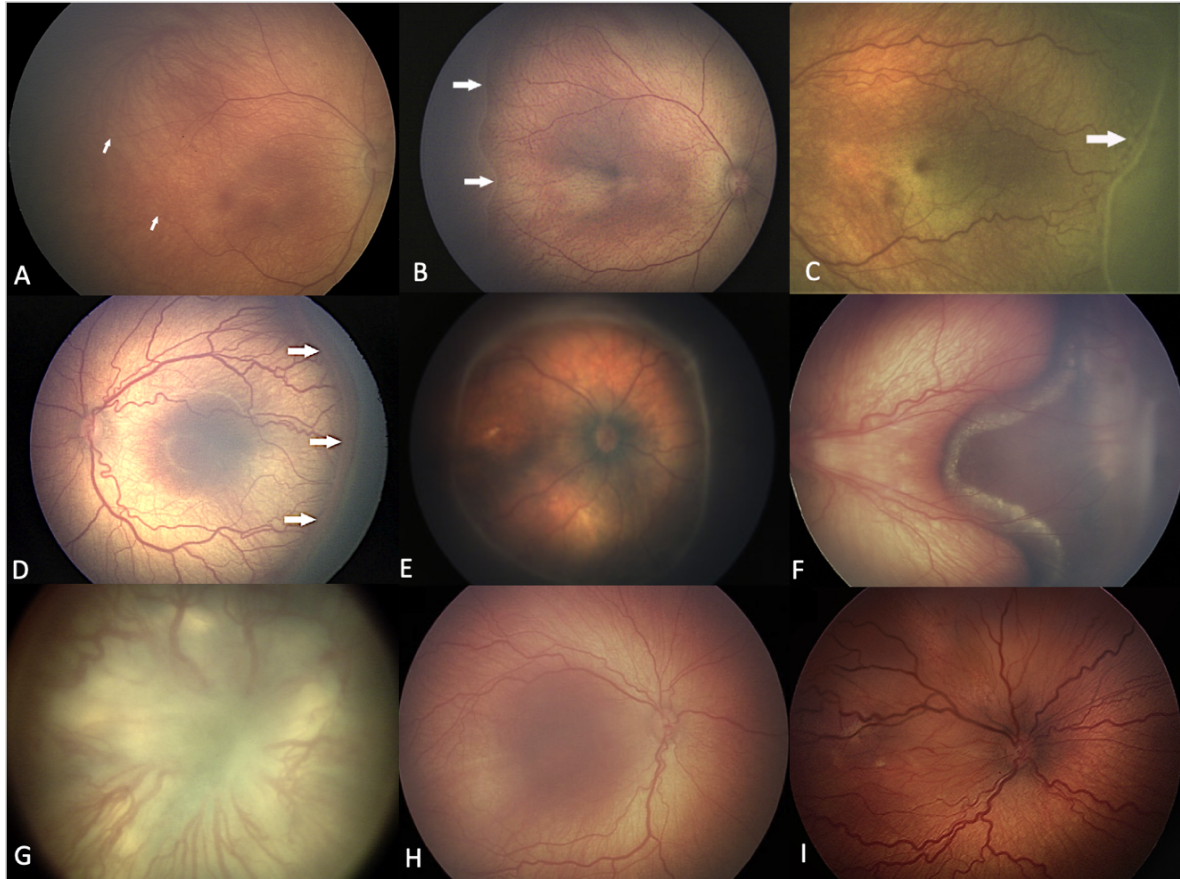


Figure 17: Les différents stades de ROP. (A) Vascularisation incomplète en zone II; (B) ROP de stade 1; (C) ROP de stade 2; (D) ROP de stade 3 associée à un stade plus; (E) ROP de stade 4A; (F) ROP de stade 4B avec exsudats associés et hémorragie sous-rétinienne; (G) ROP de stade 5; (H) Stade pré-plus; (I) Stade plus. Figure adaptée de (Chiang et al, 2021), reproduction avec la permission de Elsevier.

Cette classification par stade est complétée par une classification par zones (Figure 18). La zone I étant un cercle ayant pour centre la papille et le rayon de deux fois la distance intermaculo-papillaire (Chiang et al, 2021). La zone II étant un cercle entourant la zone I et allant jusqu'à l'ora serrata en nasal. On peut démarquer la zone II postérieure, partie de la zone II entourant la zone 1 avec une distance de deux diamètres papillaires par rapport à la limite de la zone I (Chiang et al, 2021). Et finalement la zone III, qui entoure la zone II jusqu'à l'ora serrata en temporal (Chiang et al, 2021).

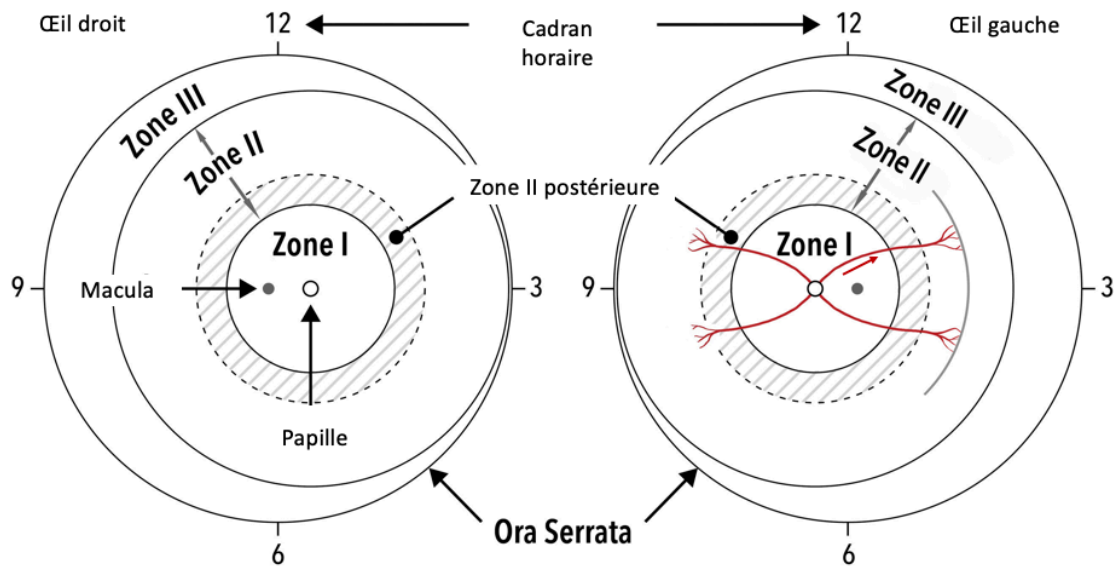


Figure 18: Zones permettant de localiser la ROP. Schéma de l'œil droit et de l'œil gauche montrant les limites de zones et les secteurs d'heures d'horloge utilisés pour décrire l'emplacement de la vascularisation et l'étendue de la ROP. Les cercles pleins représentent les frontières des zones I à III, et les cercles en pointillés représentent les frontières de la zone postérieure II.

Figure adaptée de (Chiang et al, 2021), reproduction avec la permission de Elsevier.

4.4 Dépistage de la ROP

Le dépistage des rétinopathies sévères se fait en phase de néovascularisation après dilatation pupillaire par collyre mydriatique et anesthésie cornéenne par collyre anesthésiant. Après mise en place d'un écarteur à paupière, ou blépharostat, le fond d'œil est réalisé soit par ophtalmoscopie indirecte soit par caméra de rétine (Darulich et al, 2020). Le premier fond d'œil de dépistage a lieu à 1 mois de vie et au minimum à 31 SA d'âge corrigé. Le rythme de suivi de dépistage est défini par l'ophtalmologiste selon les résultats (Jefferies et al, 2016).

Le dépistage est actuellement la phase clé de la prise en charge de la ROP en pratique clinique. Néanmoins il pose quelques problématiques. En effet, seulement environ 6% des dépistages de ROP vont mettre en évidence une ROP à traiter (Holmström et al, 2018),

et les collyres instillés et l'examen en lui-même sont source d'inconfort et de déstabilisation des nouveau-nés (Samra et al, 2009)

Dans cette optique, il y a une volonté d'optimisation du dépistage depuis plusieurs années.

Les recommandations des sociétés savantes se sont adaptées pour revoir les critères de dépistage afin de ne pas surdépister des nouveau-nés qui ne feraient pas de rétinopathie à traiter. Les recommandations de la Société Canadienne de Pédiatrie de 2016 (Jefferies et al, 2016) demandent de dépister tous les nouveau-nés prématurés nés avant 31 semaines d'aménorrhée ou avec un poids de naissance inférieur à 1251g ou les nouveau-nés plus matures avec parcours instable. Celles de l'Association Américaine de Pédiatrie de 2018 recommandent de dépister tous les nouveau-nés de moins de 31 SA, ou moins de 1501 g à la naissance ou ceux de plus de 30 SA ou ayant un poids de naissance entre 1501 et 2001 g si parcours instables (Fierson et al 2018).

Toujours dans cette volonté d'optimisation de dépistage et compte-tenu de la corrélation entre la prise de poids postnatale et de l'IGF-1, un algorithme de dépistage basé sur la prise de poids postnatale a été élaboré : Winrop® (Löfqvist et al, 2009). Néanmoins, la sensibilité de cet algorithme avoisine les 60% dans une cohorte que j'ai mené dans le passé. Ainsi il ne suffit pas à lui seul pour le dépistage de la ROP (Wirth et al, 2019). En revanche, il semble efficace pour les nouveau-nés de plus de 30 SA et pourrait ainsi aider pour ceux nés après 30 SA et présentant des facteurs de risque, ou encore chez tous les prématurés des pays en voie de développement dans lesquels l'accès au dépistage peut encore être parfois difficile.

4.5 Modèles de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) pour l'étude animale de la ROP

Afin de comprendre les mécanismes physiopathologiques et d'explorer des possibilités thérapeutiques, il a fallu trouver des modèles animaux fiables. Nous allons donc maintenant explorer les différentes spécificités liées aux modèles animaux. Il est important de trouver un modèle de vascularisation rétinienne immature sur lequel les

conditions environnementales pourront reproduire les deux phases décrites de la rétinopathie du prématuré. Bien que des études aient initialement été réalisées sur le chaton ou encore le lapereau, nous allons nous concentrer sur les modèles de rongeurs, puisque les modèles murins sont ceux encore utilisés aujourd'hui.

4.5.1 Comparaison des différents modèles d'OIR chez les rats

4.5.1.1 Différences sur le développement de la vasculopathie

La vascularisation rétinienne du rat est similaire à celle de l'humain. Cependant, contrairement à l'humain où elle se termine au moment de la naissance à terme, celle du rat se termine au 15^{ème} jour de vie (Ashton, 1961), rendant cet animal intéressant pour l'étude de la ROP.

Le modèle d'hyperoxie continue à 60-80% permet d'étudier la vaso-oblitération mais n'entraîne pas de néovascularisation post-ischémique. Somme toute, outre l'altération des cellules endothéliales, il ne semble pas y avoir d'autre anomalie structurelle de la rétine, sous réserve de l'ancienneté de cette étude et des techniques disponibles à l'époque (Ashton, 1961). Plus tard, il a été montré que les fluctuations de PO₂ précoces étaient associées au développement de la ROP, tant sur le plan clinique (Cunningham et al, 1995) qu'expérimental. En effet, Penn a exposé, dès la naissance, un groupe de rats à de l'hyperoxie continue à 80% suivie d'une période en air ambiant et un autre groupe de rats à un modèle cyclique d'oxygène variant d'une FiO₂ de 40% à 80% aux 12h suivie d'un retour en normoxie. Au retour en normoxie, la vaso-oblitération était identique dans les 2 groupes. Dans le groupe d'hyperoxie continue, aucun rat n'avait présenté de néovascularisation prérétinienne contrairement à 66% dans le groupe du modèle cyclique. Par ailleurs, il était intéressant de noter que la majorité des rats exposés à l'hyperoxie, indépendamment du protocole, ont présenté des plis rétiniens, ce qui même en l'absence de néovascularisation pathologique, indique un développement dysplasique du tissu rétinien hypoxique (Penn et al, 1993). Dans le protocole d'exposition quotidienne précoce à 80% d'oxygène avec période de 30 min en air ambiant et remise graduelle sur

3h à 80% d'oxygène, on notait une vaso-oblitération centrale et la périphérie rétinienne avasculaire était plus grande que chez les témoins et une néovascularisation était obtenue chez 94% des animaux (Reynaud et al, 1994).

Afin de reproduire de la manière la plus représentative les variations de PaO₂ des nouveau-nés très grands prématurés, des modèles de variation cyclique d'apport en oxygène ont été mis au point.

Dans le modèle d'exposition précoce (jours postnataux P1-P6) et tardive (P6-P14) à 80% O₂ pendant 22,5h interrompues de 3x30min à 21%, les rats exposés à ce modèle d'hyperoxie présentaient une vaso-oblitération rétinienne centrale et périphérique comparé aux rats en normoxie durant toute la durée du protocole (Dorfman, 2008).

Parmi les modèles cycliques, le modèle 50/10% d'oxygène est le plus répandu dans l'étude de la ROP. En comparaison au modèle 80/40% d'O₂, la vaso-oblitération était plus importante (29% vs. 22%), et l'incidence de la néovascularisation était plus importante (97% vs 72%), accompagnée de plus de touffes vasculaires, de dysplasie fibrovasculaire pré-rétinienne et d'hémorragies intravitréennes. Par ailleurs, dans le modèle 50/10%, la vaso-oblitération était essentiellement périphérique, contrairement au modèle 80/40% où elle était surtout centrale, rendant ce modèle plus représentatif de la ROP (Penn et al 1994, Penn et al 1995), Le modèle cyclique 50/10% d'oxygène induit également des changements en termes de diamètre et tortuosité des artéριοles rétiniennes, ce qui correspond au stade plus en clinique. On note également un retard de croissance des plexus vasculaires profonds et superficiels identiques à ceux de la ROP (Liu et al, 2006).

4.5.1.2 Comparaison structurelle et fonctionnelle des différents modèles

À l'électrorétinographie chez les rats exposés au modèle de cyclique 50/10%, les ondes a et b étaient diminuées et le stimulus nécessaire pour obtenir une détection d'onde b était plus élevé que chez les rats en air ambiant. L'altération des ondes a montre que l'amplitude saturée et la sensibilité de la réponse des photorécepteurs sont plus faibles chez les rats exposés, tandis que l'altération des ondes b montre que l'amplitude et la

sensibilité de la réponse post-récepteur sont plus faibles chez les rats exposés. Les altérations à l'électrorétinogramme (ERG) étaient durables dans le temps, témoignant d'une atteinte des photorécepteurs et des cellules neuronales (Liu et al, 2006). L'amplitude des ondes à l'ERG multifocal était réduite au niveau central dans les modèles précoces cyclique 50/10% et d'exposition continue à 80% contrairement au contrôle, correspondant à une perte centrale des photorécepteurs en fonction du temps d'exposition à l'hyperoxie, ceci étant lié à l'involution choroïdienne induite par l'hyperoxie. Les ondes périphériques semblaient en revanche préservées, tout comme les photorécepteurs périphériques (Shao et al, 2011). Dans les modèles cycliques précoces 50/10% d'oxygène et d'hyperoxie tardive (P7-P14) continue à 75% d'oxygène, la sensibilité de réponse des bâtonnets et des post-récepteurs est diminuée à moyen terme, en corrélation avec une augmentation de la tortuosité vasculaire ultérieure, plus marquée dans l'exposition continue à 75%. La récupération de la sensibilité post-récepteur est meilleure dans le modèle 50/10%, ceci semblant être liée à la meilleure récupération de la tortuosité vasculaire. Par ailleurs, l'atteinte de la rétine interne et externe est plus intense dans le modèle 75% vs 50/10% (Akula et al, 2007). Plus récemment il a été montré, dans le modèle de cycling 50/10% d'O₂, une atteinte de l'épithélium pigmentaire rétinien et une diminution du nombre de photorécepteurs, de manière IL-1 dépendante et corrélée à l'involution choroïdienne, ainsi qu'une altération de leur fonction en OIR avec une réduction des amplitudes à l'électrorétinogramme multifocal observée spécialement dans la zone centrale (Zhou et al, 2016).

Dans le modèle d'exposition quotidienne précoce à 80% d'oxygène avec période de 30 min en air ambiant et remise graduelle sur 3h à 80% d'oxygène, le développement, l'organisation des bâtonnets et leur fonction étaient altérés avec une épaisseur de la partie externe des bâtonnets plus faible par rapport aux rats laissés en normoxie, sans différence quant à l'épaisseur de la couche nucléaire externe. En outre, la variance d'absorbance des segments externes des bâtonnets des rats exposés était plus grande et ceux-ci apparaissaient désorganisés, moins uniformes et plus courts, avec des espaces

inter-disques moins réguliers et plus denses (Fulton et al, 1999). Dans le modèle d'exposition précoce et tardive à 80% O₂ pendant 22,5h interrompues de 3x30min à 21%, les changements structurels, avec amincissement de la couche plexiforme externe, et fonctionnels, avec altération signaux émis par les bâtonnets et les cellules neuronales, sont liés à la durée de l'hyperoxie en tant que telle, mais aussi au niveau de maturité rétinienne atteint au moment de l'exposition à l'oxygène et les anomalies structurelles précèdent les déficiences fonctionnelles (Dembinska et al, 2001). Ces résultats ont été confirmés et étendus aux réponses photopiques et donc à l'atteinte des cônes, ainsi qu'aux potentiels oscillatoires; le tout témoignant d'une atteinte pan-rétinienne, avec une atteinte spécifique de l'hyperoxie sur les cellules horizontales mais aussi des cellules bipolaires activées, entraînant l'amincissement de l'OPL (Dembinska et al, 2002). Les rats exposés à ce modèle d'hyperoxie ont un retard d'apparition et une atteinte des ondes a et b à l'ERG scotopique et photopique. Bien que diminuée, l'onde a reste somme toute relativement préservée contrairement à l'onde b qui est altérée précocement et de manière durable. L'étude cyto-architecturale retrouve comme précédemment une OPL plus mince et une diminution du nombre de cellules horizontales. Les lésions structurelles et fonctionnelles induites par l'hyperoxie semblent donc irréversibles même malgré la revascularisation (Dorfman et al, 2008). Cet amincissement de l'OPL semble être due à un mécanisme apoptotique et de rétraction synaptique des cellules bipolaires, dont les projections axonales sont également désorganisées dans la couche plexiforme interne (IPL), impactant donc aussi la couche nucléaire interne (INL) et la couche plexiforme externe. Il semble également y avoir une communication limitée avec la rétine interne (Dorfman et al, 2011). Plus précisément, il semble également y avoir une atteinte de l'INL et l'IPL dans la rétine périphérique et de l'INL dans la rétine centrale avec une altération de l'analyse neurochimique plus importante dans les cellules amacrines que dans les cellules bipolaires. Ces anomalies ont une prédilection pour la périphérie rétinienne, où le développement vasculaire est anormal. Les cellules de Müller semblent plus gliotiques en périphérie. Par ailleurs, il existe une « zone de transition » périphérique où les neurones et la glie sont affectés de manière variable en fonction de leur emplacement

par rapport à la vascularisation (Downie et al, 2007). On retrouve en effet une dégénérescence des astrocytes périphériques avec une réactivité importante des cellules de Müller ultérieurement, témoignant de l'atteinte des astrocytes et des cellules de Müller dans ce modèle OIR (Downie et al, 2008).

4.5.2 Impact de la souche de rat dans les modèles OIR

Il a été remarqué une vaso-oblitération et une néovascularisation post-ischémique plus faible pour les rats albinos que pour les rats pigmentés. En effet, certaines souches pigmentées semblent développer des atteintes microvasculaires plus sévères. Dans le modèle d'hyperoxie continue tardive, les rats Brown Norway (BN), pigmentés, ont une vaso-oblitération et une néovascularisation beaucoup plus importante que les rats Sprague Dawley (SD), albinos, ce qui a également été retrouvé dans un modèle cyclique (Gao et al, 2002; Floyd et al, 2005; van Wijngaarden et al, 2005).

La vaso-oblitération est plus importante chez les rats Long-Evans (LE), pigmentés vs SD (zone vascularisée respectivement de 28,7% et 57,2%), accompagnée d'une réduction de la densité vasculaire (densité normale de 51,0% et 66,7% respectivement). La fonction rétinienne était aussi plus altérée avec une onde b beaucoup plus atténuée. Il y avait également une altération plus sévère de la structure rétinienne, de manière permanente, qui touchait l'OPL, les cellules horizontales mais aussi et contrairement aux rats SD la rétine interne, avec une perte significative de l'INL et l'IPL. Les séquelles les plus sévères et permanentes des rats SD se sont produites dans la partie la plus interne de la rétine. Or, la tendance au raccourcissement des segments internes des photorécepteurs, avec une onde a atténué chez les rats LE suggère une implication des photorécepteurs. Les conséquences du modèle OIR étaient plus prononcées chez les rats LE que SD (Dorfmann et al, 2009), ce qui pourrait être expliqué par l'action pro-oxydante de la mélanine de l'épithélium pigmentaire rétinien en condition d'hyperoxie. Le développement rétinien se produit différemment chez les animaux albinos et pigmentés. En effet, la maturation rétinienne est retardée en l'absence de mélanine avec un moindre développement de la

couche de cellules ganglionnaires, des couches nucléaires interne et externe plus fines, avec un impact sur les bâtonnets dans la couche nucléaire externe. Il a par ailleurs été montré un décalage temporel dans l'apparition et la différenciation de la couche plexiforme externe des rats albinos (Jeffery et al, 1997; Webster et al, 1991). En outre, les rats SD ont un niveau de CNTF élevé plus précocément que les rats LE en condition d'hyperoxie, ce qui pourrait expliquer la préservation des photorécepteurs des rats SD (Dorfman et al, 2009; Wen et al, 2012).

Les mécanismes apoptotiques de la couche plexiforme interne et le remodelage architectural sont plus importants chez les rats LE que SD. En effet, la perte de terminaison synaptique fonctionnelle a lieu dans l'OPL chez les rats SD versus l'OPL et l'IPL chez les rats LE. L'atteinte des cellules bipolaires était également plus marquée chez les rats LE. L'apoptose était retrouvée dans l'INL et l'ONL des rats LE et uniquement dans l'INL des rats SD. La sensibilité des rats LE à l'hyperoxie est donc plus importante que les rats SD. (Dorfman et al, 2011)

Il existe aussi des différences selon les vendeurs : En effet, l'équipe de Penn a observé sans publier les résultats que les rats SD de Charles Rivers produisent deux fois plus de néovascularisation que ceux de Zivic-Miller (Barnett et al, 2010).

4.5.3 Réponse de la rétine des souriceaux aux modèles OIR

Le modèle d'hyperoxie continue à 75% de P7 à P12 chez la souris induit une vaso-oblitération centrale des plexus profonds et superficiels, suivie d'un pic de néovascularisation arrivant entre P17 et P21. Il ne présente pas de différence de vascularisation de la couche de cellules ganglionnaires et de la couche plexiforme interne. La néovascularisation ne semble pas y être induite via les astrocytes et les cellules de Müller, qui étaient en quantité diminuée à l'évaluation plus tardive des zones post-ischémiques (Smith et al, 1994). Ce modèle offre un modèle de néovascularisation post-ischémique plus rapide et plus robuste mais moins reproductible de la ROP. Chez la souris, le modèle d'exposition accélérée à 85% d'O₂ de P8 à P11 induit une néovascularisation

pré-rétinienne similaire au modèle précédent, avec une plus grande régression vasculaire rétinienne mais qui récupère plus rapidement. Par ailleurs, la fonction neurorétinienne des photorécepteurs est conservée. En revanche, il existe une atteinte fonctionnelle des post-récepteurs avec une récupération meilleure dans le groupe accéléré sans toutefois atteindre de normalisation (Villacampa et al, 2017).

Comme chez les rats, il existe des phénotypes différents quant au stress oxydatif et il semble pertinent d'utiliser les souris C57BNN/6 compte tenu de leur bonne susceptibilité au stress oxydatif (Walsh et al, 2004).

Chez les souris BALB/cByJ et C57BL/6J, les astrocytes sont préservés durant la période d'hyperoxie et sont observés dans les zones vaso-oblitérées lors du retour en normoxie. Cependant les souris C57BL/6J ont présenté une dégénérescence de ces cellules après 48h de normoxie, accompagnée d'une augmentation de la réactivité des cellules de Müller, communément associée au stress rétinien et aux maladies vasculaires. En revanche, la densité astrocytaire est restée élevée dans la zone vaso-oblitérée des rétines de BALB/cByJ tout au long de la revascularisation et l'activation des cellules de Müller n'a pas été observée. Ainsi, la survie de l'astroglie est en corrélation avec une revascularisation physiologique accélérée et une diminution des changements pathologiques dans les rétines de souris BALB/cByJ (Dorrell et al, 2010).

On retrouve un amincissement de la rétine interne chez les souris OIR par rapport aux souris en normoxie, et cela est corrélé à la tortuosité de l'artère rétinienne. Les souris OIR avaient une altération fonctionnelle des post-récepteurs dans les zones rétinienne avasculaires, ceci étant corrélé à l'amincissement de la rétine interne. Les variations focales de la vascularisation rétinienne sont également corrélées à l'épaisseur et la fonction rétinienne et suggèrent une atrophie des neurones rétiniens internes ou un retard dans les réponses post-récepteurs des cellules rétiniennes internes (Mezu-Ndubuisi et al, 2018). Les souris exposées à l'OIR montraient une attrition capillaire malgré une revascularisation périphérique ainsi qu'un amincissement de la rétine interne précocement et de la rétine externe plus tardive. Ceci étant accompagné d'anomalies des fonctions interne et externe. L'onde a était relativement conservée mais l'onde b était

diminuée de manière durable, témoignant d'une atteinte de la réponse des post-récepteurs. Histologiquement, la rétine était fine et désorganisée, surtout dans la couche plexiforme externe, et on retrouvait une augmentation de la gliose impliquant les astrocytes et les cellules de Müller, de l'activation microgliale et de l'apoptose dans le temps. Les couches des cellules ganglionnaires, plexiforme interne, plexiforme externe et de manière prédominante la couche nucléaire interne des souris OIR présentaient un amincissement inégal par rapport aux couches correspondantes des souris en normoxie. Les synapses entre les bâtonnets et les cellules bipolaires étaient localisées de manière ectopique, notamment une extension des dendrites des cellules bipolaires de l'OPL dans l'ONL en central et périphérique. En revanche la quantité de cellules bipolaires était similaire en central et diminuée en périphérie. Cela s'accompagnait d'une apoptose plus marquée dans la rétine en OIR et notamment dans les GCL et l'ONL. L'apoptose ne touche pas l'INL, l'OPL ou le RPE mais atteint l'ONL de façon durable. Par ailleurs dans ce modèle, une vaso-oblitération persistante était retrouvée à l'âge adulte en dépit d'une revascularisation complète (Mezu-Ndubuisi et al, 2020)

La rétine des souriceaux exposée à l'hyperoxie conserve l'intégrité des photorécepteurs par rapport aux rats. En revanche l'atteinte de la rétine interne semble plus marquée.

4.5.4 Choix du modèle animal

Plusieurs modèles animaux d'OIR ont été utilisés à travers les années (chat, lapin, souris, rat). A ce jour, les plus souvent utilisés sont le rat et la souris. De manière similaire à la ROP, on peut y retrouver la phase primaire de vaso-oblitération suivie de la phase de néovascularisation. Les modèles d'hyperoxie continue utilisés chez le rat et la souris entraînent une vaso-oblitération centrale. Tandis que chez la souris, la phase de néovascularisation est présente, elle est inconstante chez le rat. En revanche, le modèle de cycling de rat présente une vaso-oblitération périphérique suivie d'une néovascularisation. Il est difficile de comparer précisément tous les modèles car ils n'ont pas eu les mêmes investigations dans la littérature. Il est important de connaître les

spécificités de ceux que l'on utilise, de même que les spécificités liées aux souches de rats. Dans tous les cas, l'atteinte des photorécepteurs est présente et irréversible et semble plus importante en central. Les modèles possèdent des atteintes structurelles spécifiques à chacun mais dans tous les cas, on note une atteinte des cellules de transmission neuronale. Les modèles de cycling sont à l'origine de plus de lésions structurelles et par conséquent fonctionnelles. A ce jour, le modèle de cycling d'OIR est celui qui se rapproche le plus de la physiopathologie de la ROP.

4.6 Physiopathologie de la rétinopathie de la prématurité

4.6.1 Pathogénèse de la ROP

La ROP fait partie des rétinopathies ischémiques, tout comme la rétinopathie diabétique (Rivera et al, 2017a). En cas de naissance prématurée, la vascularisation rétinienne est incomplète à la naissance puisqu'elle atteint l'ora serrata nasale vers 36 SA et l'ora serrata temporale vers 40 SA (Darwich et al 2020). La ROP se développe en deux phases. La première est une phase ischémique, où il existe une vaso-oblitération où a lieu un arrêt de croissance des vaisseaux sanguins et une dégénérescence vasculaire rétinienne et choroïdienne. Plusieurs facteurs de risques, dont l'oxygène est le principal, ont été identifiés et seront discutés plus loin. La deuxième phase est marquée par la prolifération de néovaisseaux pré-rétiens à partir des zones ischémiques. Cette néovascularisation sera d'autant plus délétère qu'elle aura lieu sur une rétine hypoxique, dépourvue de vaisseaux nourriciers qui auront involué à la phase précédente (Rivera et al, 2016). Chez certains nouveau-nés, et essentiellement lorsque le lit vasculaire sous-jacent sera préservé a minima, cette phase sera équilibrée et la vascularisation de la rétine reprendra son cours jusqu'au terme corrigé de la prématurité voire sur une plus longue période, pour une résolution spontanée de la ROP. Tandis que dans les cas les plus sévères, cette néovascularisation sera excessive et anarchique, conduisant au développement de la ROP

sévère qui pourra entrainer un décollement de rétine et une cécité en l'absence de traitement adéquat (Rivera et al, 2017a).

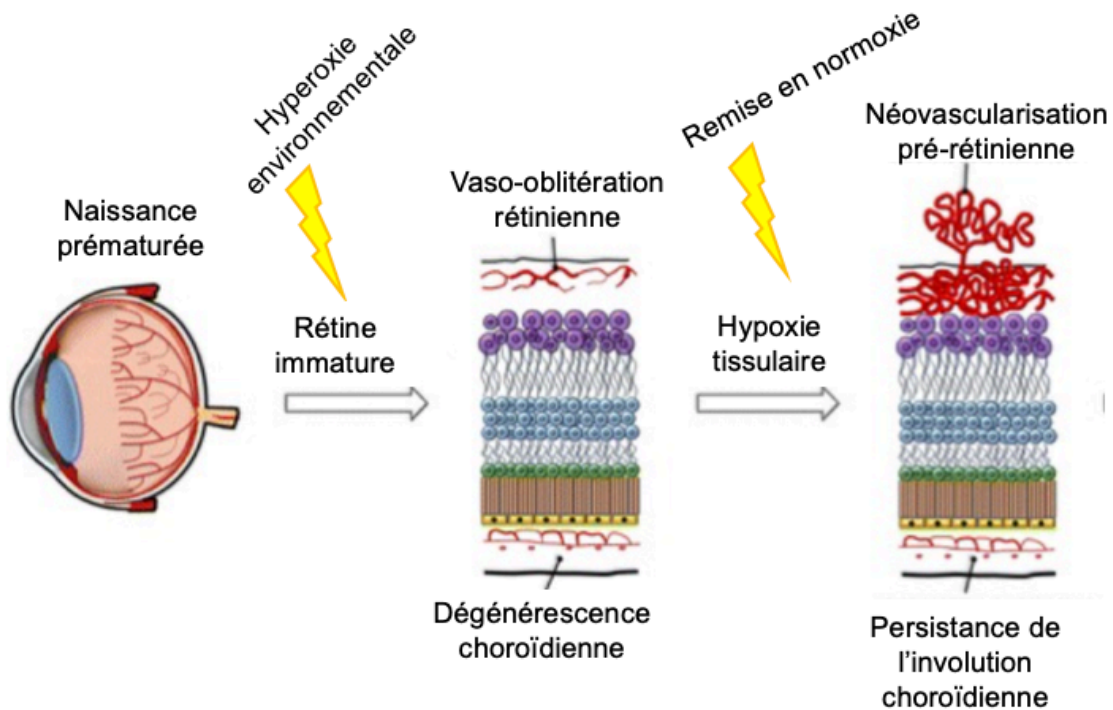


Figure 19: Physiopathologie de la ROP. La ROP est une pathologie complexe et multifactorielle touchant la rétine incomplètement vascularisée des nouveau-nés prématurés. La première phase correspond à une dégénérescence microvasculaire dans les plexus vasculaires rétiniens et choroïdiens, causée par une hyperoxie environnementale. La deuxième phase correspond à une néovascularisation pré-rétinienne pathologique survenant sur une rétine hypoxique par ischémie. Cette néovascularisation peut soit régresser, menant à une reprise de vascularisation normale, soit se majorer et conduire à un décollement de rétine et une cécité. L'involution choroïdienne vasculaire persiste quant à elle dans le temps.

Figure adaptée de (Rivera et al, 2016)

4.6.2 Mécanismes impliqués dans cette rétinopathie ischémique

4.6.2.1 Hyperoxie environnementale initiale

Plus les enfants sont petits en âge gestationnel et en poids de naissance, plus leur vascularisation rétinienne s'arrête tôt et plus ils ont des besoins accrus en oxygène, ceci expliquant pourquoi l'âge gestationnel et le poids de naissance faibles sont en soi des facteurs de risque non modifiables.

Le nouveau-né prématuré est exposé à une situation d'hyperoxie relative dès sa naissance puisqu'il passe, en quelques minutes, d'un environnement intra-utérin pauvre en oxygène à l'état normoxique ambiant, le faisant passer d'une saturation en oxygène d'environ 60% à 90% en quelques minutes (Mortone et al, 2016). A cela s'ajoute parfois un environnement plus hyperoxique, quand le nouveau-né prématuré a besoin d'apport en oxygène supplémentaire pour compenser l'immaturation de certains organes et répondre à ses besoins, ce qui entrainera malheureusement un stress oxydatif prolongé (Vento et al, 2001). Or le nouveau-né-prématuré présente des défenses anti-oxydantes immatures (Thibeault, 2000)

Par ailleurs, il a été montré que les fluctuations d'oxygénation augmentent le risque de ROP sévère (York et al 2004).

4.6.2.1.1 Induction des perturbations angiogéniques initiales par l'hyperoxie

Le VEGF (vascular endothelial growth factor) est le facteur angiogénique le plus impliqué dans le développement de la ROP et est intimement dépendant de l'oxygène (Kermorvant-Duchemin et al, 2010). L'hyperoxie supprime des facteurs de croissance clé tels que HIF, qui est composé de deux sous-unités α et β qui doivent s'hétérodimériser pour être actives. Alors que HIF-1 α a une demi-vie brève en condition normoxique, il est stabilisé en condition hypoxique, ce qui lui permet de se déplacer dans le noyau cellulaire où il peut se dimériser avec la sous unité β et initier la transcription de gènes cibles en

réponse à l'hypoxie. Ainsi, HIF, par son inhibition contribue à la phase de vaso-oblitération et par son activation par l'hypoxie tissulaire à la phase de néovascularisation. En effet, HIF induit d'une part la transcription de clusters de gènes pour favoriser la perfusion tissulaire et d'autre part la production de facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et l'EPO. Ainsi, en condition d'hyperoxie l'expression de VEGF et EPO est supprimée, ce qui contribue à un arrêt du développement vasculaire et une atteinte de la survie endothéliale. Le VEGF est sécrété directement par les cellules ganglionnaires et les astrocytes pour stimuler l'angiogenèse locale des cellules endothéliales de la rétine. L'EPO est quant à elle une hormone produite par le parenchyme rénal en réponse à l'hypoxie ou l'anémie pour stimuler la production de globules rouges et a une action cytoprotectrice durant l'hyperoxie vis-à-vis du lit vasculaire rétinien et protège les neurones rétiniens de l'apoptose en phase précoce de la rétinopathie et peut aider à la réparation vasculaire par recrutement de cellules souches proangiogéniques dans la rétine (Sapieha et al, 2010). Ainsi la rétine va devenir ischémique.

4.6.2.1.2 Mécanismes moléculaires liés à l'état d'ischémie rétinienne

Par ailleurs, lors de cette phase d'ischémie rétinienne, le métabolisme oxydatif est en partie mis en pause, ce qui va favoriser l'accumulation intracellulaire de succinate par inhibition de l'enzyme succinate déshydrogénase. L'accumulation du succinate va alors activer le *G-protein-coupled receptor* (GPR) 91, un récepteur au succinate fortement exprimé dans la rétine interne, qui lorsqu'il est activé, contribue à la production de VEGF, Ang1, Ang2 (Sapieha et al, 2008). De la même façon, la production de lactate est augmentée en condition ischémique, ce qui va activer le GPR 81 et entraîner la production de facteurs pro-angiogéniques via la voie de signalisation Norrin/Wnt et contribuer à la néovascularisation pathologique post-ischémique (Madaan et al, 2019). Ainsi, le GPR 91 et le GPR 81 contribuent à la néovascularisation pathologique secondaire par accumulation préalable du succinate et de lactate induite par l'hypoxie tissulaire et une

supplémentation précoce pourrait prévenir la vaso-oblitération et donc la revascularisation pathologique.

4.6.2.1.3 Stress oxydant et nitro-oxydant

Le stress oxydant, ou stress oxydatif, contribue de manière importante à la pathogénèse des rétinopathies ischémiques (Rivera et al, 2017a).

Le stress oxydant correspond au fait, qu'après un stimulus donné, les niveaux intracellulaires d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) sont augmentés et endommagent les protéines, les lipides et l'ADN. La production d'anion superoxyde O_2^- est issue soit de l'oxydation de NADPH en présence d'oxygène par l'enzyme *Nicotamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxydase* (NOX), soit de la perte d'électrons par la respiration aérobie des mitochondries. L'anion superoxyde va ensuite être transformé en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par l'enzyme superoxyde dismutase. Le peroxyde d'hydrogène va alors pouvoir oxyder les résidus cystéine des protéines pour initier l'oxydoréduction. H_2O_2 peut être converti en eau H_2O par des protéines cellulaires antioxydantes. Néanmoins, lorsque son niveau est trop élevé, ces protéines sont dépassées et des radicaux hydroxyles sont formés. Après réaction avec des cations ferriques Fe^{2+} , ils induisent des dommages irréversibles sur l'ADN et les lipides. Les ROS peuvent également activer des voies de signalisation. Les niveaux standards de ROS permettent de maintenir un système immunitaire sain. Des niveaux augmentés de ROS vont induire l'inflammasome et entraîner le relargage de cytokines, telles qu'IL-1 β , TNF- α , ou encore IFN- β . Par ailleurs, le niveau élevé de ROS peut induire la sénescence cellulaire car ils présentent un risque élevé d'épuisement des cellules souches et de vieillissement prématuré par hyperactivation des voies de signalisation favorisant l'inflammation et la mort cellulaire (Schieber et al, 2014). Or l'hyperoxie est l'un des principaux facteurs de risque de formation d'espèces réactives à l'oxygène.

La rétine du prématuré est un tissu aux défenses anti-oxydantes immatures. En effet, face à l'augmentation des ROS, l'autorégulation du flux sanguin oculaire est déficiente, notamment via le maintien d'une circulation choroïdienne à haut débit en condition d'hyperoxie, ce qui va entraîner un apport excessif d'oxygène au tissu rétinien. L'hypercapnie associée va quant à elle augmenter le flux sanguin par production de NO via la PGE2 et eNOS. Le tout contribuant à la phase ischémique par réduction du VEGF. Les activités COX et NOX sont importantes en période néonatale et se potentialisent dans la formation de radicaux libres. L'augmentation de l'activité COX produit plus de prostaglandines, notamment PGD₂ et PGE₂, qui vont augmenter eNOS et donc la production de NO, ce qui va contribuer à l'augmentation du flux sanguin et le stress oxydant. De plus, les ROS vont pouvoir interagir avec le NO pour générer des espèces azotées hautement réactives, telles que le peroxydinitrite, le nitroxyde et le dinitroxyde, ce qui va induire des effets délétères sur la fonction cellulaire et une dégénérescence vasculaire. eNOS contribue ainsi à la dégénérescence vasculaire à l'origine de la néovascularisation secondaire. iNOS, qui est augmentée en condition d'hypoxie empêche la revascularisation rétinienne normale et contribue à la néovascularisation pathologique. Le stress oxydant et la peroxydation vont induire COX et la phospholipase-A2, qui vont transformer l'acide arachidonique en prostanoides. La production de thromboxane A2 est favorisée aux dépens des prostaglandines, ce qui entraîne une vasoconstriction et une cytotoxicité au niveau de la microvascularisation. Les isoprostanes formés par la peroxydation de l'acide arachidonique sont libérés par les phospholipases et sont indirectement cytotoxiques par la stimulation de la production de thromboxane A2. Par ailleurs le stress nitratif induit une trans-isomérisation de l'acide arachidonique, qui va contribuer à la dégénérescence vasculaire par induction de thrombospondine-1 qui a un effet anti-angiogénique et pro-apoptotique (Sapieha et al, 2010).

Par ailleurs, la rétine contient beaucoup de molécules photosensibles, qui pourront générer des radicaux libres sous stimulation lumineuse. De plus, chez le nouveau-né, on

trouve plus de fer libre dans les tissus neuronaux, ce qui favorise les réactions oxydatives. Parmi les enzymes contribuant à la génération de radicaux libres, on retrouve l'*endothelial cell xanthine oxydase*, COX, NOS et moindrement la voie de la lipo-oxygénase. Les activités de COX et NOX sont élevées en période néonatale. Le stress oxydant va induire une vasoconstriction, une altération de l'agrégation plaquettaire et des effets cytotoxiques directs, des modifications du tonus vasculaire rétinien, dont l'effet va dépendre du type de vaisseaux et du type et de la concentration de radicaux libres. La vasoconstriction induite par les radicaux libres est plus prononcée chez les sujets immatures du fait de la modification de PGI₂ en thromboxane A₂ via la platelet thromboxane synthase. Ces ROS vont être à l'origine d'une peroxydation lipidique, ce qui va altérer les membranes cellulaires tant dans leur fonction que leur intégrité. Les cellules endothéliales rétiniennes sont par ailleurs particulièrement sensibles aux effets délétères de la peroxydation. En effet, la rétine est riche en acides gras poly-insaturés (environ 20% de son poids sec) dont le DHA 22:6 ω -3, l'acide arachidonique 20:4 ω -6, la choline phosphoglycéride, qui sous l'influence des ROS, vont induire la production de thromboxane A₂, du facteur d'activation plaquettaire et des isoprostanes, ce qui va entraîner une vaso-oblitération par cytotoxicité sur l'endothélium rétinovasculaire. Les antioxydants sont des molécules qui peuvent interagir avec les ROS et mettre fin à la réaction de peroxydation avant qu'il y ait un impact négatif sur les molécules vitales. Les anti-oxydants, tels que l'hème oxygénase-1, la métallothionine, la Cuivre-Zinc superoxyde dismutase, la catalase, les vitamines C et E et la glutathion peroxydase ont une concentration diminuée dans les tissus rétiniens des nouveau-nés, leur donnant des défenses anti-oxydantes immatures et les rendant beaucoup plus sensibles aux effets toxiques des ROS. Dans les atteintes tissulaires d'ischémie-reperfusion, il a été décrit le rôle déterminant de l'adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales dans l'initiation et les insultes de reperfusion. D'ailleurs, on note une activité augmentée de la NADPH oxydase dans le processus oxydatif, conduisant à une mort cellulaire (Hardy et al, 2005).

Par ailleurs, le stress oxydatif en phase de vaso-oblitération rétinienne induit la formation d'acide trans-arachidonique par nitration, ce qui va pouvoir entraîner une dégénérescence microvasculaire par expression de thrombospondine-1, un facteur anti-angiogénique connu (Leduc et al, 2006).

4.6.2.1.4 Voies identifiées dans la phase de néovascularisation post-ischémique

Lors de la phase de néovascularisation post-ischémique, l'expression de VEGF-A et PlGF augmentent, ce qui va pouvoir induire l'angiogénèse, avec un effet plus néfaste par le VEGFR-1 que le VEGFR-2, notamment de par la transcription secondaire de facteurs pro-inflammatoires (Uemura et al, 2021).

Les modèles d'OIR chez le rat et la souris retrouvent la présence d'amas néovasculaires aberrants en phase de néovascularisation post-ischémique, correspondant à des amas et des nappes de cellules endothéliales protubérants au niveau de l'interface vitréo-rétinienne à la limite de la rétine vascularisée/avasculaire. Ces lésions s'apparentent aux lésions « pop corn » décrites en clinique mais ont un intérêt plus clair en science expérimentale pour contribuer à l'étude de la revascularisation post-ischémique. En effet, ces formations vasculaires sont immatures, hyperperméables, hyperplasiques et sont poussées vers le vitré, constituant une néovascularisation prérétinienne. Elles sont par ailleurs englobées d'extensions membraneuses et peuvent contribuer à un décollement de rétine tractionnel. On peut remarquer des anomalies vasculaires associées dans les couches intermédiaires et profondes des plexus vasculaires (Penn et al, 1993;;Penn et al, 1994; Smith et al, 1994; Stahl et al, 2010; Lange et al, 2009; Vähätupa et al, 2020). Enfin, ces touffes néovasculaires sont constituées de cellules endothéliales hyperprolifératives, de cellules endothéliales sénescents et de péricytes sénescents (Dubrac et al, 2018; Binet et al, 2020).

Le VEGF est impliqué dans la formation de ces amas néovasculaires. Néanmoins, il est intéressant de noter que les souris exposées à une hyperoxie continue de longue durée

finissent par reprendre une revascularisation normale sans formation de touffes néovasculaires, indiquant que la forte expression de facteur de croissance induits par l'hypoxie, comme le VEGF, entraîne ces formations néovasculaires lors du retour en normoxie. Néanmoins, l'utilisation d'anti-VEGF bloque à la fois la néovascularisation pathologique et la revascularisation (Scott et al, 2010; Tokunaga et al, 2014; Vähätupa et al, 2020).

Le 2-azahypoxanthine a un effet inhibiteur sur l'induction et la stabilisation de HIF-1 α , ce qui conduit à une augmentation de VEGF *in vitro*. *In vivo* dans le modèle OIR de souris, l'injection de 2-azahypoxanthine de P12 à P16 entraîne une diminution de la néovascularisation et des touffes néovasculaires sans modification de la vaso-oblitération résiduelle par rapport aux souris OIR contrôle (Lee et al, 2020).

L'impact de la matrice extracellulaire est important dans la formation de ces amas néovasculaires. Le *Cellular communication Network Factor 1* (CCN1) est sécrété par les péricytes. Les souris génétiquement modifiées pour avoir une perte de CCN1 spécifique à la cellule endothéliale présentaient plus de touffes vasculaires dans le modèle d'OIR. Inversement, celles présentant une perte de CCN1 spécifique au péricyte ont présenté une néovascularisation réduite. La perte de fonction de CCN1 dans les péricytes a entraîné une réduction de 78% et de 82% de la néovascularisation pathologique par rapport aux souris non mutées et celles génétiquement modifiées pour la perte de CCN1 spécifique à la cellule endothéliale, respectivement. Par ailleurs, la revascularisation avait tendance à être améliorée chez ces souris et les touffes néovasculaires présentes étaient plus petites et composées de quelques cellules endothéliales coiffées de péricytes. Ainsi, la perte de CCN1 spécifique au péricyte réduit les signaux angiogéniques favorisant la formation de touffes néovasculaires. La surexpression de CCN1 dans les péricytes augmente l'expression du ligand Wnt5a, qui par stimulation paracrine va inhiber la synthèse de CCN1 dans les cellules endothéliales et conduire à une hyperprolifération à l'origine des touffes néovasculaires. L'inhibition de Wnt5a supprime la néovascularisation rétinienne pathologique (Lee et al, 2017), en faisant une cible intéressante.

L'EphrinB2, un récepteur de la tyrosine kinase, est localisée dans les cellules endothéliales. En normoxie, son inhibition conduit à un retard de développement vasculaire. Elle ne semble pas avoir d'impact en phase de vaso-oblitération rétinienne dans l'OIR puisque la surface avasculaire est similaire, au moment de la remise en normoxie, chez les souris contrôle et les souris avec EphrinB2 inhibée. Cependant, l'inhibition d'EphrinB2 en OIR diminue la néovascularisation post-ischémique et la formation de touffes néovasculaires mais n'améliore pas la revascularisation. De plus, elle augmente la formation de capillaires borgnes et de filopodes endothéliaux (Taylor et al, 2012). Ainsi, l'EphrinB2 semble contribuer au processus de néovascularisation et formation des touffes néovasculaires.

Le stress hypoxique augmente l'expression de Méthyltransférase 3 (METTL3) de manière HIF médiée, ce qui augmente l'expression de N6-méthyladénosine dans les cellules endothéliales. METTL3 a une action pro-angiogénique dans les cellules endothéliales. L'inhibition de METTL3 *in vitro* entraîne une dégradation de la migration, la prolifération des cellules endothéliales ainsi qu'une altération de la tubulogénèse. METTL3 régule l'activation de la signalisation Wnt par la modulation de ses gènes cibles LRP6 et DVL1. Ainsi la suppression de METTL3 diminue l'expression de LRP6 et DVL1, ce qui atténue la signalisation Wnt, qui entraîne une diminution l'expression de VEGF. *In vivo*, la suppression de METTL3 dans les souris diminue la formation de touffes néovasculaires et améliore la revascularisation (Yao et al, 2020).

Par ailleurs, STAT3 est activée dans toutes les cellules de la rétine de souris OIR ainsi que dans la vascularisation hyaloïdienne de P14 à P22. L'inhibition systémique de STAT3 à P14 supprime la formation des touffes néovasculaires et altère la revascularisation rétinienne. En revanche, l'inhibition de STAT3 par injection intravitréenne réduit la formation de touffes néovasculaires et améliore la revascularisation post-ischémique. Bien qu'après inhibition de STAT3, l'expression de TGFb1, IL-1 β , TNF- α et CCL2 reste augmentée par rapport aux souris en normoxie, la sécrétion de TGFb1 est diminuée par l'inhibition de STAT3 en OIR par rapport aux souris en OIR contrôle, suggérant une cible spécifique. Par ailleurs, la vascularisation hyaloïdienne semble être une source de cellules myéloïdes

actives sécrétant STAT3 et la sévérité de formation des touffes néovasculaires étaient corrélée à la densité de cellules myéloïdes activées dans la vascularisation hyaloïdienne. La délétion de SOCS3 dans les cellules myéloïdes augmente l'expression de STAT3 et augmente la néovascularisation pathologique. L'augmentation du nombre de touffes néovasculaires était en outre associée à une réduction de la vaso-oblitération (Hombrebueno et al, 2020). Ainsi, les cellules rétinienne, mais aussi la vascularisation hyaloïdienne, semblent agir sur la néovascularisation post-ischémique via STAT3.

En normoxie, la sécrétion endothéliale de PDGF- β est nécessaire pour le recrutement des péricytes. L'activation de PDGFR β à la surface des péricytes conduit à l'activation et la migration de péricytes de manière PAK dépendante via NCK1 et NCK2. Dans l'OIR, Les touffes néovasculaires sont associées à une augmentation de l'expression de VEGF-a et PDGF- β . Dans cette condition, l'augmentation de PDGF- β active un phénotype sénescence de péricytes. Ces péricytes altérés vont contribuer à la néovascularisation pathologique et inhiber la revascularisation par induction de NCK1 et NCK2 (Dubrac et al, 2018). Ainsi, le blocage de NCK1/2 est une piste thérapeutique intéressante, de même que l'inhibition de PDGF-b.

4.6.2.2 Rôle de l'inflammation

L'inflammation, qu'elle soit prénatale, périnatale ou postnatale est impliquée de manière importante dans la pathogenèse de la ROP en contribuant à une pré-phase, sensibilisant la rétine pour des insultes ultérieures (Lee et al, 2013 ; Rivera et al, 2017a).

Récemment, il a été montré que l'inflammation anténatale contribuait à la vaso-oblitération rétinienne et choroïdienne en période périnatale, notamment par la cytokine IL-1 β (Beaudry-Richard, 2018). Une étude clinique a objectivé que certaines cytokines étaient associées à la ROP chez les nouveau-nés prématurés de poids de naissance inférieur à 1000g : IL-6 et IL-17 en période postnatale précoce (J0 à J3), BDNF et RANTES

en période plus tardive (J7 à J21) et IL-18, CRP et neurotrophin-4 dans les deux périodes (Sood et al, 2010).

La sécrétion d'IL-1 β par les cellules microgliales en phase de vaso-oblitération dans l'OIR maintient l'activation de la microglie et induit des lésions microvasculaires par la libération de sémaphorine 3A (Sema3a) par les cellules ganglionnaires adjacentes, contribuant ainsi à la vaso-oblitération (Rivera et al, 2013). L'inflammation dans la rétine hypoxique durant l'OIR induit la sécrétion par les cellules ganglionnaires de Sema3a, qui, en plus de participer à la vaso-oblitération, va secondairement entraver la revascularisation normale au profit de la néovascularisation pré-rétinienne sur une balance inadéquate entre l'expression locale de Sema3a, pro-apoptotique et anti-angiogénique, et de VEGF, pro-angiogénique. En effet, lors de la phase post-ischémique, les cellules ganglionnaires stressées exprimant Sema3a dans la zone avasculaire contribuent à favoriser la dégénérescence du système vasculaire environnant en déviant les néovaisseaux les plus ischémiques dans le but de redistribuer les ressources métaboliques aux zones viables, ce qui va entraîner une répulsion des touffes néovasculaires vers le vitré. Un traitement par recombinant de Sema3A en intravitréen durant la phase de néovascularisation permet de réduire la formation des touffes néovasculaires et de prévenir la déviation de la néovascularisation vers le vitré (Joyal et al, 2011).

Il a par ailleurs été montré le cofacteur BH4, ou tétrahydrobioptérine, permet de prévenir l'activation microgliale induite par l'hyperoxie et régule négativement des cytokines pro-inflammatoires. Le BH4 est diminué en OIR, ce qui est associé à une augmentation de production de ROS et par conséquent d'une majoration de l'inflammation, et notamment des cytokines IL-1 β , IL-6 et la protéine *NOD-like receptor family pyrin domain containing-3* (NLRP3) et une dégénérescence microvasculaire (Rivera et al, 1017b).

L'inflammation systémique précoce induite par LPS provoque une inflammation rétinienne et altère l'angiogenèse rétinienne chez le rat en induisant une vaso-oblitération, suivi d'une majoration de la tortuosité et dilatation vasculaire avec présence de touffes néovasculaires et formation d'un bourrelet, similairement à ce qui est observé chez l'homme dans la ROP. Parallèlement, on notait une infiltration des cellules CD11+ en central et périphérique et une augmentation transitoire des cytokines TNF- α , IL-1 β et IL-12 et de l'apoptose. Plus tardivement, la rétine était plus fine, montrant un défaut de développement (Hong et al, 2014).

L'ischémie est associée à des manifestations inflammatoires, car elle induit une voie de signalisation qui attire les macrophages dans les zones hypoxiques par l'expression de chimiokines telles que la protéine chimiotactique des monocytes-1 (MCP-1). Les macrophages et la microglie activés par l'hypoxie, libèrent du TNF- α , qui stimule la libération d'IL-8, de MCP-1 dans les cellules endothéliales ou dans les cellules de la microglie rétinienne, participant ainsi à la néovascularisation rétinienne durant l'inflammation post-ischémique en induisant des facteurs angiogéniques, tels qu'IL-8, VEGF ou bFGF de manière autocrine ou paracrine. Cette induction dépendante du TNF- α est en partie médiée par l'activation de NF- κ B (Pierce et al 1995, Yoshida et al 1997, Yoshida et al 2004). L'inhibition de TNF α prévient l'hypoxie rétinienne induite par la vaso-oblitération et la phase de néovascularisation dans l'OIR (Gardiner et al, 2005). MCP-1 est exprimé par la microglie activée dans la neurorétine. Les nouveau-nés prématurés qui ont des concentrations de MCP-1 plus élevées dans le sang de cordon ombilical ont tendance à développer une ROP. MCP-1 est associée avec la néovascularisation rétinienne, probablement pas attraction des macrophages et de la microglie durant la phase ischémique (Rivera et al, 2017a). Par ailleurs l'ischémie rétinienne entraîne un relargage de différents facteurs solubles dans le vitré tels que des cytokines, des chemokines et des facteurs de croissance (dell'Omo et al 2013).

L'inflammation postnatale sévère par induction par LPS induit un développement vasculaire anormal et entraîne une majoration de l'activation microgliale dans la couche de cellules ganglionnaires et la couche plexiforme externe juste avant leur vascularisation. Cette activation touche la rétine centrale et périphérique au niveau des plexus superficiels, intermédiaires et profonds avec une normalisation dans le temps pour les plexus intermédiaires et profonds mais un maintien au niveau superficiel. Par ailleurs, de manière intéressante, la microglie n'augmente que secondairement dans la zone du plexus intermédiaire, correspondant probablement à une forte migration initiale dans le plexus superficiel. Il existait un contact direct entre la microglie activée et les vaisseaux germinaux, suggérant une implication de la microglie dans l'initiation de la vascularisation aberrante. Le lit vasculaire rétinien restait appauvri à l'âge adulte et la fonction rétinienne était diminuée à l'électrorétinographie. L'inflammation postnatale sévère est impliquée dans la genèse de la rétinopathie induite à l'oxygène et ce, de manière permanente (Tremblay et al, 2013).

L'OIR entraîne une activation de la microglie et des macrophages. L'activation du phénotype M1 pro-inflammatoire a été retrouvé dès la phase de vaso-oblitération et contribue à la néovascularisation et la formation des touffes néovasculaires via l'activation de la voie de signalisation NF- κ B-STAT3. Cette activation entraîne également l'expression à la hausse du TNF- α , de l'IL-6 et de l'IL-1 β . La polarisation du phénotype M2 se met en place tardivement, bien après le début de la néovascularisation et est induite par la voie de signalisation IL-4-STAT6-PPAR- γ qui conduit à l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires et la régression des touffes néovasculaires (Li et al, 2021).

Il a également été retrouvé dans l'OIR une involution choroïdienne, IL-1 β dépendante, à l'origine d'une altération de la rétine externe avec altération fonctionnelle permanente induite (Zhou et al, 2016). Dans l'inflammation induite par IL-1 dans les rétinopathies ischémiques, l'axe CD40 joue un rôle important. Le CD40 ligand est une protéine transmembranaire dont la partie extracellulaire est apparenté au récepteur du TNF, ce qui lui permettra d'enclencher la signalisation TRAF et donc la sécrétion de TNF- α et IL-

1 β . Il est par ailleurs capable de majorer la vasoblitération de par sa fonction d'activation plaquettaire et son action pro-inflammatoire vasculaire par sécrétion de chimiokines et de molécules d'adhésion (Aouiss et al, 2019).

L'IL-12 a un effet antiangiogénique sur la néovascularisation pathologique et préserve la revascularisation. Elle n'a pas d'action anti-angiogénique directe mais l'IFN- γ semble être un médiateur clé dans les effets anti-angiogéniques liés à l'IL-12 (Zhou et al, 2016).

Au pic de néovascularisation, une activation de l'immunité a été mise en évidence avec un recrutement tardif des neutrophiles dans les touffes néovasculaires où ils peuvent former des pièges extracellulaires de neutrophiles (NETs). Alors que plusieurs populations cellulaires de la rétine subissent une sénescence cellulaire dans l'OIR, les populations non neuronales et neuronales adoptent des signatures transcriptionnelles sécrétoires différentes. L'endothélium vasculaire sénescence déclenche la libération de NETs dans les touffes néovasculaires via un sécrétome touchant essentiellement le système immunitaire, l'hémostase et l'organisation de la matrice extracellulaire et notamment une augmentation d'IL-1 β et CXCL1. Les NETs remodelent la vascularisation rétinienne à travers l'élimination apoptotique des cellules endothéliales sénescences. La suppression des NETs au pic de néovascularisation accentue la néovascularisation et diminue la revascularisation. Ainsi les NETs sont nécessaires à la régression des touffes néovasculaires et à l'amélioration de la revascularisation (Binet et al, 2020).

En modèle pré-clinique, il a été montré que l'utilisation de traitements anti-inflammatoires, tels que la dexaméthasone ou l'ibuprofène, durant la phase précoce réduisait la sévérité de la rétinopathie ischémique (Rotschild et al 1999, Sharma et al 2003).

L'inflammation est donc une composante importante du développement des rétinopathies ischémiques, que ce soit dans la phase d'ischémie tissulaire initiale et la

phase de néovascularisation pathologique secondaire, mettant en jeux de multiples mécanismes.

4.6.2.3 Rôle de la sénescence

L'ischémie rétinienne est liée à un processus inflammatoire et apoptotique mais déclenche également la sénescence cellulaire via l'augmentation de p53, p16^{INK4a}, *plasminogen activator inhibitor 1*, *promyelocytic leukemia protein* et γ H2AX., l'activation de *l'inositol-requiring enzyme 1 α* (IRE1 α) induisant le stress du réticulum endoplasmique, et l'augmentation des cyclin-dependent kinase inhibitors Cdkn1a et Cdkn2a. A P17, la sénescence cellulaire est aussi identifiée dans les touffes néovasculaires et on note moins de couverture péricytaire au niveau vasculaire. A P21, la rétine est revascularisée, la sénescence est alors confinée aux cellules vasculaires et la couverture des péricytes est quant à elle restaurée. Il s'agit donc d'un processus dynamique où l'ischémie rétinienne entraîne une sénescence prématurée des cellules rétiniennes, qui vont avoir un sécrétome inflammatoire avec augmentation d'IL-6, IL-1 β , TGF- β 1, *plasminogen activator inhibitor 1*, VEGF-a, IRE1 α et Tp53. Ce sécrétome va entraîner un effet de sénescence paracrine qui va exacerber la néovascularisation pathologique et limiter la régénération vasculaire. En outre, les cellules sénescents intrarétiniennes sécrètent de manière augmentée la Sema3a, ce qui conduit à la sénescence des cellules endothéliales par effet paracrine et activation de p53, contribuant à la formation des touffes néovasculaires. Par ailleurs, l'atténuation thérapeutique de la sénescence IRE1 α -médiée des cellules ganglionnaires et de la microglie, initialement induite par l'OIR, a permis une amélioration de l'angiogenèse réparatrice et une diminution de la néovascularisation pré-rétinienne pathologique en comparaison à l'utilisation d'anti-VEGF, qui a seulement permis un arrêt de la néovascularisation pathologique mais n'améliore pas la régénération vasculaire ni ne réduit la sénescence (Oubaha et al, 2016).

4.6.2.4 Rôle de l'hyperglycémie

L'hyperglycémie est désormais reconnue comme un facteur de risque de ROP même si la relation physiopathologique n'est pas bien documentée (Lei et al, 2010). L'hyperglycémie est une condition fréquente chez les grands prématurés et survient essentiellement durant les premières semaines de vie. Celle-ci est liée à une perturbation de la balance entre la néoglucogenèse hépatique et l'utilisation de glucose, de par la production d'insuline immature et une insulino-résistance relative (Mitanchez-Mokhtari et al, 2004). Une étude de cohorte récente a montré que l'exposition à des concentrations élevées de glucose dans le sang était un facteur de risque indépendant de ROP sévère. Fait intéressant, l'association de l'exposition moyenne globale et la durée d'hyperglycémie semblait avoir un impact plus fort qu'une seule valeur élevée de glycémie pour déterminer le risque de ROP sévère (Kermorvant-Duchemin et al, 2020). L'hyperglycémie sur des rétines de rats immatures contribuait à une vaso-oblitération rétinienne, avec une activation de l'inflammation et notamment une sécrétion majorée de CCL2 qui induira un recrutement microglial et une majoration de l'apoptose, conduisant à une dégénérescence neuronale de la couche nucléaire interne (Kermorvant-Duchemin, 2013). Physiopathologiquement, nous savons que l'hyperglycémie entraîne une augmentation du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-6, de l'IL-8 et du PG-E2 dans les rétinopathies diabétiques, un autre type de rétinopathie ischémique (Semeraro et al, 2015).

4.6.2.5 Rôle de l'Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)

L'IGF-1 est une hormone de croissance polypeptidique qui est importante pour la croissance fœtale (Liu et al, 1993) et postnatale (Baker et al, 1993). Elle augmente particulièrement lors du troisième trimestre de grossesse. En effet sa concentration plasmatique fœtale moyenne est stable à environ 50-60 $\mu\text{g/l}$ entre 19 et 30 SA pour augmenter de manière importante jusqu'à environ 140 $\mu\text{g/l}$ à 40 SA (Hellström et al, 2016). Lors d'une naissance prématurée, son taux plasmatique diminue drastiquement,

du fait de l'arrêt d'apport placentaire et amniotique. En effet, les nouveau-nés prématurés ont une concentration placentaire moyenne d'IGF-1 d'environ 10 µg/l entre 23 et 30 SA pour atteindre lentement 50 µg/l à 40 SA (Hellström et al, 2016). L'IGF-1 a un rôle important dans le développement des organes et tissus. Chez les nouveau-nés prématurés, une faible concentration plasmatique en IGF-1 est liée à une altération du système nerveux central, des poumons, du système cardio-vasculaire, du métabolisme glucidique (Hellström et al, 2016). Le faible niveau d'IGF-1 plasmatique a été rapporté comme facteur de risque de ROP et notamment de sévérité de ROP, tant en clinique (Hellström et al, 2003) que dans les modèles précliniques où il a été montré que IGF-1 est important pour le développement vasculaire et que le faible niveau d'IGF-1 favorise la vaso-oblitération rétinienne, indépendamment de la présence de VEGF, par un mécanisme d'empêchement de l'activation de la protéine kinase B (Akt) par le VEGF dans les cellules endothéliales rétinienne, par altération de leur survie (Hellström et al, 2001). Par ailleurs, IGF-1 est nécessaire à la stimulation maximale de la voie MAPK par le VEGF, ce qui contribue à la prolifération des cellules endothéliales rétinienne.

Une fois la rétine avasculaire et hypoxique, l'augmentation secondaire de VEGF liée à la diminution de l'environnement hyperoxique est potentialisée par l'augmentation d'IGF-1, en lien avec la reprise de croissance. En effet, dans ce contexte, au-delà d'un seuil critique de niveau d'IGF-1, l'activation de la protéine kinase B (Akt) par le VEGF est majorée, de même que celle de la voie MAPK (p44/42), conduisant à une prolifération anarchique de néovaisseaux. Une inhibition de cette néovascularisation a pu être obtenue par utilisation d'un antagoniste du récepteur de l'IGF-1 (Hellström et al, 2001; Smith et al 1999).

4.7 Complications visuelles associées au long terme

En dehors de la ROP, la prématurité est un facteur de risque de différents troubles oculaires, tels que les troubles réfractifs (myopie, astigmatisme, anisométrie), l'amblyopie, le strabisme, le trouble de la vision des couleurs et la cécité corticale

secondaire à une atteinte cérébrale. Ces troubles de la vision sont par ailleurs intimement liés à une baisse du quotient intellectuel (Birch et al, 2005; Fielder et al, 2015; Geldof et al, 2015).

De façon intrigante, il a récemment été démontré que contrairement à la néovascularisation pathologique pré-rétinienne observée lors de la ROP, la choroïde, un tissu pourtant hautement vascularisé, est incapable de se régénérer en réponse à l'hypoxie, ceci entraînant un impact à long terme sur les photorécepteurs et donc sur la fonction visuelle dans les modèles animaux (Zhou et al, 2016; Zhou et al, 2019). Chez l'homme, l'impact de la ROP sur l'épaisseur de la choroïde semble inconstante dans la littérature. Bien qu'il ait été rapporté une choroïde épaissie chez des enfants ayant présenté une ROP en période néonatale (Fieß et al, 2017), plusieurs auteurs retrouvent des données concordantes aux données apportées par les sciences fondamentales (Bowl et al, 2018; Rezar-Dreindl et al, 2020). Plus spécifiquement, la sévérité de la ROP est associée à la finesse de la choroïde chez l'enfant. En effet, comparé aux enfants étant nés à terme, il a également été observé que la choroïde dans la zone fovéolaire était environ 22% plus fine chez les enfants ayant présenté une ROP régressant spontanément et une choroïde d'environ 53% plus fine chez les enfants ayant dû être traités pour leur ROP. Les enfants ayant eu une ROP sévère avaient une choroïde plus fine de 34% par rapport à celle de ceux ayant présenté une ROP qui a régressé spontanément (Bowl et al, 2018).

Dans une récente étude évaluant des enfants entre 5 et 15 ans, on peut noter que l'acuité visuelle était moins bonne chez les enfants nés prématurément comparés à ceux nés à terme et que parmi les nouveau-nés prématurés, ceux ayant présenté une ROP, tout stade confondu, avaient une acuité visuelle significativement moins bonne que ceux n'ayant pas eu de ROP. Il n'y avait en revanche pas de différence d'épaisseur de choroïde entre ces différents groupes. Cependant, les enfants nés prématurément et ayant présenté une ROP avaient un index de vascularisation choroïdienne plus faible que les enfants nés prématurément mais n'ayant pas présenté de ROP ou encore les enfants nés à terme. Il y avait par ailleurs une corrélation négative entre cet index et l'acuité visuelle

(Lavric et al, 2020). L'index de vascularisation choroïdienne semble donc être un marqueur intéressant et mérite d'être validé sur une plus large population.

En outre, une altération de la sensibilité aux contrastes a également été observée chez les jeunes adultes ayant présenté une ROP, tout stade confondu (Zhou et al, 2022).

Il n'y a, en revanche, pas de risque majoré de trouble de la vision des couleurs par rapport au risque des nouveau-nés prématurés sans ROP (Dobson et al, 1996).

La myopie, de même que l'astigmatisme sont majorés en cas de ROP avec un plus haut risque de myopie sévère et d'astigmatisme sévère (Fielder et al, 2015).

Environ 70% des enfants avec ROP vont développer une myopie dans la première année de vie. La myopie va augmenter dans l'enfance. Les yeux présentant des signes résiduels de ROP tels qu'une hétérotopie maculaire (traînement maculaire temporal) ou des vaisseaux sanguins redressés ont un risque majoré de myopie et de myopie élevée (Quinn et al, 2008). Les enfants ayant été traités par laser vont présenter plus de myopie que les enfants dont la ROP a régressé spontanément (Davitt et al, 2005). Le degré de myopie est d'ailleurs corrélé au nombre d'impacts de photocoagulation laser (Kiran Yenice et al, 2022).

Après un traitement par laser, comparativement aux patients dont la ROP a régressé, l'acuité visuelle de loin étaient plus altérée. Il ne semble en revanche pas y avoir de différence d'acuité visuelle de près, de vision des couleurs ou de sensibilité aux contrastes (McLoone et al, 2006). Le champ visuel périphérique était, quant à lui, diminué, sans nécessairement qu'un déficit fonctionnel soit associé (McLoone et al, 2007).

La maturation de la sensibilité des bâtonnets apparaît plus lente chez les nouveau-nés prématurés bien que la réponse soit accélérée. La ROP réduit, en revanche, la sensibilité et les enfants ayant eu une ROP traitée présentent une baisse de sensibilité et de réponse (Hamilton et al, 2008).

Comparé aux enfants nés à terme, où le risque de strabisme est d'environ 3%, le risque de développer un strabisme chez les enfants nés prématurément est d'environ 20% à 10 ans (Fielder et al, 2015; O'Connor et al, 2002a). Plus spécifiquement, il est d'environ 10%

pour les nouveau-nés prématurés n'ayant pas présenté de ROP, d'environ 25% pour ceux ayant eu une ROP peu sévère et de 70% pour ceux ayant eu une ROP sévère (sous réserve du faible effectif de cette sous-catégorie dans cette étude) (O'Connor et al, 2002b). Ce risque augmente donc avec la sévérité de la ROP. Environ 40% des enfants ayant eu une rétinopathie sévère vont avoir un strabisme à l'âge de 6 ans. Néanmoins, environ 60% des enfants ayant présenté une ROP sévère présenteront un strabisme au cours des 6 premières années de vie avec parfois une régression spontanée dans les mois suivants (VanderVeen et al, 2011; Fielder et al, 2015).

L'astigmatisme était majoré en cas de ROP sévère. En effet on retrouvait un astigmatisme à 3 ans chez 43% des enfants ayant eu une ROP sévère (avec traitement précoce ou non), versus 35% chez ceux ayant eu une régression spontanée de la ROP. L'astigmatisme fort, à risque d'amblyopie, était quant à lui de 20% chez les enfants ayant eu une ROP sévère traitée précocement par laser, versus 15% chez ceux ayant bénéficié d'un traitement conventionnel, versus 9% chez ceux dont la ROP a régressé spontanément (Davitt et al, 2009).

A l'âge adulte, la ROP peut se compliquer d'anomalies du segment postérieur (88%), de décollement de rétine tardif (26%), de myopie (91%), de cataracte (84%), de glaucome (16%). On peut également retrouver de manière plus rare des changements pigmentaires de la rétine, une hétéropie maculaire, des déchirures rétinienne et un glaucome (Smith et al, 2005; Fielder et al, 2015)

Par ailleurs, la ROP entraîne une fragilité puisque le risque de décollement de rétine post chirurgical de cataracte est majoré à 23% chez les patients ayant un antécédent de ROP versus 2% dans la population générale (Kaiser et al, 2008).

La vascularisation rétinienne est marquée par des anomalies vasculaires persistantes après la ROP, avec 37% des patients présentant des stigmates de néovascularisation,

100% présentant des aspects vasculaires anormaux sur la rétine périphérique et 25% ayant des vaisseaux empiétant sur la fovéa (Mansukhani et al, 2019).

4.8 Prise en charge actuelle

4.8.1 Prévention

Dans la mesure où 1- des objectifs de saturation en oxygène élevée dans les premières semaines de vie, exposant à un risque important d'hyperoxie; 2- une exposition à des épisodes hyperoxémiques et hypoxémiques nombreux, ou à des fluctuations de la fraction inspirée en oxygène et de la pression partielle en oxygène, sont associés à une incidence plus grande de ROP, la première mesure à réaliser est de limiter les épisodes d'hyperoxie et d'hypoxie. Pour se faire, le contrôle de l'oxygénothérapie se révèle être la première mesure à réaliser. Sur une méta-analyse d'environ 4000 nouveau-nés prématurés, on retrouvait des effets protecteurs des cibles de SpO₂ 85-89% versus 91-95% vis-à-vis de la ROP sévère mais augmentait le risque de décès et d'entérocolite nécrosante (Askie et al 2017). Ainsi il semble raisonnable pour la prise en charge de l'enfant dans sa globalité de considérer la cible 91-95%. Il conviendra également de limiter les épisodes d'apnées du nouveau-né prématuré en traitant leur immaturité cardio respiratoire par un traitement par caféine et d'assurer un soutien ventilatoire adapté (Schmidt et al, 2006). Il convient également de limiter les épisodes d'hypercapnie prolongés et sévères (Leduc et al, 2006). Ainsi le rôle du contrôle de l'oxygénothérapie, de la ventilation et de l'immaturité cardio-respiratoire du prématuré est primordial.

Compte-tenu du rôle de l'IGF-1 discuté dans ce chapitre, il conviendra de maintenir une croissance adéquate par des apports nutritionnels suffisants (Löfqvist et al, 2009). Par ailleurs, l'alimentation précoce par lait maternel augmente l'IGF-1 sérique des nouveau-nés prématurés, en faisant une alimentation de choix (Alzaree et al, 2019). Le lait maternel, qui possède de nombreuses vertus et notamment contient des facteurs de

croissance, des médiateurs anti-inflammatoires, des acides gras oméga-3 a un effet protecteur sur la ROP et doit être privilégié pour l'alimentation entérale (Hellström et al, 2019). La supplémentation entérale en acide gras oméga-3 et oméga-6 semble être également une bonne stratégie préventive de la ROP (Hellström et al, 2021). La nutrition parentérale devra quant à elle être enrichie en acide gras oméga-3 et oméga-6 pour protéger les membranes cellulaires rétinienne (Hellström et al, 2019).

Compte-tenu du rôle décrit de l'hyperglycémie, il conviendra également de dépister et prendre en charge les épisodes d'hyperglycémie (Kermorvant-Duchemin et al, 2020).

4.8.2 Traitements curatifs

L'essai *Early Treatment For Retinopathy of Prematurity* a permis de définir des seuils de sévérité de ROP pour la prise en charge des ROPs sévères : Les ROPs « seuil » ont été définies comme les ROPs à traiter pour obtenir les résultats fonctionnels et structurels les plus favorables pour les patients et les ROPs pré-seuils comme les ROPs à surveiller de manière accrue devant leur risque de passer au stade seuil (Early Treatment For Retinopathy Of Prematurity Cooperative Group, 2003).

Initialement, le traitement de la ROP se faisait par cryothérapie (Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group, 1990). Le traitement de référence est actuellement la photocoagulation laser de la rétine avasculaire, qui a montré une efficacité similaire à la cryothérapie sur la prise en charge de la ROP sévère mais un moindre risque de myopie secondaire et une meilleure acuité visuelle à long terme (Mc Namara, 1991; Connolly, 1998; Connolly et al, 2002).

Les anti-VEGF ont été introduits dans le traitement de la ROP et ont montré un bénéfice avec une meilleure régression et d'une durabilité supérieure pour les ROP sévères en zone I par rapport au traitement par laser. Par ailleurs, la vascularisation rétinienne reprenait après injection intravitréenne d'anti-VEGF alors que le traitement par laser entraînait une destruction de la rétine périphérique (Mintz-Hittner et al, 2011). L'étude RAINBOW a

validé la meilleure efficacité des anti-VEGF sur le laser pour les ROPs de stade seuil (Stahl et al, 2019). Le traitement par anti-VEGF entraîne par ailleurs beaucoup moins de myopie sévère que le laser (50% versus 4% respectivement) (Geloneck et al, 2014) et également moins d'astigmatisme qu'après traitement de la ROP par laser (Tan et al, 2019). Par rapport aux patients dont la ROP a régressé spontanément, les patients traités par anti-VEGF n'avaient pas plus de stigmates de néovascularisation et avaient autant d'aspect vasculaire anormal sur la rétine périphérique mais ils présentaient plus d'empiètement vasculaire au niveau de la fovéa (Mansukhani et al, 2019). Néanmoins, le VEGF étant nécessaire au développement vasculaire, il va être important d'explorer les effets à long terme de ce traitement sur des organismes en développement.

Sur le plan anecdotique, la tentative de cibler des saturations en oxygène plus élevées chez les enfants diagnostiqués de ROP pour diminuer la production de facteur de croissance angiogénique en phase vasoproliférative n'a pas eu de résultat favorable sur la progression de la ROP mais des résultats délétères sur l'évolution pulmonaire de ces patients (Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), 2000).

La supplémentation en Vitamine E pour ses effets anti-oxydants a montré une efficacité chez l'animal mais une efficacité inconstante chez le prématuré. Il semblerait que la vitamine E à forte dose diminue l'incidence de ROP sévère mais au prix d'un risque de sepsis augmenté (Muller, 1992).

4.9 Thérapeutiques d'avenir

Le propranolol, un antagoniste des récepteurs adrénergiques β , a été envisagé en traitement de la phase vasoproliférative. En effet, il a été montré qu'il possède une activité anti-angiogénique sur les cellules endothéliales à différentes étapes de la néovascularisation par inhibition de leur prolifération, leur migration et leur différenciation en agissant sur la voie de signalisation du VEGF (Lamy et al, 2010). Par

ailleurs, le propranolol a été reconnu pour prévenir le stress oxydatif des tissus soumis à ce stress, notamment en limitant la peroxydation lipidique (Mansuy et al, 2000), le rendant d'autant plus intéressant pour la prise en charge de la ROP. Enfin, le propranolol a été caractérisé comme ayant des propriétés anti-inflammatoires, notamment par modulation de la microglie et des astrocytes (Mollá et al, 2021), le rendant d'autant plus intéressant dans le contexte d'inflammation rétinienne. Il semble efficace sous forme de gouttes oculaires avec une innocuité correcte pour diminuer la progression de sévérité des ROP de stade 1 (Filippi et al, 2019). Néanmoins il est difficile de conclure sur son efficacité dans la mesure où l'étude se déroule sur des ROPs de stade 1, qui régressent spontanément pour la majeure partie. Une récente méta-analyse sur le propranolol oral est en faveur de son efficacité mais est suggestive d'évaluation de l'efficacité et l'innocuité à court, moyen et long terme (Stritzke et al, 2019). Un essai clinique multicentrique est en cours pour évaluer l'efficacité et la sécurité de l'administration du propranolol oral en prévention de l'évolution de sévérité des ROP de stade 1 et 2 (Bührer et al, 2018).

Nous avons pu par ailleurs montrer dans le laboratoire que l'anti-IL1 β semble être une thérapie intéressante en phase de vaso-oblitération sur les modèles animaux (Rivera et al, 2013; Zhou et al, 2016; Beaudry-Richard, 2018; Sayah et al, 2020) et pourrait être envisagée pour prévenir la vaso-oblitération et la néovascularisation abérante post-ischémique, ainsi que la dégénérescence neuronale associée.

La thérapie cellulaire semble également être intéressante pour moduler la part de vasculogénèse impliquée dans le processus de cette rétinopathie ischémique. Nous avons montré que l'induction de la *tyrosine-protein phosphatase non-receptor de type 9* (PTPN9) altère les fonctions paracrine des PACs en condition d'hyperoxie, contribuant ainsi à l'ischémie et que le traitement par l'inhibition de PTPN9 dans les PACs permet de restaurer leurs propriétés angiogéniques et d'améliorer la vascularisation en phase précoce (Desjarlais et al, 2021).

Les micro-ARNs commencent à être explorés dans les rétinopathies ischémiques. Ils semblent être des agents thérapeutiques prometteurs et méritent d'être investigués en ce sens. Nous allons les développer dans le prochain chapitre.

4.10 Résumé et perspectives

La ROP est une pathologie complexe faisant intervenir de multiples mécanismes et dont la part de l'inflammation et l'angiogénèse sont primordiaux, tant dans sa première phase, ischémique, que dans sa deuxième phase de néovascularisation pathologique. Les enjeux dans la prise en charge des enfants nés prématurément sont grands, tant sur la période néonatale que l'évolution à long terme.

Présentement, les traitements en place agissent sur la phase de revascularisation aberrante et les traitements à l'étude chez l'humain ne prennent en compte que cette phase. Pourtant plusieurs autres molécules ont montré leur intérêt en phase de vaso-oblitération et mériteraient d'être évaluées car nous l'avons compris, pouvoir agir sur la première phase est primordial, dans la prévention du développement de la néovascularisation secondaire d'une part et dans le développement de complications ophtalmologiques à long terme d'autre part. Les miRs sont à l'étude depuis quelques années et représentent des candidats intéressants pour cette pathologie complexe. Nous allons maintenant en aborder le sujet.

Chapitre 5. Les micro-ARNs

5.1 Les ARNs non codants

En 1993, il a été décrit pour la première fois qu'un ARN pouvait avoir une interaction antisense avec un autre ARN pour réprimer son expression. Il s'agissait de l'ARN non codant lin-4 et du début de l'exploration du transcriptome, que l'on pensait jusque là inutile (Lee et al, 1993).

L'étude du génome humain est récente et a permis de mettre en évidence la complexité des séquences ADN et d'ouvrir sur de nouvelles opportunités de recherche, notamment avec la découverte des ARNs non codants (ARNnc) (Lander 2001, IHGSC 2004).

En effet, contrairement à l'idée initiale qu'un ARN codait pour une protéine, il s'avère que les transcrits d'ARN sont beaucoup plus nombreux que les gènes codants pour les protéines et qu'il existe donc des ARNnc, qui sont donc des ARNs non messagers qui proviennent de la transcription qui n'est pas traduite en protéine et qui jouent un rôle clé dans la régulation épigénétique. La connaissance de ces ARNnc, qui représentent environ 99% du génome, est croissante à chaque année et on dénombre parmi eux, entre autres : les microARNs (miRs), les transcrits antisens naturels, les ARNs interagissant avec Piwi, les petits ARNs interférents (siARNs), les ARNs non codants longs (lncARN) (Bartel et al, 2009 ; ENCODE Project Consortium, 2012 ; Washietl et al, 2012 ; St Laurent et al, 2015 ; Yan et al, 2012 ; Hanna et al, 2019). Bien qu'anciennement considéré comme superflu, le transcriptome est un composant primordial dans la régulation de la stabilité et la manifestation du génome. Les techniques de séquençage ont permis d'avoir des analyses de plus en plus précises du génome et du transcriptome.

Le séquençage permet de déterminer la succession continue des bases dans la structure du génome. Les techniques de séquençage de l'ADN ont vu le jour dans les années 1970. La technique de Sanger a permis le décryptage du génome humain (Lamoril et al, 2008). Les techniques ne cessent d'évoluer depuis avec l'apparition constante de nouveautés,

telles que les micropuces, la bio-informatique et plus récemment le *next generation sequencing* (NGS), ou séquençage à haut débit. Cela permet d'offrir la possibilité d'une identification de plus en plus précise du génome codant et non codant (Lamoril et al, 2008; Wang, et al 2009). Le NGS permet une analyse plus précise que le *micro-array*, qui est seulement fondé sur la complémentarité des séquences déjà établies. En effet, le NGS permet de caractériser le contenu entier d'ARN provenant d'un échantillon de tissu en établissant la quantité spécifique de chaque séquence correspondant à un ARN, sans nécessité que l'ARN soit déjà préalablement connu. La première étape du NGS consiste en la préparation d'une librairie de fragments d'ADN complémentaire avec enrichissement en régions d'intérêts. L'enrichissement pourra également se faire par capture via des sondes spécifiques. La seconde phase est l'amplification clonale. Ensuite a lieu l'étape de séquençage avec la réalisation parallèle de millions de réactions de séquençage individuelles par PCR. Après cela, une analyse bio-informatique est lancée, basée sur la détermination de la séquence et de son alignement avec le génome ou le transcriptome de référence, la détection des variants, leur annotation et leur filtrage. Le NGS offre également l'avantage d'évaluer l'épissage alternatif du transcrit, la modification post-transcriptionnelle et de distinguer la mutation de gènes (Wang et al, 2009; Pareek, et al 2011; Hu et al, 2021).

On peut différencier des ARNnc régulateurs et non régulateurs. Parmi les ARNnc régulateurs, qui sont les plus étudiés à l'heure actuelle de par leur importance démontrée dans les différents processus biologiques, on trouve les siARNs, les miRs, et les lncARN (Ling et al, 2013; Arraiano, 2021).

5.2 ARNs non codants régulateurs

Les ARNncs régulateurs sont ubiquitaires et ne codent pas pour les protéines mais coordonnent la fonction cellulaire au regard des changements requis (Arraiano, 2021).

Les lncARNs sont des transcrits non codants pour les protéines, faisant plus de 200 nucléotides. Bien qu'ils soient plus présents en termes de quantité dans le génome, ils sont moins exprimés et ont des variables d'identification plus complexes, ce qui les rend moins détectables. Ils peuvent réguler l'expression des gènes, par répression ou stimulation au niveau épigénétique, transcriptionnel et traductionnel. Leur méthode de régulation est donc plus compliquée à évaluer. Néanmoins, ils semblent réguler l'expression génique par orientation des modificateurs de la chromatine vers leur cible génique, modulation du recrutement des régulateurs transcriptionnels, dégradation de miRs et préservation de l'ARN messager, modification de l'épissage et de la traduction et facilitation de l'initiation de la transcription par promotion des séquences amplificatrices. Il est désormais clair qu'ils sont impliqués dans différentes pathologies, telles que les maladies ophtalmologiques, la fibrose ou encore les maladies vasculaires (Ulitsky et al, 2013, Yan et al, 2012; Pedrazzini, 2015; Arraiano, 2021). Parmi les lncARNs, on peut individualiser les ARNs circulants ou circARNs. Ceux-ci ont une structure circulaire établie après rétro-épissage de pré-ARN messager, leur attribuant une résistance à la dégradation par les ribonucléases cellulaires. Ils peuvent également moduler l'activité des miRs. Il a été également mis en évidence qu'un certain nombre de circARNs peuvent provenir de virus, en faisant des candidats intéressants dans la lutte contre les atteintes virales (Arraiano, 2021).

Les miRs et les siARNs sont de taille identique et ont pour rôle de réguler négativement l'expression d'un gène de manière spécifique et sélective par appariement à une séquence complémentaire. Tandis que les miRs sont codés par le génome de leurs propres cellules, les siARNs sont de provenance exogène. Les siARNs peuvent provenir de vecteurs viraux et de vecteurs non viraux, tels que les peptides, les lipides et les polymères. Les siARNs ont pour rôle de maintenir l'intégrité du génome face à des acides nucléiques étrangers ou invasifs comme les transposons, les transgènes et les virus (Ulitsky et al 2013, Yan et al 2012; Dana et al, 2017). Nous allons maintenant nous concentrer sur les miRs.

5.3 Les micro-ARNs

5.3.1 Généralités

Les miRs sont de plus en plus étudiés à l'heure actuelle en recherche clinique et fondamentale. Leurs propriétés de genèse endogène et de modulation de gènes cibles par inhibition seulement en fait une cible d'étude vraiment intéressante. Par ailleurs l'étude des miRs étant relativement récente, cela offre un potentiel de découverte quant à leur portée et leur rôle modulateur dans les différents processus physiologiques et pathologiques. En effet, leur étude en tant que biomarqueurs d'une part et de stratégie thérapeutique d'autre part est en plein essor (Giza, et al 2014).

Tout organisme confondu, environ 49000 miRs matures ont été identifiés. Actuellement, on connaît au génome humain entre 2654 miRs matures, générés de 1917 précurseurs (Kozomara et al, 2019). Les miRs sont des ARNs non codant simple brin d'environ 22 nucléotides de long qui régulent négativement l'expression de gènes impliqués dans différents processus physiologiques et pathologiques en modulant l'expression de plus de 60% des gènes codant pour des protéines et régulent ainsi environ un tiers du génome (O'Brien et al 2018, Friedman et al 2009, Almeida, et al 2011; Zendjabil et al, 2017). Ils peuvent cibler des centaines voire des milliers de gènes et certaines fonctions de manière spécifique à un organe ou un type cellulaire (Bartel, 2009). Ils peuvent ainsi être impliqués dans la constitution de multiples pathologies ou dans le maintien de l'homéostasie par effet protecteur cellulaire (Arraiano, 2021).

Les premiers miRs découverts, tel que « let-7 » ont leurs noms propres. Devant l'expansion de la recherche sur les miRs, la nomenclature actuelle veut que les nouveaux miRs soient identifiés de manière standardisée. Les trois premières lettres vont correspondre à l'espèce d'identification, ensuite le nombre correspondra à l'ordre de mise en évidence du miR dans cette espèce (Zendjabil et al, 2017).

Les miRs ont été mis en cause dans divers processus fondamentaux comme l'inflammation, la différenciation, la prolifération, l'apoptose et l'angiogénèse et s'intègre dans de multiples pathologies complexes comme les cancers (Arraiano, 2021; Zendjabil et al, 2017). Nous reverrons prochainement leurs implications cliniques.

5.3.2 Mécanisme d'action des miRs

Le fonctionnement exact des miRs est encore incomplètement connu. Ils peuvent fonctionner seuls, appartenir à une famille ou encore fonctionner en cluster. Quand plusieurs miRs sont physiquement proches, on parle alors de cluster. Un cluster pourra être transcrit comme une seule unité. Par conséquent, plusieurs miRs peuvent être produits à partir du même transcrit primaire et leur expression serait donc régulée par les mêmes facteurs, y compris les processus épigénétiques. En général, la plupart des clusters comptent 2 à 8 miRs et environ 70% d'entre eux sont composés de 2 miRs. 19% des clusters sont composés de gènes multicopies. Les pré-miARNs multicopies pourraient produire les mêmes miRs matures, bien qu'ils puissent avoir des séquences différentes mais pourraient être situés dans différentes régions génomiques. A l'exception de ces pré-miRs multicopies, certains membres des clusters ont été identifiés comme des miRs homologues et ont une similitude de séquence importante et même des « seed sequences », qui sont les séquences de reconnaissance et d'appariement entre les miRs et leur ARN messenger cible, identiques (Guo et al 2014, Kozomara et al 2019). Par ailleurs, les clusters contiennent fréquemment des représentants de différentes familles de miRs. Il a été proposé que les transcrits d'ARN messagers codant pour les protéines qui interagissent les unes avec les autres soient généralement ciblés par les miRs d'un même cluster pour une auto/rétro-régulation simultanée (Yuan et al 2009). Une famille de miRs correspond à 2 ou plusieurs miRs possédant une « seed sequence » similaire, provenant d'un ancêtre phylogénétique commun, et donc un ARN messenger (ARNm) cible similaire. Elle peut être située dans un ou plusieurs clusters et les membres de différentes familles

ont tendance à être localisés dans les clusters apparentés avec des relations fonctionnelles étroites (Zou et al 2014, Guo et al 2014).

Les miRs peuvent être soit intergéniques, transcrits par des unités de transcription indépendantes avec leurs propres promoteurs ou introniques, transcrits simultanément à la transcription des gènes hôtes codants pour une protéine. La voie de synthèse principale est la voie canonique (Figure 20) : la séquence promotrice des miRs est alors localisée entre les gènes et leur synthèse se fait de manière autonome. Parfois ils pourront être transcrits en cluster, c'est-à-dire qu'ils vont partager un promoteur identique avec d'autres miRs de localisation proche et que l'ensemble va être transcrit en même temps. Cette biogenèse débute par la transcription d'une séquence d'ADN en un transcrit primaire, ou pri-miR, par l'enzyme ARN polymérase 2. Ce pri-miR est de longueur variable et a une organisation prenant la forme d'une tige-boucle. Toujours dans le noyau, il va être clivé par le complexe Drosha/DiGeorge Syndrome Critical Région 8 pour devenir un miR précurseur, ou pré-miR. Celui-ci va alors être transporté dans le cytoplasme par le complexe exportin-5/RanGTP pour être ensuite clivé par l'enzyme Dicer qui permettra de passer de la conformation tige-boucle à un miR double brin d'une vingtaine de nucléotides, correspondant à la forme mature. Le brin 5p provient de l'extrémité 5' de la tige-boucle initiale tandis que le brin 3p provient de l'extrémité 3'. Le brin guide sera ensuite incorporé au complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) de l'ARN messenger cible via la protéine Argonaute 2 pour le réprimer. Le choix du brin pris en charge par Argonaute 2 varie selon le type cellulaire ou son environnement. Généralement, le brin avec une plus faible stabilité thermodynamique en 5' ou ayant un 5'U en position nucléotidique 1, est le brin guide. Le brin déchargé est le brin passager. Bien que l'interaction des miRs soit possible avec UTR'5, la séquence codante ou les promoteurs de gènes, les miRs interagissent avec la région non traduite 3' (3'UTR) des ARN messagers cibles dans la plupart des cas. Lorsque l'appariement entre le miR et l'ARN messenger cible est exactement concordant, l'ARN messenger cible sera dégradé tandis que si l'appariement est partiel, la traduction de l'ARN messenger cible sera inhibée. Dans tous

les cas, il s'agit d'un contrôle négatif de l'expression du gène cible (O'Brien et al, 2018, Desjarlais et al, 2020).

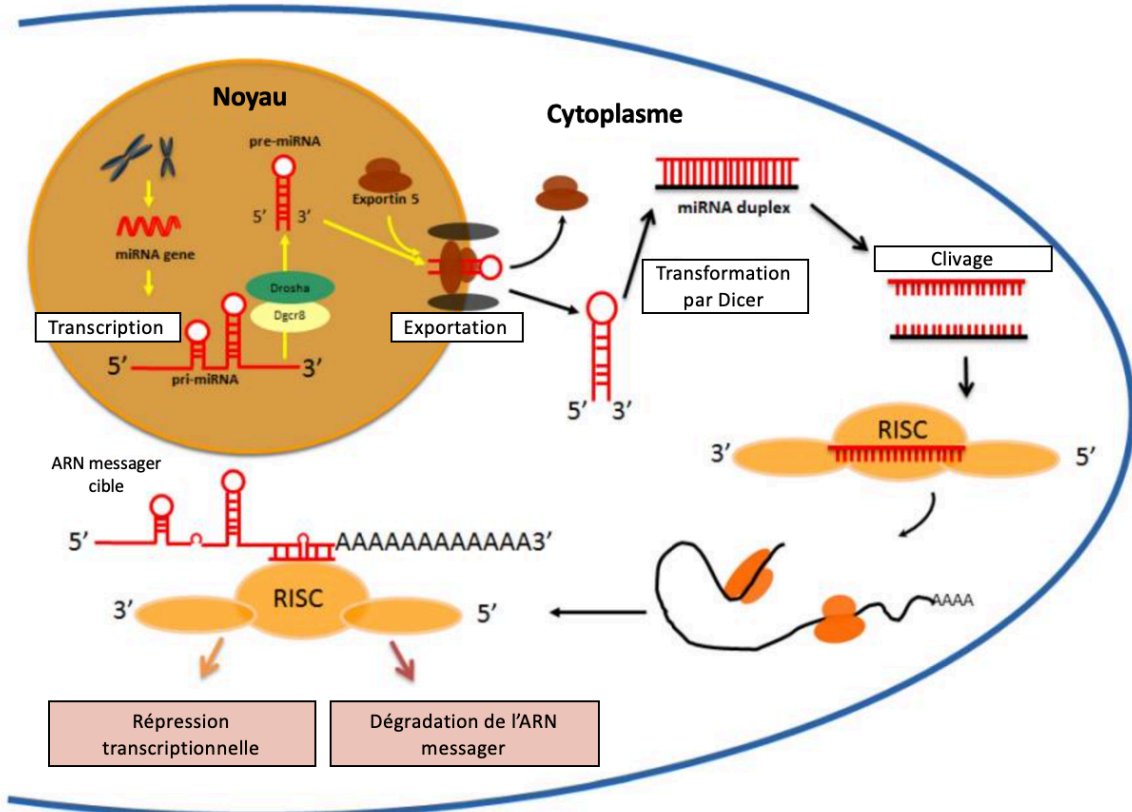


Figure 20: Biogenèse des miRs. Le miR est transcrit en pré-miRNA d'environ 70 bases. Il est ensuite clivé dans le noyau par l'enzyme Drosha pour devenir un pré-miRNA. Le pré-miRNA est quant à lui clivé et exporté dans le cytosol par l'enzyme Dicer et son complexe protéique. Il est alors réduit à environ 22 bases. Ce brin interagit avec la protéine Argonote 2 pour former le complexe RISC qui va se fixer sur un site de 5 à 8 bases spécifique sur l'ARN messenger. Le miR peut alors réprimer sa cible de deux façons: Si le miR possède une séquence complémentaire parfaite avec sa cible, l'ARNm sera dégradé; dans le cas d'un appariement imparfait, la traduction de l'ARNm sera inhibée. Figure adaptée de Abba et al, 2014.

Le ciblage des ARN messagers cibles par les miRs se fait par l'appariement de séquences précises de 2 à 7 nucléotides, nommées *seed sequences*, dans la voie canonique. Il a

cependant été montré que les suites de nucléotides au-delà de cette séquence ont également leur importance dans la spécificité de l'identification et de la modulation de leurs ARN messagers cibles. Cela permettrait de compenser les imperfections de certaines *seed sequences* et de démarquer les membres d'une même famille de miRs et leur modulation propre. Par ailleurs, il a récemment été mis en évidence la possibilité d'un phénomène de dégradation du miR dirigé par son ARN messager cible, notamment via la séquence associée à un appariement étendu du brin 3'. Le mécanisme précis en est encore mal connu (Chipman et al, 2019).

Les miRs sont « multi-tâches » de par le fait qu'un miR possède des centaines d'ARN messagers cibles et qu'un miR semble pouvoir réguler des voies biologiques entières à l'origine de pathogénicité ciblée (Bartel et al, 2004; Feinberg et al, 2016; Giza et al, 2014; Hanna et al, 2019). Ce caractère pléiotropique les rend donc véritablement intéressant dans l'étude des pathologies complexes.

5.3.3 Localisation des miRs

Ils sont ubiquitaires dans l'organisme de chaque être vivant et se trouvent dans les tissus mais aussi dans tous les liquides biologiques (Hanna, 2019; Zendjabil et al, 2017).

Les miRs peuvent être trouvés dans les cellules ou sous forme extracellulaire/circulante où ils sont plus stables. Il existe 2 populations de miRs extracellulaires dans les liquides biologiques : ceux encapsulés dans des vésicules telles que les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques et ceux associés à des protéines et spécialement Argonaute 2. La répartition de ces populations est actuellement mal connue et divergente selon les études (O'Brien et al 2018).

Par ailleurs, la source du miR influence son accessibilité en tant que biomarqueur, la façon dont le miR est extrait de l'échantillon biologique et la façon dont il est analysé. Par exemple, les miRs présents dans le sang peuvent provenir d'une libre circulation mais aussi d'exosomes (Kanlikilicer et al, 2016; Bayraktar et al, 2017; Rashed et al, 2017;

Paskeviciute et al, 2019). Il est donc important de considérer ces éléments en vue d'études sur les miRs afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles. Il semblerait par ailleurs que la purification des vésicules pourrait réduire le rendement et l'intégrité de l'ARN, conduisant à une plus grande variabilité interindividuelle (Buschmann et al, 2018).

5.3.4 Études des miRs comme biomarqueurs en clinique

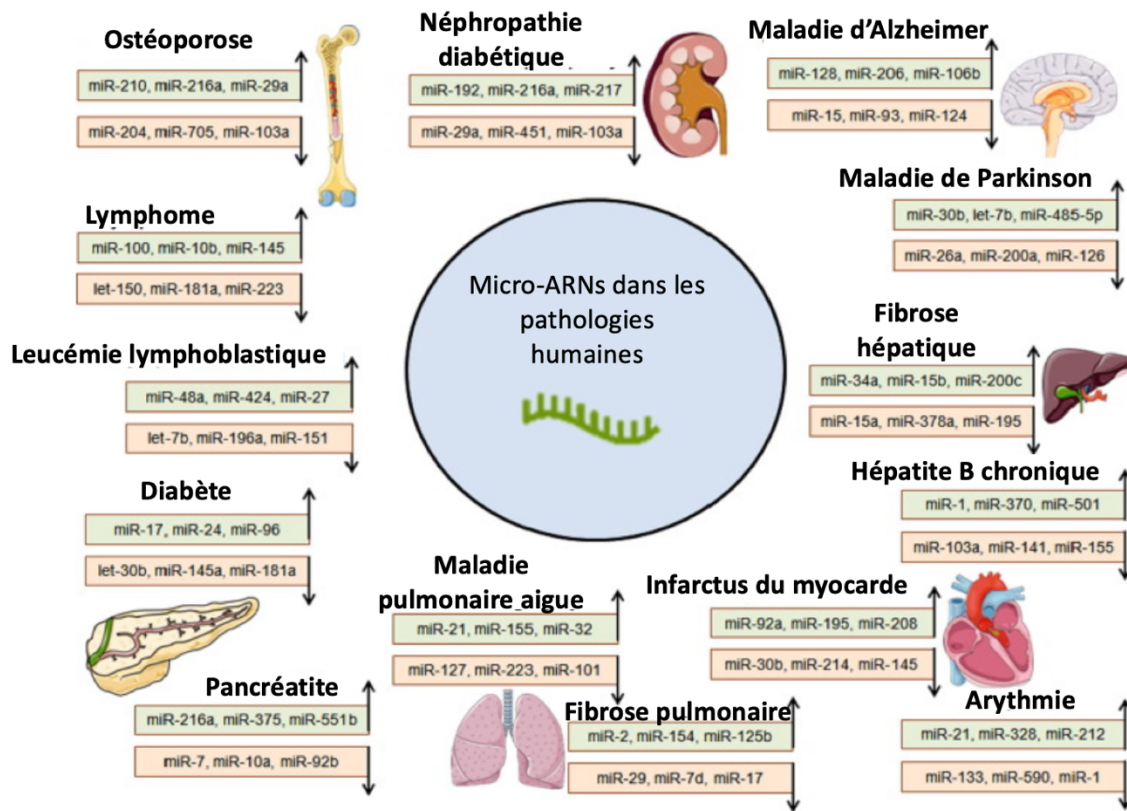


Figure 21: Exemple de modulation des miRs dans diverses pathologies humaines. Tels que décrits dans le texte, les miRs modulent de nombreux phénomènes physiologiques et pathologiques. Ils sont impliqués dans la physiopathologie des tissus osseux, rénaux, cérébraux, hépatiques, cardiaques, pulmonaires, endocriniens, hématopoïétiques.

Figure adaptée de (Chakraborty et al, 2021).

Les miRs sont interreliés à la modulation de centaines d'ARN messagers cibles dans toutes les pathologies (Figure 21). De nombreuses études sur la modulation des miRs ont été réalisées dans les maladies neuropsychiques telles que la schizophrénie, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer; les maladies auto-immunes telles que le lupus, la maladie de Crohn, les maladies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'infarctus du myocarde, l'ischémie, les accidents vasculaires cérébraux, les maladies virales, l'épilepsie, la tuberculose, le diabète comme biomarqueurs d'identification. Certains miRs ont également été reconnus comme signature pathologique directement corrélée à l'agressivité tumorale ou encore comme modulateurs de la réponse aux traitements de certains cancers ou encore de sensibilité à l'insuline dans le diabète (Giza et al, 2014; Biswas et al, 2018; McManus et al, 2003; Hu et al, 2018; Wang et al, 2015; Wagh et al, 2017; Gupta et al, 2018; Montastier et al, 2018). Parfois un miR peut être suffisant pour identifier un problème pathogénique mais on peut coupler l'identification de plusieurs miRs pour augmenter la sensibilité et/ou la spécificité diagnostique. Par exemple, dans le cadre de la démence fronto-temporale, un modèle d'expression de miRs distinctifs entre patients avec ou sans mutation de gènes a pu être établi et même a pu permettre d'identifier des régions cérébrales spécifiques atteintes (Kocerha et al 2011).

5.3.5 Évaluation des cibles potentielles des miRs candidats à visée thérapeutique

Les connaissances et technologies évoluant sans cesse, il est aujourd'hui possible d'évaluer certaines fonctions mécanistiques des miRs en bioinformatique et/ou *in vitro* avant de passer à une évaluation préclinique *in vivo*. Un nombre croissant de bases de données sont disponibles pour prédire les cibles de régulation. Par exemple, TargetScan prédit les gènes cibles des miRs tandis que Ingenuity identifie les voies biologiques ciblées par les miRs (Bartel et al 2009; Washietl et al 2012, Lekpraset et al 2011, Riffo-Campos et al, 2016). La base DIANA-TarBase permet de regrouper les liens entre les miRs et les gènes en se basant sur des entrées manuelles de résultats de métadonnées, de travaux expérimentaux et de réflexions hypothétiques (Vlachos et al, 2015). Les entrées

d'informations se faisant souvent de manière manuelle, elles sont soumises à l'irrégularité des annotations du fait de la diversité des chercheurs, rendant parfois l'accès à l'information difficile. Par ailleurs, la charge de travail des entrées manuelles étant importantes, il peut également y avoir des données manquantes. Certaines bases, comme la miRBase, offrent l'accès à des analyses post-hoc, afin d'apprécier la qualité des données proposées et de pouvoir choisir les données les plus concordantes (Kozomara et al, 2019). Le criblage et la validation des prédictions bioinformatiques *in vitro* a permis d'accélérer les études précliniques de transcrits thérapeutiques putatifs pour passer à l'intégration de ces miRs ou antago-miRs en modèle *in vivo* puis en clinique (Hanna et al, 2019).

5.3.6 Les miRs thérapeutiques

Les médicaments à petites molécules ont été conçus avec succès sur le plan pharmacologique pour cibler de manière simultanée plusieurs cibles ou voies (Hopkins et al, 2008, McCall et al, 2017). Des vecteurs et des oligonucléotides modifiés pour surexprimer ou faire taire la fonction des miRs sont générés pour la plupart des miRs (Hanna et al, 2019; Mercatelli et al, 2008; Chen et al, 2015).

Comme nous l'avons vu précédemment, certaines altérations d'expression de miRs sont pathognomoniques de résistance au traitement standard (Wang et al, 2015; Wagh et al, 2017; Gupta et al, 2018; Montastier et al, 2018). Ainsi, moduler ces miRs pourrait permettre d'améliorer la réponse au traitement.

Il est par ailleurs intéressant de remarquer que de moduler simultanément plusieurs miRs dont l'expression est altérée en contexte pathologique peut contribuer à la potentialisation de l'amélioration des résultats thérapeutiques (Shen et al, 2008). Le mécanisme de fonctionnement des miRs semble encore incomplètement compris mais leur ubiquité et leur polyvalence d'action pour restaurer un équilibre dans les fonctions nécessitant un équilibre entre elles pour rester à un niveau physiologique, telles que l'angiogénèse et l'inflammation en font une clé dans le processus thérapeutique.

A visée thérapeutique, on utilisera les anti-miRs ou antagomiRs ou les miR-mimics. L'antagomiR est une série d'oligonucléotides antisens composant une séquence complémentaire parfaite avec le miR ciblé. Le miR mimic correspond à la surexpression d'une séquence duplex du miR cible (Quévillon Huberdeau et al, 2018). Le candidat thérapeutique devra être administré au plus proche des cellules cibles. Il va par ailleurs être nécessaire ne pas stimuler de réponse immunogène, d'éviter la désintégration précoce dans le sang, de trouver un vecteur biocompatible et biodégradable pour soutenir son absorption cellulaire. Parmi les vecteurs utilisés pour l'administration de miR-mimics ou d'antagomiRs, on trouve des vecteurs polymériques, l'*atelocollagen*, le *poly lactic-co-glycolic acid*, le polyamidoamine, les dendrimères dégradables, les nanomatériaux inorganiques, le système d'administration à base lipidique et les vecteurs viraux (Chakraborty et al, 2021).

Parmi les compagnies biopharmaceutiques générant des miRs, on peut nommer *miRagen therapeutics Inc*, *Mirna therapeutics Inc*, *Regulus therapeutics* et *SantarisPharma* (Chakraborty et al, 2021).

Certains miRs ont déjà été étudiés en étude interventionnelle, comme par exemple, l'antago-miR-122, Miraversen, dans le traitement de l'hépatite C (Lanford et al, 2010; Janssen et al, 2013). Le Miraversen est présentement en phase 2 de l'essai clinique (Chakraborty et al, 2021).

Dans notre revue de la littérature publiée à l'occasion de la pandémie liée au COVID-19, nous avons cherché à identifier quels agents neutraceutiques, c'est-à-dire des substances naturelles, pourraient aider à combattre la tempête cytokinique induite par le virus du covid-19 via la modulation par les miRs. Par exemple, nous avons ainsi pu montrer que le resveratrol, un composant des raisins rouges, des baies, des cacahuètes et du bambou a une activité anti-inflammatoire par régulation négative d'IL-1 β , IL-6 et TNF- α via une modulation positive des miR-132, -let-7a, -146a et -146b. D'autres agents neutraceutiques tels que la quercétine, la vitamine D, la curcumine, le ginseng et les

polyphénols de thé vert ont également révélé leur intérêt dans la modulation des miRs impactant l'inflammation (Desjarlais et al, 2020). Il est donc intéressant de voir que l'on peut compléter les miRs par création humaine et les administrer par différentes voies mais aussi qu'on peut moduler leur expression via l'utilisation de substances naturelles.

5.3.7 Balance bénéfique/risque des miRs à visée thérapeutique

Le taux de succès des molécules standards dans les essais cliniques est d'environ 65% en phase I, 40% en phase II et 65% en phase III (Kola et al, 2004). L'avantage principal de l'utilisation de la modulation de miR thérapeutique est que, contrairement aux molécules traditionnelles qui ciblent une protéine ou un récepteur unique et s'avèrent souvent être en échec dans les phénotypes pathogènes complexes, les miRs agissent de manière pléiotropique et sont plus à même de réussir à contrer ses phénotypes multicomplexes en ciblant plusieurs cibles en même temps (Hopkins et al, 2008).

Les médicaments à petites molécules ont été conçus avec succès sur le plan pharmacologique pour cibler de manière simultanée plusieurs cibles ou voies. D'un point de vue thérapeutique, des vecteurs et des oligonucléotides modifiés pour surexprimer ou faire taire la fonction des miRs sont générés pour la plupart des miRs (Hanna et al, 2019; Mercatelli et al, 2008; Chen et al, 2015; Hopkins et al, 2008; McCall et al, 2017). Il se pose alors légitimement la question de la pathogénicité de la modulation externe de ces miRs puisqu'ils peuvent avoir des centaines de cibles et peuvent donc impacter des cibles non prévues et avoir des effets secondaires.

Un essai de phase 1 a été interrompu sur le miR mimic 34, ou MRX 34, à l'étude dans le cancer car 5 patients ont présenté une réponse immunitaire grave (Hanna et al, 2019). Cependant, il est à noter que le risque d'effet biologique hors cible est aussi retrouvé dans les thérapies traditionnelles monocible (Hopkins et al, 2008; McCall et al, 2017), ce qui est logique dans la mesure où tout étant inter-relié de près ou de loin, la modification d'une seule cible peut impacter d'autres cibles, notamment via les régulations épigénétiques adjacentes. Ainsi, il n'est pas dit que les miRs seront pourvoyeurs de plus

d'effets secondaires que les médicaments traditionnels. La pharmacovigilance et le suivi des patients impliqués dans les essais thérapeutiques seront d'une grande utilité pour répondre à ces questions. Néanmoins, pour l'instant les miRs thérapeutiques sont évalués chez l'homme adulte, mais la question de l'impact secondaire doit être d'autant plus importante dans une population pédiatrique en pleine croissance, telle que les nouveau-nés et qui plus est les nouveau-nés prématurés, où il est possible que les mécanismes de régulation et l'homéostasie générale soient sur une autre balance que celle de l'adulte.

5.4 Rôle des miRs dans l'inflammation

Comme il l'a été mentionné au préalable, les miRs régulent de nombreux processus dont l'inflammation fait partie, tels que les cancers, le lupus, la maladie de Crohn, l'athérosclérose, les infections virales, les maladies cardiovasculaires, les maladies neurodégénératives, le diabète (Giza et al, 2014; Biswas et al, 2018; McManus et al, 2003; Hu et al, 2018; Wang et al, 2015; Wagh et al, 2017 ; Gupta et al, 2018; Montastier et al, 2018). Le processus d'inflammation, en faisant intervenir différentes voies biologiques, différentes cellules, est un bon candidat pour l'étude de l'impact de la modulation des miRs. Nous allons maintenant parler de quelques impacts identifiés des miRs sur l'inflammation, dans une liste non exhaustive. Il est intéressant de voir que les miRs ont des capacités de modulation sur toutes les cellules et étapes intervenant dans le processus inflammatoire.

Le miR-10a a été étudié comme étant anti-inflammatoire par régulation négative de la voie NF- κ B dans les phénotypes endothéliaux athérosclérotiques (Fang et al, 2010). Les miR-124, miR-223, miR-34a, miR let-7c, miR-132, miR-146a et miR-125a peuvent induire la polarisation macrophagique M2 (Essandoh et al, 2016). Le miR-146 régule négativement la formation de NETs (Arroyo et al, 2021) et améliore la réponse inflammatoire microgliale dans les atteintes inflammatoires cérébrales (Liu et al, 2020). Dans l'asthme, une pathologie d'hyperréactivité bronchique associée à une inflammation

chronique, le miR let-7 a permis de réduire l'expression d'IL-13 et de favoriser une réponse Th2 (Kumar, 2011).

Durant la pandémie, en nous basant sur des données de la littérature, nous avons pu identifier certains miRs intéressants pour l'exploration de la tempête cytokinique associée au COVID-19 : Par exemple, les miRs-486, -182, -15b, -223, -483-5p étaient plus exprimés dans le sepsis clinique, tandis que l'expression des miRs-150, -342-5p, -223, -146b, -146a, -122, -193b, -499-5p, -23a, -26a, -342 était diminuée; dans l'infection pulmonaire à virus respiratoire syncytial, les miRs-155, -31, 203a, -16 et let-7 étaient surexprimés tandis que les miRs-34b, -34c, -125a, -125b, -29c, -429 et -27b étaient diminués. Nous avons dans un second temps exploré les fonctions connues des miRs que nous avons identifiés pour mettre en lumière leur rôle dans la régulation de l'inflammation lié à ce syndrome inflammatoire sévère. Par exemple, le miR-146 est connu pour réguler la voie NF- κ B, ainsi que *l'interleukine receptor associated kinase 1* (IRAK-1) et TRAF6, lui conférant des propriétés anti-inflammatoires. Pour rappel, il était diminué dans le sepsis. Ainsi, le rééquilibrer dans l'organisme pourrait permettre de combattre le sepsis (Desjarlais et al, 2020; Taganov et al, 2006).

5.5 Rôle des miRs dans l'angiogenèse

Comme pour l'inflammation, l'angiogenèse est un bon candidat pour l'étude de l'impact de la modulation des miRs puisqu'elle fait intervenir différentes voies biologiques et différentes étapes. Nous allons maintenant parler de quelques rôles identifiés des miRs dans l'angiogenèse, dans une liste non exhaustive.

Les miRs ont été identifiés pour cibler directement les facteurs pro ou anti-angiogéniques et les facteurs de transcriptions de leurs voies de signalisation. Le miR-34a diminue le VEGF en ciblant Notch1 (Shi et al, 2019). Le miR-20b diminue l'expression de VEGF en ciblant les voies HIF-1 α et STAT3 dans le cancer du sein (Cascio et al, 2010). Le miR-137 inhibe l'expression d'Ephrinb2 dans la maladie d'Alzheimer (Wu et al, 2016). Le miR-124 inhibe l'expression de STAT3 (Shi et al, 2020). Le miR-410 administré en collyre a permis

de diminuer la néovascularisation en ciblant le VEGF-A (Chen et al, 2014). Le miR-15b diminue le VEGF et inhibe la néovascularisation dans la rétinopathie diabétique proliférante (Yang et al, 2020). Le miR-21 est capable d'inhiber l'IL-12, une cytokine anti-angiogénique (Melo et al, 2019). Le miR-126 a été rapporté comme régulateur négatif de la sprout-related protein 1 et de la voie de signalisation PI3K/Akt, favorisant ainsi la survie des cellules endothéliales et l'angiogénèse (Wang et al, 2008; Chen et al, 2016). Le miR-205 est régulé par le stress oxydatif et diminue le VEGF dans les cellules de l'EPR (Oltra et al, 2020).

Certains miRs peuvent avoir un effet double, dépendamment du type cellulaire, processus impliqué et des facteurs environnants mis en cause. À l'étape embryonnaire, les miR-181a et miR-181b vont induire la différenciation des cellules souches en cellules endothéliales, pouvant ainsi permettre d'optimiser les stratégies pro-angiogéniques en médecine régénérative.

Dans les cellules endothéliales humaines, le miR-181a a été décrit d'une part comme anti-angiogénique en ciblant directement PDGFA et indirectement MMP-2, MMP-9, VEGF et eNOS par inhibition de H19 et d'autre part pro-angiogénique en ciblant la voie CaMKII. Le miR-181b a également été décrit comme ayant un effet mixte avec d'une part une promotion de l'angiogénèse par inhibition de TRPM7 et d'autre part un effet antiangiogénique en ciblant PDGFA, CCN1 et NRP1 (Yang et al, 2022).

5.6 Rôle des miRs dans le développement de l'OIR

A ce jour, lorsque l'on cherche l'association « miR » et « oxygen induced retinopathy » dans pubmed, il existe des études de séquençage des miRs dans différents modèles d'OIR (Chen et al, 2022; Desjarlais et al, 2019; Wang et al, 2017) et les résultats concernant réellement l'OIR explorent en grande majorité la caractérisation des miRs dans la phase de néovascularisation post-ischémique et ciblent essentiellement l'angiogénèse.

Voici quelques exemples de miRs caractérisés dans l'OIR :

Le miR-126 est impliqué dans la prévention de la néovascularisation post-ischémique dans l'OIR par effet anti-angiogénique (Fan et al, 2021).

Le miR-21 semble quant à lui avoir un effet proangiogénique STAT3 médié dans les rétinopathies ischémiques. Ainsi l'utilisation d'une antago-miR-21 en phase post-ischémique permettrait de prévenir la néovascularisation pathologique (Gutsaeva et al, 2017). Le miR-150 permet d'atténuer la revascularisation pathologique post-ischémique en ciblant CXCR4, DLL4 et Frizzled-4 (Liu et al, 2015) Le miR-218 inhibe la néovascularisation en régulant l'expression de Roundabout 1 (Han et al, 2016). Le miR-181 inhibe la néovascularisation en ciblant Endocan qui est inducteur du VEGF (Chen et al, 2020). Le miR-203 inhibe la néovascularisation en ciblant VEGF et HIF-1 α (Han et al, 2020).

5.7 Résumé et perspectives

Les miRs sont donc des ARNs non codants de découverte récente et dont la caractérisation est actuellement en plein essor. De par leur caractère pléiotropique, ils sont des candidats intéressants dans l'étude des processus complexes tels que l'inflammation ou l'angiogénèse, tant comme biomarqueurs qu'agents thérapeutiques. Leur caractérisation dans chaque processus est importante, ce d'autant qu'il a déjà été décrit que leur rôle dépend du type cellulaire, de l'environnement et de la condition physiopathologique. L'OIR est une pathologie de la microvascularisation rétinienne et choroïdienne faisant intervenir un état inflammatoire soutenu et une atteinte de l'angiogénèse, les deux étant intimement liées. Les miRs sont donc des candidats attrayants dans l'étude de cette pathologie. A ce jour, très peu d'études se sont concentrées sur la phase de vaso-oblitération rétinienne, or c'est une phase clé, y compris pour la prévention de la néovascularisation post-ischémique.

II. Hypothèses et objectifs de recherche

1 Problématique et hypothèse générale

Devant l'amélioration des techniques et des connaissances, les nouveau-nés prématurés sont pris en charge de plus en plus tôt et survivent de plus en plus. La très grande et l'extrême prématurité sont donc plus fréquentes et laissent place au développement de ses complications telle que la ROP. A l'heure actuelle, la ROP est une des principales causes de cécité dans l'enfance dans le monde. Elle se déroule en une phase de vaso-oblitération conduisant à une ischémie du tissu rétinien, qui sera le lit de développement d'une néovascularisation abérante pré-rétinienne. Elle peut être pourvoyeuse non seulement d'atteintes sévères en période néonatale en rapport avec la néovascularisation post-ischémique pathologique de la rétine, mais aussi de complications visuelles à long terme. Actuellement, la prise en charge se joue sur la prévention des facteurs de risque modifiables et sur le traitement curatif en phase de vaso-prolifération. Néanmoins, il semble plus qu'important d'agir sur la phase de vaso-oblitération pour limiter la néovascularisation pathologique et donc la sévérité de la ROP, mais également pour prévenir les complications à long terme, en préservant qualitativement et quantitativement le lit vasculaire. L'exploration récente du transcriptome permet de mieux appréhender les processus biologiques physiologiques et pathologiques. Les miRs étant des modulateurs négatifs de l'expression des gènes pléiotropiques, ils sont des éléments importants à prendre en compte dans les composantes de la ROP, telles que l'angiogenèse et l'inflammation. Le rôle des miRs dans la constitution de la phase de vaso-oblitération est actuellement mal connu et mérite d'être exploré.

L'hypothèse générale de cette thèse est la suivante : les miRs sont impliqués dans la régulation de l'angiogenèse et de l'inflammation dans la phase de vaso-oblitération de la rétinopathie induite par l'oxygène et leur modulation peut permettre d'élaborer des perspectives thérapeutiques novatrices.

Afin d'explorer cette hypothèse, 2 axes ont été entrepris.

2 Axe 1 : Rôle des miRs dans la régulation de l'angiogenèse dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR

2.1 Mise en contexte et hypothèses spécifiques au projet

Lors de l'établissement du profil des miRs durant l'OIR, nous avons mis en évidence la modulation de certains miRs dans la rétine et la choroïde lors de la phase de vaso-oblitération. Parmi ces miRs, certains ont été prédits par analyse bioinformatique comme pouvant moduler l'angiogenèse.

Hypothèse 1 : Durant l'OIR, l'expression de certains miRs est diminuée ou augmentée et induit une diminution des facteurs pro-angiogéniques et peut mener à la dégénérescence vasculaire rétinienne et choroïdienne.

Hypothèse 2 : La restauration de l'expression de ces miRs pourrait restaurer la production de ces facteurs pro-angiogéniques et permettre de protéger la vascularisation contre la dégénérescence vasculaire induite par l'hyperoxie.

2.2 Objectifs de recherche

- A- Identifier un miR anti-angiogénique qui est augmenté ou un miRs pro-angiogénique qui est diminué en phase précoce de l'OIR.
- B- Valider la modulation du miR candidat sélectionné en conditions d'hyperoxie *in vitro* dans les cellules endothéliales rétiniennes et *in vivo* dans les rétines.
- C- Investiguer les effets pro-angiogéniques de la correction de la modulation du miR candidat sur les cellules endothéliales rétiniennes.
- D- Caractériser l'impact d'une thérapie intravitréenne basée sur la modulation du miR candidat quant à la vaso-oblitération des rats dans l'OIR.

3 Axe 2 : Rôle des miRs dans la régulation de l'inflammation dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR

3.1 Mise en contexte et hypothèses spécifiques au projet

Lors de l'établissement du profil des miRs durant l'OIR, nous avons pu mettre en évidence la modulation de certains miRs lors de la phase de vaso-oblitération. Parmi ces miRs, certains ont été prédits par analyse bioinformatique comme pouvant moduler l'inflammation.

Hypothèse 1 : Durant l'OIR, l'expression de certains miRs est diminuée ou augmentée et induit une augmentation des cytokines pro-inflammatoires qui vont contribuer à l'établissement de la dégénérescence vasculaire rétinienne.

Hypothèse 2 : La restauration de l'expression de ces miRs pourrait limiter la production de cytokines pro-inflammatoires et permettre de protéger la vascularisation contre la dégénérescence vasculaire induite par l'hyperoxie.

3.2 Objectifs de recherche

- A- Identifier un miR pro-inflammatoire qui est augmenté ou un miR anti-inflammatoire qui est diminué dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR.
- B- Valider la modulation du candidat sélectionné en conditions inflammatoires *in vitro* dans les cellules microgliales et *in vivo* dans les rétines.
- C- Investiguer les effets anti-inflammatoires de la correction de la modulation du miR candidat sur les cellules microgliales soumises à l'inflammation.
- D- Caractériser l'impact d'une thérapie intravitréenne basée sur la modulation du miR candidat sur la vaso-oblitération des rats dans l'OIR.

III. Méthodes

1. Sélection des miRs candidats

1.1 Modulation des miRs dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR chez le rat

Notre laboratoire a préalablement établi le profil d'expression des miRs par NGS dans le modèle d'OIR cyclique d'oxygène. Une soixantaine de miRs sont modulés durant la phase dans la rétine et la choroïde. Nous avons pu également établir les miRs les plus modulés en milieu et fin de la phase de vaso-oblitération (Desjarlais et al, 2019). Basé sur ce profil d'expression, nous avons pu sélectionner les miRs candidats potentiels à investiguer dans l'étude de la phase de vaso-oblitération de l'OIR.

1.2 Rôles imputés de l'effet régulateur des miRs candidats

Après identification de miRs candidats potentiels, il convenait de déterminer leur implication estimée dans les processus d'angiogenèse ou d'inflammation. La détermination de l'impact potentiel de la modulation des miRs candidats sur les processus inflammatoires et angiogéniques a été réalisée par des moyens complémentaires.

Déjà, le rôle régulateur imputé du miR candidat a été mis en cause selon le sens de modulation du miR et la condition associée (vaso-oblitération ou inflammation).

Ensuite, lors du travail préalable de détermination de la modulation des miRs dans le modèle d'OIR, une analyse bio-informatique a été réalisée pour identifier les cibles angiogéniques et inflammatoires potentiellement modulées par certains miRs (Desjarlais et al, 2019).

Enfin, une revue de la littérature a été réalisée via pubmed pour valider le rôle connu de ces miRs dans d'autres pathologies et dans les mécanismes d'inflammation et d'angiogenèse.

Nous y reviendrons dans la section résultats mais les miRs sélectionnés ont été le miR-125a pour l'inflammation et le miR-96 pour l'angiogénèse.

2. Études *in vitro*

2.1 Culture cellulaire pour les essais *in vitro* sur l'inflammation

Les cellules microgliales (SIM-A9) ont été choisies pour étudier l'inflammation compte tenu de leur rôle primordial dans la régulation de l'inflammation dans la rétine. Elles ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (cat CRL-3265) et cultivées dans du DMEM/F12 (Life technologies) additionné de 10 % de sérum bovin fœtal inactivé par traitement thermique (FBS, Wisent, St-Jean- Baptiste, QC, Canada), 100 UI/ml de pénicilline/0,1 mg/ml de streptomycine (Wisent) et 10 % de sérum de cheval donneur inactivé par traitement thermique (Thermos Fisher).

Les SIM-A9 ont été mises en culture à 37 °C, dans un environnement à 5 % de CO₂ et 95 % d'air, et le milieu de culture a été changé tous les 2 jours. Les cellules ont été passées lorsqu'elles atteignaient 90 % de confluence ; les passages 3 à 8 ont été utilisés pour les expériences.

Les SIM-A9 ont été mises en condition inflammatoire soit par hyperoxie, soit par inflammation induite par LPS. Ainsi, les SIM-A9 ont été soumises ou non à une hyperoxie (80%) en utilisant des chambres de surveillance d'oxygène pendant différentes durées (1, 3, 6 et 24h). Dans d'autres expériences, les SIM-A9 ont été soumises ou non au LPS (1µg/ml) pendant différentes durées (1, 3, 6 et 24h).

2.2 Culture cellulaire pour les essais *in vitro* sur l'angiogénèse

Les cellules endothéliales microvasculaires rétiniennes humaines (HRMEC) ont été choisies pour étudier l'angiogénèse rétinienne. Elles ont été obtenues auprès de Applied Biological Materials (cat T4169) et cultivées dans du milieu 200 (Life technologies)

additionné de 10 % de sérum bovin foetal inactivé par traitement thermique (FBS, Wisent, St-Jean- Baptiste, QC, Canada), 100 UI/ml de pénicilline/0,1 mg/ml de streptomycine (Wisent) et un supplément à faible croissance sérique (LSGS composé de 2 % de FBS, 3 ng/ml de bFGF, 10 mg/ml d'héparine, 1 µg/ml d'hydrocortisone et 10 ng/ml de facteur de croissance épidermique ; LifeTechnologies).

Les HRMECs ont été mises en culture à 37 °C, dans un environnement à 5 % de CO₂ et 95 % d'air, et le milieu de culture a été changé tous les 2 jours. Les cellules ont été passées lorsqu'elles atteignaient 90 % de confluence ; les passages 3 à 6 ont servi pour les expériences.

Les HRMECs ont été mises en condition d'hyperoxie (80%) en utilisant des chambres de surveillance d'oxygène pendant différentes durées (1, 3, 6, 24h et 48h).

Afin d'évaluer l'impact du sécrétome des cellules microgliales, le milieu de culture des SIM-A pré-transfectées ou non et pré-conditionnées par l'hyperoxie ou non a été gardé (Soit trois conditions : normoxie, hyperoxie et hyperoxie avec miR-125a). Il a été administré aux HRMEC pour un ratio de 1/3 de milieu de culture de cellules microgliales et 2/3 de milieu complet de HRMEC.

2.3 Transfection *in vitro* des miRs candidats

Les transfections ont été réalisées à une concentration de 50 nM en utilisant le réactif Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher, ON, Canada) selon le protocole du fabricant. Les cellules SIM-A9 ou HREMC ont été transfectées 24 h après avoir été étalées dans des plaques à 6 puits avec les miR-125a-5p mimic acheté chez Abm (Applied Biological Materials Inc, Richmond, BC, CA), hsa-miR-96-5p mimic et antago-miR-96-5p provenant de Dharmacon (GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, CO) dans du milieu basal. Après 6h, le milieu de transfection a été remplacé par du milieu de culture complet pour 18h (24h totales de transfection) puis les cellules ont été soumises aux différentes conditions testées.

L'efficacité de cette méthode de transfection a été évaluée 80 à 90 % en utilisant le contrôle de transfection mimique Dy547 (Dharmacon) et par PCR (Kumar et al, 2015; Desjarlais et al, 2017; Desjarlais et al, 2019; Desjarlais et al, 2020)

3. Études *in vivo*

3.1 Soins aux animaux

Toutes les expérimentations animales ont été approuvées par le Comité de Protection des Animaux de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont selon les directives établies par le Conseil canadien de protection des animaux. Les rats albinos Sprague–Dawley provenant de la société Charles River (St. Constant, Québec, Canada) ont été utilisés pour les expérimentations *in vivo*. Une fois nés, ils ont été placés dans les conditions nécessaires aux expérimentations en présence de leur mère. Les cycles naturels de lumière ont été respectés, de même que l'hydratation et l'alimentation (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

3.2 Modèle de vaso-oblitération à exposition continue d'oxygène

Le modèle favorisant la vaso-oblitération chez le raton a été utilisé pour apprécier la modulation de la fonction angiogénique du miR-96 dans la rétine et les effets vasoprotecteurs potentiels de la thérapie à base de miR pendant la dégénérescence vasculaire (Rivera et al., 2015). Une vaso-oblitération rétinienne a été induite chez les rats soumis à une hyperoxie continue (80 % d'O₂) de P5 à P10 dans des chambres contrôlées par un oxycycleur assisté par ordinateur (BioSpherix, Ltd.). Des rats témoins normoxiques appariés selon l'âge (NOR) ont été maintenus en normoxie (21 % d'O₂) tout au long de l'expérimentation. Trente minutes avant l'exposition à l'hyperoxie à P5, les rats OIR ont été anesthésiés et ont reçu une injection intravitréenne ou non, avec 1 µl (1 mg/kg) de miR-96-5p mimic, ou un contrôle négatif (GE Healthcare Dharmacon,

Lafayette, CO). Cette dose a été choisie sur la base d'expériences préliminaires montrant la gamme de doses pour une efficacité de transfection optimale dans les tissus (Desjarlais et al., 2017). Les miARN ont été administrés dans une solution mélangée d'InvivoFectamine 3.0 (Thermo Fisher, ON, Canada) selon les recommandations du fabricant. Pour l'analyse moléculaire, les animaux OIR et témoins ont été euthanasiés et les yeux ont été récupérés à P6, P8, P10 (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

3.3 Modèle d'inflammation induite par LPS chez le rat

Afin d'évaluer l'impact de l'inflammation induite sur l'expression du miR-125a, un processus inflammatoire systémique a été induit. Les rats albinos Sprague-Dawley (Charles River, St. Constant, QC, Canada) ont été injectés au jour postnatal 5 (P5) avec 1 mg/kg de LPS (*Escherichia coli* O55:B5 lipopolysaccharide, L2880 ; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) par voie intrapéritonéale afin de mimer l'état inflammatoire systémique que l'on retrouve chez les nouveau-nés prématurés. Le groupe de rats témoins a été injecté par voie intrapéritonéale avec une solution saline normale. Les rats ont été maintenus en normoxie jusqu'à ce qu'ils aient été sacrifiés à P10. Les yeux ont été prélevés et les rétines isolées.

3.4 Modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) par cycling 50/10 chez le rat

Le modèle d'OIR cyclique chez le raton a été utilisé, pour évaluer le profil d'expression du miR-125a et des facteurs ciblés de l'inflammation dans la rétine au cours de la phase de vaso-oblitération pathologique de cette maladie. Les rats ont été placés avec leur mère dans un environnement régulé en oxygène par OxyCycler A820CV (BioSpherix, Ltd., Redfield, New-York, USA) dès le jour postnatal 1 (P1). Le modèle cyclique (Figure 22) correspond à une alternance de conditions d'hyperoxie et d'hypoxie avec une exposition à 50% de fraction inspirée en oxygène dès le premier jour postnatal (P1) en alternance toutes les 24 heures avec une exposition à une fraction inspirée en oxygène à 10%

jusqu'au quatorzième jour de vie (P14). Les ratons et leur mère sont ensuite remis en normoxie. La phase de dégénérescence microvasculaire a lieu progressivement entre P1 et P14 durant ce modèle avec un pic de vaso-oblitération à P14. La phase de néovascularisation secondaire post-ischémique a lieu à partir de P14 avec une acmé à P17 (Rivera et al, 2015; Desjarlais et al, 2019). Les ratons soumis au modèle cyclique d'oxygène seront nommés « OIR ».

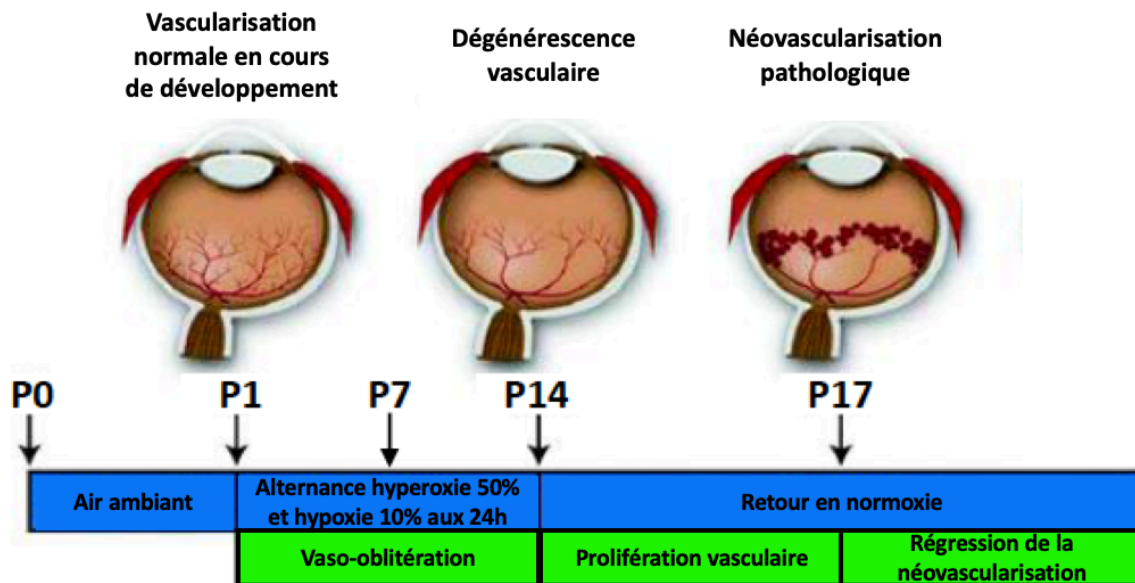


Figure 22: Modèle d'OIR cyclique. Ce modèle consiste en la mise en alternance de conditions d'hyperoxie et d'hypoxie avec une exposition à 50% de fraction inspirée en oxygène dès le premier jour postnatal (P1) en alternance toutes les 24 heures avec une exposition à une fraction inspirée en oxygène à 10% jusqu'au quatorzième jour de vie (P14). Les ratons et leur mère sont ensuite remis en normoxie.

Figure adaptée de (Tsang et al, 2019)

Le groupe témoin de ratons contrôle du même âge postnatal, groupe « NOR », correspond à des ratons maintenus en air ambient (fraction inspirée d'oxygène à 21%). Les ratons OIR ont été anesthésiés à P5 et ont reçu une injection intravitréenne avec 1 μ l (10 nM/kg) de miR-125a-5p mimic acheté chez Abm (Applied Biological Materials Inc, Richmond, BC, CA) ou un contrôle négatif miR-scrambled. La dose a été choisie selon le

panel de doses utilisées dans la littérature, pour une visée de concentration minimale efficace (Cheng et al, 2019) afin de réguler l'inflammation mais de ne pas la bloquer complètement compte-tenu de son impact sur l'angiogenèse. Le miR-mimic a été administré dans une solution mélangée d'InvivoFectamine 3.0 (Thermo Fisher, ON, Canada) selon les recommandations du fabricant. Les yeux ont été prélevés à P10 et P14 au durant la phase de vaso-oblitération de l'OIR. Les rétines ont été isolées.

3.5 Extraction des yeux et isolation des rétines et des choroïdes

En vue du sacrifice les rats ont été anesthésiés puis euthanasiés. Les yeux ont alors été énucléés et réservés dans du PBS pour être immédiatement disséqués afin d'isoler les rétines et les choroïdes en vue des analyses moléculaires et protéiques. Les yeux utilisés pour les montages à plat ou la cryosection ont été conservés dans le PFA avant dissection et isolation de la rétine pour le montage à plat ou avant la cryosection.

4. Analyses

4.1 Analyses moléculaires par qRT-PCR

Isolation de miRs et validation par qRT-PCR du miR-96

Pour établir les effets de l'hyperoxie sur l'expression du miR-96, l'ARN total a été extrait des rétines de rats soumis aux conditions d'hyperoxie et de normoxie (NOR) (modèle de vaso-oblitération induite par oxygénation continue à 80%) à P6, P8 et P10, et dans des cellules endothéliales rétinienne microvasculaires humaines (HRMEC) soumis ou non à une hyperoxie (80%O₂) pendant 1, 3, 6, 24 et 48h, en utilisant le mini kit miRNeasy (Qiagen) selon les consignes du fabricant. L'ARN a été rétrotranscrit à l'aide du kit miScript II RT (Catalogue # 218161, QIAGEN, Hilden, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. La PCR en temps réel a été réalisée en utilisant 25 ng d'échantillon d'ADNc,

l'agent d'amplification iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) avec 2 μ M d'amorces de miR-96-5p conçues à l'aide du logiciel Primer Bank et NCBI Primer Blast (Alpha DNA, Montréal Canada). L'expression relative (RQ = Δ/Δ CT) a été évaluée à l'aide du système de détection ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et normalisée avec les petits ARNs nucléaires 18S et U6 (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Isolation de miRs et validation par qRT-PCR du miR-125a

L'isolation et la validation de l'expression du miR-125a a été réalisée sur la même base méthodologique que pour le miR-96 (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Pour valider l'expression du miR-125a en contexte d'hyperoxie, l'ARN total a été extrait des rétines de rats prélevées à P10 en conditions OIR (modèle cyclique d'OIR) et normoxie, et dans des cellules microgliales activées (SIM-A9) soumises ou non à l'hyperoxie (80% O₂) pendant 1, 3, 6 et 24h, ou au LPS à la concentration de 1 μ g/mL pendant 1, 3, 6 et 24h. L'extraction a été réalisée avec le mini kit miRNeasy (Qiagen) selon le protocole défini par le fabricant. La rétrotranscription de l'ARN a été effectuée en utilisant le kit miScript II RT (Catalogue # 218161, QIAGEN, Hilden, Allemagne) conformément aux instructions du fabricant. Pour la PCR en temps réel, il a été utilisé 25 ng d'échantillon d'ADNc, ainsi que l'agent d'amplification iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) avec 2 μ M de *primer* de miR-125a conçu à partir du logiciel Primer Bank et NCBI Primer Blast (Alpha DNA, Montréal, Canada). L'expression relative (RQ = Δ/Δ CT) a été évaluée à l'aide du système de détection ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et normalisée avec les petits ARNs nucléaires 18S et U6.

Analyse qRT-PCR

Pour explorer le niveau des ARNm des facteurs inflammatoires dans les SIM-A9 et dans les rétines des rats et le niveau des ARNm des facteurs angiogéniques dans les HMREC

et dans les rétines des rats, l'ARN total a été extrait des échantillons à l'aide du kit RNeasy mini (Qiagen) selon les directives du fabricant et a été transcrit à l'aide du kit iScript-II RT (Qiagen) selon les consignes du fabricant pour produire de l'ADNc. La réaction de PCR quantitative en temps réel a été réalisée en utilisant 25 ng d'échantillon d'ADNc, 2 µM d'amorces spécifiques pour les ARNm choisis (Alpha DNA, Montréal, Canada) et de l'Universal SYBR Green Supermix (BioRad). L'expression relative ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$) a été mesurée à l'aide du système de détection de l'instrument ; ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) et normalisé à b-Actin et GAPDH (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

4.2 Analyses protéiques en Western Blot

Concernant les expérimentations sur le miR-125a-5p, les taux de protéines de TNF- α , IL-6 et IL-16 ont été analysés par Western blots dans la rétine des différents groupes de rats et dans les différents échantillons de SIM-A9. Concernant les expérimentations sur le miR-96 (Desjarlais, Wirth et al, 2020), les taux de protéines de VEGF, Ang2 et FGF-2 ont été analysés par Western blots dans la rétine des différents groupes de rats et dans les différents échantillons de HRMEC.

Les rétines isolées des différents groupes de rats ont été lavées dans du PBS. Pour obtenir les extraits protéiques, elles ont ensuite été homogénéisées dans 250 µl de tampon de lyse RIPA à une température de +4°C (pH = 8) contenant 50 mM de Tris-HCL, 150 mM de NaCl, 5 mM d'EDTA, 1% de Triton 100 x, du désoxycholate de sodium 0,5%, du SDS 0,1% avec un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (MiniComplete, PhosphoStop et PMSF, Roche, Bâle, Suisse). Les SIM-A9 et les HRMEC ont été lysées avec 100 µl par puits de tampon de lyse, récoltées puis soniquées. 50 µg de protéines par échantillon d'homogénat de rétine pour les expériences concernant le miR-125a et le miR-96 et 20 µg de protéines par échantillon de lysat cellulaire ont été séparés sur un gel de SDS-polyacrylamide et électrotransférés sur des membranes de nitrocellulose. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués avec une solution à 5

% de lait-TBS-Tween pendant 1 h. Les anticorps spécifiques ont été appliqués à la membrane pendant une nuit à 4°C: anticorps de lapin TNF alpha (1:1000, ab6671; ABCAM; (Abcam Cat# ab6671, RRID:AB_305641), anticorps de lapin IL-6 (1:1,000, ab208113; ABCAM; (Abcam Cat# ab208113, RRID:AB_2927421)), anticorps de lapin IL-16 (1 :1000, ab180792; ABCAM), anticorps de lapin VEGF (1:500, sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; (Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-152, RRID:AB_2212984), anticorps de chèvre Ang2 (1:1,000, ab10601; ABCAM; (Abcam Cat# ab10601, RRID:AB_297329), anticorps de souris FGF-2 (1:1000, ab181; ABCAM; (Abcam Cat# ab181, RRID:AB_302619), GAPDH (1:2,000, ab181602; ABCAM; (Abcam Cat# ab181602, RRID:AB_2630358). ou β -actin (1:1000, sc-47778; Santa Cruz Biotechnologies; Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-47778, RRID:AB_626632). Les membranes ont ensuite été lavées à trois reprises pendant 10 min avec du TBS-T et incubées pendant 1 h avec des anticorps secondaires HRP (1: 2 000) anti-lapin, anti-souris ou anti-chèvre (Millipore). Les protéines distinctes ont été détectées sous réaction chimioluminescente (GE Healthcare, Piscataway, NJ) par exposition des membranes avec un imageur LAS-3000. L'expression de ces protéines a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ et les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs de densité normalisées par rapport au contrôle.

4.3 Immunohistochimie des vaisseaux réiniens

Pour examiner le système vasculaire rétinien, une dissection rétinienne à plat a été réalisée sur les yeux énucléés fixés dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 1 h à température ambiante, puis stockés dans du PBS jusqu'à leur utilisation. Les rétines ont été incubées pendant une nuit dans 1 % de Triton X100, 1 mM de CaCl₂/PBS avec le marqueur de cellules endothéliales de lectine conjugué à l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine *Bandeiraea simplicifolia* (1:100 ; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Les rétines ont été lavées dans du PBS et montées sur des lames de microscope (Bio Nuclear Diagnostics, Inc., Toronto, ON, Canada) sous des lamelles avec un milieu de montage (Fluoro-Gel; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Les rétines ont

été photographiées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Zeiss AxioObserver; Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada), et les images ont été fusionnées en un seul fichier à l'aide de l'option MosiaX du logiciel AxioVision 4.6.5 (Zeiss).

La vaso-oblitération de la microvascularisation rétinienne a été quantifiée par le pourcentage de la zone avasculaire périphérique rétinienne pour le modèle cyclique OIR et par le pourcentage de la zone avasculaire centrale et périphérique rétinienne pour le modèle de vaso-oblitération par exposition continue à 80% d'oxygène (Rivera et al, 2015; Desjarlais, Wirth et al, 2020) en utilisant le logiciel Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>; fourni dans le domaine public par les National Institutes of Health, Bethesda, MD, États-Unis).

4.4 Immunohistochimie des vaisseaux choroïdiens

Pour évaluer le système vasculaire choroïdien, des coupes transversales des yeux ont été réalisées par cryosection. Les yeux ont été extraits, déshydratés à l'alcool et inclus dans de la paraffine. Des coupes sagittales de 7 µm d'épaisseur ont été effectuées au microtome (RM 2145 ; Leica, Wetzlar, Allemagne). Les coupes contenant la partie postérieure de la rétine ont été congelées. Ces coupes ont ensuite été marquées pour visualiser les vaisseaux choroïdiens avec de la lectine marquée à l'isothiocyanate de tétraméthylrhodamine conjuguée au TRITC (Sigma-Aldrich). Elles ont ensuite été observées avec un microscope à épifluorescence (Eclipse E800; Nikon, Tokyo, Japon) (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

4.5 Test de germination microvasculaire des explants choroïdiens du modèle de vaso-oblitération (Hyperoxie continue à 80%)

Le bourgeonnement angiogénique des choroïdes isolées des différents groupes de rats a également été évaluée. Les choroïdes de rats ont été isolées des yeux prélevés à P10, coupées en cercles de 1 mm et placées dans du Matrigel à facteur de croissance réduit

(Fisher Scientific, New Hampshire, États-Unis) dans des plaques de 24 puits et cultivées à 37 °C, dans un environnement à 5 % CO₂ et 95 % d'air, pendant 5 jours dans le milieu de croissance des cellules endothéliales HRMEC tel que préalablement décrit. Les explants individuels ont été observés au jour 5 avec un microscope à contraste de phase inversé (AxioObserver; Zeiss). La zone de bourgeonnement microvasculaire a été quantifiée (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

4.6 Essais de tubulogénèse des HMRECs sur Matrigel

Les capacités angiogéniques microvasculaires des HRMECs ont été évaluées au moyen d'un test de formation de tubules sur essai de Matrigel. Les HRMEC pré-transfectées ou non par le miR-96 mimic ou l'antago-miR 96 ont été étalées à une densité de 30 000 cellules/puits dans des plaques à 96 puits pré-enduites de 50 µl de Matrigel (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) et cultivées à 37°C dans 150 µL de milieu de croissance endothélial complet en condition de normoxie et d'hyperoxie pendant 6 h après l'étalement sur le Matrigel (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Afin d'évaluer si le miR-125a a un rôle dans la modulation des capacités angiogéniques des HRMECs, celles-ci ont été pré-transfectées ou non par le miR-125a mimic puis ont été étalées à une densité de 30 000 cellules/puits dans des plaques à 96 puits pré-enduites de 50 µl de Matrigel et cultivées à 37°C dans 150 µL de milieu de croissance endothélial complet en condition de normoxie pendant 6 h.

Pour évaluer l'impact du sécrétome des SIM-A9 sur les HRMEC, les HRMECs ont été étalées à une densité de 30 000 cellules/puits dans des plaques à 96 puits sur Matrigel et cultivées à 37°C dans 100 µL de milieu de croissance endothélial complet et 50 µL de milieu de culture de SIM-A9 préconditionnées (en normoxie, hyperoxie ou hyperoxie après avoir été transfectées par le miR-125a mimic) pendant 6 h après l'étalement sur le Matrigel.

La formation de tubules a été observée au microscope optique. Les images ont été obtenues à un grossissement de 10 × et tous les tubules ont été comptés.

4.7 Test de migration des cellules endothéliales

L'évaluation de la migration cellulaire a été effectuée par un test de grattage dans des puits de cellules HRMEC confluentes. Les cellules ont été transfectées et cultivées à quasi confluence dans des plaques 24 puits et mises ou non en condition d'hyperoxie (80% O₂). La cassure mécanique de la monocouche a été réalisée en grattant avec une pointe de pipette. La migration a été évaluée 24 h après à l'aide d'un microscope inversé. L'espace de migration a été quantifié. Six champs par puits ont été évalués et toutes les expériences ont été réalisées en double (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

4.8 Étude de la prolifération des cellules endothéliales

Afin d'étudier l'impact du sécrétome des cellules microgliales, les cellules HRMEC ont étéensemencées à la densité de 20000 cellules/puits sur dans une plaque de 24 puits et ont été soumises à une mise en culture par mélange de milieu de 2/3 de milieu complet de cellules endothéliales et 1/3 de milieu de culture de cellules microgliales pré-conditionné tel que décrit préalablement. Au bout de 48h, les puits ont été lavés au PBS à 37°C, puis trypsinisés afin de permettre un compte cellulaire au microscope.

5. Analyses statistiques

Tous les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm somme des écarts type à la moyenne. La signification statistique a été évaluée avec le logiciel GraphPad Prism par un test de Student ou un test de Mann-Whitney pour les tests à deux variables. Pour les tests à plus de deux variables, une ANOVA à une ou deux voies suivie d'un test post hoc de Bonferroni. Une valeur de $P < 0,05$ a été interprétée comme dénotant une différence significative (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

IV. Résultats

1. Caractérisation d'un miR modulant l'angiogenèse dans l'OIR

1.1 Sélection du miR-96

Nous avons pu mettre en évidence au préalable que le miR-96 est fortement exprimé dans la rétine et la choroïde au cours de la phase de vaso-oblitération, qu'il est fortement diminué dans la choroïde à P7 et fortement diminué dans la rétine à P14, en faisant un candidat intéressant dans la protection de la dégénérescence vasculaire et choroïdienne et donc le maintien en santé de la rétine interne et externe dans le processus d'OIR (Desjarlais et al, 2019).

Le miR-96 est impliqué dans le développement neurosensoriel, notamment auditif central (Schlüter et al, 2018). Il a par ailleurs un rôle dans la maturation, l'homéostasie et la fonction rétinienne (Lumayag et al, 2013). Dans l'analyse bio-informatique réalisée au cours de notre travail de séquençage, le miR-96 n'était pas prédit pour moduler l'angiogenèse (Desjarlais et al, 2019). Le miR-96 a essentiellement été caractérisé comme favorisant la prolifération cellulaire avec une promotion de l'angiogenèse tumorale dans les pathologies néoplasiques (Ma et al, 2018; Lin et al, 2010; Li et al, 2017; Li et al, 2018). En revanche, son rôle dans l'angiogenèse n'est clairement pas établi dans les pathologies non cancéreuses, et notamment dans l'OIR.

Ainsi, le miR-96 semble un candidat intéressant du fait de son expression dans la rétine et la choroïde en développement, de sa modulation négative durant la phase de vaso-oblitération et de la présomption d'une activité pro-angiogénique le concernant.

1.2 Validation de la modulation du miR-96 dans le modèle de vaso-oblitération

Afin de valider la modulation du miR-96 en condition de vaso-oblitération *in vivo*, nous avons analysé des rétines à P6, P8 et P10 du modèle d'oxygénothérapie continue à 80%.

L'expression du miR-96 était significativement diminuée dans les rétines de rats du groupe OIR par rapport à celles des rats du groupe contrôle (Figure 23), confirmant ainsi sa modulation dans le contexte de vaso-oblitération. Par ailleurs, il est intéressant de noter que sa régulation négative a lieu précocément, déjà 24h après la mise en hyperoxie (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

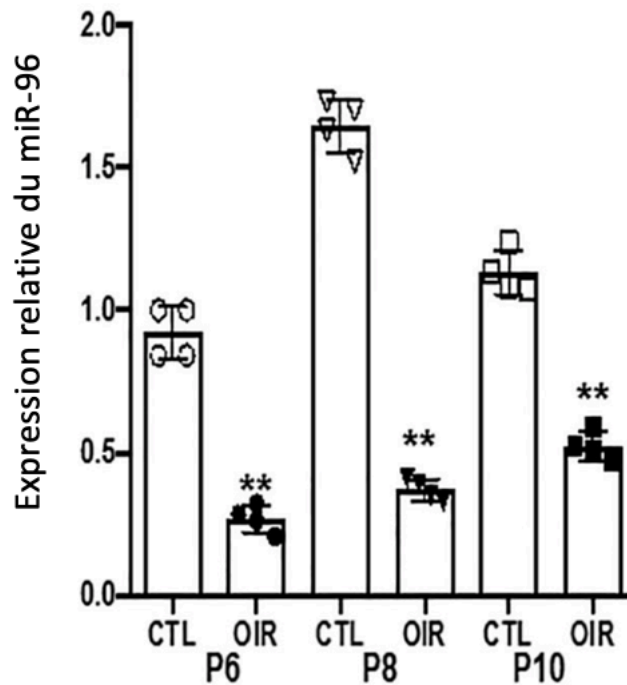


Figure 23: Réduction de l'expression du miR-96 dans le modèle OIR de vaso-oblitération (Oxygénothérapie continue à 80% de P5 à P10). Expression obtenue en qRT-PCR. Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

CTL : groupe contrôle; OIR : groupe OIR; P : jour postnatal.

** $p < 0,01$ pour les comparaisons OIR par rapport au contrôle.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

1.3 Validation de la modulation du miR-96 dans les cellules endothéliales en condition d'hyperoxie

Comme nous nous intéressons à l'angiogenèse, il convenait de vérifier que l'hyperoxie modulait l'expression du miR-96 dans les cellules endothéliales microvasculaires rétinienne humaines (HRMEC). Dans ces cellules soumises à une hyperoxie contrôlée à 80%, l'expression du miR-96 chute significativement à partir de 6h d'exposition à l'hyperoxie et persiste dans le temps (Figure 24).

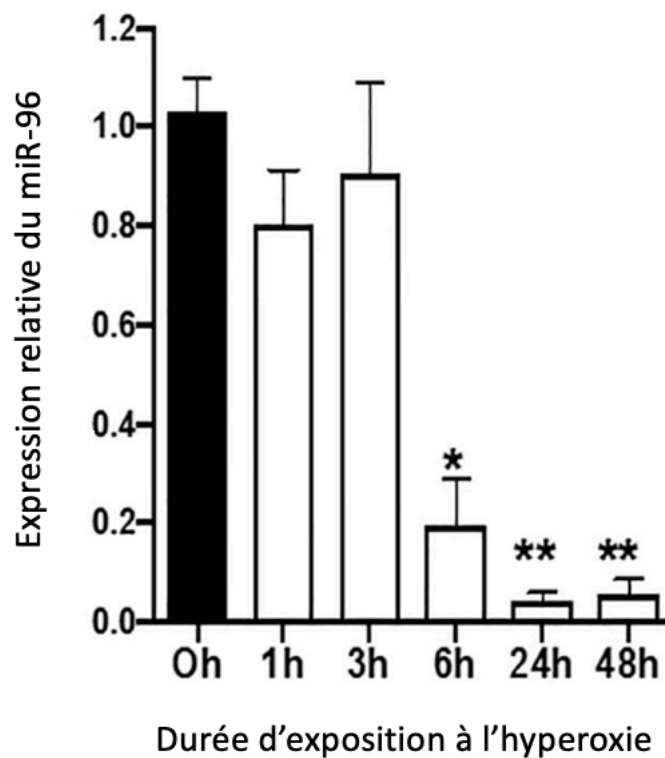


Figure 24: Modulation négative de l'expression du miR-96 dans les cellules endothéliales microvasculaires rétinienne humaines soumises à l'hyperoxie (80% d'oxygène). Expression obtenue en qRT-PCR.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

** $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ pour les comparaisons par rapport au contrôle.*

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

En effet, le niveau d'expression du miR-96 est encore significativement bas à 48h d'exposition d'hyperoxie (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Cela suggère que l'hyperoxie peut altérer la fonction des cellules endothéliales rétinienne durant l'OIR par modulation négative significative de l'expression du miR-96 en leur sein.

1.4 Validation de l'efficacité de transfection du miR-96 mimic et de l'antago-miR-96

Nous avons validé l'efficacité de la transfection à la concentration efficace utilisée dans des études ultérieures (Desjarlais et al, 2017; Desjarlais et al, 2019). La transfection du mi-96 mimic (Figure 25.A) et de l'antagomiR-96 (Figure 25.B) dans les cellules endothéliales rétinienne marquait une régulation de l'expression du miR-96 significative lors de l'utilisation de la concentration de 50 nM/ml. Ainsi, nous avons choisi d'utiliser cette dose de modulateurs de l'expression du miR-96 pour nos expériences sur les HRMECs (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

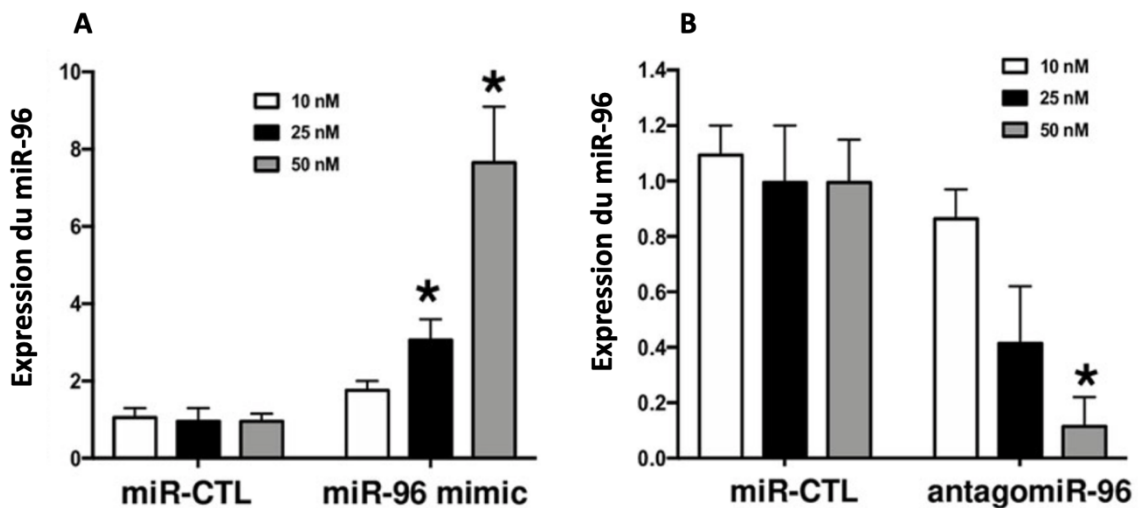


Figure 25: Efficacité de la transfection sur l'expression du miR-96. (A) Efficacité du miR-96 mimic; (B) Efficacité de l'antagomiR-96. Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. * $p < 0,05$ par rapport aux cellules transfectées avec le contrôle. Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

1.5 Modulation de l'expression de facteurs angiogéniques dans les cellules endothéliales par le miR-96

Nous avons ensuite évalué si la modulation de l'expression du miR-96 dans les cellules endothéliales rétiniennes pouvait réguler l'expression de facteurs impliqués dans l'angiogenèse (Figure 26).

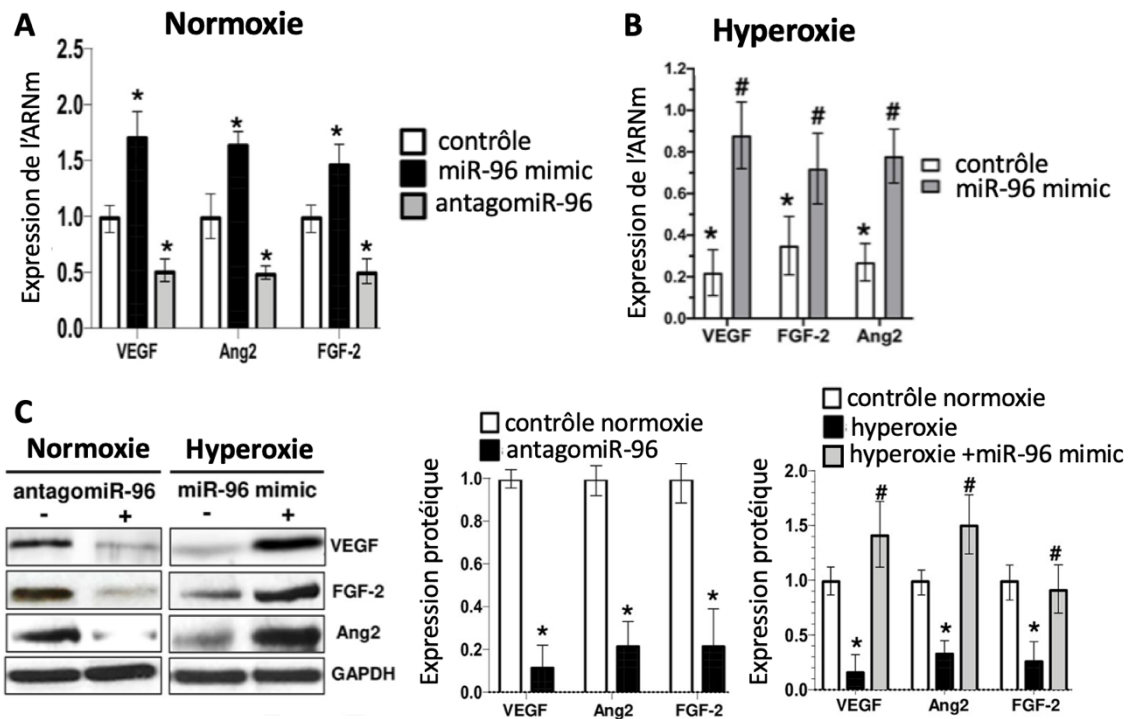


Figure 26: Régulation positive concomitante de l'expression de VEGF, FGF-2 et Ang2 par le miR-96 dans les cellules endothéliales rétiniennes. (A) Analyse de la régulation de l'expression de VEGF/Ang2/FGF-2 en qRT-PCR par la modulation du miR-96 en condition basale; (B) Analyse de la régulation de l'expression de VEGF/Ang2/FGF-2 en qRT-PCR par la modulation du miR-96 en condition d'hyperoxie; (C) Analyse du potentiel régulateur du miR-96 sur l'expression protéique des facteurs VEGF/Ang2/FGF-2 en western blot.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

* $p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au contrôle en normoxie.

$p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au contrôle en hyperoxie.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Il s'est avéré que l'expression des ARN messagers des facteurs pro-angiogéniques VEGF, Ang2 et FGF-2 était significativement modulée à la hausse avec l'utilisation du miR-96 mimic et était réprimée avec l'utilisation de l'antagomiR-96 (Figure 26.A). En condition d'hyperoxie, l'utilisation du miR-96 mimic permettait de prévenir la baisse de ces facteurs induite par l'hyperoxie au niveau moléculaire (Figure 26.B). L'expression protéique de ces facteurs était également modulée par le miR-96, avec une diminution de leur expression lors de l'utilisation de l'antago-miR-96 en normoxie. La baisse de l'expression protéique de ces facteurs, induite par l'hyperoxie, était quant à elle récupérée lorsque les cellules avaient été transfectées préalablement par le miR-96 mimic (Figure 26.C).

Le miR-96 est donc un facteur clé important dans la régulation de l'expression des facteurs pro-angiogéniques dans la rétine en régulant positivement les facteurs VEGF, Ang2 et FGF-2, nécessaires à l'homéostasie et la fonction des cellules endothéliales rétiniennes, et ce notamment en condition d'hyperoxie (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

1.6 Régulation de la tubulogénèse des cellules endothéliales rétiniennes soumises à l'hyperoxie par le miR-96

Nous nous sommes ensuite intéressés à évaluer le rôle protecteur du miR-96 sur la fonction angiogénique des cellules endothéliales rétiniennes. Pour cela, nous avons observé les capacités de tubulogénèse des cellules endothéliales rétiniennes transfectées par le miR-96 en condition d'hyperoxie ou l'antagomiR-96 en condition de normoxie sur essai de matrigel *in vitro* (Figure 27).

En condition de normoxie, la transfection par le miR-96 mimic permettait de majorer la tubulogénèse des cellules endothéliales par rapport à celles ayant reçu le contrôle, tandis que l'antagomiR-96 l'altérait. En condition d'hyperoxie, la tubulogénèse des cellules endothéliales rétiniennes était altérée, comme attendue, par rapport aux cellules en normoxie. En revanche, la transfection préalable par le miR-96 mimic permettait d'assurer leurs capacités de tubulogénèse. A contrario, la transfection par l'antagomiR-

96 potentialisait l'effet de la dégradation de la tubulogénèse induite par l'hyperoxie (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

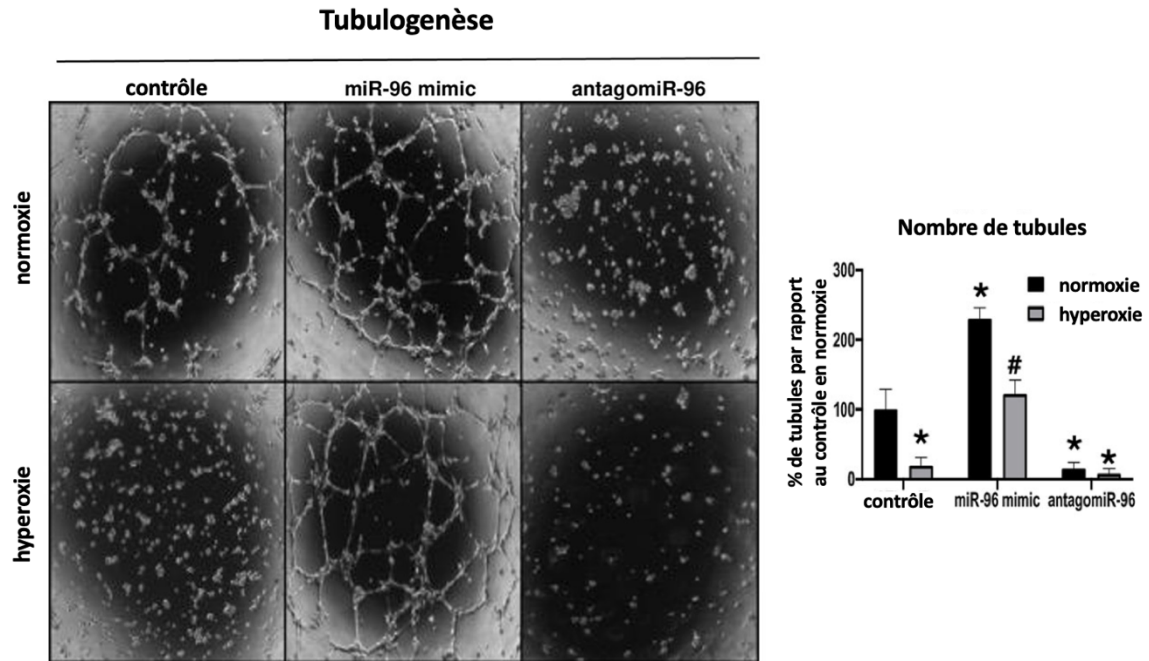


Figure 27: Effet protecteur du miR-96 vis-à-vis de la tubulogénèse des cellules endothéliales. Évaluation réalisée sur essai de Matrigel avec des cellules endothéliales rétiniennes ayant été préalablement traitée par un contrôle, le miR-96 mimic ou un antagomiR-96 et soumises ou non à l'hyperoxie.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

* $p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au contrôle en normoxie.

$p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au contrôle en hyperoxie.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Ainsi, le miR-96 protège les aptitudes de tubulogénèse des cellules endothéliales soumises à l'hyperoxie. Cet effet peut être expliqué par la préservation des niveaux de VEGF, Ang2 et FGF-2 suite à la supplémentation en miR-96.

1.7 Impact du miR-96 sur la migration des cellules endothéliales rétiniennes soumises à l'hyperoxie

Toujours dans un but d'évaluation du rôle conservateur du miR-96 sur la fonction angiogénique des cellules endothéliales rétiniennes, nous avons étudié l'impact du miR-96 sur la motilité des cellules endothéliales rétiniennes transfectées par le miR-96 en condition d'hyperoxie ou l'antagomiR-96 en condition de normoxie par un test de migration cellulaire *in vitro* (Figure 28).

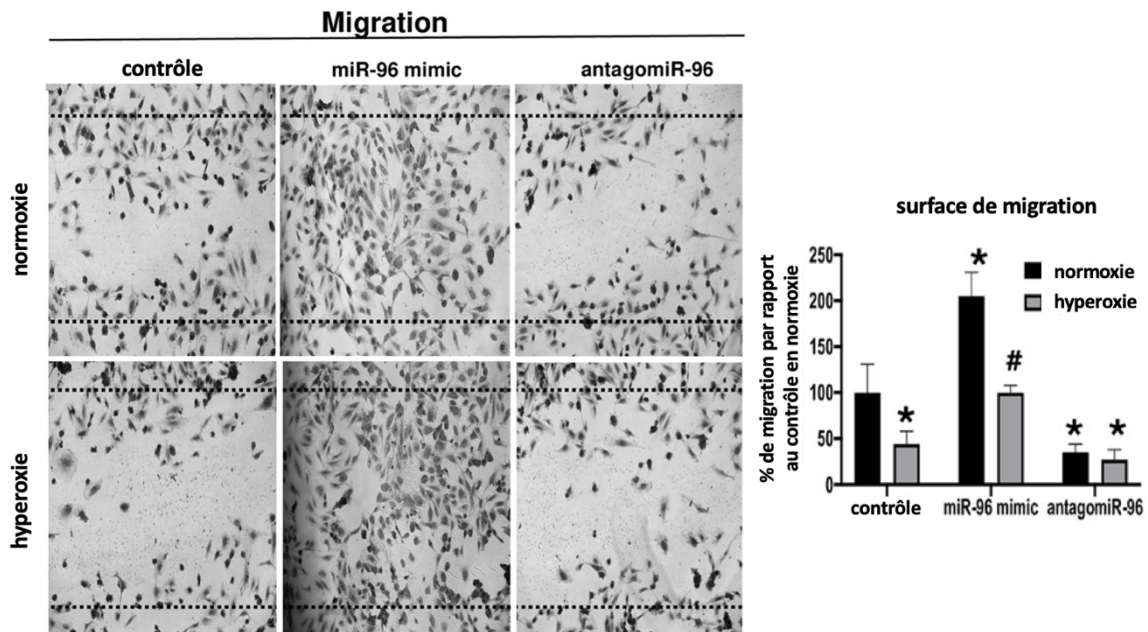


Figure 28: Effet protecteur du miR-96 vis-à-vis de la migration des cellules endothéliales. Évaluation réalisée par test de cicatrisation sur des cellules endothéliales rétiniennes ayant été préalablement traitées par un contrôle, le miR-96 mimic ou un antagomiR-96 et soumises ou non à l'hyperoxie.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

* $p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au contrôle en normoxie.

$p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au contrôle en hyperoxie.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

En condition de normoxie, la transfection par le miR-96 mimic permettait de favoriser la migration des cellules endothéliales par rapport à celles de la condition contrôle, tandis que l'antagomiR-96 la dégradait. En condition d'hyperoxie, la migration des cellules endothéliales rétinienne était altérée, telle qu'attendue, comparée à celle des cellules en normoxie. Cependant, la transfection préalable par le miR-96 mimic permettait de soutenir leurs capacités de motilité. A contrario, la transfection par l'antagomiR-96 majorait l'effet de la dégradation des capacités migratoires induites par l'hyperoxie (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Ainsi, en plus de préserver la tubulogénèse, le miR-96 protège les capacités de migration des cellules endothéliales soumises à l'hyperoxie. Ce résultat peut également être expliqué par la sauvegarde de l'expression de VEGF, Ang2 et FGF-2 par la supplémentation en miR-96 en condition d'hyperoxie.

1.8 Régulation des facteurs angiogéniques *in vivo* après la supplémentation intravitréenne de miR-96 en condition d'OIR

Pour confirmer l'effet pro-angiogénique du miR-96 mimic dans la rétine de rats soumis au modèle de vaso-oblitération de l'OIR, le miR-96 mimic ou un miR-contrôle a été injecté par voie intravitréenne à la dose de 1mg/kg à P5, juste avant l'exposition à l'hyperoxie continue à 80% jusque P10. Les rétines ont été récoltées à P6, P8 et P10. L'efficacité de la supplémentation intravitréenne en miR-96 mimic sur l'expression rétinienne de miR-96 a été évaluée à P10 en qRT-PCR (Figure 29.A). L'évaluation de l'expression de VEGF et Ang2 a été réalisée par analyse moléculaire en qRT-PCR (Figure 29.B) et protéique par western blot (Figure 29.C) à P6, P8 et P10 (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Grâce à la supplémentation intravitréenne en miR-96 mimic, l'expression du miR-96 était conservée à la hausse malgré la condition d'OIR, témoignant de l'efficacité de la transfection par injection intravitréenne. Tel qu'attendu, l'hyperoxie diminue l'expression

de VEGF et Ang2. Conformément aux résultats obtenus *in vitro* sur les cellules endothéliales rétiniennes, la supplémentation intravitréenne en miR-96 permet d'améliorer le niveau d'expression de VEGF et Ang2 dans la rétine lors de l'exposition des rats à l'hyperoxie continue, que ce soit à P6, P8 ou à P10, tant au niveau moléculaire et protéique (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

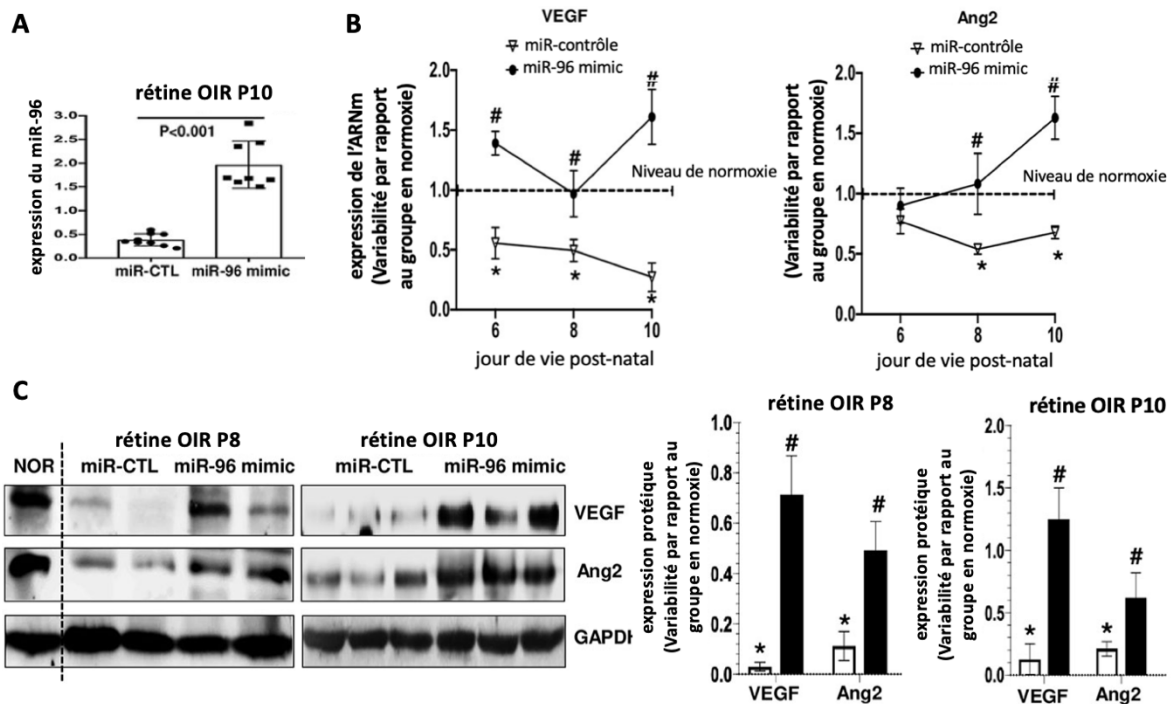


Figure 29: Expression moléculaire et protéique de VEGF et Ang2 dans les rétines de rats soumis au modèle de vaso-oblitération (hyperoxie continue à 80%) et supplémentée ou non par le miR-96 mimic par voie intravitréenne. (A) Efficacité du traitement par augmentation de l'expression de miR-96 en qRT-PCR; (B) Analyse de l'expression de VEGF et Ang2 par qRT-PCR; (C) Analyse de l'expression de VEGF et Ang2 par western blot.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

* $p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au groupe contrôle en normoxie; # $p < 0,05$ pour les comparaisons par rapport au groupe contrôle OIR.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Le miR-96 semble donc pouvoir potentiellement protéger de la dysfonction endothéliale associée à l'hyperoxie par maintien d'un niveau adéquat de ces facteurs pro-angiogéniques durant l'OIR.

1.9 Modulation de la vaso-oblitération rétinienne par l'injection intravitréenne de miR-96 en condition d'OIR

Afin de voir si la restauration des niveaux d'expression de VEGF et Ang-2 dans la rétine des rats durant la vaso-oblitération de l'OIR permettrait de prévenir de la dégénérescence vasculaire rétinienne, nous avons observé l'état de la vaso-oblitération centrale et périphérique spécifique à ce modèle d'OIR chez des rats ayant été préalablement supplémentés par voie intravitréenne avec le miR-96 mimic ou le miR-contrôle (Figure 30).

Nous avons pu constater comme attendu une majoration de la zone avasculaire rétinienne centrale et une diminution de la densité microvasculaire périphérique chez les rats en OIR à P10, témoignant de la vaso-oblitération. La densité vasculaire centrale et périphérique à P10 était cependant améliorée chez les rats en OIR ayant reçu une injection intravitréenne de miR-96 mimic à 1 mg/kg à P5, attestant d'une propriété de protection du miR-96 vis-à-vis de la vaso-oblitération rétinienne de l'OIR (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Ainsi, en accord avec les données précédentes, l'injection intravitréenne de miR-96 mimic 30 minutes avant la mise en hyperoxie continue à 80% a permis de maintenir le niveau d'expression de miR-96 intrarétinien et par conséquent de préserver le niveau d'expression de VEGF et Ang2 dans les cellules endothéliales rétiniennes, ce qui a permis de protéger la rétine contre la dégénérescence microvasculaire et d'encourager la revascularisation durant la phase de vaso-oblitération de l'OIR.

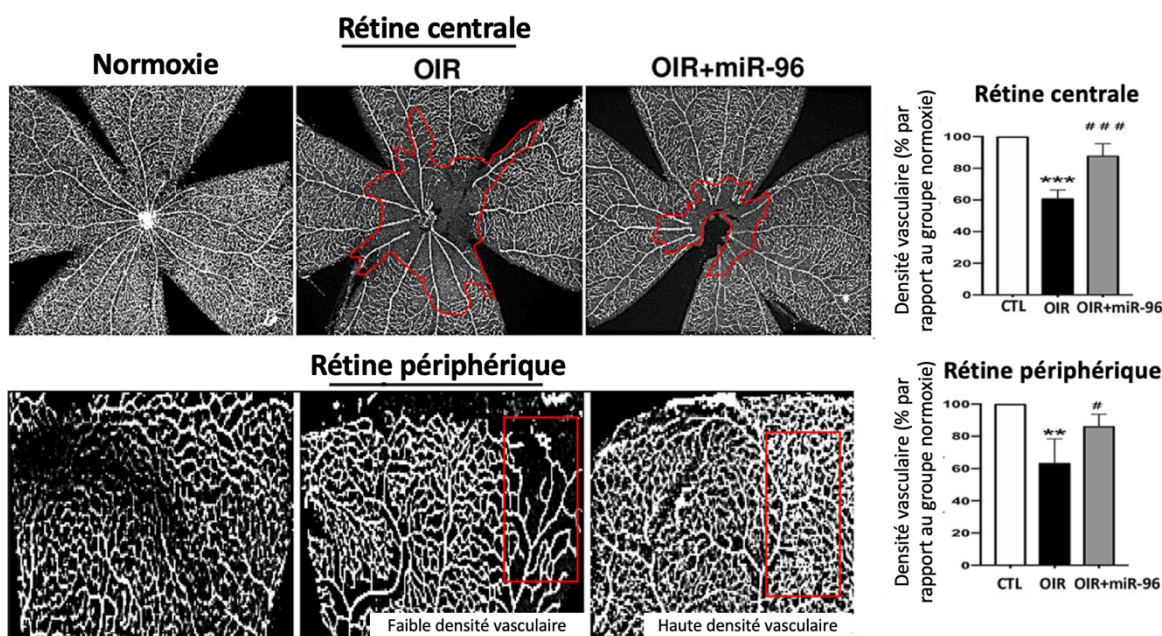


Figure 30: Modulation de la vaso-oblitération rétinienne centrale et périphérique de l'OIR par supplémentation intravitréenne en miR-96. Photographies au microscope de la rétine centrale et périphérique de montages à plat de rétines de rats à P10 dans les conditions de normoxie, OIR et OIR après supplémentation par miR-96 mimic par voie intravitréenne; et quantification de la densité vasculaire associée.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ pour les comparaisons par rapport au groupe contrôle en normoxie (CTL); # $p < 0,05$ ou ### $p < 0,001$ pour les comparaisons par rapport au groupe contrôle OIR.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

1.10 Modulation de la vaso-oblitération choroïdienne par l'injection intravitréenne de miR-96 en condition d'OIR

Le miR-96 étant également fortement exprimé dans la choroïde et modulé à la baisse durant la phase de vaso-oblitération de l'OIR, nous avons observé, par marquage de la sous-rétine, l'état de densité choriocapillaire chez les rats soumis au modèle de vaso-

oblitération de l'OIR par hyperoxie constante à 80% et ayant été supplémentés par voie intravitréenne avec le miR-96 mimic ou le miR-contrôle (Figure 31.A).

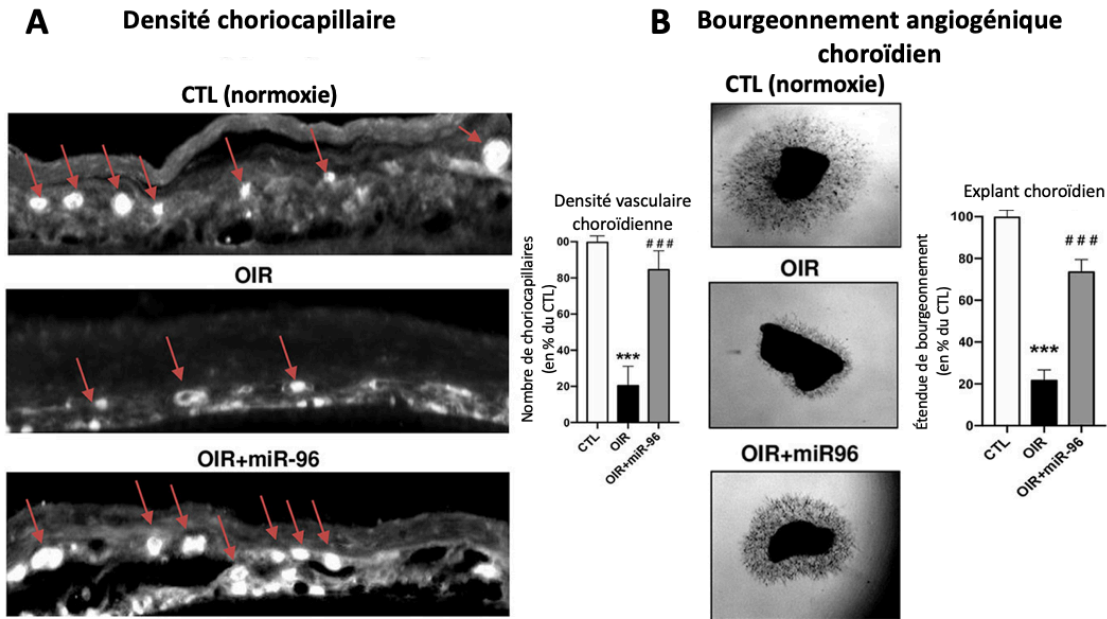


Figure 31: Modulation de la vaso-oblitération choroïdienne de l'OIR par supplémentation intravitréenne en miR-96. (A) Visualisation des choriocapillaires par marquage de la sous-rétine à l'isolectine permettant d'évaluer la densité vasculaire choroïdienne; (B) Photographies du bourgeonnement vasculaire d'explants choroïdiens issus de choroïdes de rats en normoxie, en OIR et en OIR avec une pré-supplémentation intravitréenne en miR-96 mimic. La zone de bourgeonnement a été évaluée et quantifiée au bout de 5 jours d'incubation dans le Matrigel.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

*** $p < 0,001$ pour les comparaisons par rapport au groupe contrôle (CTL) en normoxie;

$p < 0,001$ pour les comparaisons par rapport au groupe OIR.

Figure adaptée de (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Nous avons pu observer l'altération attendue avec diminution de la densité choriocapillaire dans la sous-rétine, associée à une diminution de l'épaisseur choroïdienne, des rats ayant été mis en condition d'OIR par rapport aux rats en

normoxie. En revanche, chez les rats mis en condition d'OIR et ayant reçu une injection intravitreuse de miR-96 mimic avant la mise en hyperoxie, nous avons pu constater un maintien de la densité vasculaire choroïdienne.

Afin de confirmer les effets du miR-96 sur les capacités angiogéniques de la choroïde, nous avons réalisé des explants choroïdiens (Figure 31.B) à partir de choroïdes de rats ayant été mis dans des conditions de normoxie, OIR et OIR avec supplémentation préalable par le miR-96 mimic. Ces explants ont été disposés dans du Matrigel pendant 5 jours. Les capacités angiogéniques des choroïdes de rats en OIR étaient dérisoires par rapport à celles des rats en normoxie. En revanche, la supplémentation en miR-96 a permis de préserver les capacités de bourgeonnement angiogénique de la choroïde malgré l'OIR (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

Ainsi, en plus d'avoir une régulation positive du miR-96 sur les capacités angiogéniques, le miR-96 a également un impact pro-angiogénique sur la choroïde, permettant le maintien des capacités vasculaires de la sous-rétine en condition d'OIR.

1.11 Conclusion sur le rôle du miR-96 dans l'OIR

Le miR-96 est fortement diminué dans la rétine et la choroïde par la condition d'hyperoxie durant la phase de vaso-oblitération de l'OIR. Dans ce travail, nous avons montré que le miR-96 préserve la vascularisation rétinienne et choroïdienne durant l'OIR. Plus spécifiquement, durant l'OIR, l'hyperoxie entraîne une baisse de l'expression du miR-96, ce qui contribue à une diminution de l'expression de facteurs de croissance angiogéniques tels que VEGF et Ang2, ce qui va conduire à une dysfonction des cellules endothéliales avec altération de leurs capacités de tubulogénèse et de migration cellulaire. Le tout va conduire à une baisse de la densité vasculaire et choroïdienne et donc à une dégénérescence microvasculaire et une ischémie rétinienne, qui sera la condition de base sur laquelle se développera la néovascularisation aberrante secondaire. La

supplémentation intravitréenne en miR-96 mimic en condition d'hyperoxie permet de restaurer l'expression de miR-96 intrarétinien, de renforcer l'expression de VEGF et Ang2, ce qui entraîne une amélioration de la signalisation angiogénique et de surcroît une protection des cellules endothéliales rétinienne avec maintien de leurs capacités de tubulogénèse et de migration. Ainsi, le miR-96 protège contre la vaso-oblitération rétinienne et choroïdienne induite par l'hyperoxie et permet une meilleure revascularisation avec une amélioration de la densité vasculaire rétinienne et choroïdienne et par conséquent une prévention de la dégénérescence microvasculaire et des dommages ischémiques dans l'OIR (Desjarlais, Wirth et al, 2020).

2. Caractérisation d'un miR modulant l'inflammation dans l'OIR

2.1 miRs modulés en phase de vaso-oblitération de l'OIR dans le modèle cyclique et rôle potentiel sur l'inflammation

Le profil de modulation des miRs lors de la phase de vaso-oblitération de l'OIR a permis d'identifier une soixantaine de miRs modulés et a également permis de distinguer les miRs les plus modulés au milieu (P7) et en fin (P14) de phase de vaso-oblitération (Desjarlais et al, 2019).

Le tableau suivant présente quelques exemples de miRs modulés durant la phase de vaso-oblitération et leurs rôles rapportés dans la caractérisation de leur fonction vis-à-vis de l'inflammation dans d'autres processus pathologiques.

miRs	Modulation (↑/↓)	Rôle dans l'inflammation	Tissus/cellules	Références
miR-30a	↑ choroïde P14	Anti-inflammatoire par inhibition des voies NF-κB et MAPK; ciblage d'IL-17, IL-1α, IL-6 et TNF-α,	Lymphocytes T, macrophages, cellules microgliales	Wan et al, 2015; Jiang et al, 2017; Zhao et al, 2016; Choi et al, 2022
miR-30e	↑ rétine P14 ↑ choroïde P14	Anti-inflammatoire par ciblage de NLRP3 et diminution d'IL-18 et IL-1β; inhibition de la voie Notch1/DLL4 et baisse de TNF-α et CCL-2; ciblage du TLR4	Microglie, macrophages des tissus adipeux, tissu cérébral	Li et al, 2018; Miranda et al, 2018; Song et al, 2022
miR-125a	↓ rétine P7 ↓ rétine P14	Anti-inflammatoire par ciblage IL-16; promotion du phénotype M2	Monocytes, macrophages	Smith et al, 2018; Banerjee et al, 2013
miR-146a	↑ choroïde P7	Anti-inflammatoire par régulation négative de IRAK-1 et TRAF 6, par ciblage IL-6	Cellules de tissu hématolymphocytaire de leucémie, cellules épithéliales alvéolaires, RPE/choroïde	Taganov et al, 2006; Perry et al, 2008; Hou et al, 2009; Hao et al, 2016
miR-199	↓ rétine P7 ↑ choroïde P7	Anti-inflammatoire par ciblage TNF-α, IL-6, MAP3K5, IKKB (diminution induite de NF-κB)	Hippocampe, fibroblastes synoviaux, noyau pulpeux, cellules microgliales	Chen et al, 2018; Wu et al, 2018; Wang et al, 2018; Liu et al, 2013

Tableau 3: miRs modulés durant l'OIR et leur rôle dans l'inflammation.

2.2 Sélection du miR-125a

Le miR-125a est un candidat intéressant pour l'étude de la modulation de l'inflammation. En effet, il est modulé dans la rétine, zone de prédilection de la microglie qui correspond aux cellules principales de la régulation du processus inflammatoire dans ce tissu et il est modulé à la baisse de façon constante lors de la phase de vaso-oblitération. L'inflammation soutenue étant une des causes d'atteinte microvasculaire, cette caractéristique le rend particulièrement éligible.

La famille du miR-125 est hautement conservée entre les espèces, notamment entre les rongeurs et l'homme (Sun et al, 2013), le rendant intéressant quant à la généralisation de résultats obtenus dans les modèles d'OIR de rat sur la ROP.

Le miR-125 est impliqué dans le développement et la différenciation neuronale (Le et al, 2009) et a un rôle dans le développement rétinien. En effet sa surexpression accélère le développement rétinien (La Torre et al, 2013). Ainsi, le maintien de son niveau basal semble important pour le développement normal de la rétine. Le miR-125 est par ailleurs fortement exprimé dans la rétine jeune et adulte dans les modèles murins, que ce soit le miR-125a et le miR-125b (Arora et al, 2010; Desjarlais et al, 2019). Le miR-125a est également fortement exprimé dans la rétine humaine (Karali et al, 2016).

Dans l'analyse bio-informatique réalisée lors notre précédent travail, il a été mis en évidence que le miR-125a semble cibler l'IL-16 (Desjarlais et al, 2019). Dans la littérature, le miR-125a a été caractérisé comme anti-inflammatoire dans certaines pathologies et certains processus biologiques. Le miR-125a est en effet diminué dans la maladie de Crohn, ce qui est inversement corrélé à l'expression de TNF- α (Sun et al, 2017). Il est également diminué dans les monocytes néonataux soumis à inflammation (Huang et al, 2012). Par ailleurs, le miR-125a entraîne une inhibition de la polarisation macrophagique M1 et favorise la polarisation macrophagique M2 (Banerjee et al, 2013). En outre, le miR-125 contribue à la régulation de l'inflammation endothéliale avec un effet anti-

inflammatoire par répression de TNF- α . En effet, son expression est diminuée dans les cellules macrophagiques Raw 264.7 et les splénocytes après induction de l'inflammation par LPS. Ceci étant alors étroitement relié à la voie NF- κ B (Tili et al 2007). Le miR-125a a également été décrit comme inhibiteur de TGF- β et d'IL-6 (Cai et al, 2018). Le miR-125a est également diminué dans le lupus, ce qui est corrélé à une augmentation d'IL-16 qui va entraîner une augmentation de l'infiltration des neutrophiles (Smith et al, 2018).

Il est admis que les miRs d'une même famille ont une action proche dans un processus physiopathologique donné (Zou et al 2014, Guo et al 2014). Par ailleurs, il est établi que les mir-125a et miR-125b sont fortement exprimés dans la rétine en développement (Arora et al, 2010) et il apparaît que dans notre modèle cyclique d'OIR, le miR-125b fait partie des 10 miRs les plus exprimés dans la rétine. Néanmoins ici, tandis que l'expression du miR-125b est fortement diminuée dans la rétine uniquement à P7 dans le modèle cyclique d'OIR, le miR-125a est fortement réduit dans la rétine de manière stable dans la période de vaso-oblitération puisque son expression est diminuée à P7 et également à P14 (Desjarlais et al, 2019). Le miR-125a semble donc un meilleur candidat quant à une correction de modulation en vue d'une action thérapeutique puisque le miR-125b semble se réguler rapidement sans intervention extérieure et qu'une supplémentation en miR-125b pourrait surcorriger son expression et avoir des conséquences délétères. Par ailleurs, le miR-125b fait partie des miRs les plus exprimés dans la choroïde. Bien qu'il ne présente pas de forte modulation dans la choroïde, il a une tendance à être plus exprimé à P7 et P14. Ainsi, une supplémentation intravitréenne en miR-125b risquerait de majorer son expression qui est déjà accrue sur le plan choroïdien du fait de l'OIR et d'avoir des conséquences délétères. Le miR-125a quant à lui ne fait pas partie des miRs les plus exprimés dans la choroïde durant la phase de vaso-oblitération ni n'y présente de modulation significative (Desjarlais et al, 2019).

Le miR-125a est donc exprimé dans la rétine, est connu pour avoir un rôle dans le développement rétinien, est connu pour avoir un rôle anti-inflammatoire dans d'autres pathologies et fait partie des miRs les plus modulés dans l'OIR avec une expression

atténuée de façon constante dans la phase de vaso-oblitération. Ainsi le choix de la caractérisation du miR-125a en vue d'une supplémentation thérapeutique semble le plus pertinent.

2.3 Validation de la modulation du miR-125a en condition OIR

Le profil d'expression du miR-125a dans les résultats de séquençage nouvelle génération publiés précédemment par notre laboratoire retrouvait une diminution significative du miR-125a à P7 et P14 (Desjarlais et al, 2019).

Dans la mesure où nous souhaitons moduler la composante inflammatoire soutenue pour protéger la fonction endothéliale, l'idéal était de viser une action thérapeutique dans la première partie de la phase de vaso-oblitération, comme à P5, et d'évaluer son impact sur la modulation de l'inflammation durant la phase de vaso-oblitération et notamment à P10. La validation de la baisse de l'expression du miR-125a a donc été réalisée en qRT-PCR à P10 sur des échantillons de rétines de rats en phase de vaso-oblitération du modèle cyclique d'OIR (OIR) en comparaison aux échantillons de rétines de rats en condition contrôle de normoxie (NOR) (Figure 32.A). L'expression du miR-125a était bien significativement diminuée en condition OIR à P10.

Ensuite, nous avons vérifié que cette modulation n'était pas soumise à des variations significatives au cours du temps. La modulation du miR-125a sur cette période a été confirmée sur des échantillons de rétines de rats en phase de vaso-oblitération du modèle cyclique d'OIR à P6, P8 et P10 en comparaison aux échantillons de rétines de rats en condition contrôle de normoxie. Le dosage de miR-125a a été réalisé en qRT-PCR. Comparé aux rats contrôles, l'expression du miR-125a était diminuée dès P6 et de façon constante jusque P10 chez les rats OIR (Figure 32.B). Ainsi, pour les expérimentations *in vivo*, il a été décidé de supplémenter l'expression de miR-125a à P5 dans le modèle d'OIR cyclique et d'évaluer les effets à P10 durant la phase de vaso-oblitération.

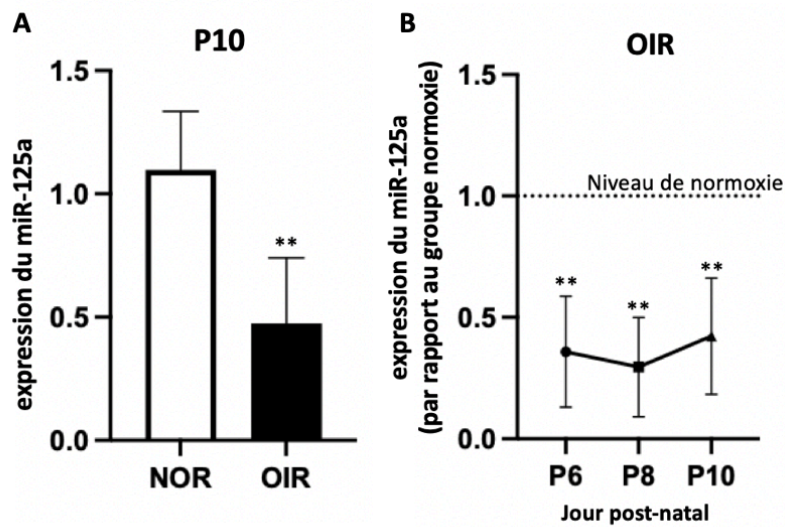


Figure 32: Modulation de l'expression du miR-125a dans le modèle cyclique d'OIR (Alternance d'oxygène entre 50% et 10% aux 24h). (A) Expression du miR-125a à P10 en qRT-PCR; (B) Profil d'expression du miR-125a en condition d'OIR durant la phase de vaso-oblitération par rapport à la condition normoxie.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

NOR : groupe contrôle en normoxie; OIR : groupe OIR.

** $p < 0,01$ pour les comparaisons OIR par rapport au contrôle en normoxie.

2.4 Confirmation de la modulation du miR-125a par l'inflammation

Afin de confirmer le rôle de l'inflammation sur l'expression du miR-125a, celle-ci a également été évaluée dans les rétines de rats soumis à inflammation systémique par injection intrapéritonéale à la dose de 1 mg/kg à P5. L'expression du miR-125a a été évaluée à P10 en qRT-PCR. À P10, les poids des rats ayant reçu l'injection par LPS étaient en moyenne de 20,5g contre 26,2g chez les rats contrôle, témoignant de l'effet soutenu de l'inflammation induite. L'expression du miR-125a était significativement réduite dans la rétine des rats ayant subi une inflammation systémique, en comparaison aux rats contrôles à P10 (Figure 33).

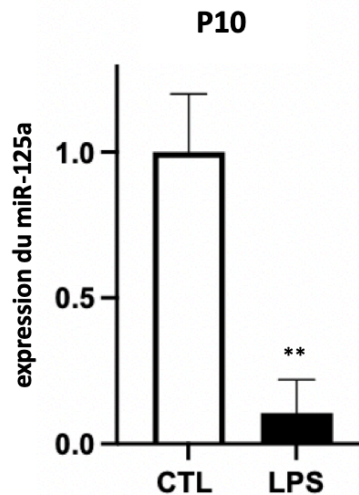


Figure 33: Modulation rétinienne du miR-125a à P10 en condition d'inflammation systémique. L'inflammation systémique a été induite par injection intrapéritonéale de 1mg/kg de lipopolysaccharide (LPS) à P5. L'expression du miR-125a a été quantifiée par qRT-PCR pour les groupes LPS et contrôle CTL.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. ** $p < 0,01$

Ainsi, en condition inflammatoire, que ce soit par OIR ou par inflammation systémique provoquée, l'expression du miR-125a est diminuée. Ce miR étant évalué comme étant anti-inflammatoire, il semble que l'inflammation accrue et soutenue entraîne une diminution de son expression et que cela contribue à la dysfonction endothéliale de la microvascularisation rétinienne contribuant à l'OIR.

2.5 Modulation du miR-125a *in vitro* dans les cellules microgliales soumises à inflammation

Comme discuté dans l'introduction, les cellules microgliales ont un rôle important dans le processus inflammatoire rétinien et notamment de l'OIR. Elles sont donc les cellules de premier choix d'une part pour l'étude de la modulation d'un miR dont l'expression est altérée par l'inflammation et d'autre part pour l'étude du potentiel régulateur de ce miR sur l'inflammation dans l'OIR. Afin de valider le changement d'expression du miR-125a en

condition inflammatoire dans les cellules microgliales, celles-ci ont été soumises à l'inflammation par une mise en hyperoxie avec une exposition à 80% d'oxygène durant 24h (Figure 34.A) d'une part et à une exposition au LPS (1 μ g/mL) durant 24h (Figure 34.B) d'autre part. Afin d'évaluer le profil d'expression du miR-125a *in vitro*, plusieurs temps ont été évalués durant l'exposition (1, 3, 6 et 24 heures).

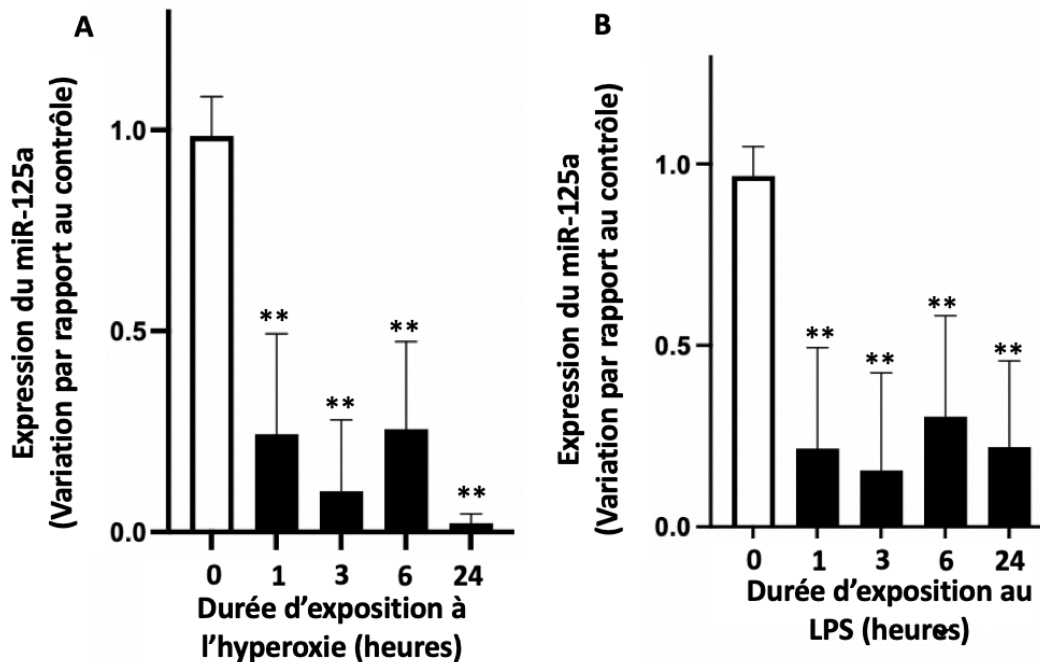


Figure 34: Modulation de l'expression du miR-125a dans les cellules microgliales soumises à l'inflammation. (A) Par exposition à l'hyperoxie (80% d'oxygène); (B) Par exposition au LPS (1 μ g/mL). Quantification en qRT-PCR.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle.

L'expression du miR-125a était significativement diminuée dans les cellules microgliales SIM-A9 en condition d'inflammation, que ce soit par hyperoxie ou par LPS. Sa diminution est précoce après le stimulus inflammatoire et durable dans le temps.

Ces résultats suggèrent que le processus inflammatoire diminue le niveau d'expression du miR-125a dans les cellules microgliales dans l'OIR.

2.6 Modulation de l'inflammation par le miR-125a dans les cellules microgliales

Bien que le miR-125 ait été rapporté comme ayant un effet anti-inflammatoire dans la littérature, son rôle potentiel dans le processus inflammatoire de l'OIR reste à explorer. J'ai cherché à déterminer si des cytokines pro-inflammatoires étaient régulées par le miR-125a dans les cellules microgliales à l'aide d'un miR-125a mimic.

Premièrement, l'expression de miR-125a était maintenue dans les cellules transfectées par le miR-125a mimic et soumises aux conditions inflammatoires comparée aux cellules microgliales mises en condition inflammatoire, que ce soit par LPS (Figure 35.A) ou hyperoxie (Figure 35.B).

Dans les cellules microgliales SIM-A9 soumises à une inflammation par LPS ou hyperoxie, l'expression du niveau d'ARN messagers (ARNm) de 3 cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-6 et IL-16 était modulé par le miR-125a mimic. En effet l'expression de ces cytokines est majorée de manière significative lors de l'induction de l'inflammation. La transfection de miR-125a mimic dans les cellules microgliales, préalablement à l'exposition à l'inflammation induite par LPS inhibait cette surexpression des ARNm de TNF α , IL-6 et IL-16 (Figure 35.C) On retrouvait le même effet après l'exposition à l'hyperoxie (Figure 35.D) De plus, le miR-125a mimic freinait également l'augmentation de l'expression protéique de TNF α , IL-6 et IL-16, induite par l'hyperoxie (Figure 35.E). Nous avons trouvé le même effet inverse sur la surexpression protéique de TNF α et IL-6 induite par le LPS (Figure 35.F). Les Western blots étaient non contributifs pour IL-16 dans les cellules microgliales soumises au LPS.

Ainsi, le miR-125a est un acteur anti-inflammatoire important dans le maintien et la signalisation des cellules microgliales pour le contrôle du processus inflammatoire avec une répression des cytokines pro-inflammatoires TNF α , IL-6 et IL-16.

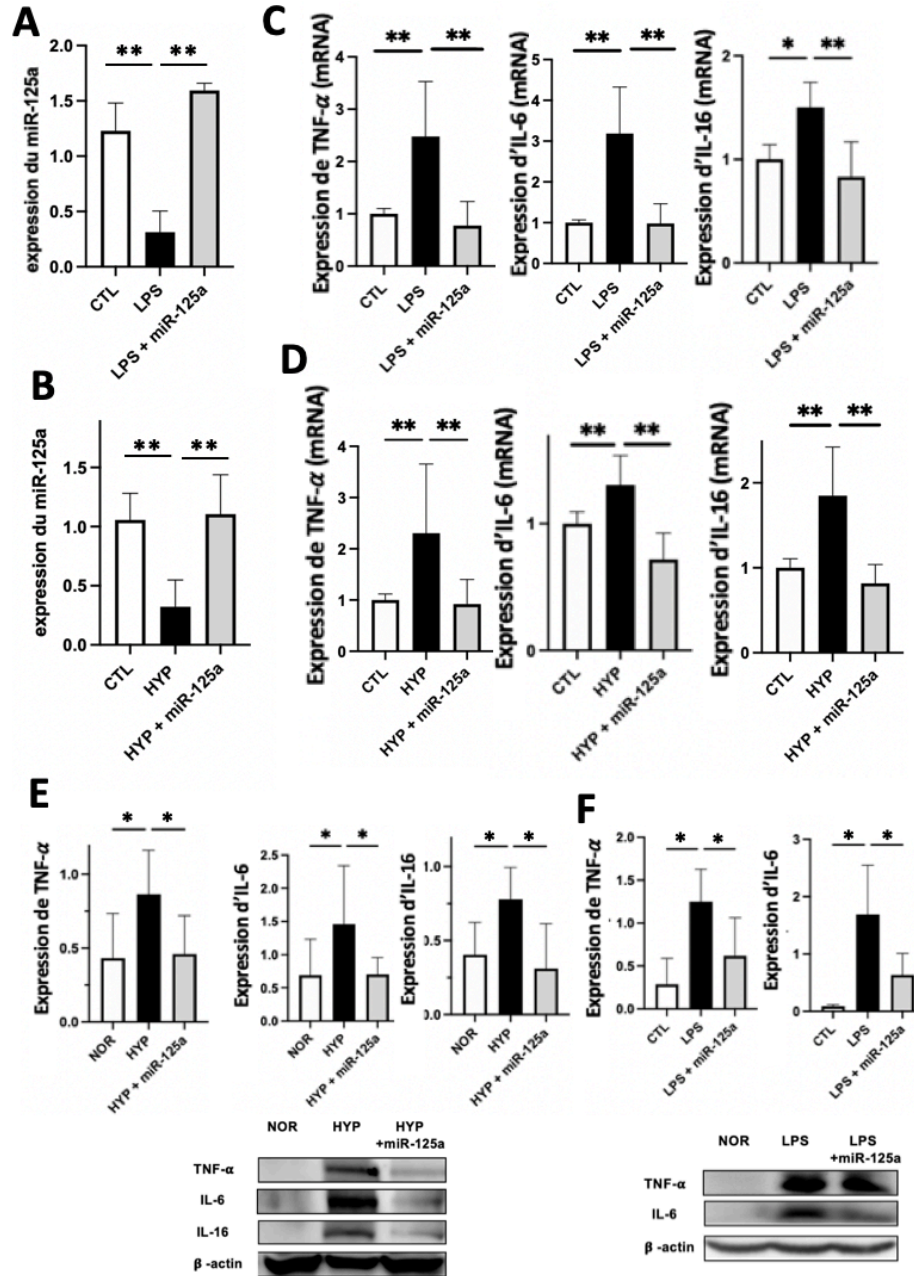


Figure 35: Régulation négative des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-16 par le miR-125a dans les cellules microgliales. Expression du miR-125a dans les cellules microgliales soumises (A) au LPS et (B) à l'hyperoxie; Evaluation de l'expression de TNF- α , IL-6 et IL-16 en qRT-PCR dans les cellules microgliales soumises (C) au LPS et (D) à l'hyperoxie; et en western blot dans les cellules microgliales soumises (E) à l'hyperoxie et (F) au LPS

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

2.7 Modulation de l'inflammation par la supplémentation intravitréenne de miR-125a *in vivo* dans la rétine de rats soumis à l'OIR

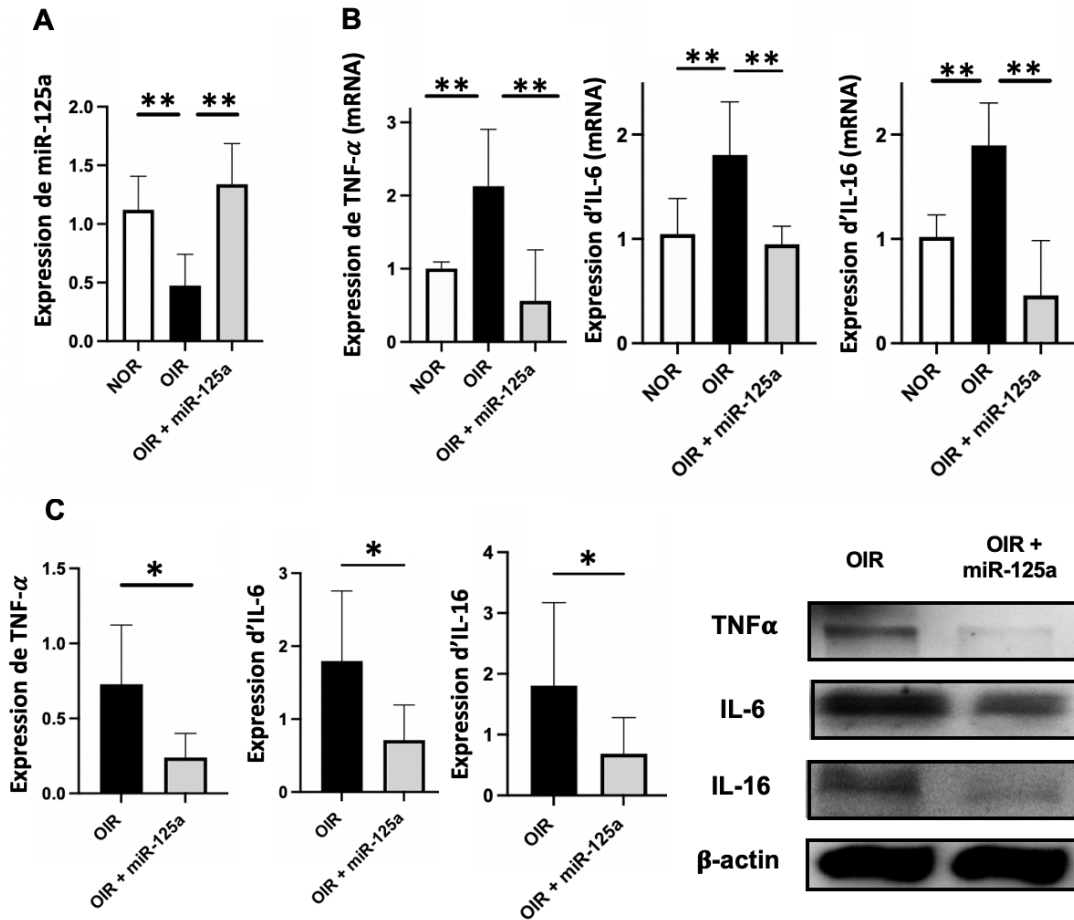


Figure 36: Modulation des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-16 par le miR-125a dans la rétine en OIR à P10. (A) Quantification de l'expression du miR-125a dans la rétine en qRT-PCR; (B) Quantification des cytokines TNF- α , IL-6 et IL-16 en qRT-PCR; (C) Quantification des cytokines TNF- α , IL-6 et IL-16 en western blot.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Pour confirmer l'effet anti-inflammatoire du miR-125a mimic dans la rétine de rats soumis à l'OIR, le miR-125a mimic a été injecté (10 nmol/kg) par voie intravitréenne à P5. L'efficacité de la transfection a été évaluée en utilisant la quantification de l'expression du miR-125 par qRT-PCR à P10 (Figure 36.A).

Conformément aux résultats obtenus *in vitro* dans les cellules microgliales, l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-6 et IL-16 était significativement surexprimée en condition OIR à P10. De façon intéressante, l'injection intravitréenne de miR-125a mimic à P5 prévenait ces surexpressions d'ARNm de TNF- α , IL-6 et IL-16 en qRT-PCR à P10 (Figure 36.B) en les ramenant au niveau basal. En outre, le miR-125a mimic réversait l'augmentation protéique de TNF α , IL-6 et IL-16 induite par l'OIR en western blot (Figure 36.C).

Ainsi, le miR-125a est anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo* et semble contrôler le processus inflammatoire de l'OIR, où les cellules microgliales sont des actrices clés.

2.8 Effet de la modulation inflammatoire par le miR-125a mimic sur la vaso-oblitération en condition OIR

Il convenait ensuite d'évaluer si les propriétés anti-inflammatoires précédemment décrites du miR-125a mimic pouvaient agir sur l'inflammation soutenue et accrue afin de préserver l'intégrité des vaisseaux rétiniens pendant la phase de dégénérescence vasculaire de l'OIR.

Le maintien du niveau de miR-125a à P10 en condition OIR suite à l'administration intravitréenne de miR-125a mimic (10 nmol/kg) à P5 conduisait à une atténuation de la vaso-oblitération rétinienne par rapport au contrôle OIR à P10, avec moins de rétine avasculaire, sans toutefois atteindre la vascularisation complète du groupe contrôle en normoxie (Figure 37.A). Nous avons également observé l'état de la vaso-oblitération à P14. Le pourcentage de rétine avasculaire était également plus faible chez les ratons OIR ayant reçu le miR-125a mimic en intravitréen par rapport au contrôle OIR à P14 (Figure 37.B).

La supplémentation intravitréenne de miR-125a mimic semble donc en partie efficace dans la prévention de la vaso-oblitération.

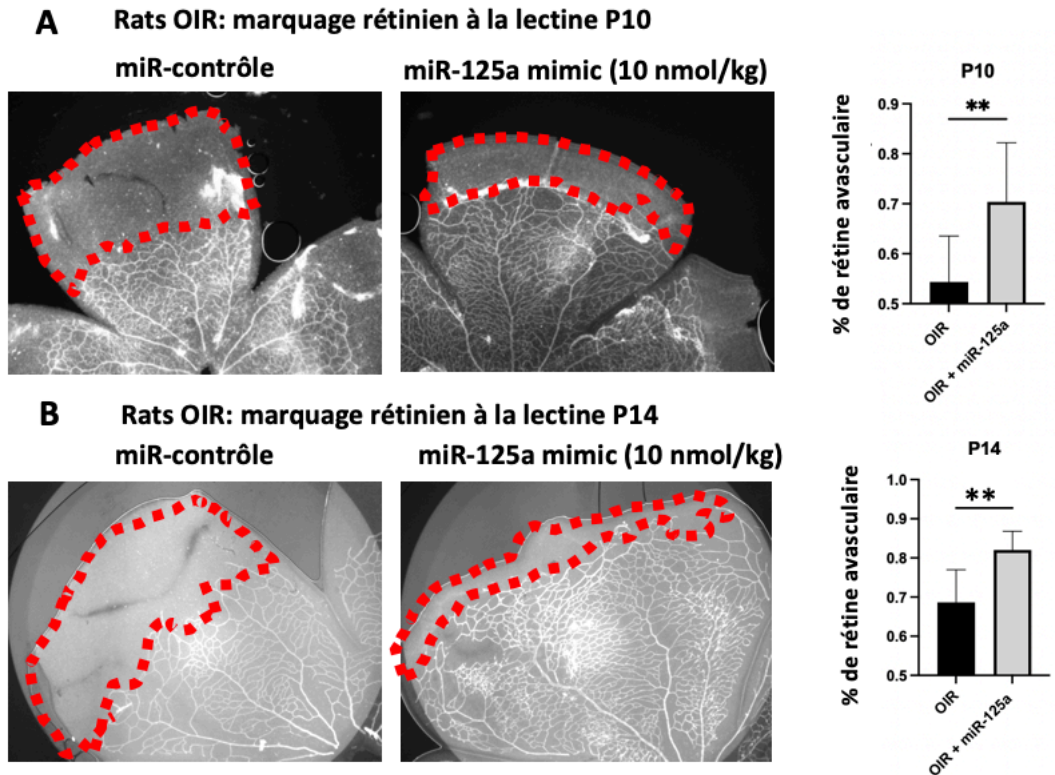


Figure 37: Modulation de la vaso-oblitération par supplémentation intravitréenne de miR-125a mimic. Photographies au microscope de la rétine périphérique de montages à plat de rétines de rats (A) marquage rétinien à la lectine à P10 et quantification de la rétine avasculaire par rapport au groupe contrôle en normoxie; (B) marquage rétinien à la lectine à P14 et quantification de la rétine avasculaire par rapport au groupe contrôle en normoxie.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

2.9 Évaluation de l'effet direct du miR-125a sur l'angiogénèse

Je me suis également posé la question de savoir si le miR-125a pouvait avoir un effet direct sur la fonction angiogénique des cellules endothéliales rétiniennes. Afin de vérifier l'impact du miR-125a sur l'angiogénèse des HRMEC, j'ai transfecté des cellules endothéliales rétiniennes humaines avec le miR-125a mimic puis j'ai regardé leur capacité angiogénique sur essai de matrigel (Figure 38).

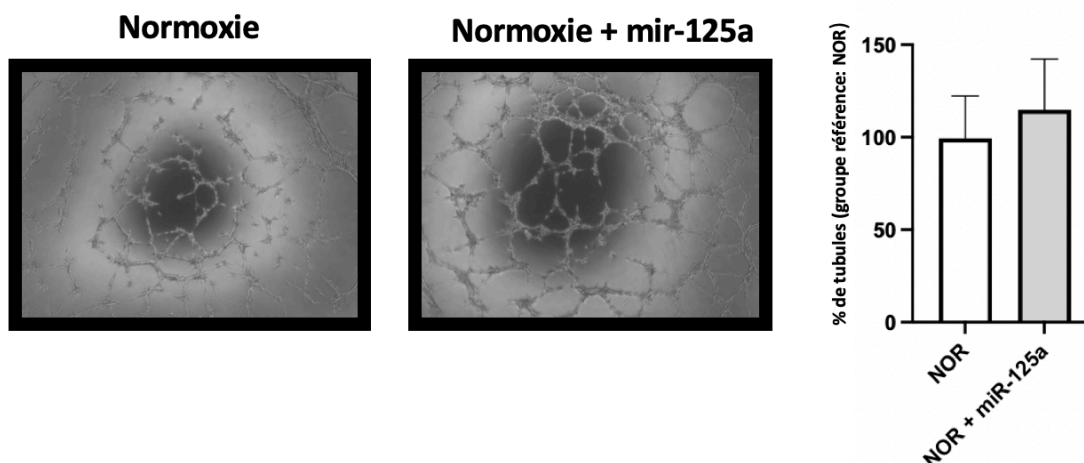


Figure 38: Impact direct du miR-125a sur les capacités angiogéniques des cellules endothéliales. Photographies d'essais de Matrigel avec les cellules endothéliales HRMEC transfectées ou non par le miR-125a mimic avec quantification de la tubulogénèse. Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types.

Le miR-125a semble avoir une tendance pro-angiogénique sur les cellules endothéliales rétiniennes. Néanmoins, la différence avec les capacités de tubulogénèse des HRMECs non transfectées par le miR-125a n'était pas significative à la répétition de l'expérience. Ainsi, le miR-125a ne semble pas avoir d'impact direct significatif, ou en tous cas avoir seulement un impact direct mineur, sur les cellules endothéliales rétiniennes et apparaît cependant non délétère à l'angiogénèse.

2.10 Évaluation de l'impact du miR-125a sur les propriétés angiogéniques des cellules endothéliales rétiniennes soumises à l'inflammation via le sécrétome des cellules microgliales

Afin d'évaluer l'impact de la protection contre l'inflammation sur la microvascularisation rétinienne en contexte d'OIR, le milieu de culture des cellules microgliales préalablement transfectées ou non et soumises ou non à l'hyperoxie a été centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et conservé. Pour évaluer l'effet du sécrétome des cellules microgliales

sur l'angiogenèse, ces milieux de culture des différentes conditions pré-citées ont été utilisés pour évaluer la tubulogénèse des cellules endothéliales rétiniennes humaines HRMEC sur essai de matrigel.

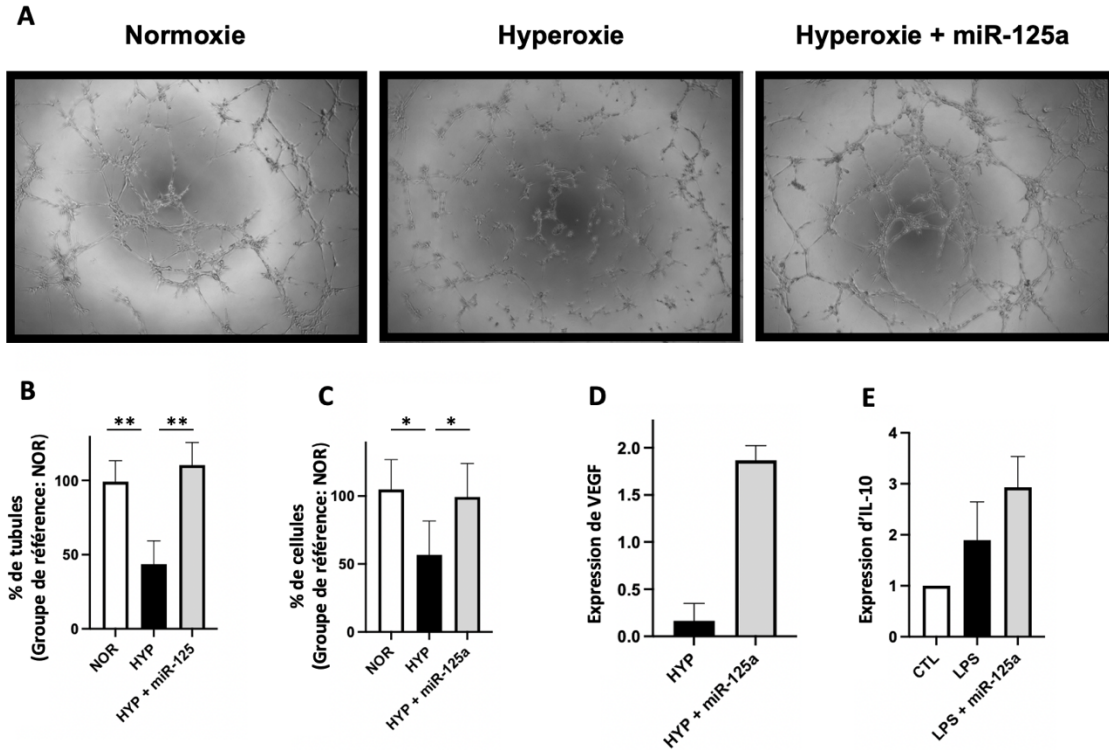


Figure 39: Impact du miR-125a sur les cellules endothéliales via le sécrétome des cellules microgliales. (A) Photographies d'essais de Matrigel avec les cellules endothéliales HRMEC mises dans 2/3 de milieu de culture des HRMEC et 1/3 de milieu de culture de SIM-A9 pré-transfectées ou non avec le miR-125a et mises ou non en condition d'hyperoxie; (B) Quantification de la tubulogénèse; (C) Evaluation de la prolifération des HRMEC soumises à ces différents milieux par compte cellulaire; (D) Quantification du VEGF en qRT-PCR dans les HRMECS soumises aux différents milieux de culture; (E) Quantification de IL-10 en qRT-PCR dans les cellules microgliales soumises à inflammation par LPS.

Données présentées sous forme de moyennes et écarts-types. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

Tandis que l'utilisation du milieu de culture des cellules microgliales soumises à l'hyperoxie altérait la tubulogénèse, les capacités angiogéniques étaient récupérées lors

de l'utilisation du milieu de culture des cellules microgliales préalablement transfectées par le miR-125a mimic puis soumises à l'hyperoxie (Figure 39.A et B). La prolifération des cellules HRMEC était par ailleurs altérée lorsqu'on les mettait en culture avec le milieu préconditionné des cellules microgliales soumises à hyperoxie. Le compte cellulaire était en revanche normalisé lorsqu'on utilisait le milieu pré-conditionné de cellules microgliales préalablement transfectées par le miR-125a mimic puis soumises à l'hyperoxie (Figure 39.C).

L'expression de VEGF est améliorée dans les cellules endothéliales rétiniennes soumises au milieu de cellules microgliales ayant été transfectées et mises en hyperoxie par rapport à celles soumises au milieu de culture des cellules microgliales mises en hyperoxie (Figure 39.D). Le sécrétome des cellules microgliales a donc un impact sur les capacités angiogéniques des HRMECs et la supplémentation en miR-125a dans les cellules microgliales permet aux cellules endothéliales rétiniennes de maintenir leurs propriétés angiogéniques.

Afin d'explorer cet impact, j'ai regardé l'expression de l'IL-10, une cytokine clé de la polarisation M2 (Figure 39.E). Les cellules microgliales soumises aux conditions inflammatoires et supplémentées en miR-125a mimic tendaient à une accélération de l'expression d'IL-10 par rapport à celles soumises à l'inflammation. Ainsi, il est très probable que l'impact du sécrétome des cellules microgliales passe par la polarisation M2 induite par le miR-125a, connue dans la littérature. Cette piste reste à approfondir.

2.11 Conclusion sur le rôle du miR-125a dans la phase de vaso-oblitération rétinienne de l'OIR

Collectivement, ces données montrent que le miR-125a semble jouer un rôle dans le contrôle de l'inflammation dans les cellules microgliales de la rétine et qu'il pourrait partiellement aider à la prévention de l'atteinte de la microvascularisation et donc de la vaso-oblitération dans l'OIR. Néanmoins, bien que j'obtienne des résultats significatifs, j'ai pu observer beaucoup de variabilités dans les résultats.

Ce travail démontre cependant pour la première fois que le miR-125a régule l'expression des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6 et IL-16) dans les cellules microgliales et que par la modification du sécrétome de celles-ci en condition d'hyperoxie, les capacités vasculaires des cellules endothéliales semblent améliorées. La supplémentation en miR-125a mimic a notamment permis d'améliorer *a minima* la microvascularisation rétinienne au cours des conditions pathologiques qui conduisent à la dégradation vasculaire en phase de vaso-oblitération de l'OIR. L'impact du miR-125a sur le sécrétome des cellules microgliales menant à l'amélioration des fonctions angiogéniques des cellules endothéliales rétinienne n'a pas pu être clairement établi et le lien entre la modification de ce sécrétome et la fonction angiogénique reste à approfondir.

La supplémentation en miR-125a mimic pourrait constituer un potentiel axe dans le contrôle de l'atteinte vasculaire liée à l'inflammation accrue et soutenue et contribuer à la prévention de la vaso-oblitération dans les rétinopathies ischémiques.

V. Discussion

1. miRs et OIR

Les miRs sont impliqués dans la régulation de plusieurs processus physiologiques et pathologiques en modulant l'expression de plus de 60% des gènes codants pour des protéines (O'Brien et al 2018, Friedman et al 2009). Le caractère pléiotropique des miRs les rend vraiment intéressants pour la régulation de voies biologiques entières impliquées dans la pathogénicité (Hanna et al 2019). L'exploration du rôle des miRs est en plein essor depuis une vingtaine d'année. Leur rôle dans l'OIR commence donc également à être exploré. Des profils d'expression des miRs dans les phases de vaso-oblitération et de néovascularisation pré-rétinienne ont été établis dans l'OIR ces dernières années (Shen et al. 2008; Desjarlais et al. 2019). La réponse angiogénique peut être modulée par les miRs dans les rétinopathies ischémiques. Présentement, la phase de néovascularisation post-ischémique, qui constitue la base des traitements curatifs actuels de la ROP, a été essentiellement explorée dans la caractérisation des miRs (Gutsaeva et al 2017; Fan et al, 2021). Cependant, de nombreuses études récentes semblent être en faveur d'une prise en charge précoce de la phase de vaso-oblitération qui serait bénéfique pour la prévention de la phase de néovascularisation post-ischémique et de l'apparition de complications fonctionnelles plus tardives, que ce soit sur le plan clinique ou dans les modèles animaux (Zhou et al, 2016; Zhou et al, 2019; Bowl et al, 2018). A ce jour, cette phase a été moins explorée en général et le rôle des miRs dans la période de vaso-oblitération restait à définir.

Ce travail a permis d'examiner pour la première fois le rôle de deux miRs dans la phase de vaso-oblitération. Deux grandes fonctions impliquées dans l'OIR ont été évaluées : l'angiogenèse et l'inflammation. Dans un premier temps, la modulation de la fonction angiogénique impliquée dans l'OIR a été évaluée : Le miR-96 a été caractérisé comme pro-angiogénique et permettait de préserver la microvascularisation rétinienne et choroïdienne par maintien de l'expression de VEGF/Ang2 et protection de la fonction

angiogénique des cellules endothéliales rétinienne. La fonction angiogénique peut ainsi être modifiée par la modulation d'un miR, notamment le miR-96, dans l'OIR. L'autre grande fonction biologique impliquée dans l'OIR étant l'inflammation, il semblait donc intéressant de voir si celle-ci pouvait également être impactée par la modulation d'un miR potentiellement impliqué dans les mécanismes inflammatoires : Le miR-125a a été caractérisé comme anti-inflammatoire par répression de TNF- α , IL-6 et IL-16 dans les cellules microgliales, permettant ainsi de modérer l'inflammation accrue et soutenue délétère à la fonction endothéliale et donc de contribuer à la préservation de la microvascularisation rétinienne lors de la phase de vaso-oblitération de l'OIR.

Par ailleurs, une des limitations de ce travail est que la mécanistique précise de la régulation de VEGF et Ang2 par le miR-96 et celle de TNF α , IL-6 et IL-16 par le miR-125a et notamment ses conséquences sur l'angiogenèse dans l'OIR n'est pas établie et nécessite des investigations complémentaires. Nous allons discuter des mécanismes potentiels dans les prochains paragraphes.

2. miR-96 angiogenèse

Ici, nous avons rapporté que le miR-96 agit comme un protecteur de la microvascularisation rétinienne par préservation des capacités angiogéniques des cellules endothéliales rétinienne par maintien de l'expression de VEGF et Ang2. La modulation de cette signalisation reste toutefois à définir.

Dans les pathologies tumorales, le miR-96 a été largement décrit comme pro-angiogénique. En effet, il a été démontré que le miR-96 réprime l'expression de PTPN9 dans le cancer du col de l'utérus (Ma et al, 2018) et dans le cancer du sein (Hong et al, 2016), favorisant ainsi la prolifération tumorale. Nous avons montré que l'inhibition de PTPN9 dans les PACs permettait de restaurer leurs propriétés angiogéniques par amélioration de l'expression de facteurs de croissance angiogéniques, tels que le VEGF et SDF-1 et d'améliorer la vascularisation rétinienne dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR (Desjarlais et al, 2021). Ainsi, le miR-96 pourrait également contribuer à la

modulation de l'expression de VEGF et l'amélioration de la vaso-oblitération rétinienne par ciblage de PTPN9.

À ce jour, nous sommes les premiers à avoir décrit un lien potentiel entre le miR-96 et l'expression de l'angiopoïétine 2. L'Ang2 est connue pour avoir un effet double, pro-angiogénique ou anti-angiogénique, dépendamment des contextes. Nous avons identifié un effet pro-angiogénique de l'Ang2 dans la vascularisation rétinienne au cours de la phase de vaso-oblitération de l'OIR.

L'Ang2 peut avoir un effet pro- ou anti-angiogénique et elle est notamment nécessaire à la régression de la vascularisation hyaloïdienne via son versant anti-angiogénique (Gale et al, 2002).

Il a été montré que l'Ang2 n'induisait pas de régression vasculaire dans les vaisseaux rétiniens et choroïdiens constitués et matures, ni n'en altérait la qualité. En revanche, elle a un effet pro-angiogénique sur les vaisseaux rétiniens immatures, lors de leur développement en période postnatale précoce. L'Ang2 favorise également la néovascularisation dans les tissus hypoxiques, mais aussi lorsque l'expression de VEGF est élevée de manière concomitante (Oshima et al, 2005). Ceci expliquant l'effet pro-angiogénique obtenu de la majoration de l'Ang2 sur la vascularisation rétinienne et choroïdienne dans notre travail.

Il est également probable que la production de l'Ang2 soit dépendante du VEGF. En effet le VEGF a été identifié comme inducteur de la sécrétion d'Ang2 dans les cellules endothéliales (Jiang et al, 2016). Ainsi, la modulation de l'Ang2 dans notre travail peut être la conséquence de la modulation du VEGF sans régulation d'une autre cible impliquée dans son expression.

L'IL-35 est capable d'inhiber l'expression basale de VEGF et Ang2 (Jiang et al, 2016). Elle pourrait donc être une cible intéressante à réprimer pour la régulation positive de ces deux facteurs pro-angiogéniques. L'IL-35 n'est pas connue pour être une cible du miR-96, que ce soit via la base Targetscan ou dans la revue de la littérature.

D'autres voies de modulation de l'angiogenèse par le miR-96 sont également probables. L'expression du miR-96 est également augmentée dans les cancers hépatocellulaires, où il va favoriser la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire par répression de l'expression du gène SOX6 (Li et al, 2018). SOX6 altère l'angiogenèse par diminution de la migration des cellules endothéliales et de leur capacité de tubulogenèse (Li et al, 2017). Par ailleurs, le miR-96 favorisait la viabilité, la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales de glioblastome. Il y réprimait notamment l'expression des protéines GRP78, eIF2 α et CHOP, permettant l'atténuation de stress au niveau du réticulum endoplasmique (Li et al, 2017b). Par ailleurs, dans le cancer du sein, le miR-96 accentue la prolifération cellulaire par répression de FOXO3 (Lin et al, 2010). FOXO3 est un facteur de transcription dont l'inhibition entraîne une majoration de la formation et de la maturation des vaisseaux (Potente et al, 2005).

Par ailleurs, la sous-unité inhibitrice alpha de l'HIF1 est une cible directe du miR-96 retrouvée dans la base de données Targetscan. Ainsi, le miR-96, en la réprimant, pourrait permettre de favoriser l'angiogenèse en favorisant l'activité d'HIF-1. Le miR-182, appartenant au même cluster que le miR-96 a été caractérisé dans ce mécanisme moléculaire (Li et al, 2015).

De manière intéressante, l'expression du miR-96 est également diminuée par l'inflammation et inversement corrélée à l'expression d'IL-1 β , TNF- α et IL-6. La supplémentation en miR-96 permettait en outre de diminuer l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires (Jiang et al, 2022). Ainsi, le miR-96 pourrait également contribuer à la prévention de la vaso-oblitération en protégeant la microvascularisation rétinienne par prévention de l'inflammation accrue et soutenue. La caractérisation de l'impact inflammatoire du miR-96 dans l'OIR reste à établir.

3. miR-125a et inflammation

Dans ce travail, l'expression du miR-125a était réduite par l'inflammation induite par le LPS dans les cellules microgliales. Il a été montré que la stimulation des monocytes par le LPS induisait l'expression du miR-125a et permettait de lutter contre l'inflammation en réprimant directement TNF- α , IL-6, IL-12p40, CCL2, CCL3, CCL7, CXCL8 et CXCL10 (Curtale et al, 2018). La stimulation des macrophages par le LPS entraînait en revanche une diminution de l'expression du miR-125a, entraînant une aggravation de l'inflammation (Wang et al, 2020, Yang et al, 2022). La réaction de ces cellules face à l'inflammation est différente quant à l'expression des régulateurs de l'expression des gènes. Néanmoins, les cellules microgliales qui sont considérées comme des équivalents des macrophages résidents du système nerveux central et de la rétine semblent réagir comme les macrophages périphériques face à la stimulation de l'inflammation vis-à-vis de la régulation de l'expression du miR-125a.

Nous avons montré que l'expression du miR-125a restait basse jusqu'à 24h après l'induction de l'inflammation dans les cellules microgliales. Dans les macrophages, l'expression du miR-125a suite à l'induction de l'inflammation par LPS est diminuée pendant 8h et normalisée à 24h post induction (Yang et al, 2022). L'activation microgliale en polarisation M1 suite à un stimulus inflammatoire est agressive d'emblée et conduit à un phénomène inflammatoire tenace avec relargage de cytokines et chimiokines et génération d'espèces réactives à l'oxygène, qui vont pouvoir auto-entretenir l'intensité du phénomène inflammatoire (Nagamoto-Combs et al, 2015; Jurga et al, 2020). Par ailleurs, l'inflammation dans les cellules microgliales augmente l'expression des récepteurs Ager et Trem1 qui vont permettre d'entretenir le climat pro-inflammatoire (Lively et al, 2018). Il existe une différence dans l'expression des gènes du système de détection et de réponse aux stimuli inflammatoires entre les macrophages et les cellules microgliales : entre autres, les TLR2, TLR7, TLR4, TLR3, TLR1, TLR6, TLR12 sont plus exprimés dans les cellules microgliales que les macrophages, de même que les récepteurs

aux chimiokines CCR5, CX3CR1, CXCR4, CXCR2, CXCR3 (Hickman et al, 2013), ce qui peut expliquer une inflammation plus soutenue et plus accrue dans les cellules microgliales activées que dans les macrophages. D'ailleurs, dans le système nerveux central, la phase pro-inflammatoire en cas d'injure persiste beaucoup plus longtemps que dans les autres types tissulaires, entraînant des dommages locaux et un retard à la réparation tissulaire (Mesquida-Veny et al, 2021). L'interaction entre la microglie et les macrophages est complexe. Les macrophages peuvent cibler la microglie pour diminuer sa capacité d'inflammation et d'apoptose mais n'ont en revanche pas d'impact sur la prolifération et l'intensité de la réponse de la microglie suite à l'injure. Ils ont donc un rôle protecteur vis-à-vis de l'activation microgliale et aide à la non chronicisation du processus inflammatoire. Cela pourrait expliquer leur régulation plus rapide du niveau d'expression du miR-125a en contexte inflammatoire (Greenhalgh et al, 2018).

Ainsi, il semble que l'intensité de l'inflammation ait un rôle pivot dans la réponse du miR-125a. Une inflammation modérée et courte permet une récupération plus rapide du niveau d'expression du miR-125a pour mettre en avant son pouvoir anti-inflammatoire et aider à la résolution du processus inflammatoire. Tandis que dans l'inflammation importante et soutenue, telle que dans la microglie en OIR, ce mécanisme compensatoire semble dépassé et écrasé, le miR-125a ne peut donc pas aider au processus anti-inflammatoire et l'inflammation prend le dessus. Dans l'OIR, il existe une inflammation soutenue et accrue médiée par les cellules microgliales, ce qui correspond bien à cette situation. Il est possible que certaines cytokines puissent inhiber l'expression du miR-125a au-delà d'un effet seuil, soit directement, soit par induction d'ARNs régulateurs des miRs tels que les ARNs non codants longs.

Le lncARN *Nuclear-Enriched Abundant Transcript 1* (NEAT1) pourrait être en cause. En effet, dans l'inflammation induite par le LPS dans les macrophages, le lncARN NEAT1 est plus amplement exprimé et le miR-125a nettement diminué et l'inhibition du lncARN NEAT1 permettait une récupération de l'expression du miR-125a. Et de manière intéressante la surexpression du miR-125a inhibait l'expression du lncARN NEAT1, qui est un ARN endogène compétitif du miR-125a sur TRAF6 (Wang et al, 2020). Il est donc

également probable que l'apport exogène de miR-125a mimic améliore la sécrétion endogène de miR-125a par inhibition du lncARN NEAT1 en plus de l'inhibition de ses cibles cytokiniques spécifiques.

Il semble par ailleurs que le miR-125a soit induit par l'IL-10 dans les monocytes. Contrairement à son induction par LPS dans cette catégorie cellulaire, la stimulation par l'IL-10 ne va pas entraîner de modulation du facteur de transcription NF- κ B (Curtale et al, 2018). Cela mériterait d'être vérifié dans les cellules microgliales mais cela pourrait concorder avec le fait que le niveau d'expression du miR-125a se normalise après la phase d'ischémie et de stress oxydatif (Desjarlais et al, 2019), où son expression sera stimulée par l'IL-10 pour promouvoir un phénotype réparateur vis-à-vis de l'inflammation. Ainsi le miR-125a pourrait avoir un pouvoir inducteur mais aussi amplificateur de la phase réparatrice vis-à-vis de l'inflammation.

L'augmentation d'expression du TNF- α contribue à prolonger la polarisation M1 dans les macrophages et la microglie du système nerveux central (Kroner et al, 2014). Il est donc possible que le niveau augmenté du TNF α inhibe l'expression de miR-125a. La récupération du niveau d'expression du miR-125a dans les macrophages induisait une polarisation M2 par inhibition de l'expression de TRAF6. La supplémentation en miR-125a mimic permettait en outre une accélération de l'expression de l'IL-10 (Yang et al, 2022), ce qui concorde avec nos données.

Il a par ailleurs été récemment montré que le miR-125a avait un effet protecteur vis-à-vis de la névrite optique et de ses conséquences fonctionnelles en luttant contre l'inflammation par modulation de la différenciation des lymphocytes T et protection des cellules ganglionnaires rétiniennes (Zhan et al, 2023), renforçant ainsi son rôle protecteur vis-à-vis de la rétine en contexte inflammatoire.

Nous avons pu constater que le miR-125a permettait de réduire l'expression de TNF- α . La famille du miR-125 a été largement décrite dans la littérature comme modulatrice de l'expression du TNF- α . La modulation du TNF- α peut être la conséquence d'une régulation à un autre niveau des voies inflammatoires mais il a également été identifié comme étant une cible directe du miR-125a (Sun et al, 2017 ; Tili et al, 2007 ; Ganan-Gomez et al, 2014; Curtale et al, 2018).

Nous avons pu constater que le miR-125a permettait de réduire l'expression d'IL-6. Le miR-125a a également été décrit comme modulateur de l'expression d'IL-6 (Cai et al., 2018; Curtale et al, 2018; Park et al, 2019).

Le miR-125a et les autres membres de son cluster sont impliqués dans la régulation des voies de signalisation liées au TLR4, que ce soit par ciblage de récepteurs, tels que TLR4 et CD14, de molécules de signalisation, telle que IRAK-1 et de médiateurs inflammatoires, tels que TNF- α , IL-6, CCL3, CCL7 et CXCL8 (Curtale et al, 2018). La modulation inflammatoire étendue peut également être liée au ciblage de TRAF-6 (Yang et al, 2022) ou encore à la réduction de l'activité de NF- κ B lors de la stimulation du TLR (Gañán-Gómez et al, 2014).

Nous avons finalement observé que le miR-125a entraînait une diminution de l'expression de l'IL-16 surexprimée par la composante inflammatoire dans l'OIR.

Le miR-125 a également été décrit comme ciblant directement l'IL-16 dans la littérature (Smith et al., 2018) et dans la base de données Targetscan.

L'IL-16 ne semble pas faire partie des cytokines dominantes exprimées dans l'œil. Néanmoins, plusieurs études décrivent sa modulation dans les pathologies rétinienne, et notamment la rétinopathie du prématuré. Son expression dans le sang au deuxième jour de vie des nouveau-nés prématurés ayant présenté ultérieurement une ROP était majorée par rapport aux nouveau-nés prématurés n'ayant pas présenté de ROP (Markasz et al, 2020). L'expression d'IL-16 est notamment majorée dans le vitré des yeux présentant des membranes épiréiniennes ou des trous maculaires (Zandi et al, 2016), dans le vitré des vitréo-rétinopathies prolifératives avancées (Zandi et al, 2019; Balogh et

al, 2020), dans le vitré des yeux ayant présenté un décollement de rétine rhéomatogène (Balogh et al, 2020; Prasad et al, 2023), dans le vitré des yeux des patients présentant une rétinopathie diabétique proliférative avec ou sans décollement de rétine associé (Balogh et al, 2020; Loporchio et al, 2021) et dans le vitré des patients présentant une occlusion ischémique de la veine centrale de la rétine (Zeng et al, 2019). Par ailleurs, dans la vitréo-rétinopathie proliférative, son expression est hautement majorée dans la rétine gliotique par rapport à la rétine normale du groupe contrôle (Eastlake et al, 2016). Enfin, l'expression d'IL-16 est augmentée en réponse à une stimulation inflammatoire dans les cellules équivalentes aux cellules microgliales dans les organoïdes rétiens dérivés des cellules souches humaines pluripotentes (Chichagova et al, 2023). En outre, la microglie activée a été rapportée comme sécrétrice d'IL-16 dans le cerveau fœtal en développement et où elle y permet de médier l'activation de la microglie, indépendamment de sa fonction médiatrice connue sur les lymphocytes CD4+ discutée dans l'introduction de cette thèse. En outre, elle y favorise le chimiotactisme pour favoriser la migration des précurseurs microgliaux (Schwab et al, 2001). Ainsi, l'IL-16 semble bien être exprimée dans les cellules microgliales de la rétine et modulée dans la rétine dans les pathologies impliquant la composante inflammatoire rétinienne et sa surexpression au niveau vitréen est fortement associée au décollement de rétine. Elle pourrait donc également être un marqueur de gravité de ces pathologies.

4. Impact du miR-125a sur l'angiogenèse

Habituellement, l'inflammation est connue pour renforcer l'angiogenèse via l'expression de certaines cytokines et chimiokines qui vont avoir un double effet pro-inflammatoire et pro-angiogénique. Bien que différents, ces deux processus pourront ainsi se potentialiser (Granger et al, 2010). Les cytokines TNF- α , IL-1, IL-6 ont d'ailleurs été rapportées pour avoir des propriétés pro-angiogéniques (Dinarello, 2007). Cependant, nous avons également vu dans l'introduction que l'inflammation peut être délétère à l'endothélium

vasculaire et donc l'angiogenèse et la qualité de la microvascularisation en condition pathologique.

Dans l'OIR, les cellules microgliales soumises à l'hyperoxie vont s'activer et sécréter très précocement des facteurs pro-inflammatoires et notamment l'IL-1 β et le TNF- α , ce qui va contribuer à la vaso-oblitération rétinienne. En effet, la production d'IL-1 β par les cellules microgliales activées va induire la production de sémaphorine-3A par les cellules ganglionnaires adjacentes et entraîner une dégénérescence neurovasculaire en entraînant un phénomène apoptotique dans les cellules endothéliales rétiniennes. L'inhibition de l'activité de l'IL-1 β par des antagonistes au récepteur de l'IL-1 permettait en revanche d'atténuer la vaso-oblitération et d'améliorer la revascularisation rétinienne par désactivation des cellules microgliales et suppression du relargage de sémaphorine-3A par les cellules ganglionnaires adjacentes pour prévenir l'apoptose des cellules endothéliales rétiniennes (Rivera et al, 2013). Ainsi, l'atténuation de la phase inflammatoire permet de protéger la microvascularisation rétinienne dans l'OIR.

Dans ce travail, nous montrons que le miR-125a est important dans le contrôle de l'inflammation dans les cellules microgliales de la rétine et que cela permet de prévenir l'installation de la vaso-oblitération dans l'OIR. Nous avons notamment montré l'importance du sécrétome des cellules microgliales sur les cellules endothéliales rétiniennes dans le développement de la microvascularisation rétinienne.

Les macrophages en polarisation M2 expriment fortement les miR-125a et miR-125b (Cobos Jiménez et al, 2014). Cette polarisation M2 des macrophages a été décrite pour augmenter la sécrétion de VEGF via les voies ERK1/2 et PI3K/AKT (Xu et al., 2019). Le miR-125a est capable d'inhiber la polarisation macrophagique M1 induite par le LPS et la sécrétion de TNF- α , IL-12 et iNOS, en faisant un régulateur négatif de l'inflammation induite par le TLR4. De plus il peut améliorer l'expression de la voie alternative M2 en ciblant KLF13, un facteur transcriptionnel actif durant l'inflammation (Banerjee et al.,

2013). La récupération du niveau d'expression du miR-125a dans les macrophages induisait une polarisation M2 par inhibition de l'expression de TRAF6 (Yang et al, 2022). Par ailleurs, l'IL-16 a été décrite comme potentialisatrice de la polarisation M1 par inhibition de l'expression d'IL-10 dans les macrophages (Huang et al, 2019). Ici, en inhibant l'expression de l'IL-16, le miR-125a peut également contribuer à la polarisation M2 des cellules microgliales.

Il est très probable que la limitation du phénomène de vaso-oblitération de l'OIR par la supplémentation en miR-125a passe par l'induction de la polarisation M2 des cellules microgliales. En effet, l'expression d'IL-10 est majorée dans les cellules transfectées par le miR-125a mimic et soumises à l'inflammation par rapport à celles soumises à l'inflammation en condition miR-contrôle. Néanmoins, le mécanisme précis par lequel le miR-125a régule l'expression de l'angiogenèse dans l'OIR nécessite des investigations supplémentaires.

Récemment, il a été montré que la ninjurine 1, une molécule d'adhésion, était impliquée dans le développement de l'angiogenèse rétinienne après la naissance. Elle permet notamment la régression de la vascularisation hyaloïde. De plus, elle permet de favoriser l'infiltration macrophagique dans les cellules endothéliales rétiniennes. La ninjurine 1 exprimée par les macrophages va être à l'origine d'apoptose au niveau des cellules endothéliales rétiniennes. Le miR-125a a été identifié comme régulateur de cette molécule d'adhésion. Par cette voie, il permet d'inhiber l'activation des macrophages, leur adhésion aux cellules endothéliales et donc leur recrutement lors d'un processus inflammatoire. Le miR-125a a été caractérisé comme anti-inflammatoire par diminution de médiateurs pro-inflammatoires et par diminution de l'infiltration macrophagique au niveau des cellules endothéliales rétiniennes. Par ailleurs, dans le modèle de rétinopathie diabétique, il a permis une atténuation de la dysfonction vasculaire médiée par les macrophages par ciblage de la ninjurine 1 et inhibition secondaire de SCF et VEGFR-1. En effet, la supplémentation intravitréenne en miR-125a mimic permettait d'atténuer la fuite vasculaire dans les vaisseaux rétiniens et de préserver de l'atrophie rétinienne

(Hwang et al, 2022). La ninjurine 1 semblerait donc intéressante à explorer dans l'OIR avec toutefois le paradoxe qu'elle semble aider au développement vasculaire rétinien postnatal. Néanmoins, elle a été décrite dans la littérature comme pro-angiogénique (Kim et al, 2020) ou anti-angiogénique (Matsuki et al, 2015; Yin et al, 2014) dépendamment des contextes. Il serait donc intéressant de caractériser son impact dans le développement vasculaire postnatal en condition inflammatoire et non physiologique puisque dans la rétinopathie diabétique, son inhibition par le miR-125a permet de protéger la microvascularisation rétinienne et la trophicité rétinienne.

Bien que miR-125 ait par ailleurs été documenté comme répresseur du VEGF dans les cancers solides (Fu et al., 2020), une étude sur la leucémie myéloïde a montré que miR-125b régule à la hausse le VEGF-A en ciblant TET2 (Liu et al., 2017). TET 2 est également une cible répertoriée du miR-125a dans Targetscan et semble une piste intéressante dans la modulation de pathologies vasculaires. Son implication dans l'OIR reste à explorer.

Il a par ailleurs été montré récemment que la stimulation inflammatoire des cellules endothéliales induisait l'expression de miR-125a. Cette induction permettait au niveau des cellules endothéliales de faciliter la perméabilité vasculaire induite par l'inflammation en freinant l'expression des molécules d'adhésion VE-Cadhérine et de Claudine-5, des tyrosines phosphatases PTPN1 et PPP1CA et du facteur de transcription ETS1. Par ailleurs, la chimiokine CCL2 semblait induite par la surexpression du miR-125a. Dans les monocytes, contrairement aux études mentionnées précédemment où l'expression du miR-125a était augmentée dans la stimulation inflammatoire des monocytes par LPS, l'inflammation par un agoniste de l'IL-6 réprimait en revanche l'expression de miR-125a, ce qui conduisait à une majoration de l'expression du récepteur à CCL2, CCR2, permettant ainsi de favoriser l'activité chimiotactique. En revanche il a été montré que le miR-125a réprimait CCR2 lors de la différenciation des monocytes en macrophages (Müller et al, 2022). Dans l'OIR, la répression du miR-125a est prédominante en phase de vaso-oblitération. Si la dualité d'expression du miR-125a est présente entre les cellules

endothéliales et les cellules microgliales, il semblerait que le miR-125a soit beaucoup plus exprimé dans les cellules microgliales que les cellules endothéliales rétinienne au vu du profil global de modulation. Conformément à cette étude, l'expression du miR-125a est diminuée dans les cellules microgliales, cela pouvant notamment favoriser le chimiotactisme, qui sera inhibé par la supplémentation en miR-125a mimic. L'expression du miR-125a semble être majorée dans les cellules endothéliales en condition inflammatoire, contribuant à la perméabilité vasculaire. Nous nous sommes concentrés ici sur le rôle des cellules microgliales, compte-tenu de leur fonction majeure dans le contrôle de l'inflammation dans l'OIR. Néanmoins, la régulation double dans les différents types cellulaires pourrait expliquer l'effet partiel obtenu sur la vaso-oblitération par la supplémentation en miR-125a. Des investigations complémentaires seraient nécessaires à l'explication de cet effet.

Ainsi, il serait intéressant de pouvoir avoir la modulation exacte de l'expression du miR-125a par type cellulaire dans l'OIR. Le séquençage à cellule unique a donc tout son intérêt dans la caractérisation précise de la modulation des conditions pathologiques sur les miRs afin de comprendre le rôle régulateur des miRs dans leur intégralité (Hwang et al, 2018).

Le TNF- α à faible dose a été reconnu pour induire l'angiogenèse, tandis qu'à forte dose, il a un rôle inhibiteur vis-à-vis de l'angiogenèse sur les microvaisseaux. Ainsi, en contexte inflammatoire accru et soutenu, les concentrations élevées de TNF- α altèrent la microvascularisation (Fajardo et al, 1992). Le TNF- α est connu pour induire l'apoptose des cellules endothéliales. L'inhibition de l'activité du TNF- α par le récepteur soluble du TNF- α permettait de diminuer l'apoptose des cellules endothéliales et de préserver l'angiogenèse (Sugano et al, 2002). Le TNF- α a également été décrit comme répresseur de l'expression de l'intégrine alpha Vbeta 3, entraînant ainsi une inhibition de l'angiogenèse par altération de l'adhésion cellulaire et apoptose de l'endothélium vasculaire (Rüegg et al, 1998). Le TNF- α semble également diminuer l'expression de récepteurs du VEGF dans les cellules endothéliales, contrant ainsi l'effet du VEGF sur

l'angiogenèse (Patterson et al, 1996). Ainsi, l'inhibition de l'expression massive de TNF- α par le miR-125a peut préserver l'angiogenèse.

Un autre point intéressant pour la compréhension du mécanisme *in vivo* est que les exosomes des cellules souches mésenchymateuses périvasculaires semblent être enrichis en miR-125a et peuvent être absorbés par les cellules endothéliales pour promouvoir l'angiogenèse par répression de DLL4 (Liang et al, 2016). Ainsi, les exosomes semblent être intéressants dans l'étude de l'impact du miR-125a sur l'angiogenèse.

D'autre part, il a récemment été décrit que le miR-125a augmentait le nombre et la taille des cellules souches hématopoïétiques chez la souris et favorisait leur renouvellement, leur durée de vie et leur migration (Wojtowicz et al, 2019). Par conséquent, *in vivo*, le miR-125a pourrait également contribuer à la protection de la vascularisation rétinienne par amélioration du recrutement des PACs. Cette hypothèse reste à explorer.

5. Variabilité d'expression des miRs *in vivo*

Bien que la tendance ait été identique, nous avons observé plus de variabilité inter-individuelle dans l'expression des miRs en condition OIR dans les travaux sur le miR-125a par rapport à ceux sur le miR-96. Tout ayant été réalisé selon les protocoles en vigueur, je me suis intéressée à l'impact environnemental de la modulation de l'expression de ces deux miRs.

Le miR-96 peut être modulé par son environnement. En effet, l'expression du cluster miR-183/96/182 a été décrite comme variable selon le rythme circadien et avec une régulation positive de son expression par la lumière (Xu et al, 2007). Tous les animaux ont été soumis aux mêmes conditions lumineuses, dans le respect des directives du Comité de Protection des Animaux. Ainsi, ce paramètre de variabilité était contrôlé au niveau inter-individuel. Il est intéressant de noter que le miR-125 peut également être modulé par son environnement. En effet, son expression est diminuée lors de l'activité physique (Radom-

Aizik et al, 2012). Ainsi, c'est un paramètre qui pourrait être pris en compte dans les études sur modèles animaux portant sur les miRs et qui pourrait être à l'origine de différences inter-individuelles et expliquer que, bien qu'allant dans la même direction, il existe un plus grand écart type au niveau de certains résultats, puisque tous les rats ne sont pas actifs de la même façon, surtout lorsqu'ils sont soumis à des conditions de stress, telles que les variations d'oxygénation.

Un autre point intéressant est qu'il a été rapporté une hétérogénéité fonctionnelle de la microglie au niveau du cluster Sx6 présent uniquement en période postnatale précoce et enrichi chez les femelles pour certains gènes, dont celui de Arg1, qui est un marqueur des macrophages périphériques ayant une polarisation M2 (Hammond et al, 2019). Ainsi, il existe une plasticité microgliale liée au sexe et qui pourrait potentiellement influencer la réponse à l'inflammation des cellules microgliales. Nous n'avons pas différencié les mâles des femelles dans nos rats mais c'est un élément qui pourrait être pris en compte dans des travaux ultérieurs.

Un autre élément pouvant également éclairer sur l'interprétation de l'observation de cette variabilité est que pour l'étude sur le miR-96, nous avons utilisé le modèle de vaso-oblitération avec hyper-oxygénation constante à 80%, tandis que pour l'étude sur le miR-125a, nous avons utilisé le modèle d'oxygénation cyclique alternant une oxygénation à 50% et à 10% aux 24h. Il est possible que la régulation des miRs puisse avoir des différences individuelles face aux variations régulières d'oxygénation par rapport au modèle constant.

Par ailleurs, comme mentionné dans l'introduction, la vaso-oblitération est variable selon les souches de rats. Il est possible qu'en utilisant une autre souche de rats plus sensibles vis-à-vis de la vaso-oblitération, tels que les rats Long-Evans, l'atteinte soit plus sévère et la variabilité inter-individuelle moindre.

De plus en plus de modèles non animaux sont en cours d'élaboration ou élaborés pour l'étude des maladies et pourraient limiter les variabilités inter-individuelles et permettre de réaliser des expérimentations dans l'optimisation du respect de la vie des animaux.

Parmi eux, la bio-impression tissulaire de complexes microvasculaires rétiniens permet d'avoir une vision de la microvascularisation rétinienne (Puro, 2012). Un modèle en 3 dimensions a récemment été établi pour l'étude du développement de la vascularisation rétinienne et choroïdienne (Alberding et al, 2023), et pourrait représenter une base d'amélioration pour être le plus semblable possible au modèle *in vivo* et être intégré dans l'étude de l'OIR. Ces modèles de bio-impression en 3 dimensions pourront permettre la modélisation de maladie, l'évaluation de molécules thérapeutiques mais aussi la régénération tissulaire (Meng et al, 2021).

On peut également parler des organoïdes rétiniens dérivés des cellules souches humaines pluripotentes qui sont utilisés pour l'étude du développement rétinien, la modélisation de maladies, et le développement de thérapies novatrices (Chichagova et al, 2023). À ma connaissance, aucun modèle n'existe à ce jour pour la ROP et cela mériterait d'être développé.

6. Rôle du stress oxydatif

Tel que discuté dans l'introduction, le stress oxydatif est une composante importante de l'OIR et de la ROP.

Il a été décrit que l'expression du miR-125a était réduite dans les cellules endothéliales cérébrales traitées par des lipoprotéines de faible densité oxydées, pourvoyeuses de stress oxydatif. Le miR-125a pouvait tempérer les effets néfastes des lipoprotéines de faible densité oxydées dans les cellules endothéliales de la microvascularisation cérébrale, et notamment de limiter la production de ROS (Pan et al, 2017). Ainsi, le miR-125a semble avoir un effet protecteur vis-à-vis du stress oxydatif cérébral. Par ailleurs, l'expression du miR-125a était diminuée par l'induction du stress oxydatif dans les cellules endothéliales par H₂O₂. Cependant, il a été montré qu'en contexte normal, le miR-125a ne module pas l'expression d'ARN messager de TrxR1 mais qu'en contexte de stress oxydatif, il réprimait directement l'expression de TrxR1, un régulateur de la réduction de l'oxydation cellulaire. Ainsi, lors du stress oxydatif, l'expression de TrxR1 est induite par

la diminution d'expression du miR-125a. Ainsi, dans cette étude le stress oxydatif diminue l'expression de miR-125a, ce qui permettrait de limiter la production de ROS par induction de TrxR1 et les dégâts cellulaires liés à ce stress (Chen et al, 2018). Bien que la modulation du miR-125a par le stress oxydatif soit identique dans ces deux études, le rôle du miR-125a vis-à-vis du stress oxydatif est différent. Cela pourrait être lié au type d'induction de stress oxydatif ou encore au type cellulaire impliqué. Dans tous les cas, il est possible que le stress oxydatif impliqué dans l'OIR contribue à la diminution de l'expression du miR-125a dans les cellules rétinienne. Cela reste à définir, de même que l'exploration de sa réponse vis-à-vis de ce stress.

Le GSH est un agent anti-oxydant impliqué dans la préservation neuronale. Le miR-96 permet l'augmentation de son expression par répression de l'inhibiteur direct de GSH, EAAC1. Néanmoins, il existe une régulation à deux niveaux puisque le miR-96 permet le maintien de l'expression de l'inhibiteur de EAAC1, GTRAP3-18 par répression post-transcriptionnel de l'inhibiteur de celui-ci, NOVA1 (Kinoshita et al, 2021). Ainsi le miR-96 semble avoir des propriétés antioxydantes au niveau cérébral. Par ailleurs, le miR-96, en inhibant l'expression de p66shc et par conséquent de la cascade de signalisation p66shc/cytochrome C permet de réduire le stress oxydatif hépatique dans la stéatose hépatique non alcoolique (Zhang et al, 2020). Collectivement, ces études montrent que le miR-96 a un potentiel anti-oxydant. Ainsi, sa diminution dans l'OIR pourrait être liée au stress oxydatif. Une éventuelle régulation du miR-96 par le stress oxydatif serait à explorer dans l'OIR, de même que l'impact de la supplémentation en miR-96 sur le stress oxydatif.

7. Autres impacts potentiels des miR-125 et miR-96 sur la vision

Les miR-125a et miR-96 ont un impact positif sur la préservation de la microvascularisation rétinienne dans l'OIR. Les miRs étant pléiotropiques, il serait

intéressant d'évaluer s'ils peuvent contribuer à la protection de la rétine en développement par d'autres moyens non explorés ici.

Outre son rôle dans la préservation de la microvascularisation rétinienne dans l'OIR, le miR-96 a un rôle important dans le développement visuel. Le miR-96 a une expression réduite dans la rétinite pigmentaire. Le cluster miR-183/96/182 est hautement exprimé dans la rétine. Ce cluster, et donc le miR-96, est ainsi important dans le développement sensoriel visuel. L'inactivation de ce cluster va entraîner une dégénérescence rétinienne graduelle, notamment par atteinte des connexions synaptiques des photorécepteurs. Le miR-96 possède des cibles conjointes avec le miR-182, un autre miR fortement exprimé dans la rétine et appartenant au même cluster. Ces deux miRs ciblent notamment Rac1, une GTPase pan-rétinienne impliquée dans le développement oculaire (Palfi et al, 2016; Mitchell et al, 2007). Le cluster miR-188/96/182 est également impliqué dans la régulation de l'expression de PAX6, un gène majeur dans le développement oculaire, et notamment dans le développement neuro-ectodermique et donc rétinien (Peskova et al, 2020). Il a par ailleurs été récemment montré que la suppression du miR-96 altérait le développement des photorécepteurs avec une couche nucléaire externe plus fine, que ce soit les cônes ou les bâtonnets. En outre, la délétion en miR-96 altérait les réponses à l'électrorétinogramme en période jeune. Néanmoins, une récupération était observée à l'âge adulte. Ainsi, la restriction d'expression du miR-96 entraîne un retard de maturation des photorécepteurs (Xiang et al, 2022). Par ailleurs, l'expression du miR-96 augmente fortement dans la rétine entre la naissance et l'âge adulte. Ceci suggère qu'il pourrait également avoir un rôle important dans le développement visuel et notamment la différenciation cellulaire rétinienne et la mise en place structurelle postnatale de la rétine (Xu et al, 2007). Ainsi, le maintien du niveau d'expression du miR-96 sur un œil en croissance est probablement bénéfique au développement tissulaire rétinien en plus de la préservation de la microvascularisation dans l'OIR et l'impact fonctionnel rétinien mériterait d'être exploré en complément de ce travail.

Il a été montré que chez le rat, l'inhibition de l'enzyme IRE1 α qui est associée au stress du réticulum endoplasmique permet de limiter les atteintes cérébrales de l'anoxo-ischémie néonatale. L'induction d'IRE1 α lors de cette pathologie entraîne une dégradation de miR-125b, conduisant une activation de l'inflammasome via NLRP1 dans les neurones, la microglie et les astrocytes et une augmentation de la caspase 1 et in fine à une pyroptose (Huang et al, 2020). Le miR-125b semble donc avoir une action neuroprotectrice. L'IRE-1 α a également été caractérisée comme inhibitrice du miR-125a dans les infections au virus de l'hépatite C (Fink et al, 2017). Par ailleurs, il a été montré que le miR-125 est un régulateur de la transition des progéniteurs rétiniens dans le développement rétinien précoce et tardif et qu'il augmente de manière physiologique au cours du développement. Sa surexpression entraîne notamment une accélération du développement rétinien (La Torre et al, 2013). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer les conséquences de la supplémentation en miR-125a mimic sur l'organisation rétinienne ainsi que la trophicité neuronale rétinienne et la fonction visuelle.

8. Variabilité de la modulation des miR-96 et miR-125 selon les différentes localisations et conditions

Contrairement à ce que l'on a trouvé dans notre modèle de rétinopathie ischémique par OIR, l'expression du miR-96 est augmentée dans la rétine des rats du modèle de diabète induit par streptozotocine (Wu et al, 2012). Cependant, il n'est pas différencié dans cette étude si la rétinopathie diabétique est proliférative ou non et si l'expression du miR-96 varie selon ces deux entités. Ainsi, bien que la ROP et la rétinopathie diabétique soient deux rétinopathies ischémiques, les résultats obtenus dans les modèles d'OIR ne sont pas forcément extrapolables à la rétinopathie diabétique et inversement.

Nous avons identifié le miR-96 comme pro-angiogénique dans ce travail. Comme discuté plus tôt, d'autres travaux ont également retrouvé cet effet pro-angiogénique. Cependant, les miR-96 et miR-183, issus de la même famille, ont également été caractérisés comme anti-angiogéniques par ciblage de l'aniline dans les cellules endothéliales cardiaques *in*

vitro et dans le parenchyme cardiaque *in vivo* dans l'étude de la revascularisation après infarctus du myocarde (Castellan et al, 2020). Ainsi, le miR-96 semble avoir des effets différents selon le type cellulaire et tissulaire.

Nous avons rapporté une diminution de l'expression du miR-125a par le phénomène inflammatoire dans l'OIR. Comme discuté préalablement, la modulation du miR-125 dans les cellules de l'immunité est variable selon le type cellulaire dans l'inflammation. Cette différence de modulation peut être plus générale également. En effet, durant l'infection à la tuberculose, l'expression du miR-125a est majorée dans le sang et permettait d'améliorer la survie bactérienne dans les macrophages par régulation négative de l'expression de cytokines dont TNF- α et IL-6 par ciblage de TRAF6, altérant ainsi la voie de transcription NF- κ B (Niu et al, 2018).

Par ailleurs il est intéressant de constater qu'un miR peut avoir des cibles menant à la fois à la promotion et la restriction d'une même fonction. Le miR-125 a été beaucoup étudié dans les cancers solides et hématologiques. D'une manière générale, il est intéressant de noter que dépendamment du type cellulaire et du type de cancer, les miR-125a et -125b peuvent être pro-oncogénique ou suppresseur tumoral (Wang et al, 2019), faisant relever l'importance du type cellulaire et de l'environnement dans la régulation des miRs. Dans les cellules tumorales, les membres anti-apoptotique de la famille Bcl-2, tels que Bcl-w, Bcl-2, Mcl-1, Bak-1 sont tous ciblés par le miR-125, de même que d'autres sont impliqués dans l'apoptose comme P53, TP53INP1, TNFAIP3, p38; le tout protégeant de la prolifération tumorale (Sun et al, 2013). Il est intéressant de voir qu'un même miR peut moduler des cibles contraires, à la fois pro et anti-apoptotiques, et répondre ainsi à un certain équilibre.

9. Variabilité d'expression des miR-125 et miR-96 selon la période de vie

On peut apparenter la circulation cérébrale à la circulation rétinienne. Il a été montré que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les fibroblastes ont une séquence de maturation postnatale spécifique au niveau cérébral. Plus spécifiquement, les cellules musculaires lisses artériolaires se dilatent et se contractent pour augmenter le flux sanguin cérébral (Slaoui et al, 2023). Ainsi la modulation des miRs impliqués dans les pathologies vasculaires rétiniennes risque d'être différente *in vivo* entre la période postnatale précoce et la période adulte et donc selon le type cellulaire utilisé. Ici, nous avons des effets correspondants entre nos modèles cellulaires *in vitro* avec les HRMECs et les SIM-A9, et nos modèles *in vivo*.

Le miR-96 a été identifié comme régulateur de la néovascularisation post-ischémique dans l'infarctus du myocarde. Les cellules endothéliales cardiaques néonatales et adultes possèdent des phénotypes différents vis-à-vis de l'angiogenèse. En effet, les capacités de récupération angiogénique sont meilleures dans les cellules endothéliales cardiaques néonatales par rapport aux cellules endothéliales cardiaques adultes. L'expression du miR-96 est nettement augmentée dans les cellules endothéliales cardiaques adultes par rapport aux néonatales et le miR-96 a été caractérisé comme anti-angiogénique dans ce modèle, en empêchant la néovascularisation et la réparation vasculaire en ciblant l'aniline (Castellan et al, 2020). Ceci montre bien qu'il est important de caractériser les miRs dans chaque type tissulaire et pathologie puisqu'ici le miR-96 a un effet anti-angiogénique, contrairement à ce que nous avons retrouvé dans l'OIR. D'autre part, cette étude montre l'importance de la différence d'expression cellulaire des miRs selon l'âge et a un impact quant aux pathologies ciblées. Le modèle d'OIR correspond aux rétinopathies ischémiques, telles que la ROP ou la rétinopathie diabétique. Or, pour une mise en perspective, ce modèle a lieu sur une vascularisation immature, tel que c'est le cas dans la ROP et les données obtenues ne pourront pas nécessairement être étendues à la

compréhension d'autres pathologies ischémiques telle que la rétinopathie diabétique dont la physiopathologie est différente, de même que l'âge d'apparition.

Il a été montré que la famille du miR-125, comprenant le miR-125a, le miR-125b et le miR-315, joue un rôle important dans la régulation des gènes d'effet maternel requis pour le développement précoce de l'embryon et dans l'expression des gènes importants pour l'activation du génome zygotique. En effet, ils inhibent dans les embryons l'expression des gènes *Sebox* et *Lin28a*, qui ont normalement pour rôle d'induire la croissance des cellules souches embryonnaires. Ainsi la famille du miR-125 joue un rôle important dans la régulation de l'embryogenèse précoce pré-implantation. En revanche, la famille de miR-125 ne semble plus modulée au stade embryonnaire précoce post-implantatoire de morula et blastocyte (Kim et al 2016). Bien que des études embryonnaires tardives seraient nécessaires pour le confirmer, il semble que le miR-125 soit sécuritaire à étudier dans des tissus dont le développement est encore en cours mais plus avancé, tel que c'est le cas pour les nouveau-nés prématurés, le rendant donc intéressant dans l'étude de la rétinopathie de la prématurité, dont le modèle est l'OIR.

Dans la famille du miR-125, il est par ailleurs intéressant de noter que l'expression du miR-125b est majorée dans le cerveau mais diminuée dans le sang des patients atteints de maladie d'Alzheimer (Takousis et al, 2019), mais également dans le liquide céphalorachidien de ces patients (Lusardi et al, 2017). Cela pourrait montrer une action à localisation spécifique en termes de tissu voire de cellule et serait rassurant quant à l'impact d'un traitement local par agoniste ou antagoniste de miR sur des effets potentiels systémiques. Une autre explication pourrait être que les miRs contenus dans le secteur extracellulaire et encapsulés dans des vésicules pourraient être recrutés à un endroit spécifique et abaisser leur présence dans la circulation sanguine générale. Bien qu'une autre étude ait retrouvé une diminution du miR-125b dans le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de maladie d'Alzheimer (Kiko et al, 2014), une étude a quant à elle montré une augmentation du miR-125b dans le LCR des patients atteints de maladie

d'Alzheimer. Elle montrait également que dans les cellules de souris de type neuroblastome, la transfection de miR-125b entraînait une augmentation de l'apoptose ainsi qu'une surexpression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 et une diminution de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. Par ailleurs, la surexpression du miR-125b augmentait le stress oxydatif et entraînait une augmentation des protéines APP, BACE1, Tau 1, p-ERK et du peptide A β et supprimait l'expression de la protéine SphK1. Sphk1 est connue pour réduire le dépôt de protéines amyloïdes; il est supposé que cette protéine ait un effet protecteur dans la maladie d'Alzheimer. Les auteurs supposaient que l'augmentation du miR-125b diminuait la viabilité cellulaire par augmentation de p-ERK induite par la régulation négative de SphK1 dans la maladie d'Alzheimer (Jin et al, 2018). La base de cette étude sur laquelle l'expression du miR-125b est majorée dans le liquide céphalorachidien des patients atteints de maladie d'Alzheimer ne correspond pas aux résultats d'autres études. Contrairement à l'étude de Lusardi et al où les volontaires sains du groupe contrôle étaient âgés en moyenne de 68 ans, ceux de l'étude de Jin sont âgés de 22 à 26 ans. Comme discuté précédemment, l'inhibition de l'enzyme IRE1 α permettait de limiter les atteintes cérébrales de l'anoxo-ischémie néonatale. L'induction d'IRE1 α lors de cette pathologie entraîne une dégradation de miR-125b, conduisant une activation de l'inflammasome via NLRP1 dans les neurones, la microglie et les astrocytes et une augmentation de la caspase 1 et in fine à une pyroptose (Huang et al, 2020). Le miR-125b semble donc avoir une action neuroprotectrice sur le cerveau en période néonatale, ce qui confirme la possibilité de la différence de fonction selon l'âge dans un même organe. La famille du miR-125 est l'homologue chez les mammifères du miR-lin-4 qui est impliqué dans la régulation des processus responsables de la détermination de la durée de vie. En effet, lin-4 est nécessaire à la prévention de la mort prématurée dans le développement de *Caenorhaditis elegans* (Boehm et al, 2005). Ainsi, la régulation de la famille du miR-125 pourrait être différente selon l'âge et peut-être plus préservatrice dans l'enfance par rapport à l'âge avancé. Par conséquent, le miR-125 semble impliqué dans les processus de régulation de la détermination de la durée de vie et cela pourrait expliquer qu'il soit physiologiquement plus faible dans les liquides biologiques chez l'adulte jeune que chez

les personnes âgées dans l'étude de Jin et al, expliquant la différence de résultats avec les études de Lusardi, et al et Kiko, et al.

Il se pourrait que le miR-125, de même que le miR-96 comme nous l'avons discuté plus haut, augmentent avec l'âge de manière « physiologique », s'inscrivant dans un phénomène de vieillissement inné mais néanmoins à prendre en compte dans la compréhension et la réalisation de parallélismes quant aux mécanismes moléculaires impliqués dans les rétinopathies ischémiques, dépendamment de l'âge d'apparition de ces pathologies.

10. Forces et difficultés liées à l'étude des miRs

Comme nous l'avons vu, le miR-125a permet la répression simultanée de l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires clé et le miR-96 permet la modulation simultanée de plusieurs facteurs pro-angiogéniques. La force des miRs est de pouvoir contrôler des mécanismes physiopathologiques tels que l'inflammation ou l'angiogenèse dans leur ampleur de par la régulation d'une multitude de cibles en même temps, soit directement, soit par le contrôle de voies biologiques entières.

Par ailleurs, les miRs peuvent être intracellulaires mais peuvent aussi être contenus dans des microvésicules, qui peuvent être formées par tous les types cellulaires et être circulantes pour être déversées dans le micro-environnement où cela le nécessite ce qui va renforcer leur action ciblée (O'Brien et al 2018).

Néanmoins, compte-tenu de la multitude de cibles potentielles, prévisibles ou non, il est difficile de connaître avec exactitude toutes les répercussions sur les différentes voies biologiques de miRs. Cependant, le résultat final oriente sur la direction d'action des miRs, qui semblent agir synergiquement sur les différentes cibles pour arriver à ce résultat. Ainsi les miRs sont des candidats très intéressants dans la régulation des processus physiologiques et pathologiques mais leur caractérisation la plus complète possible semble préférable.

Par ailleurs, nous avons montré que la supplémentation intravitréenne en miR-96 mimic permettait une amélioration de la vascularisation rétinienne et choroïdienne. Il est intéressant de voir que la correction de la modulation des miRs altérés dans la rétine par injection intravitréenne de miR-mimic ou d'antagomiR peut agir à la fois sur les altérations vasculaires dans la rétine et la choroïde pour les prévenir (Shen et al, 2008). La correction simultanée de l'expression de plusieurs miRs dont l'expression est altérée peut également potentialiser l'effet correctif (Shen et al, 2008). La supplémentation intravitréenne en miR-mimic ou antagomiR est donc un moyen efficace de rétablissement du niveau d'expression des miRs dans la rétine et la choroïde, et potentiellement d'autres ARNs non codants. Ainsi, il semble intéressant d'envisager des thérapies comprenant plusieurs miRs agonistes ou antagonistes, dépendamment de l'effet voulu, pour agir simultanément sur plusieurs cibles et potentialiser l'effet correctif souhaité. On pourrait tout à fait envisager une thérapie multicibles agissant sur la même fonction, telle que l'angiogenèse ou l'inflammation. Ainsi, il conviendrait de caractériser les autres miRs impliqués dans la modulation de l'angiogenèse dans l'OIR pour optimiser l'effet synergique souhaité avec le miR-96, ou encore les autres miRs impliqués dans la modulation de l'inflammation dans l'OIR afin de corriger l'inflammation excessive, en association avec la modulation du miR-125a déjà décrite.

Par ailleurs, bien que les miRs modulent plusieurs voies biologiques en même temps, il pourrait être intéressant d'accentuer la modulation conjointe de différentes fonctions physiopathologiques impliquées dans la constitution de l'OIR, telles que l'inflammation et l'angiogenèse, notamment en combinant les miRs principalement impliqués dans l'une et l'autre fonctions, tels que les miR-96 et miR-125a. D'autres miRs sont modulés dans l'OIR et il semblerait pertinent de les caractériser individuellement avant d'envisager des synergies, ce qui permettrait en outre de sélectionner les meilleures associations de miRs à visée thérapeutique. Cependant, il convient également d'être vigilant aux potentiels effets secondaires sur les cibles non visées mais impactées par la modulation des miRs. En effet, moduler plusieurs miRs en même temps peut permettre de maximiser l'effet souhaité mais peut également entraîner plus d'impact sur les cibles non visées. La

modulation simultanée de plusieurs miRs doit donc être évaluée en tenant compte de la balance bénéfique/risque. En outre, le choix de moduler un seul miR à la fois permet de garder plus de spécificité. Comme discuté dans l'introduction, un seul miR peut moduler des centaines d'ARNs cibles et donc plusieurs voies biologiques simultanées.

Les miRs peuvent également être des marqueurs de sévérité des maladies. L'expression des miR-125a et miR-125b est diminuée chez les patients présentant une spondylarthrite ankylosante et la diminution d'expression du miR-125a est significativement corrélée à l'augmentation de la CRP et donc l'activité inflammatoire et représente ainsi un facteur de risque de sévérité de la maladie (Tan et al, 2022). Ainsi une quantification de la modulation du niveau d'expression du miR-125a pourrait aider à jauger l'impact de l'inflammation dans les pathologies à base inflammatoire et notamment l'OIR.

Enfin, le miR-125a fait partie d'un même cluster contenant des membres de la famille du miR-99 et de la famille du miR-let-7. Les ARN messagers cibles communs peuvent être obtenus dans les trois familles de gènes, et en particulier entre les familles let-7 et miR-125 (Guo et al, 2014). Il pourrait être intéressant de regarder le fonctionnement du cluster ou de la famille dans l'OIR pour potentialiser l'effet thérapeutique.

De la même façon, il peut être pertinent de regarder le fonctionnement du cluster du miR-96, composé également des miR-182 et miR-183, ce d'autant qu'il est impliqué dans le développement oculaire (Peskova et al, 2020).

Comme discuté dans l'introduction, le mécanisme de régulation de l'expression des gènes est bien plus complexe que l'exploration des miRs, puisqu'eux-mêmes sont également régulants par d'autres ARNs non codants, tels que les lncARNs. Ainsi, le réseau de régulation à de multiples « étages » avec des co-régulations, des rétrocontrôles, ce qui rend beaucoup plus compliqué la caractérisation de tous les mécanismes impliqués.

Les lncARNs ont commencé à être étudiés dans la ROP. Comme pour les miRs, la phase de néovascularisation a été privilégiée dans l'étude des miRs. Notamment, l'expression

des lncARNs MALAT1 et TUG1 est augmentée et favorise la néovascularisation rétinienne; Celle du lncARN MEG3 est diminuée, ce qui inhibe la néovascularisation rétinienne (Kim et al, 2022).

11. Voie thérapeutique

Nous avons administré les miR-mimics par injection intravitréenne. D'autres études ont utilisé ce procédé et ont obtenu des résultats sur la modulation des miRs dans la rétine et la choroïde (Shen et al, 2008 ; Liu et al, 2019).

Une autre voie d'administration est possible. En effet, les gouttes oculaires contenant des miR-mimics semblent être efficaces. Un collyre contenant le miR-410 mimic a permis de réprimer l'expression de VEGF-A et de limiter l'angiogenèse aberrante lors de la phase de néovascularisation rétinienne (Chen et al, 2018). Cette voie d'administration semble donc efficace pour la régulation de l'expression de miRs au niveau rétinien. Cela permettrait en outre de limiter le risque de complications liées à l'injection intravitréenne, telles qu'une inflammation surajoutée, ou encore le risque d'atteinte tissulaire non souhaitée. Cependant, il est probable que le miR-mimic diffuse également sur les parties en contact avec les gouttes oculaires et puisse avoir des conséquences sur ces tissus, tels que la cornée. A noter que ce risque est également présent lors de traitement monocible administré en collyre oculaire, tel que dans les essais thérapeutiques de propranolol dans la ROP. Cette voie d'administration mérite d'être explorée dans l'OIR car elle pourrait représenter une voie de traitement non invasive pour la ROP en cas d'efficacité.

L'autre élément thérapeutique modulateur possible serait d'explorer la voie des nutraceutiques puisque certains d'entre eux semblent pouvoir moduler l'expression de miRs (Desjarlais et al, 2020). Par exemple, le ginseng semble augmenter l'expression du miR-125b (Wu et al, 2011), de même que le resveratrol (Krakowsky et al, 2015).

L'expression du miR-96 semble quant à elle également majorée par le resveratrol (Saud et al, 2014).

12. Extrapolation clinique

À mon sens, il est important que les travaux de recherche fondamentale puissent servir aux patients et la question de l'extrapolation est importante.

Un des points importants pour cette extrapolation est l'étude de molécules faisant du sens avec la physiopathologie humaine. Ici, les deux miRs étudiés sont conservés entre les rongeurs et les hommes (Sun et al, 2013; Lewis et al, 2010), les rendant particulièrement d'intérêt.

À l'âge adulte chez des donneurs humains post-mortem, le miR-125a était fortement exprimé dans la rétine et la choroïde. Le cluster miR-183/96/182 représentait environ 44% des lectures cartographiées dans la rétine. Le miR-96 était quant à lui plus fortement exprimé dans la rétine que dans la choroïde avec un ratio multiplicatif d'environ 80 (Karali et al, 2016).

Compte-tenu des variabilités d'expression selon le type tissulaire, la pathologie donnée et la période de vie, il serait intéressant d'obtenir des profils d'expression des micro-ARNs dans les différents tissus oculaires, en condition physiologique et pathologique mais également en période développementale, telle que chez le nouveau-né et l'enfant, et en période plus tardive chez l'adulte.

Cela reste pour l'instant difficilement faisable chez l'homme adulte vivant en raison des moyens actuels mais compte-tenu de l'impact que cela pourrait avoir sur l'expansion de la recherche, les moyens d'obtenir une cartographie des miRs dans l'organisme seraient un axe de recherche intéressant. Néanmoins, si des concordances sont retrouvées dans les modèles animaux entre certaines modulations dans des tissus avoisinants, des explorations de localisation proche pourraient aider pour orienter certaines recherches, telles que les analyses de prélèvements vitréens.

Concernant la ROP, la détermination de ce profil de miRs dans la rétine et la choroïde semble difficile. En effet, l'accès aux tissus rétinien et choroïdien n'est pas possible du vivant et il serait difficile, compte-tenu du contexte émotionnel lié au décès d'un nouveau-né pour les parents de pouvoir avoir accès à des échantillons d'yeux post-mortem. Il ne serait par ailleurs pas éthique de réaliser des prélèvements intravitréens dans cet objectif. Les seuls nouveau-nés chez qui ces prélèvements seraient possibles sont les nouveau-nés traités de manière chirurgicale par vitrectomie lors du décollement de rétine compliquant la ROP, soit en phase vasoproliférative. Or, cette situation n'arrive quasiment plus dans les pays développés tel que le nôtre où la qualité du dépistage et de la prise en charge curative est excellente. Ainsi, la détermination d'un profil d'expression des micro-ARNs dans l'œil des nouveau-nés souffrant ou non de ROP, sévère ou non, reste pour l'instant un challenge à surmonter. Si le profil d'expression des miRs dans la phase de vaso-oblitération de la ROP s'avère être identique à celui de nos études chez le rat, des candidats tels que le miR-96 ou le miR-125a pourraient être intéressants à utiliser pour protéger la microvascularisation rétinienne et/ou choroïdienne.

L'autre point important est d'être capable de déterminer à quel moment surveiller et éventuellement avoir une action thérapeutique le cas échéant dans la phase de vaso-oblitération. Cette phase n'a pas été réellement caractérisée sur le plan clinique et translationnel. Or, autant pour avoir une action préventive quant à l'apparition d'une ROP sévère, que pour avoir une action préventive sur les complications à long terme notamment liées à la dégénérescence choroïdienne, il va être important de caractériser cette phase chez le nouveau-né. Cette caractérisation pourra permettre d'améliorer le suivi et le dépistage des patients d'une part et d'établir le meilleur moment d'action thérapeutique au cours de cette période, que ce soit pour les miRs pertinents ou même pour les molécules monocibles déjà caractérisées.

VI. Conclusion

La rétinopathie de la prématurité fait partie des principales causes de cécité dans l'enfance et impacte le pronostic visuel de ces enfants nés prématurément. Par conséquent, elle peut avoir un impact sur leur développement neuro-moteur dans l'enfance et sur leurs capacités lorsque la vision est impliquée à l'âge adulte.

Elle se développe en deux phases. La première phase est ischémique et entraîne une vaso-oblitération rétinienne et choroïdienne. La seconde consiste en une néovascularisation aberrante sur ce lit rétinien hypoxique et pourra conduire à un décollement de rétine. La prise en charge actuelle de la rétinopathie de la prématurité consiste en la prévention sur les facteurs de risque modifiables et sur le dépistage en phase vasoproliférative pour introduire un traitement sur cette phase. De plus en plus d'études montrent que la première phase est importante, tant sur le risque de développer une néovascularisation pathologique secondaire que sur les impacts sur le pronostic visuel à long terme, notamment de par la dégénérescence choroïdienne qui ne récupère pas dans le temps. Il est donc important d'explorer cette phase pour mieux prévenir l'apparition d'une rétinopathie sévère et éventuellement introduire des traitements précoces dans ce but et dans le but de préserver la vaso-trophicité rétinienne et choroïdienne en vue de l'amélioration du pronostic visuel.

Les miRs sont des régulateurs de l'expression génique dont la découverte est relativement récente et dont la caractérisation est encore incomplète dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Leur caractère pléiotropique les rend vraiment intéressants à visée thérapeutique par rapport aux molécules monocibles. Ils pourront ainsi, avec les autres ARNs non codants, constituer probablement des thérapeutiques d'avenir. Actuellement, les miRs ont été, comme la plupart des autres molécules, essentiellement étudiés dans la phase de néovascularisation pathologique post-ischémique de l'OIR. Les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle par les miRs restent cependant encore à explorer dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR.

L'objectif de ce travail était de caractériser un miR impliqué prioritairement sur la fonction angiogénique et un miR impliqué prioritairement sur la fonction inflammatoire dans l'OIR. Nous avons identifié le miR-96 comme étant pro-angiogénique et d'expression diminuée en phase précoce de l'OIR. La restauration de son niveau d'expression permettait de maintenir les capacités angiogéniques des cellules endothéliales rétiniennes et de protéger de la vaso-oblitération rétinienne et choroïdienne par majoration de l'expression de VEGF et Ang2.

Nous avons secondairement identifié le miR-125a comme étant anti-inflammatoire et d'expression diminuée dans la phase de vaso-oblitération de l'OIR. La restauration de son niveau d'expression permettait de prévenir l'inflammation accrue et soutenue par inhibition de la majoration de cytokines pro-inflammatoires clés TNF- α , IL-6 et IL-16 par les cellules microgliales et modification de leur sécrétome, permettant ainsi de réduire la vaso-oblitération rétinienne.

Le miR-96 et le miR-125a sont donc des cibles thérapeutiques intéressantes pour la prise en charge de la phase de vaso-oblitération de la ROP, sous réserve de compléments de caractérisation individuelle, et éventuellement d'utilisation combinée.

Au cours de cette thèse, nous avons identifié de nouveaux mécanismes impliqués dans la régulation de la vaso-oblitération rétinienne et choroïdienne des modèles d'OIR chez les rats, correspondant aux modèles animaux de la rétinopathie de la prématurité. Il s'agit de la première caractérisation de miRs dans cette phase. Nous avons notamment montré que la correction du niveau d'expression des miRs pouvait contribuer à la protection de la microvascularisation rétinienne et choroïdienne et constituer un nouvel axe thérapeutique. Des caractérisations complémentaires sont à réaliser quant à la mécanistique précise de la régulation des voies moléculaires dans l'OIR et l'impact à plus long terme. Il sera également important d'explorer cette phase chez les nouveau-nés prématurés afin de pouvoir envisager un jour l'utilisation de miRs à visée thérapeutique dans cette population.

VII. Références bibliographiques

- Abba, M., Patil, N., et Allgayer, H. (2014). MicroRNAs in the Regulation of MMPs and Metastasis. *Cancers*, 6(2), 625–645. <https://doi.org/10.3390/cancers6020625>
- Abbas, A. K., Trotta, E., R Simeonov, D., Marson, A., et Bluestone, J. A. (2018). Revisiting IL-2: Biology and therapeutic prospects. *Science immunology*, 3(25), eaat1482. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aat1482>
- Alberding, J. P., et Secomb, T. W. (2023). Simulation of Angiogenesis in Three Dimensions: Development of the Retinal Circulation. *Bulletin of mathematical biology*, 85(4), 27. <https://doi.org/10.1007/s11538-023-01126-7>
- Akula, J. D., Hansen, R. M., Martinez-Perez, M. E., et Fulton, A. B. (2007). Rod photoreceptor function predicts blood vessel abnormality in retinopathy of prematurity. *Investigative ophthalmology et visual science*, 48(9), 4351–4359. <https://doi.org/10.1167/iovs.07-0204>
- Almeida, M. I., Reis, R. M., et Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation research*, 717(1-2), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009>
- Alzaree, F. A., AbuShady, M. M., Atti, M. A., Fathy, G. A., Galal, E. M., Ali, A., et Elias, T. R. (2019). Effect of Early Breast Milk Nutrition on Serum Insulin-Like Growth Factor-1 in Preterm Infants. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 7(1), 77–81. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.035>
- Ames, A., 3rd, Li, Y. Y., Heher, E. C., et Kimble, C. R. (1992). Energy metabolism of rabbit retina as related to function: high cost of Na⁺ transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 12(3), 840–853. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-03-00840.1992>
- Ansari, M.W., Nadeem, A. (2016). The Eyeball: Some Basic Concepts. In: Atlas of Ocular Anatomy. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42781-2_2

- Aouiss, A., Anka Idrissi, D., Kabine, M., et Zaid, Y. (2019). Update of inflammatory proliferative retinopathy: Ischemia, hypoxia and angiogenesis. *Current research in translational medicine*, 67(2), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.retram.2019.01.005>
- Apte, R. S., Chen, D. S., et Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6), 1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Arora, A., Guduric-Fuchs, J., Harwood, L., Dellett, M., Cogliati, T., et Simpson, D. A. (2010). Prediction of microRNAs affecting mRNA expression during retinal development. *BMC developmental biology*, 10, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-1>
- Arraiano C. M. (2021). Regulatory noncoding RNAs: functions and applications in health and disease. *The FEBS journal*, 288(22), 6308–6309. <https://doi.org/10.1111/febs.16027>
- Arroyo, A. B., Fernández-Pérez, M. P., Del Monte, A., Águila, S., Méndez, R., Hernández-Antolín, R., García-Barber, N., de Los Reyes-García, A. M., González-Jiménez, P., Arcas, M. I., Vicente, V., Menéndez, R., Andrés, V., González-Conejero, R., et Martínez, C. (2021). miR-146a is a pivotal regulator of neutrophil extracellular trap formation promoting thrombosis. *Haematologica*, 106(6), 1636–1646. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.240226>
- Arshavsky, V. Y., et Burns, M. E. (2014). Current understanding of signal amplification in phototransduction. *Cellular logistics*, 4, e29390. <https://doi.org/10.4161/cl.29390>
- Ashton, N., et Blach, R. (1961). STUDIES ON DEVELOPING RETINAL VESSELS VIII. EFFECT OF OXYGEN ON THE RETINAL VESSELS OF THE RATLING. *The British journal of ophthalmology*, 45(5), 321–340. <https://doi.org/10.1136/bjo.45.5.321>
- Askie, L. M., Darlow, B. A., Davis, P. G., Finer, N., Stenson, B., Vento, M., et Whyte, R. (2017). Effects of targeting lower versus higher arterial oxygen saturations on death or disability in preterm infants. *The Cochrane database of systematic reviews*, 4(4), CD011190. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011190.pub2>

- Azad, R., Chandra, P., Khan, M. A., et Darswal, A. (2008). Role of intravenous fluorescein angiography in early detection and regression of retinopathy of prematurity. *Journal of pediatric ophthalmology and strabismus*, 45(1), 36–39. <https://doi.org/10.3928/01913913-20080101-03>
- Baker, J., Liu, J. P., Robertson, E. J., et Efstratiadis, A. (1993). Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*, 75(1), 73–82.
- Bali, J., Bali, R.T. (2013) Pathological ocular angiogenesis in diabetes: A perspective of emerging paradigms and current evidence. *J Clin Ophthalmol Res*, (1), 3-10.
- Balogh, A., Milibák, T., Szabó, V., Nagy, Z. Z., Kaarniranta, K., et Resch, M. D. (2020). Immunological biomarkers of the vitreous responsible for proliferative alteration in the different forms of retinal detachment. *BMC ophthalmology*, 20(1), 491. <https://doi.org/10.1186/s12886-020-01745-x>
- Banerjee, S., Cui, H., Xie, N., Tan, Z., Yang, S., Icyuz, M., Thannickal, V. J., Abraham, E., et Liu, G. (2013). miR-125a-5p regulates differential activation of macrophages and inflammation. *The Journal of biological chemistry*, 288(49), 35428–35436. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.426866>
- Banisadr, G., Rostène, W., Kitabgi, P., et Parsadaniantz, S. M. (2005). Chemokines and brain functions. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4(3), 387–399. <https://doi.org/10.2174/1568010054022097>
- Banno, K., et Yoder, M. C. (2018). Tissue regeneration using endothelial colony-forming cells: promising cells for vascular repair. *Pediatric research*, 83(1-2), 283–290. <https://doi.org/10.1038/pr.2017.231>
- Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), 281–297. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5)
- Bartel D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), 215–233. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>

- Barnett, J. M., Yanni, S. E., et Penn, J. S. (2010). The development of the rat model of retinopathy of prematurity. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 120(1), 3–12. <https://doi.org/10.1007/s10633-009-9180-y>
- Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K., et Calin, G. A. (2017). Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Molecular oncology*, 11(12), 1673–1686. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12144>
- Beauchamp, M. H., Sennlaub, F., Speranza, G., Gobeil, F., Jr, Checchin, D., Kermorvant-Duchemin, E., Abran, D., Hardy, P., Lachapelle, P., Varma, D. R., et Chemtob, S. (2004). Redox-dependent effects of nitric oxide on microvascular integrity in oxygen-induced retinopathy. *Free radical biology et medicine*, 37(11), 1885–1894. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.008>
- Beaudry-Richard, A., Nadeau-Vallée, M., Prairie, É., Maurice, N., Heckel, É., Nezhady, M., Pundir, S., Madaan, A., Boudreault, A., Hou, X., Quiniou, C., Sierra, E. M., Beaulac, A., Lodygensky, G., Robertson, S. A., Keelan, J., Adams Waldorf, K. M., Olson, D. M., Rivera, J. C., Lubell, W. D., ... Chemtob, S. (2018). Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny. *Scientific reports*, 8(1), 11875. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30087-4>
- Behar-Cohen, F., Gelizé, E., Jonet, L., et Lassiaz, P. (2020). Anatomie de la rétine [Anatomy of the retina]. *Medecine sciences : M/S*, 36(6-7), 594–599. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020094>
- Berger A. (2000). Th1 and Th2 responses: what are they?. *BMJ (Clinical research ed.)*, 321(7258), 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
- Bikfalvi A. (2017). History and conceptual developments in vascular biology and angiogenesis research: a personal view. *Angiogenesis*, 20(4), 463–478. <https://doi.org/10.1007/s10456-017-9569-2>
- Binet, F., Cagnone, G., Crespo-Garcia, S., Hata, M., Neault, M., Dejda, A., Wilson, A. M., Buscarlet, M., Mawambo, G. T., Howard, J. P., Diaz-Marin, R., Parinot, C., Guber, V., Pilon, F., Juneau, R., Laflamme, R., Sawchyn, C., Boulay, K., Leclerc, S., Abu-Thuraia,

- A., et Sapieha, P. (2020). Neutrophil extracellular traps target senescent vasculature for tissue remodeling in retinopathy. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6506), eaay5356. <https://doi.org/10.1126/science.aay5356>
- Birch, E. E., et O'Connor, A. R. (2001). Preterm birth and visual development. *Seminars in neonatology* : SN, 6(6), 487–497. <https://doi.org/10.1053/siny.2001.0077>
 - Biswas S. (2018). MicroRNAs as Therapeutic Agents: The Future of the Battle Against Cancer. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(30), 2544–2554. <https://doi.org/10.2174/1568026619666181120121830>
 - Boehm, M., et Slack, F. (2005). A developmental timing microRNA and its target regulate life span in *C. elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5756), 1954–1957. <https://doi.org/10.1126/science.1115596>
 - Bowl, W., Bowl, M., Schweinfurth, S., Holve, K., Andrassi-Darida, M., Stieger, K., et Lorenz, B. (2018). Choroidal Thickness with Swept-Source Optical Coherence Tomography versus Foveal Morphology in Young Children with a History of Prematurity. *Ophthalmic research*, 60(4), 205–213. <https://doi.org/10.1159/000484631>
 - Brooks, S. E., Gu, X., Samuel, S., Marcus, D. M., Bartoli, M., Huang, P. L., et Caldwell, R. B. (2001). Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Investigative ophthalmology et visual science*, 42(1), 222–228.
 - Bühner, C., Erdeve, Ö., Bassler, D., et Bar-Oz, B. (2018). Oral propranolol for prevention of threshold retinopathy of prematurity (ROPROP): protocol of a randomised controlled trial. *BMJ open*, 8(7), e021749. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-021749>
 - Burns, S. A., Elsner, A. E., et Gast, T. J. (2021). Imaging the Retinal Vasculature. *Annual review of vision science*, 7, 129–153. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-093019-113719>
 - BURTON A. C. (1954). Relation of structure to function of the tissues of the wall of blood vessels. *Physiological reviews*, 34(4), 619–642.

<https://doi.org/10.1152/physrev.1954.34.4.619>

- Buschmann, I. R., Hoefler, I. E., van Royen, N., Katzer, E., Braun-Dulleaus, R., Heil, M., Kostin, S., Bode, C., et Schaper, W. (2001). GM-CSF: a strong arteriogenic factor acting by amplification of monocyte function. *Atherosclerosis*, *159*(2), 343–356. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(01\)00637-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(01)00637-2)
- Buschmann, D., Kirchner, B., Hermann, S., Märte, M., Wurmser, C., Brandes, F., Kotschote, S., Bonin, M., Steinlein, O. K., Pfaffl, M. W., Schelling, G., et Reithmair, M. (2018). Evaluation of serum extracellular vesicle isolation methods for profiling miRNAs by next-generation sequencing. *Journal of extracellular vesicles*, *7*(1), 1481321. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1481321>
- Byeon, S. E., Yi, Y. S., Oh, J., Yoo, B. C., Hong, S., et Cho, J. Y. (2012). The role of Src kinase in macrophage-mediated inflammatory responses. *Mediators of inflammation*, *2012*, 512926. <https://doi.org/10.1155/2012/512926>
- Cai, Z., Li, J., Zhuang, Q., Zhang, X., Yuan, A., Shen, L., Kang, K., Qu, B., Tang, Y., Pu, J., Gou, D., et Shen, J. (2018). MiR-125a-5p ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by targeting the TGF- β 1 and IL-6/STAT3 signaling pathways. *Experimental et molecular medicine*, *50*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s12276-018-0068-3>
- Campbell, J. P., Zhang, M., Hwang, T. S., Bailey, S. T., Wilson, D. J., Jia, Y., et Huang, D. (2017). Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography. *Scientific reports*, *7*, 42201. <https://doi.org/10.1038/srep42201>
- Canadian Neonatal Network. (2019). <http://www.canadianneonatalnetwork.org>
- Caporarello, N., D'Angeli, F., Cambria, M. T., Candido, S., Giallongo, C., Salmeri, M., Lombardo, C., Longo, A., Giurdanella, G., Anfuso, C. D., et Lupo, G. (2019). Pericytes in Microvessels: From "Mural" Function to Brain and Retina Regeneration. *International journal of molecular sciences*, *20*(24), 6351. <https://doi.org/10.3390/ijms20246351>

- Caputo, G., Metge-Galatoire, F., Arndt, C., Conrath, J. (2011). Décollements de rétine, Rapport SFO 2011. Elsevier SAS. <https://doi.org/10.1016/C2011-0-09553-4>
- Cascio, S., D'Andrea, A., Ferla, R., Surmacz, E., Gulotta, E., Amodeo, V., Bazan, V., Gebbia, N., et Russo, A. (2010). miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*, 224(1), 242–249. <https://doi.org/10.1002/jcp.22126>
- Castellan, R. F., Vitiello, M., Vidmar, M., Johnstone, S., Iacobazzi, D., Mellis, D., Cathcart, B., Thomson, A., Ruhrberg, C., Caputo, M., Newby, D. E., Gray, G. A., Baker, A. H., Caporali, A., et Meloni, M. (2020). miR-96 and miR-183 differentially regulate neonatal and adult postinfarct neovascularization. *JCI insight*, 5(14), e134888. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.134888>
- Chakraborty, C., Sharma, A. R., Sharma, G., et Lee, S. S. (2020). Therapeutic advances of miRNAs: A preclinical and clinical update. *Journal of advanced research*, 28, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.08.012>
- Chamorro-Jorganes, A., Araldi, E., et Suárez, Y. (2013). MicroRNAs as pharmacological targets in endothelial cell function and dysfunction. *Pharmacological research*, 75, 15–27. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.04.002>
- Chen, F., Liu, H., Wu, J., et Zhao, Y. (2018). miR-125a Suppresses TrxR1 Expression and Is Involved in H₂O₂-Induced Oxidative Stress in Endothelial Cells. *Journal of immunology research*, 2018, 6140320. <https://doi.org/10.1155/2018/6140320>
- Chan, H., Cougnard-Grégoire, A., Korobelnik, J. F., Delyfer, M. N., Touboul, D., Coste, V., Sarlangue, J., Dutheil, C., et Paya, C. (2018). Screening for retinopathy of prematurity by telemedicine in a tertiary level neonatal intensive care unit in France: Review of a six-year period. *Journal francais d'ophtalmologie*, 41(10), 926–932. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.02.020>
- Chen, J., Gong, X., Huang, L., Chen, P., Wang, T., Zhou, W., Luo, K., et Wang, J. (2018). MiR-199a-5p regulates sirtuin1 and PI3K in the rat hippocampus with intrauterine growth restriction. *Scientific reports*, 8(1), 13813. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32189-5>

- Chen, L., Yang, P., et Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular immunology and inflammation*, 10(1), 27–39.
<https://doi.org/10.1076/ocii.10.1.27.10328>
- Chen, L., Wang, J., Wang, B., Yang, J., Gong, Z., Zhao, X., Zhang, C., et Du, K. (2016). MiR-126 inhibits vascular endothelial cell apoptosis through targeting PI3K/Akt signaling. *Annals of hematology*, 95(3), 365–374.
<https://doi.org/10.1007/s00277-015-2567-9>
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., et Zhao, L. (2017). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.23208>
- Chen, M., Cheng, Y., Yuan, Z., Wang, F., Yang, L., et Zhao, H. (2020). NCK1-AS1 Increases Drug Resistance of Glioma Cells to Temozolomide by Modulating miR-137/TRIM24. *Cancer biotherapy et radiopharmaceuticals*, 35(2), 101–108.
<https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3054>
- Chen, N., Wang, J., Hu, Y., Cui, B., Li, W., Xu, G., Liu, L., et Liu, S. (2014). MicroRNA-410 reduces the expression of vascular endothelial growth factor and inhibits oxygen-induced retinal neovascularization. *PloS one*, 9(4), e95665.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095665>
- Chen, X., Yao, Y., Yuan, F., et Xie, B. (2020). Overexpression of miR-181a-5p inhibits retinal neovascularization through endocan and the ERK1/2 signaling pathway. *Journal of cellular physiology*, 235(12), 9323–9335.
<https://doi.org/10.1002/jcp.29733>
- Chen, X., Li, X., Liu, Y., Yuan, Y., Feng, Y., Wang, J., Li, M., Gao, D., et Yuan, F. (2022). MicroRNA Expression Analysis of Mice Retinas with Oxygen-Induced Retinopathy by RNA Sequencing. *Journal of ophthalmology*, 2022, 9738068.
<https://doi.org/10.1155/2022/9738068>

- Chen, Y., Gao, D. Y., et Huang, L. (2015). In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Advanced drug delivery reviews*, *81*, 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.05.009>
- Chiang, M. F., Quinn, G. E., Fielder, A. R., Ostmo, S. R., Paul Chan, R. V., Berrocal, A., Binenbaum, G., Blair, M., Peter Campbell, J., Capone, A., Jr, Chen, Y., Dai, S., Ells, A., Fleck, B. W., Good, W. V., Elizabeth Hartnett, M., Holmstrom, G., Kusaka, S., Kychenthal, A., Lepore, D., Zin, A. (2021). International Classification of Retinopathy of Prematurity, Third Edition. *Ophthalmology*, *128*(10), e51–e68. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2021.05.031>
- Chichagova, V., Georgiou, M., Carter, M., Dorgau, B., Hilgen, G., Collin, J., Queen, R., Chung, G., Ajeian, J., Moya-Molina, M., Kustermann, S., Pognan, F., Hewitt, P., Schmitt, M., Sernagor, E., Armstrong, L., et Lako, M. (2023). Incorporating microglia-like cells in human induced pluripotent stem cell-derived retinal organoids. *Journal of cellular and molecular medicine*, *27*(3), 435–445. <https://doi.org/10.1111/jcmm.17670>
- Chipman, L. B., et Pasquinelli, A. E. (2019). miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends in genetics : TIG*, *35*(3), 215–222. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.12.005>
- Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., et Chemtob, S. (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investigative ophthalmology et visual science*, *47*(8), 3595–3602. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1522>
- Cheng, H. Y., Wang, Y. S., Hsu, P. Y., Chen, C. Y., Liao, Y. C., et Juo, S. H. (2019). miR-195 Has a Potential to Treat Ischemic and Hemorrhagic Stroke through Neurovascular Protection and Neurogenesis. *Molecular therapy. Methods et clinical development*, *13*, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.11.011>
- Choi, H. R., Ha, J. S., Kim, E. A., Cho, S. W., et Yang, S. J. (2022). MiR-30a-5p and miR-153-3p regulate LPS-induced neuroinflammatory response and neuronal apoptosis

- by targeting NeuroD1. *BMB reports*, 55(9), 447–452.
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2022.55.9.061>
- Cobos Jiménez, V., Bradley, E. J., Willemsen, A. M., van Kampen, A. H., Baas, F., et Kootstra, N. A. (2014). Next-generation sequencing of microRNAs uncovers expression signatures in polarized macrophages. *Physiological genomics*, 46(3), 91–103. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00140.2013>
 - Connolly, B. P., McNamara, J. A., Sharma, S., Regillo, C. D., et Tasman, W. (1998). A comparison of laser photocoagulation with trans-scleral cryotherapy in the treatment of threshold retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*, 105(9), 1628–1631. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(98\)99029-7](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(98)99029-7)
 - Connolly, B. P., Ng, E. Y., McNamara, J. A., Regillo, C. D., Vander, J. F., et Tasman, W. (2002). A comparison of laser photocoagulation with cryotherapy for threshold retinopathy of prematurity at 10 years: part 2. Refractive outcome. *Ophthalmology*, 109(5), 936–941. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(01\)01015-6](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(01)01015-6)
 - Costeloe, K. L., Hennessy, E. M., Haider, S., Stacey, F., Marlow, N., et Draper, E. S. (2012). Short term outcomes after extreme preterm birth in England: comparison of two birth cohorts in 1995 and 2006 (the EPICure studies). *BMJ (Clinical research ed.)*, 345, e7976. <https://doi.org/10.1136/bmj.e7976>
 - Cunningham, S., Fleck, B. W., Elton, R. A., et McIntosh, N. (1995). Transcutaneous oxygen levels in retinopathy of prematurity. *Lancet (London, England)*, 346(8988), 1464–1465. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(95\)92475-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(95)92475-2)
 - Curtale, G., Renzi, T. A., Mirolo, M., Drufuca, L., Albanese, M., De Luca, M., Rossato, M., Bazzoni, F., et Locati, M. (2018). Multi-Step Regulation of the TLR4 Pathway by the miR-125a~99b~let-7e Cluster. *Frontiers in immunology*, 9, 2037. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02037>
 - Cruikshank, W. W., Kornfeld, H., et Center, D. M. (1998). Signaling and functional properties of interleukin-16. *International reviews of immunology*, 16(5-6), 523–540. <https://doi.org/10.3109/08830189809043007>

- Cryotherapy for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group. (1990). Multicenter trial of cryotherapy for retinopathy of prematurity. Three-month outcome. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 108(2), 195–204.
<https://doi.org/10.1001/archopht.1990.01070040047029>
- Dana, H., Chalbatani, G. M., Mahmoodzadeh, H., Karimloo, R., Rezaiean, O., Moradzadeh, A., Mehmandoost, N., Moazzen, F., Mazraeh, A., Marmari, V., Ebrahimi, M., Rashno, M. M., Abadi, S. J., et Gharagouzlo, E. (2017). Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International journal of biomedical science : IJBS*, 13(2), 48–57.
- Darlow, B. A., Hutchinson, J. L., Henderson-Smart, D. J., Donoghue, D. A., Simpson, J. M., Evans, N. J., et Australian and New Zealand Neonatal Network (2005). Prenatal risk factors for severe retinopathy of prematurity among very preterm infants of the Australian and New Zealand Neonatal Network. *Pediatrics*, 115(4), 990–996.
<https://doi.org/10.1542/peds.2004-1309>
- Daruich, A., Bremond-Gignac, D., Behar-Cohen, F., et Kermorvant, E. (2020). Rétinopathie du prématuré : de la prévention au traitement [Retinopathy of prematurity: from prevention to treatment]. *Medecine sciences : M/S*, 36(10), 900–907. <https://doi.org/10.1051/medsci/2020163>
- Davitt, B. V., Dobson, V., Good, W. V., Hardy, R. J., Quinn, G. E., Siatkowski, R. M., Summers, C. G., Tung, B., et Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group (2005). Prevalence of myopia at 9 months in infants with high-risk prethreshold retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*, 112(9), 1564–1568.
<https://doi.org/10.1016/j.opht.2005.03.025>
- Davitt, B. V., Dobson, V., Quinn, G. E., Hardy, R. J., Tung, B., Good, W. V., et Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group (2009). Astigmatism in the Early Treatment for Retinopathy Of Prematurity Study: findings to 3 years of age. *Ophthalmology*, 116(2), 332–339.
<https://doi.org/10.1016/j.opht.2008.09.035>

- De Spiegelaere, W., Casteleyn, C., Van den Broeck, W., Plendl, J., Bahramsoltani, M., Simoens, P., Djonov, V., et Cornillie, P. (2012). Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *Journal of vascular research*, *49*(5), 390–404. <https://doi.org/10.1159/000338278>
- dell'Omo, R., Semeraro, F., Bamonte, G., Cifariello, F., Romano, M. R., et Costagliola, C. (2013). Vitreous mediators in retinal hypoxic diseases. *Mediators of inflammation*, *2013*, 935301. <https://doi.org/10.1155/2013/935301>
- Dembinska, O., Rojas, L. M., Varma, D. R., Chemtob, S., et Lachapelle, P. (2001). Graded contribution of retinal maturation to the development of oxygen-induced retinopathy in rats. *Investigative ophthalmology et visual science*, *42*(5), 1111–1118.
- Dembinska, O., Rojas, L. M., Chemtob, S., et Lachapelle, P. (2002). Evidence for a brief period of enhanced oxygen susceptibility in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology et visual science*, *43*(7), 2481–2490.
- Desjarlais, M., Dussault, S., Dhahri, W., Mathieu, R., et Rivard, A. (2017). MicroRNA-150 Modulates Ischemia-Induced Neovascularization in Atherosclerotic Conditions. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *37*(5), 900–908. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309189>
- Desjarlais, M., Dussault, S., Rivard, F., Harel, S., Sanchez, V., Hussain, S. N. A., et Rivard, A. (2019). Forced expression of microRNA-146b reduces TRAF6-dependent inflammation and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions. *Atherosclerosis*, *289*, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.010>
- Desjarlais, M., Rivera, J. C., Lahaie, I., Cagnone, G., Wirth, M., Omri, S., et Chemtob, S. (2019). MicroRNA expression profile in retina and choroid in oxygen-induced retinopathy model. *PLoS one*, *14*(6), e0218282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218282>
- Desjarlais, M., Wirth, M., Rivera, J. C., Lahaie, I., Dabouz, R., Omri, S., Ruknudin, P., Borrás, C., et Chemtob, S. (2020). MicroRNA-96 Promotes Vascular Repair in Oxygen-

- Induced Retinopathy-A Novel Uncovered Vasoprotective Function. *Frontiers in pharmacology*, 11, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00013>
- Desjarlais, M., Wirth, M., Lahaie, I., Ruknudin, P., Hardy, P., Rivard, A., et Chemtob, S. (2020). Nutraceutical Targeting of Inflammation-Modulating microRNAs in Severe Forms of COVID-19: A Novel Approach to Prevent the Cytokine Storm. *Frontiers in pharmacology*, 11, 602999. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.602999>
 - Desjarlais, M., Ruknudin, P., Wirth, M., Lahaie, I., Dabouz, R., Rivera, J. C., Habelrih, T., Omri, S., Hardy, P., Rivard, A., et Chemtob, S. (2021). Tyrosine-Protein Phosphatase Non-receptor Type 9 (PTPN9) Negatively Regulates the Paracrine Vasoprotective Activity of Bone-Marrow Derived Pro-angiogenic Cells: Impact on Vascular Degeneration in Oxygen-Induced Retinopathy. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 679906. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.679906>
 - de Verdier, K., Ulla, E., Löfgren, S., et Fernell, E. (2018). Children with blindness - major causes, developmental outcomes and implications for habilitation and educational support: a two-decade, Swedish population-based study. *Acta ophthalmologica*, 96(3), 295–300. <https://doi.org/10.1111/aos.13631>
 - Díaz Del Moral, S., Barrena, S., Muñoz-Chápuli, R., et Carmona, R. (2020). Embryonic circulating endothelial progenitor cells. *Angiogenesis*, 23(4), 531–541. <https://doi.org/10.1007/s10456-020-09732-y>
 - Diegelmann, R., Chalfant, C., dir. (2016). Basic Biology and Clinical Aspects of Inflammation. Sharjah: Bentham Science Publishers.
 - Dinarello C. A. (2007). Historical insights into cytokines. *European journal of immunology*, 37 Suppl 1(Suppl 1), S34–S45. <https://doi.org/10.1002/eji.200737772>
 - Dobson, V., Quinn, G. E., Abramov, I., Hardy, R. J., Tung, B., Siatkowski, R. M., et Phelps, D. L. (1996). Color vision measured with pseudoisochromatic plates at five-and-a-half years in eyes of children from the CRYO-ROP study. *Investigative ophthalmology et visual science*, 37(12), 2467–2474.
 - Dorfman, A., Dembinska, O., Chemtob, S., et Lachapelle, P. (2008). Early manifestations of postnatal hyperoxia on the retinal structure and function of the

- neonatal rat. *Investigative ophthalmology et visual science*, 49(1), 458–466.
<https://doi.org/10.1167/iovs.07-0916>
- Dorfman, A. L., Polosa, A., Joly, S., Chemtob, S., et Lachapelle, P. (2009). Functional and structural changes resulting from strain differences in the rat model of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology et visual science*, 50(5), 2436–2450. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-2297>
 - Dorfman, A. L., Cuenca, N., Pinilla, I., Chemtob, S., et Lachapelle, P. (2011). Immunohistochemical evidence of synaptic retraction, cytoarchitectural remodeling, and cell death in the inner retina of the rat model of oxygen-induced retinopathy (OIR). *Investigative ophthalmology et visual science*, 52(3), 1693–1708. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6197>
 - Dorrell, M. I., Aguilar, E., Jacobson, R., Trauger, S. A., Friedlander, J., Siuzdak, G., et Friedlander, M. (2010). Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen-induced retinopathy. *Glia*, 58(1), 43–54. <https://doi.org/10.1002/glia.20900>
 - Downie, L. E., Pianta, M. J., Vingrys, A. J., Wilkinson-Berka, J. L., et Fletcher, E. L. (2007). Neuronal and glial cell changes are determined by retinal vascularization in retinopathy of prematurity. *The Journal of comparative neurology*, 504(4), 404–417. <https://doi.org/10.1002/cne.21449>
 - Downie, L. E., Pianta, M. J., Vingrys, A. J., Wilkinson-Berka, J. L., et Fletcher, E. L. (2008). AT1 receptor inhibition prevents astrocyte degeneration and restores vascular growth in oxygen-induced retinopathy. *Glia*, 56(10), 1076–1090. <https://doi.org/10.1002/glia.20680>
 - Du, M., Zhang, Y., Mao, Y., Mou, J., Zhao, J., Xue, Q., Wang, D., Huang, J., Gao, S., et Gao, Y. (2017). MiR-33a suppresses proliferation of NSCLC cells via targeting METTL3 mRNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 482(4), 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.11.077>
 - Dubrac, A., Künzel, S. E., Künzel, S. H., Li, J., Chandran, R. R., Martin, K., Greif, D. M., Adams, R. H., et Eichmann, A. (2018). NCK-dependent pericyte migration promotes

- pathological neovascularization in ischemic retinopathy. *Nature communications*, 9(1), 3463. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05926-7>
- Dulak, J., Józkwicz, A., Dembinska-Kiec, A., Guevara, I., Zdzienicka, A., Zmudzinska-Grochot, D., Florek, I., Wójtowicz, A., Szuba, A., et Cooke, J. P. (2000). Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 20(3), 659–666. <https://doi.org/10.1161/01.atv.20.3.659>
 - Early Treatment For Retinopathy Of Prematurity Cooperative Group (2003). Revised indications for the treatment of retinopathy of prematurity: results of the early treatment for retinopathy of prematurity randomized trial. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 121(12), 1684–1694. <https://doi.org/10.1001/archophth.121.12.1684>
 - Eastlake, K., Banerjee, P. J., Angbohang, A., Charteris, D. G., Khaw, P. T., et Limb, G. A. (2016). Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*, 64(4), 495–506. <https://doi.org/10.1002/glia.22942>
 - Eelen, G., de Zeeuw, P., Treps, L., Harjes, U., Wong, B. W., et Carmeliet, P. (2018). Endothelial Cell Metabolism. *Physiological reviews*, 98(1), 3–58. <https://doi.org/10.1152/physrev.00001.2017>
 - ENCODE Project Consortium (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57–74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
 - Endemann, D. H., et Schiffrin, E. L. (2004). Endothelial dysfunction. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15(8), 1983–1992. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA>
 - Essandoh, K., Li, Y., Huo, J., et Fan, G. C. (2016). MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. *Shock (Augusta, Ga.)*, 46(2), 122–131. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000604>

- Fajardo, L. F., Kwan, H. H., Kowalski, J., Prionas, S. D., et Allison, A. C. (1992). Dual role of tumor necrosis factor-alpha in angiogenesis. *The American journal of pathology*, *140*(3), 539–544.
- Fan, W., Huang, W., Chen, J., Li, N., Mao, L., et Hou, S. (2022). Retinal microglia: Functions and diseases. *Immunology*, *166*(3), 268–286.
<https://doi.org/10.1111/imm.13479>
- Fan, Y. Y., Liu, C. H., Wu, A. L., Chen, H. C., Hsueh, Y. J., Chen, K. J., Lai, C. C., Huang, C. Y., et Wu, W. C. (2021). MicroRNA-126 inhibits pathological retinal neovascularization via suppressing vascular endothelial growth factor expression in a rat model of retinopathy of prematurity. *European journal of pharmacology*, *900*, 174035.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174035>
- Fang, Y., Shi, C., Manduchi, E., Civelek, M., et Davies, P. F. (2010). MicroRNA-10a regulation of proinflammatory phenotype in athero-susceptible endothelium in vivo and in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(30), 13450–13455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002120107>
- Favier, J., Plouin, P. F., Corvol, P., et Gasc, J. M. (2002). Angiogenesis and vascular architecture in pheochromocytomas: distinctive traits in malignant tumors. *The American journal of pathology*, *161*(4), 1235–1246. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64400-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64400-8)
- Feinberg, M. W., et Moore, K. J. (2016). MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circulation research*, *118*(4), 703–720.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306300>
- Félétou, M. (2011). *The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells—Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators*. Morgan et Claypool Life Sciences.
- Fielder, A., Blencowe, H., O'Connor, A., et Gilbert, C. (2015). Impact of retinopathy of prematurity on ocular structures and visual functions. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, *100*(2), F179–F184.
<https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306207>

- Fields, J. K., Günther, S., et Sundberg, E. J. (2019). Structural Basis of IL-1 Family Cytokine Signaling. *Frontiers in immunology*, *10*, 1412.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01412>
- Fierson, W. M., AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRICS Section on Ophthalmology, AMERICAN ACADEMY OF OPHTHALMOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION FOR PEDIATRIC OPHTHALMOLOGY AND STRABISMUS, et AMERICAN ASSOCIATION OF CERTIFIED ORTHOPTISTS (2018). Screening Examination of Premature Infants for Retinopathy of Prematurity. *Pediatrics*, *142*(6), e20183061.
<https://doi.org/10.1542/peds.2018-3061>
- Fieß, A., Janz, J., Schuster, A. K., Kölb-Keerl, R., Knuf, M., Kirchhof, B., Muether, P. S., et Bauer, J. (2017). Macular morphology in former preterm and full-term infants aged 4 to 10 years. *Graefes archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, *255*(7), 1433–1442. <https://doi.org/10.1007/s00417-017-3662-5>
- Filippi, L., Cavallaro, G., Berti, E., Padriani, L., Araimo, G., Regiroli, G., Raffaelli, G., Bozzetti, V., Tagliabue, P., Tomasini, B., Mori, A., Buonocore, G., Agosti, M., Bossi, A., Chirico, G., Aversa, S., Fortunato, P., Osnaghi, S., Cavallotti, B., Suzani, M., ... Mosca, F. (2019). Propranolol 0.2% Eye Micro-Drops for Retinopathy of Prematurity: A Prospective Phase IIB Study. *Frontiers in pediatrics*, *7*, 180.
<https://doi.org/10.3389/fped.2019.00180>
- Fink, S. L., Jayewickreme, T. R., Molony, R. D., Iwawaki, T., Landis, C. S., Lindenbach, B. D., et Iwasaki, A. (2017). IRE1 α promotes viral infection by conferring resistance to apoptosis. *Science signaling*, *10*(482), eaai7814.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aai7814>
- Floyd, B. N., Leske, D. A., Wren, S. M., Mookadam, M., Fautsch, M. P., et Holmes, J. M. (2005). Differences between rat strains in models of retinopathy of prematurity. *Molecular vision*, *11*, 524–530.

- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., et Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), 92–105. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>
- Fruttiger M. (2007). Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*, 10(2), 77–88. <https://doi.org/10.1007/s10456-007-9065-1>
- Fu, K., Zhang, L., Liu, R., Shi, Q., Li, X., et Wang, M. (2020). MiR-125 inhibited cervical cancer progression by regulating VEGF and PI3K/AKT signaling pathway. *World journal of surgical oncology*, 18(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s12957-020-01881-0>
- Fulton, A. B., Reynaud, X., Hansen, R. M., Lemere, C. A., Parker, C., et Williams, T. P. (1999). Rod photoreceptors in infant rats with a history of oxygen exposure. *Investigative ophthalmology et visual science*, 40(1), 168–174.
- Gale, N. W., Thurston, G., Hackett, S. F., Renard, R., Wang, Q., McClain, J., Martin, C., Witte, C., Witte, M. H., Jackson, D., Suri, C., Campochiaro, P. A., Wiegand, S. J., et Yancopoulos, G. D. (2002). Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1. *Developmental cell*, 3, 411–423. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(02\)00217-4](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(02)00217-4)
- Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Pierce, S., Bueso-Ramos, C., Calin, G., Boyano-Adánez, M.delC., et García-Manero, G. (2014). Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF-κB activation and enhances erythroid differentiation arrest. *PloS one*, 9(4), e93404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093404>
- Gao, G., Li, Y., Fant, J., Crosson, C. E., Becerra, S. P., et Ma, J. X. (2002). Difference in ischemic regulation of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium--derived factor in brown norway and sprague dawley rats contributing to different susceptibilities to retinal neovascularization. *Diabetes*, 51(4), 1218–1225. <https://doi.org/10.2337/diabetes.51.4.1218>
- García Morán, G.A., Parra-Medina, R., Cardona, A.G., Quintero-Ronderos, P., et Garavito Rodriguez, E. (2013). Cytokines, chemokines and growth factors. In: Anaya,

- J.M., Shoenfeld, Y., Rojas-Villarraga, A., Levy, R.A., et Cervera, R. Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]. El Rosario University Press; Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459450/>
- Gardiner, T. A., Gibson, D. S., de Gooyer, T. E., de la Cruz, V. F., McDonald, D. M., et Stitt, A. W. (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. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)62284-5](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)62284-5)
 - Geldof, C. J., van Wassenaeer-Leemhuis, A. G., Dik, M., Kok, J. H., et Oosterlaan, J. (2015). A functional approach to cerebral visual impairments in very preterm/very-low-birth-weight children. *Pediatric research*, *78*(2), 190–197. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.83>
 - Geloneck, M. M., Chuang, A. Z., Clark, W. L., Hunt, M. G., Norman, A. A., Packwood, E. A., Tawansy, K. A., Mintz-Hittner, H. A., et BEAT-ROP Cooperative Group (2014). Refractive outcomes following bevacizumab monotherapy compared with conventional laser treatment: a randomized clinical trial. *JAMA ophthalmology*, *132*(11), 1327–1333. <https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2014.2772>
 - Gilbert, C., Fielder, A., Gordillo, L., Quinn, G., Semiglia, R., Visintin, P., Zin, A., et International NO-ROP Group (2005). Characteristics of infants with severe retinopathy of prematurity in countries with low, moderate, and high levels of development: implications for screening programs. *Pediatrics*, *115*(5), e518–e525. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1180>
 - Giza, D. E., Vasilescu, C., et Calin, G. A. (2014). Key principles of miRNA involvement in human diseases. *Discoveries (Craiova, Romania)*, *2*(4), e34. <https://doi.org/10.15190/d.2014.26>
 - Granger, D.N., et Senchenkova, E. (2010). Chapter 6, Angiogenesis. Dans: Granger, D.N., et Senchenkova, E. Inflammation and the Microcirculation. Morgan et Claypool Life Sciences; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53377/>

- Graven S. N. (2004). Early neurosensory visual development of the fetus and newborn. *Clinics in perinatology*, 31(2), 199–v.
<https://doi.org/10.1016/j.clp.2004.04.010>
- Graziosi, A., Perrotta, M., Russo, D., Gasparroni, G., D'Egidio, C., Marinelli, B., Di Marzio, G., Falconio, G., Mastropasqua, L., Li Volti, G., Mangifesta, R., et Gazzolo, D. (2020). Oxidative Stress Markers and the Retinopathy of Prematurity. *Journal of clinical medicine*, 9(9), 2711. <https://doi.org/10.3390/jcm9092711>
- Greenhalgh, A. D., Zarruk, J. G., Healy, L. M., Baskar Jesudasan, S. J., Jhelum, P., Salmon, C. K., Formanek, A., Russo, M. V., Antel, J. P., McGavern, D. B., McColl, B. W., et David, S. (2018). Peripherally derived macrophages modulate microglial function to reduce inflammation after CNS injury. *PLoS biology*, 16(10), e2005264. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005264>
- Guo, L., Zhao, Y., Zhang, H., Yang, S., et Chen, F. (2014). Integrated evolutionary analysis of human miRNA gene clusters and families implicates evolutionary relationships. *Gene*, 534(1), 24–32. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.10.037>
- Gupta, S., Singhal, N. K., Ganesh, S., et Sandhir, R. (2019). Extending Arms of Insulin Resistance from Diabetes to Alzheimer's Disease: Identification of Potential Therapeutic Targets. *CNS et neurological disorders drug targets*, 18(3), 172–184. <https://doi.org/10.2174/1871527317666181114163515>
- Gutsaeva, D. R., Thounaojam, M., Rajpurohit, S., Powell, F. L., Martin, P. M., Goei, S., Duncan, M., et Bartoli, M. (2017). STAT3-mediated activation of *miR-21* is involved in down-regulation of TIMP3 and neovascularization in the ischemic retina. *Oncotarget*, 8(61), 103568–103580. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21592>
- Gyllensten, H., Humayun, J., Sjöbom, U., Hellström, A., et Löfqvist, C. (2022). Costs associated with retinopathy of prematurity: a systematic review and meta-analysis. *BMJ open*, 12(11), e057864. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-057864>

- Hamilton, R., Bradnam, M. S., Dudgeon, J., et Mactier, H. (2008). Maturation of rod function in preterm infants with and without retinopathy of prematurity. *The Journal of pediatrics*, 153(5), 605–611. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2008.05.018>
- Hammond, T. R., Dufort, C., Dissing-Olesen, L., Giera, S., Young, A., Wysoker, A., Walker, A. J., Gergits, F., Segel, M., Nemesh, J., Marsh, S. E., Saunders, A., Macosko, E., Ginhoux, F., Chen, J., Franklin, R. J. M., Piao, X., McCarroll, S. A., et Stevens, B. (2019). Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50(1), 253–271.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.004>
- Han, N., Xu, H., Yu, N., Wu, Y., et Yu, L. (2020). MiR-203a-3p inhibits retinal angiogenesis and alleviates proliferative diabetic retinopathy in oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model via targeting VEGFA and HIF-1 α . *Clinical and experimental pharmacology et physiology*, 47(1), 85–94. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13163>
- Han, S., Kong, Y. C., Sun, B., Han, Q. H., Chen, Y., et Wang, Y. C. (2016). microRNA-218 Inhibits Oxygen-induced Retinal Neovascularization via Reducing the Expression of Roundabout 1. *Chinese medical journal*, 129(6), 709–715. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.178013>
- Hanna, J., Hossain, G. S., et Kocerha, J. (2019). The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Frontiers in genetics*, 10, 478. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00478>
- Hardy, P., Beauchamp, M., Sennlaub, F., Gobeil, F., Jr, Tremblay, L., Mwaikambo, B., Lachapelle, P., et Chemtob, S. (2005). New insights into the retinal circulation: inflammatory lipid mediators in ischemic retinopathy. *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids*, 72(5), 301–325. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2005.02.004>
- Hao, Y., Zhou, Q., Ma, J., Zhao, Y., et Wang, S. (2016). miR-146a is upregulated during retinal pigment epithelium (RPE)/choroid aging in mice and represses *IL-6* and *VEGF*-

- Aexpression in RPE cells. *Journal of clinical et experimental ophthalmology*, 7(3), 562.
<https://doi.org/10.4172/2155-9570.1000562>
- Heeb, L. E. M., Egholm, C., et Boyman, O. (2020). Evolution and function of interleukin-4 receptor signaling in adaptive immunity and neutrophils. *Genes and immunity*, 21(3), 143–149. <https://doi.org/10.1038/s41435-020-0095-7>
 - Hellgren, K. M., Tornqvist, K., Jakobsson, P. G., Lundgren, P., Carlsson, B., Källén, K., Serenius, F., Hellström, A., et Holmström, G. (2016). Ophthalmologic Outcome of Extremely Preterm Infants at 6.5 Years of Age: Extremely Preterm Infants in Sweden Study (EXPRESS). *JAMA ophthalmology*, 134(5), 555–562.
<https://doi.org/10.1001/jamaophthalmol.2016.0391>
 - Hellstrom, A., Perruzzi, C., Ju, M., Engstrom, E., Hard, A. L., Liu, J. L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Sjudell, L., LeRoith, D., Senger, D. R., et Smith, L. E. (2001). Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(10), 5804–5808.
<https://doi.org/10.1073/pnas.101113998>
 - Hellström, A., Engström, E., Hård, A. L., Albertsson-Wikland, K., Carlsson, B., Niklasson, A., Löfqvist, C., Svensson, E., Holm, S., Ewald, U., Holmström, G., et Smith, L. E. (2003). Postnatal serum insulin-like growth factor I deficiency is associated with retinopathy of prematurity and other complications of premature birth. *Pediatrics*, 112(5), 1016–1020. <https://doi.org/10.1542/peds.112.5.1016>
 - Hellström, A., Ley, D., Hansen-Pupp, I., Hallberg, B., Löfqvist, C., van Marter, L., van Weissenbruch, M., Ramenghi, L. A., Beardsall, K., Dunger, D., Hård, A. L., et Smith, L. E. (2016). Insulin-like growth factor 1 has multisystem effects on foetal and preterm infant development. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 105(6), 576–586.
<https://doi.org/10.1111/apa.13350>
 - Hellström, A., et Hård, A. L. (2019). Screening and novel therapies for retinopathy of prematurity - A review. *Early human development*, 138, 104846.
<https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2019.104846>

- Hellström, A., Nilsson, A. K., Wackernagel, D., Pivodic, A., Vanpee, M., Sjöbom, U., Hellgren, G., Hallberg, B., Domellöf, M., Klevebro, S., Hellström, W., Andersson, M., Lund, A. M., Löfqvist, C., Elfvin, A., Sävman, K., Hansen-Pupp, I., Hård, A. L., Smith, L. E. H., et Ley, D. (2021). Effect of Enteral Lipid Supplement on Severe Retinopathy of Prematurity: A Randomized Clinical Trial. *JAMA pediatrics*, *175*(4), 359–367.
<https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2020.5653>
- Hendrikx, G., Vöö, S., Bauwens, M., Post, M. J., et Mottaghy, F. M. (2016). SPECT and PET imaging of angiogenesis and arteriogenesis in pre-clinical models of myocardial ischemia and peripheral vascular disease. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, *43*(13), 2433–2447.
<https://doi.org/10.1007/s00259-016-3480-8>
- Hickman, S. E., Kingery, N. D., Ohsumi, T. K., Borowsky, M. L., Wang, L. C., Means, T. K., et El Khoury, J. (2013). The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature neuroscience*, *16*(12), 1896–1905.
<https://doi.org/10.1038/nn.3554>
- Hildebrand G.D., Fielder A.R. (2011) Anatomy and Physiology of the Retina. Dans: Reynolds J., Olitsky S. (dir.) Pediatric Retina. Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-12041-1_2
- Holmström, G., Tornqvist, K., Al-Hawasi, A., Nilsson, Å., Wallin, A., et Hellström, A. (2018). Increased frequency of retinopathy of prematurity over the last decade and significant regional differences. *Acta ophthalmologica*, *96*(2), 142–148.
<https://doi.org/10.1111/aos.13549>
- Hombrebueno, J. R., Lynch, A., Byrne, E. M., Obasanmi, G., Kissenpfennig, A., Chen, M., et Xu, H. (2020). Hyaloid Vasculature as a Major Source of STAT3⁺ (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) Myeloid Cells for Pathogenic Retinal Neovascularization in Oxygen-Induced Retinopathy. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, *40*(12), e367–e379.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314567>

- Hong, H. K., Lee, H. J., Ko, J. H., Park, J. H., Park, J. Y., Choi, C. W., Yoon, C. H., Ahn, S. J., Park, K. H., Woo, S. J., et Oh, J. Y. (2014). Neonatal systemic inflammation in rats alters retinal vessel development and simulates pathologic features of retinopathy of prematurity. *Journal of neuroinflammation*, *11*, 87. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-11-87>
- Hopkins A. L. (2008). Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nature chemical biology*, *4*(11), 682–690. <https://doi.org/10.1038/nchembio.118>
- Hu, T., Chitnis, N., Monos, D., et Dinh, A. (2021). Next-generation sequencing technologies: An overview. *Human immunology*, *82*(11), 801–811. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2021.02.012>
- Hu, W., Tan, C., He, Y., Zhang, G., Xu, Y., et Tang, J. (2018). Functional miRNAs in breast cancer drug resistance. *OncoTargets and therapy*, *11*, 1529–1541. <https://doi.org/10.2147/OTT.S152462>
- Huang, H. C., Yu, H. R., Huang, L. T., Huang, H. C., Chen, R. F., Lin, I. C., Ou, C. Y., Hsu, T. Y., et Yang, K. D. (2012). miRNA-125b regulates TNF- α production in CD14⁺ neonatal monocytes via post-transcriptional regulation. *Journal of leukocyte biology*, *92*(1), 171–182. <https://doi.org/10.1189/jlb.1211593>
- Huang H. (2020). Pericyte-Endothelial Interactions in the Retinal Microvasculature. *International journal of molecular sciences*, *21*(19), 7413. <https://doi.org/10.3390/ijms21197413>
- Huang, J., Lu, W., Doycheva, D. M., Gamdzyk, M., Hu, X., Liu, R., Zhang, J. H., et Tang, J. (2020). IRE1 α inhibition attenuates neuronal pyroptosis via miR-125/NLRP1 pathway in a neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy rat model. *Journal of neuroinflammation*, *17*(1), 152. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-01796-3>
- Huang, Y., Du, K. L., Guo, P. Y., Zhao, R. M., Wang, B., Zhao, X. L., et Zhang, C. Q. (2019). IL-16 regulates macrophage polarization as a target gene of mir-145-3p. *Molecular immunology*, *107*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.12.027>

- Hughes, C. E., et Nibbs, R. J. B. (2018). A guide to chemokines and their receptors. *The FEBS journal*, 285(16), 2944–2971.
<https://doi.org/10.1111/febs.14466>
- Hwang, B., Lee, J. H., et Bang, D. (2018). Single-cell RNA sequencing technologies and bioinformatics pipelines. *Experimental et molecular medicine*, 50(8), 1–14.
<https://doi.org/10.1038/s12276-018-0071-8>
- Hong, Y., Liang, H., Uzair-Ur-Rehman, Wang, Y., Zhang, W., Zhou, Y., Chen, S., Yu, M., Cui, S., Liu, M., Wang, N., Ye, C., Zhao, C., Liu, Y., Fan, Q., Zhang, C. Y., Sang, J., Zen, K., et Chen, X. (2016). miR-96 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PTPN9 in breast cancer. *Scientific reports*, 6, 37421.
<https://doi.org/10.1038/srep37421>
- Hwang, S. J., Ahn, B. J., Shin, M. W., Song, Y. S., Choi, Y., Oh, G. T., Kim, K. W., et Lee, H. J. (2022). miR-125a-5p attenuates macrophage-mediated vascular dysfunction by targeting Ninjurin1. *Cell death and differentiation*, 29(6), 1199–1210.
<https://doi.org/10.1038/s41418-021-00911-y>
- International Committee for the Classification of Retinopathy of Prematurity (2005). The International Classification of Retinopathy of Prematurity revisited. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 123(7), 991–999.
<https://doi.org/10.1001/archopht.123.7.991>
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931–945.
<https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Jain, V., Bordes, S. J., et Bhardwaj, A. (2023). Physiology, Pulmonary Circulatory System. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK525948/>
- Janssen, H. L., Reesink, H. W., Lawitz, E. J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A. J., Patick, A. K., Chen, A., Zhou, Y., Persson, R., King, B. D., Kauppinen, S., Levin, A. A., et Hodges, M. R. (2013). Treatment of HCV infection by

- targeting microRNA. *The New England journal of medicine*, 368(18), 1685–1694.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209026>
- Jefferies, A. L., et Canadian Paediatric Society, Fetus and Newborn Committee (2016). Retinopathy of prematurity: An update on screening and management. *Paediatrics et child health*, 21(2), 101–108.
<https://doi.org/10.1093/pch/21.2.101>
 - Jeffery, G. (1997). The albino retina: an abnormality that provides insight into normal retinal development. *Trends in neurosciences*, 20(4), 165–169.
[https://doi.org/10.1016/s0166-2236\(96\)10080-1](https://doi.org/10.1016/s0166-2236(96)10080-1)
 - Jiang, L., et Li, J. (2022). lncRNA GMDS-AS1 upregulates IL-6, TNF- α and IL-1 β , and induces apoptosis in human monocytic THP-1 cells via miR-96-5p/caspase 2 signaling. *Molecular medicine reports*, 25(2), 67.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12583>
 - Jiang, S., Li, Y., Lin, T., Yuan, L., Li, Y., Wu, S., Xia, L., Shen, H., et Lu, J. (2016). IL-35 Inhibits Angiogenesis through VEGF/Ang2/Tie2 Pathway in Rheumatoid Arthritis. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 40(5), 1105–1116.
<https://doi.org/10.1159/000453165>
 - Jiang, X., Xu, C., Lei, F., Liao, M., Wang, W., Xu, N., Zhang, Y., et Xie, W. (2017). MiR-30a targets IL-1 α and regulates islet functions as an inflammation buffer and response factor. *Scientific reports*, 7(1), 5270. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05560-1>
 - Jin, Y., Tu, Q., et Liu, M. (2018). MicroRNA-125b regulates Alzheimer's disease through SphK1 regulation. *Molecular medicine reports*, 18(2), 2373–2380.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9156>
 - Jurga, A. M., Paleczna, M., et Kuter, K. Z. (2020). Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14, 198. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00198>

- Joyal, J. S., Sitaras, N., Binet, F., Rivera, J. C., Stahl, A., Zaniolo, K., Shao, Z., Polosa, A., Zhu, T., Hamel, D., Djavari, M., Kunik, D., Honoré, J. C., Picard, E., Zabeida, A., Varma, D. R., Hickson, G., Mancini, J., Klagsbrun, M., Costantino, S., ... Sapieha, P. (2011). Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood*, *117*(22), 6024–6035. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-10-311589>
- Kaiser, R. S., Fenton, G. L., Tasman, W., et Trese, M. T. (2008). Adult retinopathy of prematurity: retinal complications from cataract surgery. *American journal of ophthalmology*, *145*(4), 729–735. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2007.11.007>
- Kang, S., Narazaki, M., Metwally, H., et Kishimoto, T. (2020). Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *The Journal of experimental medicine*, *217*(5), e20190347. <https://doi.org/10.1084/jem.20190347>
- Kanlikilicer, P., Rashed, M. H., Bayraktar, R., Mitra, R., Ivan, C., Aslan, B., Zhang, X., Filant, J., Silva, A. M., Rodriguez-Aguayo, C., Bayraktar, E., Pichler, M., Ozpolat, B., Calin, G. A., Sood, A. K., et Lopez-Berestein, G. (2016). Ubiquitous Release of Exosomal Tumor Suppressor miR-6126 from Ovarian Cancer Cells. *Cancer research*, *76*(24), 7194–7207. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0714>
- Karali, M., Persico, M., Mutarelli, M., Carissimo, A., Pizzo, M., Singh Marwah, V., Ambrosio, C., Pinelli, M., Carrella, D., Ferrari, S., Ponzin, D., Nigro, V., di Bernardo, D., et Banfi, S. (2016). High-resolution analysis of the human retina miRNome reveals isomiR variations and novel microRNAs. *Nucleic acids research*, *44*(4), 1525–1540. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw039>
- Ke, Q., et Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Molecular pharmacology*, *70*(5), 1469–1480. <https://doi.org/10.1124/mol.106.027029>
- Kermorvant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Sirinyan, M., Brault, S., Andelfinger, G., Kooli, A., Germain, S., Ong, H., d'Orleans-Juste, P., Gobeil, F., Jr, Zhu, T., Boisvert, C., Hardy, P., Jain, K., Falck, J. R., Balazy, M., et Chemtob, S. (2005). Trans-arachidonic acids generated during nitrate stress induce a thrombospondin-1-dependent

- microvascular degeneration. *Nature medicine*, 11(12), 1339–1345.
<https://doi.org/10.1038/nm1336>
- Kermorvant-Duchemin, E., Sapieha, P., Sirinyan, M., Beauchamp, M., Checchin, D., Hardy, P., Sennlaub, F., Lachapelle, P., et Chemtob, S. (2010). Understanding ischemic retinopathies: emerging concepts from oxygen-induced retinopathy. *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology*, 120(1), 51–60.
<https://doi.org/10.1007/s10633-009-9201-x>
 - Kermorvant-Duchemin, E., Pinel, A. C., Lavalette, S., Lenne, D., Raoul, W., Calippe, B., Behar-Cohen, F., Sahel, J. A., Guillonneau, X., et Sennlaub, F. (2013). Neonatal hyperglycemia inhibits angiogenesis and induces inflammation and neuronal degeneration in the retina. *PLoS one*, 8(11), e79545.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079545>
 - Kermorvant-Duchemin, E., Le Meur, G., Plaisant, F., Marchand-Martin, L., Flamant, C., Porcher, R., Lapillonne, A., Chemtob, S., Claris, O., Ancel, P. Y., et Rozé, J. C. (2020). Thresholds of glycemia, insulin therapy, and risk for severe retinopathy in premature infants: A cohort study. *PLoS medicine*, 17(12), e1003477.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003477>
 - Kibble, J. (2020) The Cardiovascular System. In: Kibble, J. *The Big Picture Physiology: Medical Course et Step 1 Review*, 2e. McGraw Hill.
<https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2914§ionid=245391838>
 - Kiel, J. W. (2010). Chapter 2 Anatomy. Dans: Kiel, J. W. *The Ocular Circulation*. Morgan et Claypool Life Sciences. Available from:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53329/>
 - Kiko, T., Nakagawa, K., Tsuduki, T., Furukawa, K., Arai, H., et Miyazawa, T. (2014). MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 39(2), 253–259.
<https://doi.org/10.3233/JAD-130932>

- Kim, H., Kim, J., et Ryu, J. (2022). Noncoding RNAs as a novel approach to target retinopathy of prematurity. *Frontiers in pharmacology*, *13*, 1033341. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1033341>
- Kim, K. H., Seo, Y. M., Kim, E. Y., Lee, S. Y., Kwon, J., Ko, J. J., et Lee, K. A. (2016). The miR-125 family is an important regulator of the expression and maintenance of maternal effect genes during preimplantational embryo development. *Open biology*, *6*(11), 160181. <https://doi.org/10.1098/rsob.160181>
- Kim, S. W., Lee, H. K., Seol, S. I., Davaanyam, D., Lee, H., et Lee, J. K. (2020). Ninjurin 1 dodecamer peptide containing the N-terminal adhesion motif (N-NAM) exerts proangiogenic effects in HUVECs and in the postischemic brain. *Scientific reports*, *10*(1), 16656. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73340-5>
- Kinoshita, C., Kikuchi-Utsumi, K., Aoyama, K., Suzuki, R., Okamoto, Y., Matsumura, N., Omata, D., Maruyama, K., et Nakaki, T. (2021). Inhibition of miR-96-5p in the mouse brain increases glutathione levels by altering NOVA1 expression. *Communications biology*, *4*(1), 182. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01706-0>
- Kiran Yenice, E., et Kara, C. (2022). Development of myopia in laser-treated ROP infants: prematurity or laser photocoagulation?. *International ophthalmology*, *10.1007/s10792-022-02540-x*. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10792-022-02540-x>
- Kiriakidis, S., Andreakos, E., Monaco, C., Foxwell, B., Feldmann, M., et Paleolog, E. (2003). VEGF expression in human macrophages is NF-kappaB-dependent: studies using adenoviruses expressing the endogenous NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha and a kinase-defective form of the IkappaB kinase 2. *Journal of cell science*, *116*(Pt 4), 665–674. <https://doi.org/10.1242/jcs.00286>
- Kocerha, J., Kouri, N., Baker, M., Finch, N., DeJesus-Hernandez, M., Gonzalez, J., et al. (2011). Altered microRNA expression in frontotemporal lobar degeneration with TDP-43 pathology caused by progranulin mutations. *BMC Genomics* *12*:527. doi: [10.1186/1471-2164-12-527](https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-527)

- Kola, I., and Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711–715. doi: 10.1038/nrd1470
- Kolb H. (1997). Amacrine cells of the mammalian retina: neurocircuitry and functional roles. *Eye (London, England)*, 11 (Pt 6), 904–923.
<https://doi.org/10.1038/eye.1997.230>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., et Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155–D162.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Krakowsky, R. H., et Tollefsbol, T. O. (2015). Impact of Nutrition on Non-Coding RNA Epigenetics in Breast and Gynecological Cancer. *Frontiers in nutrition*, 2, 16.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2015.00016>
- Kroner, A., Greenhalgh, A. D., Zarruk, J. G., Passos Dos Santos, R., Gaestel, M., et David, S. (2014). TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord. *Neuron*, 83(5), 1098–1116.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.07.027>
- Kumar, M., Ahmad, T., Sharma, A., Mabalirajan, U., Kulshreshtha, A., Agrawal, A., et Ghosh, B. (2011). Let-7 microRNA-mediated regulation of IL-13 and allergic airway inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 128(5), .
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.034>
- Kumar, A., Bhatia, H. S., de Oliveira, A. C., et Fiebich, B. L. (2015). microRNA-26a modulates inflammatory response induced by toll-like receptor 4 stimulation in microglia. *Journal of neurochemistry*, 135(6), 1189–1202.
<https://doi.org/10.1111/jnc.13364>
- Kur, J., Newman, E. A., et Chan-Ling, T. (2012). Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Progress in retinal and eye research*, 31(5), 377–406.
<https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.04.004>
- Lambert, K. A., Roff, A. N., Panganiban, R. P., Douglas, S., et Ishmael, F. T. (2018). MicroRNA-146a is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and

- augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PloS one*, *13*(10), e0205434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205434>
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouizegarène, P., et Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie [DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one]. *Immuno-analyse et Biologie Spécialisée*, *23*(5), 260–279. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016>
 - Lamy, S., Lachambre, M. P., Lord-Dufour, S., & Béliveau, R. (2010). Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascular pharmacology*, *53*(5-6), 200–208. doi : 10.1016/j.vph.2010.08.002
 - Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921. doi: 10.1038/35057062
 - Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S., et Ørum, H. (2010). Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science (New York, N.Y.)*, *327*(5962), 198–201. <https://doi.org/10.1126/science.1178178>
 - Lange, C., Ehken, C., Stahl, A., Martin, G., Hansen, L., et Agostini, H. T. (2009). Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, *247*(9), 1205–1211. <https://doi.org/10.1007/s00417-009-1116-4>
 - Laschke, M. W., Gu, Y., et Menger, M. D. (2022). Replacement in angiogenesis research: Studying mechanisms of blood vessel development by animal-free *in vitro*, *in vivo* and *in silico* approaches. *Frontiers in physiology*, *13*, 981161. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.981161>
 - La Torre, A., Georgi, S., et Reh, T. A. (2013). Conserved microRNA pathway regulates developmental timing of retinal neurogenesis. *Proceedings of the National Academy*

- of Sciences of the United States of America*, 110(26), E2362–E2370.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1301837110>
- Lavric, A., Tekavcic Pompe, M., Markelj, S., Ding, J., Mahajan, S., Khandelwal, N., et Agrawal, R. (2020). Choroidal structural changes in preterm children with and without retinopathy of prematurity. *Acta ophthalmologica*, 98(5), e611–e616.
<https://doi.org/10.1111/aos.14324>
 - Le, M. T., Xie, H., Zhou, B., Chia, P. H., Rizk, P., Um, M., Udolph, G., Yang, H., Lim, B., et Lodish, H. F. (2009). MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. *Molecular and cellular biology*, 29(19), 5290–5305. <https://doi.org/10.1128/MCB.01694-08>
 - Leduc, M., Kermorvant-Duchemin, E., Checchin, D., Sennlaub, F., Sirinyan, M., Kooli, A., Lachapelle, P., et Chemtob, S. (2006). Hypercapnia- and trans-arachidonic acid-induced retinal microvascular degeneration: implications in the genesis of retinopathy of prematurity. *Seminars in perinatology*, 30(3), 129–138.
<https://doi.org/10.1053/j.semperi.2006.04.004>
 - Lee, D., Miwa, Y., Wu, J., Shoda, C., Jeong, H., Kawagishi, H., Tsubota, K., et Kurihara, T. (2020). A Fairy Chemical Suppresses Retinal Angiogenesis as a HIF Inhibitor. *Biomolecules*, 10(10), 1405. <https://doi.org/10.3390/biom10101405>
 - Lee, H., Fessler, M. B., Qu, P., Heymann, J., et Kopp, J. B. (2020). Macrophage polarization in innate immune responses contributing to pathogenesis of chronic kidney disease. *BMC nephrology*, 21(1), 270. <https://doi.org/10.1186/s12882-020-01921-7>
 - Lee, J., et Dammann, O. (2012). Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Seminars in fetal et neonatal medicine*, 17(1), 26–29.
<https://doi.org/10.1016/j.siny.2011.08.007>
 - Lee, R. C., Feinbaum, R. L., et Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)

- Lee, S., Elaskandrany, M., Lau, L. F., Lazzaro, D., Grant, M. B., et Chaqour, B. (2017). Interplay between CCN1 and Wnt5a in endothelial cells and pericytes determines the angiogenic outcome in a model of ischemic retinopathy. *Scientific reports*, 7(1), 1405. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01585-8>
- Lei, C., Duan, J., Ge, G., et Zhang, M. (2021). Association between neonatal hyperglycemia and retinopathy of prematurity: a meta-analysis. *European journal of pediatrics*, 180(12), 3433–3442. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04140-w>
- Lekprasert, P., Mayhew, M., et Ohler, U. (2011). Assessing the utility of thermodynamic features for microRNA target prediction under relaxed seed and no conservation requirements. *PLoS one*, 6(6), e20622. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020622>
- Lewis, M. A., et Steel, K. P. (2010). MicroRNAs in mouse development and disease. *Seminars in cell et developmental biology*, 21(7), 774–780. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2010.02.004>
- Li, D., Yang, H., Ma, J., Luo, S., Chen, S., et Gu, Q. (2018). MicroRNA-30e regulates neuroinflammation in MPTP model of Parkinson's disease by targeting Nlrp3. *Human cell*, 31(2), 106–115. <https://doi.org/10.1007/s13577-017-0187-5>
- Li, J., Yu, S., Lu, X., Cui, K., Tang, X., Xu, Y., et Liang, X. (2021). The phase changes of M1/M2 phenotype of microglia/macrophage following oxygen-induced retinopathy in mice. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society*, 70(2), 183–192. <https://doi.org/10.1007/s00011-020-01427-w>
- Li, Y., Zhang, D., Wang, X., Yao, X., Ye, C., Zhang, S., Wang, H., Chang, C., Xia, H., Wang, Y. C., Fang, J., Yan, J., et Ying, H. (2015). Hypoxia-inducible miR-182 enhances HIF1 α signaling via targeting PHD2 and FIH1 in prostate cancer. *Scientific reports*, 5, 12495. <https://doi.org/10.1038/srep12495>
- Li, Y., Xiao, M., et Guo, F. (2017). The role of Sox6 and Netrin-1 in ovarian cancer cell growth, invasiveness, and angiogenesis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(5), 1010428317705508. <https://doi.org/10.1177/1010428317705508>

- Li, Z., Ma, J., Liu, L., Liu, X., Wang, P., Liu, Y., Li, Z., Zheng, J., Chen, J., Tao, W., et Xue, Y. (2017). Endothelial-Monocyte Activating Polypeptide II Suppresses the *In Vitro* Glioblastoma-Induced Angiogenesis by Inducing Autophagy. *Frontiers in molecular neuroscience*, 10, 208. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00208>
- Li, Z., et Wang, Y. (2018). miR-96 targets SOX6 and promotes proliferation, migration, and invasion of hepatocellular carcinoma. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 96(3), 365–371. <https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0183>
- Liang, X., Zhang, L., Wang, S., Han, Q., et Zhao, R. C. (2016). Exosomes secreted by mesenchymal stem cells promote endothelial cell angiogenesis by transferring miR-125a. *Journal of cell science*, 129(11), 2182–2189. <https://doi.org/10.1242/jcs.170373>
- Lin, H., Dai, T., Xiong, H., Zhao, X., Chen, X., Yu, C., Li, J., Wang, X., et Song, L. (2010). Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a. *PloS one*, 5(12), e15797. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015797>
- Ling, H., Fabbri, M., et Calin, G. A. (2013). MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(11), 847–865. <https://doi.org/10.1038/nrd4140>
- Liu, C. H., Sun, Y., Li, J., Gong, Y., Tian, K. T., Evans, L. P., Morss, P. C., Fredrick, T. W., Saba, N. J., et Chen, J. (2015). Endothelial microRNA-150 is an intrinsic suppressor of pathologic ocular neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(39), 12163–12168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508426112>
- Liu, C. H., Wang, Z., Huang, S., Sun, Y., et Chen, J. (2019). MicroRNA-145 Regulates Pathological Retinal Angiogenesis by Suppression of TMOD3. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 16, 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.03.001>
- Liu, G. D., Zhang, H., Wang, L., Han, Q., Zhou, S. F., et Liu, P. (2013). Molecular hydrogen regulates the expression of miR-9, miR-21 and miR-199 in LPS-activated retinal microglia cells. *International journal of ophthalmology*, 6(3), 280–285.

<https://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2013.03.05>

- Liu, G. J., Zhang, Q. R., Gao, X., Wang, H., Tao, T., Gao, Y. Y., Zhou, Y., Chen, X. X., Li, W., et Hang, C. H. (2020). MiR-146a Ameliorates Hemoglobin-Induced Microglial Inflammatory Response via TLR4/IRAK1/TRAF6 Associated Pathways. *Frontiers in neuroscience*, 14, 311.

<https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00311>

- Liu, J. P., Baker, J., Perkins, A. S., Robertson, E. J., et Efstratiadis, A. (1993). Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75(1), 59–72.
- Liu, J., Guo, B., Chen, Z., Wang, N., Iacovino, M., Cheng, J., Roden, C., Pan, W., Khan, S., Chen, S., Kyba, M., Fan, R., Guo, S., et Lu, J. (2017). *miR-125b* promotes *MLL-AF9*-driven murine acute myeloid leukemia involving a *VEGFA*-mediated non-cell-intrinsic mechanism. *Blood*, 129(11), 1491–1502. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-06-721027>
- Liu, K., Akula, J. D., Falk, C., Hansen, R. M., et Fulton, A. B. (2006). The retinal vasculature and function of the neural retina in a rat model of retinopathy of prematurity. *Investigative ophthalmology et visual science*, 47(6), 2639–2647. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0016>
- Liu, T., Zhang, L., Joo, D., et Sun, S. C. (2017). NF-κB signaling in inflammation. *Signal transduction and targeted therapy*, 2, 17023–. <https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23>
- Lively, S., et Schlichter, L. C. (2018). Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFNγ+TNFα) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 215. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00215>
- Löfqvist, C., Hansen-Pupp, I., Andersson, E., Holm, K., Smith, L. E., Ley, D., et Hellström, A. (2009). Validation of a new retinopathy of prematurity screening method monitoring longitudinal postnatal weight and insulinlike growth factor I. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, 127(5), 622–627.

<https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2009.69>

- Loporchio, D. F., Tam, E. K., Cho, J., Chung, J., Jun, G. R., Xia, W., Fiorello, M. G., Siegel, N. H., Ness, S., Stein, T. D., et Subramanian, M. L. (2021). Cytokine Levels in Human Vitreous in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Cells*, 10(5), 1069. <https://doi.org/10.3390/cells10051069>
- Lumayag, S., Haldin, C. E., Corbett, N. J., Wahlin, K. J., Cowan, C., Turturro, S., Larsen, P. E., Kovacs, B., Witmer, P. D., Valle, D., Zack, D. J., Nicholson, D. A., et Xu, S. (2013). Inactivation of the microRNA-183/96/182 cluster results in syndromic retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(6), E507–E516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212655110>
- Lusardi, T. A., Phillips, J. I., Wiedrick, J. T., Harrington, C. A., Lind, B., Lapidus, J. A., Quinn, J. F., et Saugstad, J. A. (2017). MicroRNAs in Human Cerebrospinal Fluid as Biomarkers for Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 55(3), 1223–1233. <https://doi.org/10.3233/JAD-160835>
- Ma Q. (2019). MiR-219-5p suppresses cell proliferation and cell cycle progression in esophageal squamous cell carcinoma by targeting CCNA2. *Cellular et molecular biology letters*, 24, 4. <https://doi.org/10.1186/s11658-018-0129-6>
- Ma, X., Shi, W., Peng, L., Qin, X., et Hui, Y. (2018). MiR-96 enhances cellular proliferation and tumorigenicity of human cervical carcinoma cells through PTPN9. *Saudi journal of biological sciences*, 25(5), 863–867. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.10.020>
- Madaan, A., Chaudhari, P., Nadeau-Vallée, M., Hamel, D., Zhu, T., Mitchell, G., Samuels, M., Pundir, S., Dabouz, R., Howe Cheng, C. W., Mohammad Nezhady, M. A., Joyal, J. S., Rivera, J. C., et Chemtob, S. (2019). Müller Cell-Localized G-Protein-Coupled Receptor 81 (Hydroxycarboxylic Acid Receptor 1) Regulates Inner Retinal Vasculature via Norrin/Wnt Pathways. *The American journal of pathology*, 189(9), 1878–1896. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.05.016>

- Madu, C. O., Wang, S., Madu, C. O., et Lu, Y. (2020). Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *Journal of Cancer*, 11(15), 4474–4494. <https://doi.org/10.7150/jca.44313>
- Mannu G. S. (2014). Retinal phototransduction. *Neurosciences (Riyadh, Saudi Arabia)*, 19(4), 275–280.
- Mansukhani, S. A., Hutchinson, A. K., Neustein, R., Schertzer, J., Allen, J. C., et Hubbard, G. B. (2019). Fluorescein Angiography in Retinopathy of Prematurity: Comparison of Infants Treated with Bevacizumab to Those with Spontaneous Regression. *Ophthalmology. Retina*, 3(5), 436–443. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.01.016>
- Mansuy, P., Mougnot, N., Ramirez-Gil, J. F., Bonnefont-Rousselot, D., Raillecove, F., Komajda, M., & Lechat, P. (2000). Effects of prolonged propranolol treatment on left ventricular remodeling and oxidative stress after myocardial infarction in rats. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 35(5), 806–813. <https://doi.org/10.1097/00005344-200005000-00019>
- Markasz, L., Olsson, K. W., Holmström, G., et Sindelar, R. (2020). Cluster Analysis of Early Postnatal Biochemical Markers May Predict Development of Retinopathy of Prematurity. *Translational vision science et technology*, 9(13), 14. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.13.14>
- Matienzo, D., et Bordoni, B. (2022). Anatomy, Blood Flow. Dans : *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Matsuki, M., Kabara, M., Saito, Y., Shimamura, K., Minoshima, A., Nishimura, M., Aonuma, T., Takehara, N., Hasebe, N., et Kawabe, J. (2015). Ninjurin1 is a novel factor to regulate angiogenesis through the function of pericytes. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society*, 79(6), 1363–1371. <https://doi.org/10.1253/circj.CJ-14-1376>
- McLoone, E., O'Keefe, M., McLoone, S., et Lanigan, B. (2006). Long term functional and structural outcomes of laser therapy for retinopathy of prematurity. *The British journal of ophthalmology*, 90(6), 754–759. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.068304>

- McLoone, E., O'Keefe, M., McLoone, S., et Lanigan, B. (2007). Effect of diode laser retinal ablative therapy for threshold retinopathy of prematurity on the visual field: results of goldmann perimetry at a mean age of 11 years. *Journal of pediatric ophthalmology and strabismus*, 44(3), 170–173. <https://doi.org/10.3928/0191-3913-20070301-10>
- McManus M. T. (2003). MicroRNAs and cancer. *Seminars in cancer biology*, 13(4), 253–258. [https://doi.org/10.1016/s1044-579x\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/s1044-579x(03)00038-5)
- McNamara, J. A., Tasman, W., Brown, G. C., et Federman, J. L. (1991). Laser photocoagulation for stage 3+ retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*, 98(5), 576–580. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(91\)32247-4](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(91)32247-4)
- Melo, L. M., Bragato, J. P., Venturin, G. L., Rebech, G. T., Costa, S. F., Garcia, L. E., Lopes, F. L., Eugênio, F. R., Patto Dos Santos, P. S., et de Lima, V. M. F. (2019). Induction of miR 21 impairs the anti-Leishmania response through inhibition of IL-12 in canine splenic leukocytes. *PloS one*, 14(12), e0226192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226192>
- Meng, X., Xing, Y., Li, J., Deng, C., Li, Y., Ren, X., et Zhang, D. (2021). Rebuilding the Vascular Network: *In vivo* and *in vitro* Approaches. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 639299. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.639299>
- Mercatelli, N., Coppola, V., Bonci, D., Miele, F., Costantini, A., Guadagnoli, M., Bonanno, E., Muto, G., Frajese, G. V., De Maria, R., Spagnoli, L. G., Farace, M. G., et Ciafrè, S. A. (2008). The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PloS one*, 3(12), e4029. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004029>
- Mesquida-Veny, F., Del Río, J. A., et Hervera, A. (2021). Macrophagic and microglial complexity after neuronal injury. *Progress in neurobiology*, 200, 101970. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2020.101970>
- Mezu-Ndubuisi, O. J., Adams, T., Taylor, L. K., Nwaba, A., et Eickhoff, J. (2019). Simultaneous assessment of aberrant retinal vascularization, thickness, and function

- in an in vivo mouse oxygen-induced retinopathy model. *Eye (London, England)*, 33(3), 363–373. <https://doi.org/10.1038/s41433-018-0205-1>
- Mezu-Ndubuisi, O. J., Macke, E. L., Kalavacherla, R., Nwaba, A. A., Suscha, A., Zaitoun, I. S., Ikeda, A., et Sheibani, N. (2020). Long-term evaluation of retinal morphology and function in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Molecular vision*, 26, 257–276.
 - Mintz-Hittner, H. A., Kennedy, K. A., Chuang, A. Z., et BEAT-ROP Cooperative Group (2011). Efficacy of intravitreal bevacizumab for stage 3+ retinopathy of prematurity. *The New England journal of medicine*, 364(7), 603–615. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007374>
 - Miranda, K., Yang, X., Bam, M., Murphy, E. A., Nagarkatti, P. S., et Nagarkatti, M. (2018). MicroRNA-30 modulates metabolic inflammation by regulating Notch signaling in adipose tissue macrophages. *International journal of obesity (2005)*, 42(6), 1140–1150. <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0114-1>
 - Mitanhez-Mokhtari, D., Lahlou, N., Kieffer, F., Magny, J. F., Roger, M., et Voyer, M. (2004). Both relative insulin resistance and defective islet beta-cell processing of proinsulin are responsible for transient hyperglycemia in extremely preterm infants. *Pediatrics*, 113(3 Pt 1), 537–541. <https://doi.org/10.1542/peds.113.3.537>
 - Mitchell, D. C., Bryan, B. A., Liu, J. P., Liu, W. B., Zhang, L., Qu, J., Zhou, X., Liu, M., et Li, D. W. (2007). Developmental expression of three small GTPases in the mouse eye. *Molecular vision*, 13, 1144–1153.
 - Mitrovic, I. (2019). Cardiovascular disorders: vascular disease. Dans: Hammer G.D., et McPhee S.J.(dir.), *Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine*, 8e. McGraw Hill. <https://accesspharmacy.mhmedical.com/content.aspx?bookid=2468§ionid=198222009>
 - Mollá, B., Heredia, M., & Sanz, P. (2021). Modulators of Neuroinflammation Have a Beneficial Effect in a Lafora Disease Mouse Model. *Molecular neurobiology*, 58(6), 2508–2522. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02285-1>

- Montastier, E., Beuzelin, D., Martins, F., Mir, L., Marques, M. A., Thalamas, C., et al. (2018). Niacin induces miR-502-3p expression which impairs insulin sensitivity in human adipocytes. *Int. J. Obes.* doi:10.1038/s41366-018-0260-5
- Morton, S. U., et Brodsky, D. (2016). Fetal Physiology and the Transition to Extrauterine Life. *Clinics in perinatology*, 43(3), 395–407. <https://doi.org/10.1016/j.clp.2016.04.001>
- Mühl, H., et Pfeilschifter, J. (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon-gamma. *International immunopharmacology*, 3(9), 1247–1255. [https://doi.org/10.1016/S1567-5769\(03\)00131-0](https://doi.org/10.1016/S1567-5769(03)00131-0)
- Muller D. P. (1992). Vitamin E therapy in retinopathy of prematurity. *Eye (London, England)*, 6 (Pt 2), 221–225. <https://doi.org/10.1038/eye.1992.43>
- Müller, M. B., Hübner, M., Li, L., Tomasi, S., Ließke, V., Effinger, D., Hirschberger, S., Pogoda, K., Sperandio, M., et Kreth, S. (2022). Cell-Crossing Functional Network Driven by microRNA-125a Regulates Endothelial Permeability and Monocyte Trafficking in Acute Inflammation. *Frontiers in immunology*, 13, 826047. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826047>
- Mulligan-Kehoe, M. J., et Simons, M. (2014). Vasa vasorum in normal and diseased arteries. *Circulation*, 129(24), 2557–2566. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007189>
- Nagamoto-Combs, K., Kulas, J., et Combs, C. K. (2014). A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia. *Journal of neuroscience methods*, 233, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.05.021>
- Narni-Mancinelli, E., Ugolini, S., et Vivier, E. (2013). Les cellules natural killer - Adaptation et mémoire dans le système immunitaire inné [Natural killer cells: adaptation and memory in innate immunity]. *Medecine sciences : M/S*, 29(4), 389–395. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013294012>
- Negishi, H., Taniguchi, T., et Yanai, H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(11), a028423.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>

- Niu, W., Sun, B., Li, M., Cui, J., Huang, J., et Zhang, L. (2018). TLR-4/microRNA-125a/NF- κ B signaling modulates the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *17*(15), 1931–1945. <https://doi.org/10.1080/15384101.2018.1509636>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., et Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, *9*, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- O'Connor, A. R., Stephenson, T. J., Johnson, A., Tobin, M. J., Ratib, S., et Fielder, A. R. (2002a). Strabismus in children of birth weight less than 1701 g. *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)*, *120*(6), 767–773. <https://doi.org/10.1001/archopht.120.6.767>
- O'Connor, A. R., Stephenson, T., Johnson, A., Tobin, M. J., Moseley, M. J., Ratib, S., Ng, Y., et Fielder, A. R. (2002b). Long-term ophthalmic outcome of low birth weight children with and without retinopathy of prematurity. *Pediatrics*, *109*(1), 12–18. <https://doi.org/10.1542/peds.109.1.12>
- Oltra, M., Vidal-Gil, L., Maisto, R., Sancho-Pelluz, J., et Barcia, J. M. (2020). Oxidative stress-induced angiogenesis is mediated by miR-205-5p. *Journal of cellular and molecular medicine*, *24*(2), 1428–1436. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14822>
- Oshima, Y., Oshima, S., Nambu, H., Kachi, S., Takahashi, K., Umeda, N., Shen, J., Dong, A., Apte, R. S., Duh, E., Hackett, S. F., Okoye, G., Ishibashi, K., Handa, J., Melia, M., Wiegand, S., Yancopoulos, G., Zack, D. J., et Campochiaro, P. A. (2005). Different effects of angiopoietin-2 in different vascular beds: new vessels are most sensitive. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *19*(8), 963–965. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2209fje>
- Oubaha, M., Miloudi, K., Dejda, A., Guber, V., Mawambo, G., Germain, M. A., Bourdel, G., Popovic, N., Rezende, F. A., Kaufman, R. J., Mallette, F. A., et Sapieha, P. (2016). Senescence-associated secretory phenotype contributes to pathological

- angiogenesis in retinopathy. *Science translational medicine*, 8(362), 362ra144.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf9440>
- Palfi, A., Hokamp, K., Hauck, S. M., Vencken, S., Millington-Ward, S., Chadderton, N., Carrigan, M., Kortvely, E., Greene, C. M., Kenna, P. F., et Farrar, G. J. (2016). microRNA regulatory circuits in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Scientific reports*, 6, 31431. <https://doi.org/10.1038/srep31431>
 - Pan, Q., Liao, X., Liu, H., Wang, Y., Chen, Y., Zhao, B., Lazartigues, E., Yang, Y., et Ma, X. (2017). MicroRNA-125a-5p alleviates the deleterious effects of ox-LDL on multiple functions of human brain microvessel endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 312(2), C119–C130.
<https://doi.org/10.1152/ajpcell.00296.2016>
 - Pareek, C. S., Smoczynski, R., et Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of applied genetics*, 52(4), 413–435.
<https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>
 - Park, Y., et Kim, J. (2019). Regulation of IL-6 signaling by miR-125a and let-7e in endothelial cells controls vasculogenic mimicry formation of breast cancer cells. *BMB reports*, 52(3), 214–219. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2019.52.3.308>
 - Paschalaki, K. E., et Randi, A. M. (2018). Recent Advances in Endothelial Colony Forming Cells Toward Their Use in Clinical Translation. *Frontiers in medicine*, 5, 295.
<https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00295>
 - Paskeviciute, M., and Petrikaite, V. (2019). Overcoming transporter-mediated multidrug resistance in cancer: failures and achievements of the last decades. *Drug Deliv. Transl. Res.* 9, 379–393. doi: 10.1007/s13346-018-0584-7
 - Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., et Cobb, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews*, 22(2), 153–183.
<https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0428>

- Pedrazzini T. (2015). Le cœur des ARN non codants - Un long chemin à découvrir [In the heart of noncoding RNA: a long way to go]. *Medecine sciences : M/S*, 31(3), 261–267. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153103011>
- Penn, J. S., Tolman, B. L., et Lowery, L. A. (1993). Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Investigative ophthalmology et visual science*, 34(3), 576–585.
- Penn, J. S., Henry, M. M., et Tolman, B. L. (1994). Exposure to alternating hypoxia and hyperoxia causes severe proliferative retinopathy in the newborn rat. *Pediatric research*, 36(6), 724–731. <https://doi.org/10.1203/00006450-199412000-00007>
- Penn, J. S., Henry, M. M., Wall, P. T., et Tolman, B. L. (1995). The range of PaO₂ variation determines the severity of oxygen-induced retinopathy in newborn rats. *Investigative ophthalmology et visual science*, 36(10), 2063–2070.
- Perry, M. M., Moschos, S. A., Williams, A. E., Shepherd, N. J., Larner-Svensson, H. M., et Lindsay, M. A. (2008). Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1beta-induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(8), 5689–5698. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5689>
- Peskova, L., Jurcikova, D., Vanova, T., Krivanek, J., Capandova, M., Sramkova, Z., Sebestikova, J., Kolouskova, M., Kotasova, H., Streit, L., et Barta, T. (2020). miR-183/96/182 cluster is an important morphogenetic factor targeting PAX6 expression in differentiating human retinal organoids. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 10.1002/stem.3272. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/stem.3272>
- Pierce, E. A., Avery, R. L., Foley, E. D., Aiello, L. P., et Smith, L. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.3.905>
- Potente, M., Urbich, C., Sasaki, K., Hofmann, W. K., Heeschen, C., Aicher, A., Kollipara, R., DePinho, R. A., Zeiher, A. M., et Dimmeler, S. (2005). Involvement of Foxo

- transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *The Journal of clinical investigation*, 115(9), 2382–2392. <https://doi.org/10.1172/JCI23126>
- Potente, M., Gerhardt, H., et Carmeliet, P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), 873–887. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.039>
 - Prada, D., Harris, A., Guidoboni, G., Rowe, L., Verticchio-Vercellin, A.C., Mathew, S. (2019). Vascular Anatomy and Physiology of the Eye. In: Guidoboni, G., Harris, A., Sacco, R. (dir.) *Ocular Fluid Dynamics. Modeling and Simulation in Science, Engineering and Technology*. Birkhäuser, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25886-3_2
 - Prasad, M., Xu, J., Agranat, J. S., Xia, W., Daley, S., Ness, S., Chen, X., Siegel, N. H., Stein, T. D., Chung, J., et Subramanian, M. L. (2022). Upregulation of Neuroinflammatory Protein Biomarkers in Acute Rhegmatogenous Retinal Detachments. *Life (Basel, Switzerland)*, 13(1), 118. <https://doi.org/10.3390/life13010118>
 - Pratt, C. L., et Brown, C. R. (2014). The role of eicosanoids in experimental Lyme arthritis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 69. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00069>
 - Puro D. G. (2012). Retinovascular physiology and pathophysiology: new experimental approach/new insights. *Progress in retinal and eye research*, 31(3), 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.01.001>
 - Quévillon Huberdeau, M., et Simard, M. J. (2019). A guide to microRNA-mediated gene silencing. *The FEBS journal*, 286(4), 642–652. <https://doi.org/10.1111/febs.14666>
 - Quinn, G. E., Dobson, V., Davitt, B. V., Hardy, R. J., Tung, B., Pedroza, C., Good, W. V., et Early Treatment for Retinopathy of Prematurity Cooperative Group (2008). Progression of myopia and high myopia in the early treatment for retinopathy of prematurity study: findings to 3 years of age. *Ophthalmology*, 115(6), 1058–1064.e1. <https://doi.org/10.1016/j.opthta.2007.07.028>

- Radom-Aizik, S., Zaldivar, F., Jr, Leu, S. Y., Adams, G. R., Oliver, S., et Cooper, D. M. (2012). Effects of exercise on microRNA expression in young males peripheral blood mononuclear cells. *Clinical and translational science*, 5(1), 32–38. <https://doi.org/10.1111/j.1752-8062.2011.00384.x>
- Ramalingam, P., Palanichamy, J. K., Singh, A., Das, P., Bhagat, M., Kassab, M. A., Sinha, S., et Chattopadhyay, P. (2014). Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA (New York, N.Y.)*, 20(1), 76–87. <https://doi.org/10.1261/rna.041814.113>
- Rashed, M. H., Kanlikilicer, P., Rodriguez-Aguayo, C., Pichler, M., Bayraktar, R., Bayraktar, E., et al. (2017). Exosomal miR-940 maintains SRC-mediated oncogenic activity in cancer cells: a possible role for exosomal disposal of tumor suppressor miRNAs. *Oncotarget* 8, 20145–20164. doi: 10.18632/oncotarget.15525
- Rezar-Dreindl, S., Eibenberger, K., Told, R., Neumayer, T., Steiner, I., Sacu, S., Schmidt-Erfurth, U., et Stifter, E. (2021). Retinal vessel architecture in retinopathy of prematurity and healthy controls using swept-source optical coherence tomography angiography. *Acta ophthalmologica*, 99(2), e232–e239. <https://doi.org/10.1111/aos.14557>
- Reynaud, X., et Dorey, C. K. (1994). Extraretinal neovascularization induced by hypoxic episodes in the neonatal rat. *Investigative ophthalmology et visual science*, 35(8), 3169–3177.
- Rezar-Dreindl, S., Eibenberger, K., Told, R., Neumayer, T., Steiner, I., Sacu, S., Schmidt-Erfurth, U., et Stifter, E. (2021). Retinal vessel architecture in retinopathy of prematurity and healthy controls using swept-source optical coherence tomography angiography. *Acta ophthalmologica*, 99(2), e232–e239. <https://doi.org/10.1111/aos.14557>
- Ribatti D. (2009). Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. *Leukemia research*, 33(5), 638–644. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2008.11.019>

- Ribatti, D., Nico, B., et Crivellato, E. (2015). The development of the vascular system: a historical overview. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1214, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1462-3_1
- Riffo-Campos, A. L., Riquelme, I., and Brebi-Mieville, P. (2016). Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int. J. Mol. Sci.* 17. doi: 10.3390/ijms17121987
- Rivera, J. C., Sitaras, N., Noueihed, B., Hamel, D., Madaan, A., Zhou, T., Honoré, J. C., Quiniou, C., Joyal, J. S., Hardy, P., Sennlaub, F., Lubell, W., et Chemtob, S. (2013). Microglia and interleukin-1 β in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 33(8), 1881–1891. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301331>
- Rivera, J. C., Noueihed, B., Omri, S., Barrueco, J., Hilberg, F., et Chemtob, S. (2015). BIBF1120 (Vargatef) Inhibits Preretinal Neovascularization and Enhances Normal Vascolarization in a Model of Vasoproliferative Retinopathy. *Investigative ophthalmology et visual science*, 56(13), 7897–7907. <https://doi.org/10.1167/iovs.15-17146>
- Rivera, J. C., Madaan, A., Zhou, T. E., et Chemtob, S. (2016). Review of the mechanisms and therapeutic avenues for retinal and choroidal vascular dysfunctions in retinopathy of prematurity. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 105(12), 1421–1433. <https://doi.org/10.1111/apa.13586>
- Rivera, J. C., Dabouz, R., Noueihed, B., Omri, S., Tahiri, H., et Chemtob, S. (2017). Ischemic Retinopathies: Oxidative Stress and Inflammation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 3940241. <https://doi.org/10.1155/2017/3940241>
- Rivera, J. C., Noueihed, B., Madaan, A., Lahaie, I., Pan, J., Belik, J., et Chemtob, S. (2017). Tetrahydrobiopterin (BH4) deficiency is associated with augmented inflammation and microvascular degeneration in the retina. *Journal of neuroinflammation*, 14(1), 181. <https://doi.org/10.1186/s12974-017-0955-x>

- Rizzi, A., Benagiano, V., et Ribatti, D. (2017). Angiogenesis versus arteriogenesis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 58(1), 15–19.
- Robinson, J., Moseley, M. J., Thompson, J. R., et Fielder, A. R. (1989). Eyelid opening in preterm neonates. *Archives of disease in childhood*, 64(7 Spec No), 943–948. https://doi.org/10.1136/adc.64.7_spec_no.943
- Rotschild, T., Nandgaonkar, B. N., Yu, K., et Higgins, R. D. (1999). Dexamethasone reduces oxygen induced retinopathy in a mouse model. *Pediatric research*, 46(1), 94–100. <https://doi.org/10.1203/00006450-199907000-00016>
- Rüegg, C., Yilmaz, A., Bieler, G., Bamat, J., Chaubert, P., et Lejeune, F. J. (1998). Evidence for the involvement of endothelial cell integrin alphaVbeta3 in the disruption of the tumor vasculature induced by TNF and IFN-gamma. *Nature medicine*, 4(4), 408–414. <https://doi.org/10.1038/nm0498-408>
- Salesse C. (2017). Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel [Physiology of the visual retinal signal: From phototransduction to the visual cycle]. *Journal francais d'ophtalmologie*, 40(3), 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2016.12.006>
- Samra, H. A., et McGrath, J. M. (2009). Pain management during retinopathy of prematurity eye examinations: a systematic review. *Advances in neonatal care : official journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 9(3), 99–110. <https://doi.org/10.1097/ANC.0b013e3181a68b48>
- Santos, A. M., Calvente, R., Tassi, M., Carrasco, M. C., Martín-Oliva, D., Marín-Teva, J. L., Navascués, J., et Cuadros, M. A. (2008). Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *The Journal of comparative neurology*, 506(2), 224–239. <https://doi.org/10.1002/cne.21538>
- Sapieha, P., Joyal, J. S., Rivera, J. C., Kermorvant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Hardy, P., Lachapelle, P., et Chemtob, S. (2010). Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *The Journal of clinical investigation*, 120(9), 3022–3032. <https://doi.org/10.1172/JCI42142>

- Sapieha, P., Sirinyan, M., Hamel, D., Zaniolo, K., Joyal, J. S., Cho, J. H., Honoré, J. C., Kermorvant-Duchemin, E., Varma, D. R., Tremblay, S., Leduc, M., Rihakova, L., Hardy, P., Klein, W. H., Mu, X., Mamer, O., Lachapelle, P., Di Polo, A., Beauséjour, C., Andelfinger, G., et Chemtob, S. (2008). The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature medicine*, *14*(10), 1067–1076. <https://doi.org/10.1038/nm.1873>
- Saud, S. M., Li, W., Morris, N. L., Matter, M. S., Colburn, N. H., Kim, Y. S., et Young, M. R. (2014). Resveratrol prevents tumorigenesis in mouse model of Kras activated sporadic colorectal cancer by suppressing oncogenic Kras expression. *Carcinogenesis*, *35*(12), 2778–2786. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu209>
- Sayah, D. N., Zhou, T. E., Omri, S., Mazzaferri, J., Quiniou, C., Wirth, M., Côté, F., Dabouz, R., Desjarlais, M., Costantino, S., et Chemtob, S. (2020). Novel Anti-Interleukin-1 β Therapy Preserves Retinal Integrity: A Longitudinal Investigation Using OCT Imaging and Automated Retinal Segmentation in Small Rodents. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 296. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00296>
- Schieber, M., et Chandel, N. S. (2014). ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology : CB*, *24*(10), R453–R462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
- Schlüter, T., Berger, C., Rosengauer, E., Fieth, P., Krohs, C., Ushakov, K., Steel, K. P., Avraham, K. B., Hartmann, A. K., Felmy, F., et Nothwang, H. G. (2018). miR-96 is required for normal development of the auditory hindbrain. *Human molecular genetics*, *27*(5), 860–874. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy007>
- Schmidt, B., Roberts, R. S., Davis, P., Doyle, L. W., Barrington, K. J., Ohlsson, A., Solimano, A., Tin, W., et Caffeine for Apnea of Prematurity Trial Group (2006). Caffeine therapy for apnea of prematurity. *The New England journal of medicine*, *354*(20), 2112–2121. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa054065>
- Schwab, J. M., Schluesener, H. J., Seid, K., et Meyermann, R. (2001). IL-16 is differentially expressed in the developing human fetal brain by microglial cells in

- zones of neuropoiesis. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 19(1), 93–100. [https://doi.org/10.1016/s0736-5748\(00\)00063-0](https://doi.org/10.1016/s0736-5748(00)00063-0)
- Scott, A., et Fruttiger, M. (2010). Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina. *Eye (London, England)*, 24(3), 416–421. <https://doi.org/10.1038/eye.2009.306>
 - Segura, E., et Amigorena, S. (2014). Les cellules dendritiques inflammatoires [Inflammatory dendritic cells]. *Medicine sciences : M/S*, 30(1), 64–68. <https://doi.org/10.1051/medsci/20143001015>
 - Semeraro, F., Cancarini, A., dell'Omo, R., Rezzola, S., Romano, M. R., et Costagliola, C. (2015). Diabetic Retinopathy: Vascular and Inflammatory Disease. *Journal of diabetes research*, 2015, 582060. <https://doi.org/10.1155/2015/582060>
 - Sena, C. M., Pereira, A. M., et Seíça, R. (2013). Endothelial dysfunction - a major mediator of diabetic vascular disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1832(12), 2216–2231. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.08.006>
 - Serhan, C.N., Ward, P.A. and Gilroy, D.W. (2010) *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge University Press, Cambridge. <http://dx.doi.org/10.1017/CBO9781139195737>
 - Shao, Z., Dorfman, A. L., Seshadri, S., Djavari, M., Kermorvant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Blais, M., Polosa, A., Varma, D. R., Joyal, J. S., Lachapelle, P., Hardy, P., Sitaras, N., Picard, E., Mancini, J., Sapieha, P., et Chemtob, S. (2011). Choroidal involution is a key component of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology et visual science*, 52(9), 6238–6248. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6742>
 - Sharma, J., Barr, S. M., Geng, Y., Yun, Y., et Higgins, R. D. (2003). Ibuprofen improves oxygen-induced retinopathy in a mouse model. *Current eye research*, 27(5), 309–314. <https://doi.org/10.1076/ceyr.27.5.309.17222>
 - Shen, J., Yang, X., Xie, B., Chen, Y., Swaim, M., Hackett, S. F., et Campochiaro, P. A. (2008). MicroRNAs regulate ocular neovascularization. *Molecular therapy : the*

- journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(7), 1208–1216.
<https://doi.org/10.1038/mt.2008.104>
- Shi, S., Jin, Y., Song, H., et Chen, X. (2019). MicroRNA-34a attenuates VEGF-mediated retinal angiogenesis via targeting Notch1. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*, 97(4), 423–430. <https://doi.org/10.1139/bcb-2018-0304>
 - Shi, Y., Xu, X., Luan, P., Kou, W., Li, M., Yu, Q., Zhuang, J., Xu, Y., Peng, W., et Jian, W. (2020). miR-124-3p regulates angiogenesis in peripheral arterial disease by targeting STAT3. *Molecular medicine reports*, 22(6), 4890–4898. <https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11538>
 - Six, I., Chillon, J. M., et Kamel, S. (2020). La structure et la fonction vasculaires. *Revue Francophone des Laboratoires*, 30-39. doi : 10.1016/S1773-035X(20)30197-0.
 - Slaoui, L., Gilbert, A., Rancillac, A., Delaunay-Piednoir, B., Chagnot, A., Gerard, Q., Letort, G., Mailly, P., Robil, N., Gelot, A., Lefebvre, M., Favier, M., Dias, K., Jourden, L., Federici, L., Auvity, S., Cisternino, S., Vivien, D., Cohen-Salmon, M., et Boulay, A. C. (2023). In mice and humans, brain microvascular contractility matures postnatally. *Brain structure et function*, 228(2), 475–492. <https://doi.org/10.1007/s00429-022-02592-w>
 - Smith, B. T., et Tasman, W. S. (2005). Retinopathy of prematurity: late complications in the baby boomer generation (1946-1964). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 103, 225–236.
 - Smith, L. E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S. K., D'Amato, R., Sullivan, R., et D'Amore, P. A. (1994). Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative ophthalmology et visual science*, 35(1), 101–111.
 - Smith, L. E., Shen, W., Perruzzi, C., Soker, S., Kinose, F., Xu, X., Robinson, G., Driver, S., Bischoff, J., Zhang, B., Schaeffer, J. M., et Senger, D. R. (1999). Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature medicine*, 5(12), 1390–1395. <https://doi.org/10.1038/70963>

- Smith, S., Wu, P. W., Seo, J. J., Fernando, T., Jin, M., Contreras, J., Montano, E. N., Gabhann, J. N., Cunningham, K., Widaa, A., McCarthy, E. M., Molloy, E. S., Kearns, G., Murphy, C. C., Kong, W., Björkbacka, H., Kornfeld, H., Forbess, L., Venuturupalli, S., Ishimori, M., Jefferies, C. A. (2018). IL-16/miR-125a axis controls neutrophil recruitment in pristane-induced lung inflammation. *JCI insight*, 3(15), e120798. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.120798>
- Song, H., Xu, N., et Jin, S. (2022). miR-30e-5p attenuates neuronal deficit and inflammation of rats with intracerebral hemorrhage by regulating TLR4. *Experimental and therapeutic medicine*, 24(2), 492. <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11419>
- Sood, B. G., Madan, A., Saha, S., Schendel, D., Thorsen, P., Skogstrand, K., Hougaard, D., Shankaran, S., Carlo, W., et NICHD neonatal research network (2010). Perinatal systemic inflammatory response syndrome and retinopathy of prematurity. *Pediatric research*, 67(4), 394–400. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181d01a36>
- Stahl, A., Connor, K. M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krah, N. M., Seaward, M. R., Willett, K. L., Aderman, C. M., Guerin, K. I., Hua, J., Löfqvist, C., Hellström, A., et Smith, L. E. (2010). The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology et visual science*, 51(6), 2813–2826. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-5176>
- Stahl, A., Lepore, D., Fielder, A., Fleck, B., Reynolds, J. D., Chiang, M. F., Li, J., Liew, M., Maier, R., Zhu, Q., et Marlow, N. (2019). Ranibizumab versus laser therapy for the treatment of very low birthweight infants with retinopathy of prematurity (RAINBOW): an open-label randomised controlled trial. *Lancet (London, England)*, 394(10208), 1551–1559. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)31344-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31344-3)
- St Laurent, G., Wahlestedt, C., and Kapranov, P. (2015). The landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet.* 31, 239–251. doi: 10.1016/j.tig.2015.03.007
- Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., et Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular

- endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(7 Pt 1), 4738–4747. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-07-04738.1995>
- Stritzke, A., Kabra, N., Kaur, S., Robertson, H. L., et Lodha, A. (2019). Oral propranolol in prevention of severe retinopathy of prematurity: a systematic review and meta-analysis. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, 39(12), 1584–1594. <https://doi.org/10.1038/s41372-019-0503-x>
 - Sugano, M., Tsuchida, K., Tomita, H., et Makino, N. (2002). Increased proliferation of endothelial cells with overexpression of soluble TNF-alpha receptor I gene. *Atherosclerosis*, 162(1), 77–84. [https://doi.org/10.1016/s0021-9150\(01\)00684-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9150(01)00684-0)
 - Supplemental Therapeutic Oxygen for Prethreshold Retinopathy Of Prematurity (STOP-ROP), a randomized, controlled trial. I: primary outcomes. (2000). *Pediatrics*, 105(2), 295–310. <https://doi.org/10.1542/peds.105.2.295>
 - Sun, C. M., Wu, J., Zhang, H., Shi, G., et Chen, Z. T. (2017). Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease. *World journal of gastroenterology*, 23(44), 7888–7898. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i44.7888>
 - Sun, Y. M., Lin, K. Y., et Chen, Y. Q. (2013). Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *Journal of hematology et oncology*, 6, 6. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-6>
 - Sun, Y., & Smith, L.E. (2018). Retinal Vasculature in Development and Diseases. *Annual review of vision science*, 4, 101-122 .
 - Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., et Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12481–12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>

- Takousis, P., Sadlon, A., Schulz, J., Wohlers, I., Dobricic, V., Middleton, L., Lill, C. M., Pernecky, R., et Bertram, L. (2019). Differential expression of microRNAs in Alzheimer's disease brain, blood, and cerebrospinal fluid. *Alzheimer's et dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 15(11), 1468–1477. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.06.4952>
- Tan, H., Ren, R., Zhang, J., Huang, Z., Niu, Q., et Yang, B. (2022). Analysis of inflammation-related microRNA expression in patients with ankylosing spondylitis. *Immunologic research*, 70(1), 23–32. <https://doi.org/10.1007/s12026-021-09249-6>
- Tan, Q. Q., Christiansen, S. P., et Wang, J. (2019). Development of refractive error in children treated for retinopathy of prematurity with anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) agents: A meta-analysis and systematic review. *PloS one*, 14(12), e0225643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225643>
- Taylor, A. C., Mendel, T. A., Mason, K. E., Degen, K. E., Yates, P. A., et Peirce, S. M. (2012). Attenuation of ephrinB2 reverse signaling decreases vascularized area and preretinal vascular tuft formation in the murine model of oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology et visual science*, 53(9), 5462–5470. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8599>
- Tennant, M., et McGeachie, J. K. (1990). Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *The Australian and New Zealand journal of surgery*, 60(10), 747–753. <https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.1990.tb07468.x>
- Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., Antonopoulos, A. S., Siasos, G., Tsioufis, C., et Tousoulis, D. (2021). Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*, 9(7), 781. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070781>
- Thibeault D. W. (2000). The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *American journal of perinatology*, 17(4), 167–181. <https://doi.org/10.1055/s-2000-9422>
- Tili, E., Michaille, J. J., Cimino, A., Costinean, S., Dumitru, C. D., Adair, B., Fabbri, M., Alder, H., Liu, C. G., Calin, G. A., et Croce, C. M. (2007). Modulation of miR-155 and

- miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *Journal of immunology*, 179(8), 5082–5089. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.8.5082>
- Tokunaga, C. C., Mitton, K. P., Dailey, W., Massoll, C., Roumayah, K., Guzman, E., Tarabishy, N., Cheng, M., et Dresner, K. A. (2014). Effects of anti-VEGF treatment on the recovery of the developing retina following oxygen-induced retinopathy. *Investigative ophthalmology et visual science*, 55(3), 1884–1892. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-13397>
 - Tremblay, S., Miloudi, K., Chaychi, S., Favret, S., Binet, F., Polosa, A., Lachapelle, P., Chemtob, S., et Sapieha, P. (2013). Systemic inflammation perturbs developmental retinal angiogenesis and neuroretinal function. *Investigative ophthalmology et visual science*, 54(13), 8125–8139. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12496>
 - Tsang, J. K. W., Liu, J., et Lo, A. C. Y. (2019). Vascular and Neuronal Protection in the Developing Retina: Potential Therapeutic Targets for Retinopathy of Prematurity. *International journal of molecular sciences*, 20(17), 4321. <https://doi.org/10.3390/ijms20174321>
 - Uemura, A., Fruttiger, M., D'Amore, P. A., De Falco, S., Joussem, A. M., Sennlaub, F., Brunck, L. R., Johnson, K. T., Lambrou, G. N., Rittenhouse, K. D., et Langmann, T. (2021). VEGFR1 signaling in retinal angiogenesis and microinflammation. *Progress in retinal and eye research*, 84, 100954. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.100954>
 - Ulitsky, I., et Bartel, D. P. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell*, 154(1), 26–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>
 - Vähätupa, M., Jääskeläinen, N., Cerrada-Gimenez, M., Thapa, R., Järvinen, T., Kalesnykas, G., et Uusitalo-Järvinen, H. (2020). Oxygen-Induced Retinopathy Model for Ischemic Retinal Diseases in Rodents. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (163), 10.3791/61482. <https://doi.org/10.3791/61482>
 - VanderVeen, D. K., Bremer, D. L., Fellows, R. R., Hardy, R. J., Neely, D. E., Palmer, E. A., Rogers, D. L., Tung, B., Good, W. V., et Early Treatment for Retinopathy of

- Prematurity Cooperative Group (2011). Prevalence and course of strabismus through age 6 years in participants of the Early Treatment for Retinopathy of Prematurity randomized trial. *Journal of AAPOS : the official publication of the American Association for Pediatric Ophthalmology and Strabismus*, 15(6), 536–540. <https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2011.07.017>
- van Wijngaarden, P., Coster, D. J., Brereton, H. M., Gibbins, I. L., et Williams, K. A. (2005). Strain-dependent differences in oxygen-induced retinopathy in the inbred rat. *Investigative ophthalmology et visual science*, 46(4), 1445–1452. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0708>
 - Vento, M., Asensi, M., Sastre, J., García-Sala, F., Pallardó, F. V., et Viña, J. (2001). Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics*, 107(4), 642–647. <https://doi.org/10.1542/peds.107.4.642>
 - Villacampa, P., Menger, K. E., Abelleira, L., Ribeiro, J., Duran, Y., Smith, A. J., Ali, R. R., Luhmann, U. F., et Bainbridge, J. W. B. (2017). Accelerated oxygen-induced retinopathy is a reliable model of ischemia-induced retinal neovascularization. *PLoS one*, 12(6), e0179759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179759>
 - Vlachos, I. S., Paraskevopoulou, M. D., Karagkouni, D., Georgakilas, G., Vergoulis, T., Kanellos, I., Anastasopoulos, I. L., Maniou, S., Karathanou, K., Kalfakakou, D., Fevgas, A., Dalamagas, T., et Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-TarBase v7.0: indexing more than half a million experimentally supported miRNA:mRNA interactions. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D153–D159. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1215>
 - Wagh, V., Urhekar, A., and Modi, D. (2017). Levels of microRNA miR-16 and miR-155 are altered in serum of patients with tuberculosis and associate with responses to therapy. *Tuberculosis* 102, 24–30. doi: 10.1016/j.tube.2016.10.007
 - Walani S. R. (2020). Global burden of preterm birth. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*, 150(1), 31–33. <https://doi.org/10.1002/ijgo.13195>

- Wallach D. (2018). The Tumor Necrosis Factor Family: Family Conventions and Private Idiosyncrasies. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(10), a028431. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028431>
- Walzog, B., et Gaehtgens, P. (2000). Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, 15, 107–113. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2000.15.3.107>
- Wan, Q., Zhou, Z., Ding, S., et He, J. (2015). The miR-30a Negatively Regulates IL-17-Mediated Signal Transduction by Targeting Traf3ip2. *Journal of interferon et cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 35(11), 917–923. <https://doi.org/10.1089/jir.2014.0146>
- Wang, Z., Gerstein, M., et Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, 10(1), 57–63. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>
- Wang, J., Tan, L., Tan, L., Tian, Y., Ma, J., Tan, C. C., Wang, H. F., Liu, Y., Tan, M. S., Jiang, T., et Yu, J. T. (2015). Circulating microRNAs are promising novel biomarkers for drug-resistant epilepsy. *Scientific reports*, 5, 10201. <https://doi.org/10.1038/srep10201>
- Wang, J. K., Wang, Z., et Li, G. (2019). MicroRNA-125 in immunity and cancer. *Cancer letters*, 454, 134–145. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2019.04.015>
- Wang, S., Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., et Olson, E. N. (2008). The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Developmental cell*, 15(2), 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.07.002>
- Wang, W., Guo, Z., Yang, S., Wang, H., et Ding, W. (2018). Upregulation of miR-199 attenuates TNF- α -induced Human nucleus pulposus cell apoptosis by downregulating MAP3K5. *Biochemical and biophysical research communications*, 505(3), 917–924. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.194>

- Wang, Y., Wu, S., Yang, Y., Peng, F., Li, Q., Tian, P., Xiang, E., Liang, H., Wang, B., Zhou, X., Huang, H., et Zhou, X. (2017). Differentially expressed miRNAs in oxygen-induced retinopathy newborn mouse models. *Molecular medicine reports*, 15(1), 146–152. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5993>
- Wang, Zuyong et Zhang, Wanqi et Xie, Chao et Wen, Feng et Ma, Chao et Lin, N. et Thian, Eng et Wang, Xianwei. (2019). Geometric anisotropy on biomaterials surface for vascular scaffold design: Engineering and biological advances. *Journal of Physics: Materials*. 2. 10.1088/2515-7639/ab1c68.
- Wang, W., et Guo, Z. H. (2020). Downregulation of lncRNA NEAT1 Ameliorates LPS-Induced Inflammatory Responses by Promoting Macrophage M2 Polarization via miR-125a-5p/TRAF6/TAK1 Axis. *Inflammation*, 43(4), 1548–1560. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01231-y>
- Washietl, S., Will, S., Hendrix, D. A., Goff, L. A., Rinn, J. L., Berger, B., et Kellis, M. (2012). Computational analysis of noncoding RNAs. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA*, 3(6), 759–778. <https://doi.org/10.1002/wrna.1134>
- Webster, M. J., et Rowe, M. H. (1991). Disruption of developmental timing in the albino rat retina. *The Journal of comparative neurology*, 307(3), 460–474. <https://doi.org/10.1002/cne.903070309>
- Wei, H., Li, B., Sun, A., et Guo, F. (2019). Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Advances in experimental medicine and biology*, 1172, 79–96. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9_4
- Wen, R., Tao, W., Li, Y., et Sieving, P. A. (2012). CNTF and retina. *Progress in retinal and eye research*, 31(2), 136–151. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.005>
- WHO. (2022). Preterm birth. <https://www.who.int>
- Wilson, K. C., Center, D. M., et Cruikshank, W. W. (2004). The effect of interleukin-16 and its precursor on T lymphocyte activation and growth. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 22(2), 97–104. <https://doi.org/10.1080/08977190410001704679>

- Winer, H., Rodrigues, G. O. L., Hixon, J. A., Aiello, F. B., Hsu, T. C., Wachter, B. T., Li, W., et Durum, S. K. (2022). IL-7: Comprehensive review. *Cytokine*, *160*, 156049. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2022.156049>
- Wirth, M., Naud, A., Schmitt, E., Clerc-Urmès, I., et Hascoët, J. M. (2018). Visual Maturation at Term Equivalent Age in Very Premature Infants According to Factors Influencing Its Development. *Frontiers in physiology*, *9*, 1649. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01649>
- Wirth, M., Naud, A., Caputo, G., et Hascoët, J. M. (2019). Algorithm for predicting threshold retinopathy of prematurity is insufficient and fundus examinations are still needed before 31 weeks. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, *108*(6), 1049–1054. <https://doi.org/10.1111/apa.14654>
- Wojtowicz, E. E., Broekhuis, M. J. C., Weersing, E., Dinitzen, A., Verovskaya, E., Ausema, A., Ritsema, M., Zwart, E., de Haan, G., et Bystrykh, L. V. (2019). MiR-125a enhances self-renewal, lifespan, and migration of murine hematopoietic stem and progenitor cell clones. *Scientific reports*, *9*(1), 4785. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-38503-z>
- Wong-Riley M. T. (2010). Energy metabolism of the visual system. *Eye and brain*, *2*, 99–116. <https://doi.org/10.2147/EB.S9078>
- Wu, J. H., Gao, Y., Ren, A. J., Zhao, S. H., Zhong, M., Peng, Y. J., Shen, W., Jing, M., et Liu, L. (2012). Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy. *Ophthalmic research*, *47*(4), 195–201. <https://doi.org/10.1159/000331992>
- Wu, M. H., Tsai, C. H., Huang, Y. L., Fong, Y. C., et Tang, C. H. (2018). Visfatin Promotes IL-6 and TNF- α Production in Human Synovial Fibroblasts by Repressing miR-199a-5p through ERK, p38 and JNK Signaling Pathways. *International journal of molecular sciences*, *19*(1), 190. <https://doi.org/10.3390/ijms19010190>
- Wu, N., Wu, G. C., Hu, R., Li, M., et Feng, H. (2011). Ginsenoside Rh2 inhibits glioma cell proliferation by targeting microRNA-128. *Acta pharmacologica Sinica*, *32*(3), 345–353. <https://doi.org/10.1038/aps.2010.220>

- Wu, S., Zhang, R., Nie, F., Wang, X., Jiang, C., Liu, M., Valenzuela, R. K., Liu, W., Shi, Y., et Ma, J. (2016). MicroRNA-137 Inhibits EFNB2 Expression Affected by a Genetic Variant and Is Expressed Aberrantly in Peripheral Blood of Schizophrenia Patients. *EBioMedicine*, 12, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.09.012>
- Xiang, L., Zhang, J., Rao, F. Q., Yang, Q. L., Zeng, H. Y., Huang, S. H., Xie, Z. X., Lv, J. N., Lin, D., Chen, X. J., Wu, K. C., Lu, F., Huang, X. F., et Chen, Q. (2022). Depletion of miR-96 Delays, But Does Not Arrest, Photoreceptor Development in Mice. *Investigative ophthalmology et visual science*, 63(4), 24. <https://doi.org/10.1167/iovs.63.4.24>
- Xu, S., Witmer, P. D., Lumayag, S., Kovacs, B., et Valle, D. (2007). MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *The Journal of biological chemistry*, 282(34), 25053–25066. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700501200>
- Yan, B., et Wang, Z. (2012). Long noncoding RNA: its physiological and pathological roles. *DNA and cell biology*, 31 Suppl 1, S34–S41. <https://doi.org/10.1089/dna.2011.1544>
- Yang, C., Yang, C., Huang, Z., Zhang, J., Chen, N., Guo, Y., Zahoor, A., et Deng, G. (2022). Reduced expression of MiR-125a-5p aggravates LPS-induced experimental acute kidney injury pathology by targeting TRAF6. *Life sciences*, 288, 119657. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119657>
- York, J. R., Landers, S., Kirby, R. S., Arbogast, P. G., et Penn, J. S. (2004). Arterial oxygen fluctuation and retinopathy of prematurity in very-low-birth-weight infants. *Journal of perinatology : official journal of the California Perinatal Association*, 24(2), 82–87. <https://doi.org/10.1038/sj.jp.7211040>
- Xu, W. C., Dong, X., Ding, J. L., Liu, J. C., Xu, J. J., Tang, Y. H., Yi, Y. P., Lu, C., Yang, W., Yang, J. S., Gong, Y., et Zhou, J. L. (2019). Nanotubular TiO₂ regulates macrophage M2 polarization and increases macrophage secretion of VEGF to accelerate endothelialization via the ERK1/2 and PI3K/AKT pathways. *International journal of nanomedicine*, 14, 441–455. <https://doi.org/10.2147/IJN.S188439>

- Xue, K., Huang, X., Xu, S., Zhang, T., Wang, X., Zhang, M., Ruan, L., et Ni, Y. (2020). THE EVOLUTION OF ISOLATED NEOVASCULAR TUFTS ("POPCORN") IN RETINOPATHY OF PREMATURITY. *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 40(7), 1353–1358. <https://doi.org/10.1097/IAE.0000000000002596>
- Yang, C., Yang, C., Huang, Z., Zhang, J., Chen, N., Guo, Y., Zahoor, A., et Deng, G. (2022). Reduced expression of MiR-125a-5p aggravates LPS-induced experimental acute kidney injury pathology by targeting TRAF6. *Life sciences*, 288, 119657. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119657>
- Yang, C., Passos Gibson, V., et Hardy, P. (2022). The Role of MiR-181 Family Members in Endothelial Cell Dysfunction and Tumor Angiogenesis. *Cells*, 11(10), 1670. <https://doi.org/10.3390/cells11101670>
- Yang, Y., Liu, Y., Li, Y., Chen, Z., Xiong, Y., Zhou, T., Tao, W., Xu, F., Yang, H., Ylä-Herttuala, S., Chaurasia, S. S., Adam, W. C., et Yang, K. (2020). MicroRNA-15b Targets VEGF and Inhibits Angiogenesis in Proliferative Diabetic Retinopathy. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 105(11), 3404–3415. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa538>
- Yao, M. D., Jiang, Q., Ma, Y., Liu, C., Zhu, C. Y., Sun, Y. N., Shan, K., Ge, H. M., Zhang, Q. Y., Zhang, H. Y., Yao, J., Li, X. M., et Yan, B. (2020). Role of METTL3-Dependent N⁶-Methyladenosine mRNA Modification in the Promotion of Angiogenesis. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 28(10), 2191–2202. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.07.022>
- Yin, G. N., Choi, M. J., Kim, W. J., Kwon, M. H., Song, K. M., Park, J. M., Das, N. D., Kwon, K. D., Batbold, D., Oh, G. T., Koh, G. Y., Kim, K. W., Ryu, J. K., et Suh, J. K. (2014). Inhibition of Ninjurin 1 restores erectile function through dual angiogenic and neurotrophic effects in the diabetic mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), E2731–E2740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403471111>
- Yoder M. C. (2012). Human endothelial progenitor cells. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(7), a006692.

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006692>

- Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., et Kuwano, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Molecular and cellular biology*, 17(7), 4015–4023. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.7.4015>
- Yoshida, S., Yoshida, A., et Ishibashi, T. (2004). Induction of IL-8, MCP-1, and bFGF by TNF-alpha in retinal glial cells: implications for retinal neovascularization during post-ischemic inflammation. *Graefes' archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*, 242(5), 409–413. <https://doi.org/10.1007/s00417-004-0874-2>
- Yu, D. Y., et Cringle, S. J. (2001). Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Progress in retinal and eye research*, 20(2), 175–208. [https://doi.org/10.1016/s1350-9462\(00\)00027-6](https://doi.org/10.1016/s1350-9462(00)00027-6)
- Yu, D. Y., Su, E. N., Mehnert, A., Yu, P. K., Cringle, S. J., Morgan, W. H., et McAllister, I. L. (2023). Endothelial contraction of retinal veins. *Experimental eye research*, 228, 109386. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2023.109386>
- Yuan, X., Liu, C., Yang, P., He, S., Liao, Q., Kang, S., et Zhao, Y. (2009). Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC systems biology*, 3, 65. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-3-65>
- Zandi, S., Tappeiner, C., Pfister, I. B., Despont, A., Rieben, R., et Garweg, J. G. (2016). Vitreal Cytokine Profile Differences Between Eyes With Epiretinal Membranes or Macular Holes. *Investigative ophthalmology et visual science*, 57(14), 6320–6326. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-20657>
- Zandi, S., Pfister, I. B., Trainor, P. G., Tappeiner, C., Despont, A., Rieben, R., Skowronska, M., et Garweg, J. G. (2019). Biomarkers for PVR in rhegmatogenous retinal detachment. *PloS one*, 14(4), e0214674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214674>

- Zendjabil, M., Favard, S., Tse, C., Abbou, O., et Hainque, B. (2017). Les microRNA comme biomarqueurs : quelles perspectives ? [The microRNAs as biomarkers: What prospects?]. *Comptes rendus biologies*, *340*(2), 114–131.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2016.12.001>
- Zeng, Y., Cao, D., Yu, H., Zhuang, X., Yang, D., Hu, Y., He, M., et Zhang, L. (2019). Comprehensive analysis of vitreous chemokines involved in ischemic retinal vein occlusion. *Molecular vision*, *25*, 756–765.
- Zhan, J. L., Huang, Y. L., Liang, Q. W., Qu, X. S., Dong, Z. M., Du, Y., et Luo, W. J. (2023). Anti-inflammatory effect of miR-125a-5p on experimental optic neuritis by promoting the differentiation of Treg cells. *Neural regeneration research*, *18*(2), 451–455. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.346462>
- Zhang, H., Zhang, S., Zhang, J., Liu, D., Wei, J., Fang, W., Zhao, W., Chen, Y., et Shang, D. (2018). ZO-1 expression is suppressed by GM-CSF via miR-96/ERG in brain microvascular endothelial cells. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, *38*(5), 809–822. <https://doi.org/10.1177/0271678X17702668>
- Zhang, J. M., et An, J. (2007). Cytokines, inflammation, and pain. *International anesthesiology clinics*, *45*(2), 27–37.
<https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>
- Zhang, J., Yang, Z., Liang, Z., Wang, M., Hu, C., Chang, C., Shi, L., Ji, Q., et Liu, L. (2021). Anti-Interleukin-16-Neutralizing Antibody Attenuates Cardiac Inflammation and Protects against Cardiac Injury in Doxorubicin-Treated Mice. *Mediators of inflammation*, *2021*, 6611085. <https://doi.org/10.1155/2021/6611085>
- Zhang, Y., Wang, C., Lu, J., Jin, Y., Xu, C., Meng, Q., Liu, Q., Dong, D., Ma, X., Liu, K., et Sun, H. (2020). Targeting of miR-96-5p by catalpol ameliorates oxidative stress and hepatic steatosis in LDLr^{-/-} mice via p66shc/cytochrome C cascade. *Aging*, *12*(3), 2049–2069. <https://doi.org/10.18632/aging.102721>
- Zhao, M., Sun, D., Guan, Y., Wang, Z., Sang, D., Liu, M., Pu, Y., Fang, X., Wang, D., Huang, A., Bi, X., Cao, L., et He, C. (2016). Disulfiram and Diphenhydramine

Hydrochloride Upregulate miR-30a to Suppress IL-17-Associated Autoimmune Inflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 36(35), 9253–9266. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4587-15.2016>

- Zhou, T. E., Rivera, J. C., Bhosle, V. K., Lahaie, I., Shao, Z., Tahiri, H., Zhu, T., Polosa, A., Dorfman, A., Beaudry-Richard, A., Costantino, S., Lodygensky, G. A., Lachapelle, P., et Chemtob, S. (2016). Choroidal Involution Is Associated with a Progressive Degeneration of the Outer Retinal Function in a Model of Retinopathy of Prematurity: Early Role for IL-1 β . *The American journal of pathology*, 186(12), 3100–3116. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.08.004>
- Zhou, T. E., Zhu, T., Rivera, J. C., Omri, S., Tahiri, H., Lahaie, I., Rouget, R., Wirth, M., Nattel, S., Lodygensky, G., Ferbeyre, G., Nezhady, M., Desjarlais, M., Hamel, P., et Chemtob, S. (2019). The Inability of the Choroid to Revascularize in Oxygen-Induced Retinopathy Results from Increased p53/miR-Let-7b Activity. *The American journal of pathology*, 189(11), 2340–2356. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2019.07.009>
- Zhou, T. E., Kassis, P. O., Qian, C., Bérubé-Thevenet, R., Chappaz, A., Hamel, P., Chemtob, S., Nuyt, A. M., et Luu, T. M. (2022). Reduced Contrast Sensitivity in Young Adults Who Had Retinopathy of Prematurity. *Ophthalmology. Retina*, 6(8), 744–746. <https://doi.org/10.1016/j.oret.2022.04.008>
- Zhou, Y., Yoshida, S., Kubo, Y., Kobayashi, Y., Nakama, T., Yamaguchi, M., Ishikawa, K., Nakao, S., Ikeda, Y., Ishibashi, T., et Sonoda, K. H. (2016). Interleukin-12 inhibits pathological neovascularization in mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Scientific reports*, 6, 28140. <https://doi.org/10.1038/srep28140>
- Zou, Q., Mao, Y., Hu, L., Wu, Y., et Ji, Z. (2014). miRClassify: an advanced web server for miRNA family classification and annotation. *Computers in biology and medicine*, 45, 157–160. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2013.12.007>

VIII. Annexes

1. Contribution des auteurs

Article MicroRNA-96 promotes vascular repair in oxygen-induced retinopathy – A novel uncovered vasoprotective function.

- Michel Desjarlais (60%): Conception et design de l'étude, planification et réalisation des expériences, analyse des données, écriture du manuscrit
- Maëlle Wirth (30%): réalisation des expériences (Cultures et traitements cellulaires, transfection cellulaire, apprentissage des injections intra-vitréennes chez les rats, réalisation de l'extraction d'ARNs et de protéines, des qRT-PCRs, des Western-blots, apprentissage de la réalisation des flatmounts et des explants choroïdiens, réalisation des matrigels, test de migration), apprentissage à la quantification et l'analyse des données
- José Carlos Rivera, Isabelle Lahaie, Rabah Dabouz, Samy Omri, Céline Borrás (5%): assistance à la réalisation des expériences
- Sylvain Chemtob (5%): Conception et design de l'étude, analyse des données, révision du manuscrit

Article Nutraceutical targeting of inflammation-modulating microRNAs in severe forms of COVID-19: A novel approach to prevent the cytokine storm

- Michel Desjarlais (60%): Conception et design de l'étude, revue de littérature, écriture du manuscrit
- Maëlle Wirth (30%): revue de littérature, rédaction du manuscrit section « potential role of miRs related to inflammatory diseases and COVID-19 cytokine storm ».
- Isabelle Lahaie, Pakiza Ruknudin: revue de littérature (5%)
- Pierre Hardy, Alain Rivard, Sylvain Chemtob (5%): recommandations et révision du manuscrit

Article sur le miR-125a (en préparation)

- Maëlle Wirth (85%) : Conception et design de l'étude, planification et réalisation des expériences, quantification, analyse des données, écriture du manuscrit.
- Isabelle Lahaie : assistance à la réalisation des expériences
- Sylvain Chemtob (5%) : recommandations et révision du manuscrit
- Michel Desjarlais (10%): Conception et design de l'étude, analyse des données, recommandations et révision du manuscrit

2. Article *MicroRNA-96 promotes vascular repair in oxygen-induced retinopathy – A novel uncovered vasoprotective function.*



MicroRNA-96 Promotes Vascular Repair in Oxygen-Induced Retinopathy—A Novel Uncovered Vasoprotective Function

Michel Desjarlais^{1*}, Maëlle Wirth¹, José Carlos Rivera^{1,2}, Isabelle Lahaie¹, Rabah Dabouz¹, Samy Omri¹, Pakiza Ruknudin¹, Celine Borrás¹ and Sylvain Chemtob^{1,2*}

¹ Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, University of Montreal, Montreal, QC, Canada, ² Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Research Center, Montreal, QC, Canada

OPEN ACCESS

Edited by:

Zhuo Shao,
University of Toronto,
Canada

Reviewed by:

Yan Gong,
Wuhan University,
China
Carlos Spuch,
Instituto de Investigación Sanitaria
Galicia Sur (IISGS), Spain

*Correspondence:

Michel Desjarlais

Sylvain Chemtob

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 15 November 2019

Accepted: 07 January 2020

Published: 03 February 2020

Citation:

Desjarlais M, Wirth M, Rivera JC, Lahaie I, Dabouz R, Omri S, Ruknudin P, Borrás C and Chemtob S (2020) MicroRNA-96 Promotes Vascular Repair in Oxygen-Induced Retinopathy—A Novel Uncovered Vasoprotective Function. *Front. Pharmacol.* 11:13. doi: 10.3389/fphar.2020.00013

Background and Aims: Vascular degeneration is a hallmark in the pathogenesis of oxygen-induced retinopathy (OIR). Dysregulation of microRNAs (miRNAs), key regulators of genes expressions, has been implicated in the regulation of ocular angiogenesis. However, miRNAs specific functions in impaired vascular development during OIR are poorly understood. Herein, we identified miR-96 as one of the most highly expressed miRNAs in the retina and choroid during vascular development and investigated the potential role of miR-96 on microvascular degeneration in a rat OIR model.

Methods and Results: Next generation sequencing (NGS) and qRT-PCR analysis showed that miR-96 maintain high levels of expression during ocular vascular development. Nevertheless, miR-96 was significantly downregulated in the retina and choroid of OIR rats (80% O₂ from P5 to P10) during the phase of microvascular degeneration. Similarly, human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) subjected to hyperoxia (80% O₂) showed a significant downregulation of miR-96 evaluated by qPCR. Interestingly, HRMEC supplemented with miR-96 regulated positively the expression of several key angiogenic factors including VEGF and ANG-2. To explore the angiogenic activity of miR-96 on HRMEC, we performed a gain/loss of function study. In a similar way to hyperoxia exposure, we observed a robust angiogenic impairment (tubulogenesis and migration) on HRMEC transfected with an antagoniR-96. Conversely, overexpression of miR-96 stimulated the angiogenic activity of HRMEC and protected against hyperoxia-induced endothelial dysfunction. Finally, we evaluated the potential vasoprotective function of miR-96 in OIR animals. Rat pups intravitreally supplemented with miR-96 mimic (1 mg/kg) displayed a significant preservation of retinal/choroidal microvessels at P10 compared to controls. This result was consistent with the maintenance of physiologic levels of VEGF and ANG-2 in the OIR retina.

Conclusion: This study demonstrates that miR-96 regulates the expression of angiogenic factors (VEGF/ANG-2) associated to the maintenance of retinal and choroidal microvasculature during physiological and pathological conditions. Intravitreal

supplementation of miR-96 mimic could constitute a novel therapeutic strategy to improve vascular repair in OIR and other ischemic retinopathies.

Keywords: micro-RNA (miRNA), vascular degeneration, vascular repair and angiogenesis, oxygen-induced retinopathy (OIR), endothelial dysfunction

INTRODUCTION

Ocular vascular degeneration is an initial feature in the pathogenesis of several types of ischemic retinopathies, including retinopathy of prematurity (ROP) (Rivera et al., 2017). ROP is a well-known visual impairment in premature babies, characterized by an incomplete vascularization of the peripheral retina that causes ischemia and leading to an abnormal and excessive compensatory angiogenic response (pathological neovascularization [NV]) (Sapieha et al., 2010; Wu et al., 2013; Rivera et al., 2017a). However, inner retinal vasculature is not the only affected area during OIR. Recent evidences showed that choroidal thinning is present in adolescents and adults formerly affected with ROP (Wu et al., 2013; Erol et al., 2016; Rivera et al., 2017b). Similarly, our group also detected a sustained choroidal thinning in different animal models of ROP (Shao et al., 2011; Zhou et al., 2016; Beaudry-Richard et al., 2018). To date, several studies have focused their effort in developing novel anti-angiogenic monotherapy against the aberrant NV, by using anti-growth factors such as anti-VEGF, -FGF, -IGF and their receptors (Cabral et al., 2017). However, a small number of studies have focused their efforts on attempting to promote and improve revascularization during the initial phase of ischemia, a strategy that should potentially limit subsequent pathologic NV.

Several mechanisms involved in the control of the angiogenic signaling response and vascular repair during ROP are reported to be altered, including those related to the expression of microRNAs (miRNAs), key regulators of gene expression (O'Connell et al., 2010; Caporali and Emanuelli, 2012; Paul et al., 2018). miRNAs are a family of small non-coding RNAs (20–25 nucleotides) involved in post-transcriptional regulation of genes by inhibiting protein translation or by degrading specific mRNA with a perfectly complementary target binding sequence (miRNA/mRNA). miRNAs regulate a wide range of targets essential for various biological processes such as growth, apoptosis/survival, immune response, cell migration, proliferation and stem cell function (O'Connell et al., 2010; Caporali and Emanuelli, 2012; Paul et al., 2018). Physiologic expression levels of miRNAs are altered in several pathological states, suggesting their critical role in the progression of various diseases such as cancer (Hosseini et al., 2018), cardiovascular diseases (Zhou et al., 2018), degenerative disorders (Qiu et al., 2015), and retinopathies (Wu et al., 2012; Wang et al., 2017; Desjarlais et al., 2019b).

miRNAs play a key regulatory role to maintain functional activity of endothelial cells (ECs), in particular in the control of angiogenic capacity (Desjarlais et al., 2017; Fernández-Hernando and Suárez, 2018). Endothelial cell dysfunction is characterized by impaired capacity to proliferate, migrate and form tubules—

critical components associated with insufficient post-ischemic revascularization (Isner and Asahara, 1999; Desjarlais et al., 2017). Some studies have shown changes in the expression of miRNAs in oxygen-induced retinopathy model (OIR). Our group recently reported a significant alteration in the expression level of several miRNAs in the retina and choroid associated with the vascular degeneration phase in a model of OIR in rats (Desjarlais et al., 2019b). However, the individual function of some specific miRNAs associated to the retinal and choroidal vascular degenerative process in OIR has not been investigated.

Next generation sequencing (NGS) revealed miR-96 as abundantly expressed during oculo-vascular development. Although implicated in development of the hindbrain (Schluter et al., 2018), and proliferation of cancer cells (Lin et al., 2010), its role in angiogenesis is unknown. In the present study, we identified miR-96 as an important vasoprotective miRNA that modulates VEGF and Ang-2 expression in the retina and choroid during physiological conditions. miR-96 downregulation was highly associated with impaired angiogenic process in endothelial cells exposed to hyperoxia *in vitro* and *in vivo* during vasoobliteration in OIR. Intravitreal supplementation of miR-96 prevented endothelial cell impairment induced by hyperoxia and microvascular degeneration in the retina and choroid during OIR. Altogether, these results suggest that miR-96 supplementation could be considered as a novel therapeutic strategy to improve and rescue retinal/choroidal vascular repair by promoting VEGF/Ang2 signaling in ischemic retinopathy.

MATERIALS AND METHODS

Animal Care

All animal experimental procedures were performed with strict adherence to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research and approved by the Animal Care Committee of the Hospital Maisonneuve-Rosemont in accordance with guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

50/10 Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) Model in Rats

Cycling oxygen-induced retinopathy (OIR) in rats was used to evaluate the expression profile of miR-96 in the retina and choroid during the pathological progress of this disease. This model is characterized by a first phase of progressive microvascular degeneration that occurs between postnatal (P) days 1 and 14 (during cycling oxygen (50–10% every 24 h), followed by a second phase of abnormal pathological NV that

take place when pup rats are returned to room air between days 14 and 18 as previously described (Rivera et al., 2015; Desjarlais et al., 2019b). Briefly, a few hours after birth, litters of Sprague-Dawley albino rats (Charles River, St. Constant, QC, Canada) were placed with their mothers in an oxygen-regulated environment (OxyCycler A820CV; BioSpherix, Ltd., Redfield, NY, USA) adjusted to alternate between 50 and 10% oxygen every 24 h for 14 days (OIR group). At P14, rat pups were transferred to room air (21% O₂) for 3 days (P17). Age-matched normoxic control rat pups (NOR) were kept in room air (21% O₂) throughout the experiment. Retinal and choroidal samples were isolated at P7, P14 and P17 from OIR and control animals and evaluated by Next Generation Sequencing and qPCR as described (Desjarlais et al., 2019b).

Vaso-Obliteration Model (80% Constant Oxygen)

The angiogenic function of miR-96 in the retina and the potential vasoprotective effects of miR-based therapy during vascular degeneration were evaluated using a model favoring vaso-oblation in rats (Rivera et al., 2015). Retinal vaso-oblation (VO) was induced in Sprague-Dawley rat pups subjected to constant hyperoxia (80% O₂) in chambers controlled by a computer-assisted Oxycycler (BioSpherix, Ltd.) from P5 to P10. Age-matched normoxic control rat pups (NOR) were kept in room air (21% O₂) throughout the experiment. Thirty minutes before hyperoxia exposure at P5, the OIR pups were anesthetized and intravitreally injected or not, with 1 μ l (1 mg/kg) of miR-96-5p mimic, or miR-mimic negative control (scrambled) (GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, CO). This dose was chosen based on preliminary experiments showing the dose-range for optimal transfection efficiency in tissues (Desjarlais et al., 2017). miRNAs were administered in a mixture solution of InvivoFectamine 3.0 (Thermo Fisher, ON, Canada) according to the manufacturer's recommendations. For molecular analysis, the OIR and control animals were euthanized, and retinas collected at P6, P8, P10. Vessel immunostaining analysis (retinal flat mounts and cryosection) was performed at P10.

Molecular Analysis

miRNA Isolation and Next Generation Sequencing Analyses

To explore the retinal/choroidal expression profile of miR-96 compare to the other miRNAs during OIR (OIR cycling model), total RNA was extracted from retinas and choroid tissues from OIR and NOR groups at P7, and P14, using the miRNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Quantification of total RNA was made with a nanodrop and 1 μ g of total RNA was used for library preparation. Quality of total RNA was assessed with the BioAnalyzer Nano (Agilent) and all samples had a RIN above 8. Library preparation was done with the Truseq Small RNA library preparation kit (Illumina, Cat no. RS-200-0012). Eleven PCR cycles were required to amplify libraries. Libraries were quantified with a nanodrop and the quality was assessed with the BioAnalyzer High Sensitivity

(Agilent). All libraries were diluted to 10 nM, normalized and pooled (n = 5) to equimolar concentration based on Miseq v2 50 cycles using 7pM of pooled library. Sequencing was performed with the Illumina Hiseq2000 using the Hiseq Reagent Kit v3 (200 cycles, paired end) and 1.7 nM of the pooled library. Around 70 million paired-end reads were generated per sample. Quantification includes the raw read count, as well as normalized expression level as RPM values (reads per million reads mapped) to account for the variability in the library size.

qRT-PCT Validation of miR-96

To validate the effects of hyperoxia on miR-96 expression, total RNA where extracted from retinas of OIR and normoxia-raised (NOR) rats (OIR-vasooblation model) at P6, P8 and P10, and in human microvascular retinal endothelial cells (HRMEC) subjected or not to hyperoxia (80%O₂) for 1, 3, 6, 24 and 48h, using the miRNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA was reverse transcribed using with miScript II RT kit (Catalogue # 218161, QIAGEN, Hilden, Germany) according to manufacturer's guidelines. Real-time PCR was performed using 25 ng of cDNA sample by quantitative real-time PCR using iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad) with 2 μ M of miR-96-5p primers designed using Primer Bank and NCBI Primer Blast software (Alpha DNA, Montreal, Canada). Relative expression (RQ = delta/delta CT) was calculated using the detection system ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and normalized to 18S and U6 snRNA.

Immunohistochemistry of Retinal and Choroidal Vessels

To analyze retinal vasculature, retinal flat mount dissection was performed on the enucleated eyes fixed in 4% paraformaldehyde for 1 h at room temperature and then stored in PBS until used. The retinas were incubated overnight in 1% Triton X100, 1 mM CaCl₂/PBS with the tetramethylrhodamine isothiocyanate-conjugated lectin endothelial cell marker Bandeiraea simplicifolia (1:100; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Retinas were washed in PBS and mounted on microscope slides (Bio Nuclear Diagnostics, Inc., Toronto, ON, Canada) under coverslips with mounting media (Fluoro-Gel; Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Retinas were photographed under an epifluorescence microscope (Zeiss AxioObserver; Carl Zeiss Canada, Toronto, ON, Canada), and the images were merged into a single file using the MosiaX option in the AxioVision 4.6.5 software (Zeiss). Retinal microvasculature has been quantified by the percentage of total retinal vasoblation, as well as the vascular density of the retina located in the same central and peripheral regions (Sapieha et al., 2008; Rivera et al., 2015). For choroidal vasculature, retinal cross-sections were performed. Eyes were collected, dehydrated by alcohol, and embedded in paraffin. Sagittal sections (7 μ m thick) were cut by microtome (RM 2145; Leica, Wetzlar, Germany). Posterior eyecups were frozen in optimal cutting temperature medium and stained for choroidal vessels with TRITC-conjugated tetramethylrhodamine isothiocyanate-labeled lectin

(Sigma-Aldrich) in the cryosections. Sections were then visualized with an epifluorescence microscope (Eclipse E800; Nikon, Tokyo, Japan). In some experiment, cryosections of the different groups were co-stained by using rabbit antibody anti-VEGF (1:200, sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) by incubation overnight at 4°C in the blocking solution. Secondary antibodies such as Alexa Fluor 488 anti-rabbit (Life technologies) were used at a dilution of 1:1,000. Cell nuclei was identified with DAPI labeling. Incubation using rabbit or goat IgG as a primary antibody was conducted as a negative control. The image was split into the three-color channels (RGB Merge/split function) to obtain one image per channel.

Ex Vivo Choroidal Angiogenic Sprouting Assay

Angiogenic sprouting capacity of the choroid isolated from the different groups of rats were assessed as previously described (Shao et al., 2013). Briefly, choroid was isolated from rat pups at P10, sectioned into 1-mm rings, and placed into growth-factor-reduced Matrigel (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) in 24-well plates and cultured at 37°C, 5% CO₂ and 95% air, for 5 days in endothelial growth medium; medium 200 (Life technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada), 100 IU/ml penicillin/0.1 mg/ml streptomycin (Wisent) and low serum growth supplement (LSGS; 2% FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 mg/ml heparin, 1 mg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml EGF; Life Technologies). Photomicrographs of individual explants were taken at day 5 using an inverted phase-contrast microscopy (AxioObserver; Zeiss), and microvascular sprouting area was quantified using Image J.

In Vitro Angiogenesis Analyses Cell Culture

Human Retinal Microvascular Endothelial Cells (HRMECs) were purchased from Applied Biological Materials (cat #T4169) and cultured in medium 200 (Life technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Wisent, St-Jean-Baptiste, QC, Canada), 100 IU/ml penicillin/0.1 mg/ml streptomycin (Wisent) and low serum growth supplement (LSGS; 2% FBS, 3 ng/ml bFGF, 10 mg/ml heparin, 1 mg/ml hydrocortisone, and 10 ng/ml EGF; Life Technologies). In some experiments, HRMECs were subjected or not to hyperoxia (80%) using oxygen monitoring chambers for different durations (1, 3, 6, 24 and 48h). HRMECs were grown at 37°C, 5% CO₂ and 95% air, and the medium was changed every 2 days and passaged when they reached 90% confluence; passages 3–6 were only used for experiments.

miRNA Transfection in HRMEC

Transfections were carried out at a concentration of 50 nM using Lipofectamine RNAiMAX Reagent (Thermo Fisher, ON, Canada) according to the manufacturer's protocol and as previously described. Briefly, HRMECs were transfected 24 h after being plated in 6-well plates with the following miRNAs purchased from Dharmacon (GE Healthcare Dharmacon, Lafayette, CO): miRIDIAN miR mimic negative control #1,

miRIDIAN miR mimic hsa-miR-96-5p, miRIDIAN antago-miR negative control #1, miRIDIAN antago-miR-96-5p. After 24 h, the transfection medium was replaced with antibiotic-free complete M200 medium and cells were subjected or not to hyperoxia (80%) for 24 h. Transfection efficiency was measured using mimic transfection control Dy547 (Dharmacon) and found to be 80–90% and also confirmed by qRT-PCR.

HMREC Capillary-Like Tubulogenesis on Matrigel

The angiogenic activity of HRMECs was determined using a Matrigel tube formation assay. Briefly, after transfection and exposure conditions, HRMECs were plated at a density of 30,000 cells/well in 96-well plates pre-coated with 50 µl of growth factor reduced Matrigel Matrix (Fisher Scientific, New Hampshire, USA) and cultured at 37°C for 6 h in complete endothelial growth medium. HRMECs were pre-transfected or not with miR-96-5p mimic, antagomiR-96-5p or appropriate miR controls for 24 h, and subjected or not to hyperoxia (80% O₂) for 6 h after plated in Matrigel. Capillary-like tubes were observed under a light microscope. Images were obtained at 10× magnification, and all tubes and branching point were counted.

Migration Scratch Assay

Measurement of cell migration was performed using an adapted scratch assay in confluent HRMECs. The cells were transfected and grown to near confluence in 24-well plates and subjected or not to hyperoxia (80% O₂). Mechanical disruption of the monolayer was realized by scraping with a pipette tip. Migration was assessed 24 h after mechanical disruption using an inverted microscope at a magnification of 200× and the area of migration and the cells density were quantified as previously described (Desjarlais et al., 2017; Desjarlais et al., 2019a). Six fields per well were evaluated and all experiments were performed in duplicate.

qRT-PCT Analyses of Angiogenic Factors Level

To explore the effects of miR-96-5p overexpression/inhibition on angiogenic factors mRNAs level in HMREC and in the rat retinas, total RNA was extracted using RNeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol and was reverse transcribed using iScript-II RT kit (Qiagen) according to manufacturer's guidelines to generate cDNA. Quantitative real-time PCR reaction was performed using 25 ng of cDNA sample, 2 µM of specific primers for the selected mRNAs (Alpha DNA, Montreal, Canada) and Universal SYBR Green Supermix (BioRad). Relative expression (RQ = 2^{-ΔΔCT}) was calculated using the instrument detection system; ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and normalized to b-Actin and GAPDH.

Western Blot Analysis

Protein levels of VEGF, Ang2 and FGF-2 were analysed by Western blots in the retina of the different groups of rats and in HMREC extracts. For total protein extraction, isolated retina where rinsed in PBS, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use. Whole-cell protein extracts were obtained

after homogenization of the retina of the different groups of rats in ice cold RIPA buffer (pH = 8) containing 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton 100X, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS with a cocktail of proteases and phosphatases inhibitors (MiniComplete, PhosphoStop and PMSF, Roche, Bâle, Switzerland). HRMECs were lysed with 50 μ l of RIPA lysis buffer per well in 6-well plates, harvested and sonicated. 50 μ g of protein per retina homogenate sample and 20 μ g of protein per cell lysate sample were separated on an SDS-polyacrylamide gel and electroblotted on nitrocellulose membranes. Non-specific binding sites were blocked with 5% BSA for 1 h. The membranes were probed overnight at 4°C with the following antibodies: rabbit antibody VEGF (1:500, sc-152; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), goat antibody Ang2 (1:1,000, ab10601; ABCAM), mouse antibody FGF-2 (1:1,000, ab181; ABCAM) or GAPDH (1:2,000, ab181602; ABCAM). Membranes were then washed three times for 10 min with TBS-T and incubated with secondary antibodies for 1 h with 1:2,500 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or 1:2,000 HRP anti-goat or anti-rabbit secondary antibodies (Millipore). Specific proteins were detected by chemiluminescent reaction (GE Healthcare, Piscataway, NJ) by membranes exposure with LAS-3000 imager. Protein expression was quantified using ImageJ and the results are expressed as density values normalized to the loading control (GAPDH).

Statistical Analysis

All results are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was evaluated by a one- or two-way ANOVA followed by a Bonferroni *post hoc* test. A value of $P < 0.05$ was interpreted to denote statistical significance.

RESULTS

miR-96 Is Highly Expressed During Vascular Development But Downregulated During Hyperoxia-Induced Vessel Degeneration

We evaluated the expression profile of miR-96 in retinal and choroidal samples of animals exposed to normoxic (NOR) and during vasoobliteration phase in 50/10 oxygen-induced retinopathy model (50/10 OIR) at P7 and P14 by using next generation sequencing (NGS) analysis. During ocular vascular development, we found miR-96 to be highly expressed in the retina at P7 and choroid at P14 in normoxic animals (Figure 1A). However in 50/10 OIR animals, miR-96 was profoundly downregulated in the retinal/choroidal tissues at all time points evaluated (Figure 1A). To better validate the effect of hyperoxia on miR-96 expression, we also analyzed its levels of expression in the rat retina using a different vasoobliteration OIR model, specifically by constant exposure to 80% O₂. qRT-PCR analyses revealed that miR-96 expression was also significantly reduced in 80% OIR retina at P6, P8 and P10, compared to control (NOR) rats (Figure 1B). To assess whether miR-96 expression specifically affects endothelial cells during

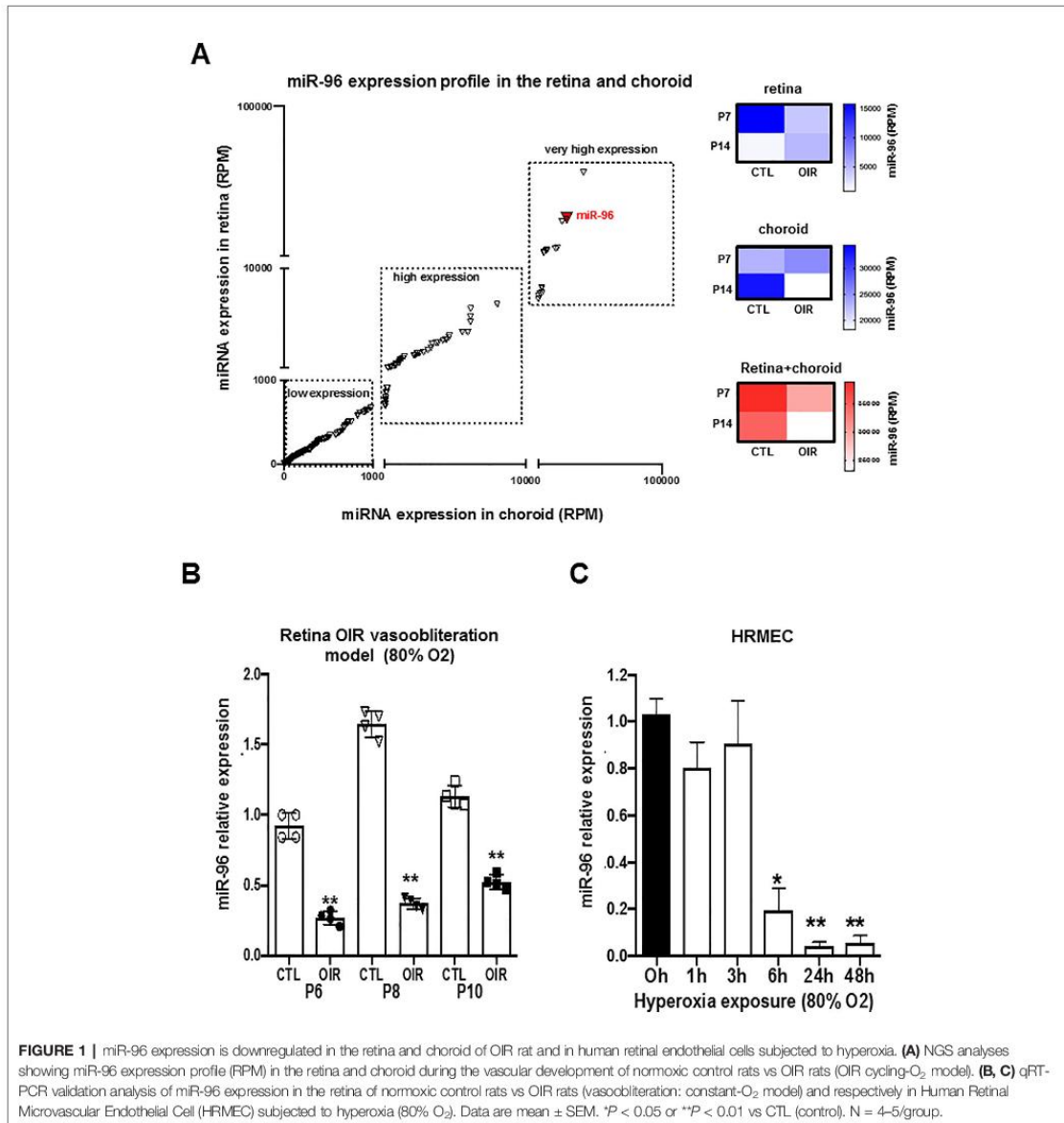
hyperoxia, human retinal microvascular endothelial cells (HRMEC) were subjected to 80% oxygen for different periods of time (1, 3, 6, 24 and 48 h). Hyperoxia markedly suppressed miR-96 expression (Figure 1C). These results infer that decreased miR-96 levels may be associated with impaired endothelial cell function during OIR.

miR-96 Positively Regulates the Expression of Several Angiogenic Factors, Including VEGF, FGF-2 and Ang2, in Endothelial Cells

Based on expression profile of miR-96 in OIR we proceeded to determine if relevant angiogenic factors were regulated by miR-96, and whether maintaining miR-96 expression can prevent endothelial cell survival during OIR. Recent studies have reported an important correlation between miR-96 levels and tumor angiogenesis (Hong et al., 2016; Shi et al., 2017; Iwai et al., 2018). However, its potential role in OIR remains unknown. We investigated the effects of miR-96 up or down regulation on the expression of different angiogenic factors. We first determined the expression efficacy of miR-96 mimic or antagomiR-96 at different concentrations (10, 25 and 50 nM) for 24h in transfected HRMECs (Figure 2A). Transfection was highly efficient on endothelium at 50 nM for both miR-96 mimic (overexpression) and antagomiR-96 (suppression), and therefore, we used this concentration in all our experiments. We next evaluated if miR-96 mimic (50 nM) in cultured HRMECs affects the expression of angiogenic growth factors. Interestingly, increased miR-96 induced simultaneously and significantly the mRNA expression of several pro-angiogenic factors including, VEGF, Ang2, FGF-2, SFD-1 and VEGFR2 (Figure 2B, C). Conversely, inhibition of miR-96 expression by using an antagomiR (50 nM) downregulated expression of these factors (Figure 2B, C). In addition, miR-96 mimic reversed hyperoxia-induced mRNAs (Figure 2D) and protein suppression of VEGF, Ang2 and FGF-2 (Figure 2E). Hence, miR-96 is an important player in the control of gene expression of growth factors essential for maintenance and signaling on endothelium.

miR-96 Regulates the Angiogenic Function of HRMEC and Protects Against Hyperoxia-Induced Endothelial Dysfunction

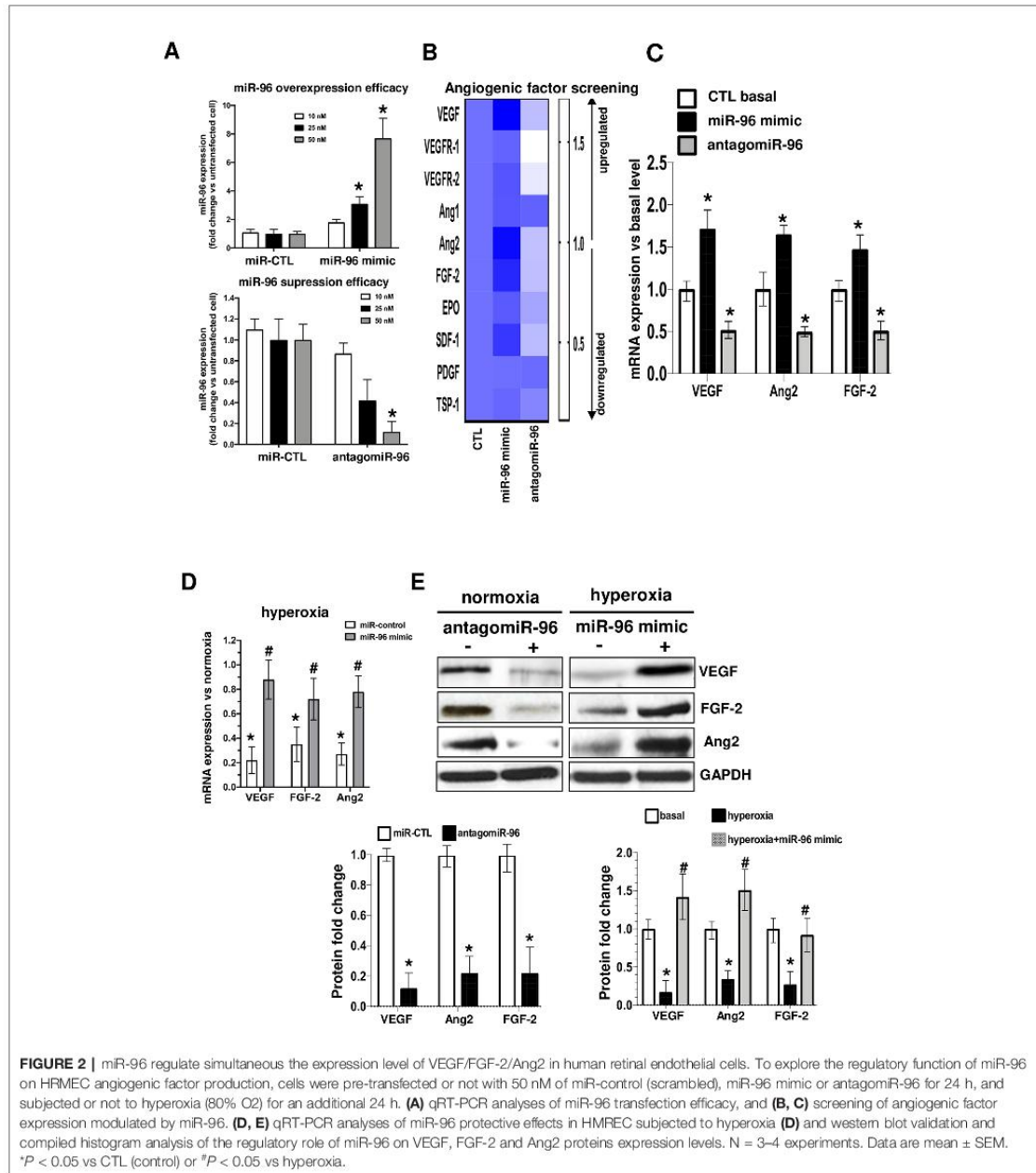
The next step was to investigate the potential protective effect of increased miR-96 in tube formation and migration assays *in vitro* during hyperoxic exposure. We performed a gain and loss-of function experiment by transfecting HRMECs with a miR-96 mimic or antagomiR-96 in normoxic or hyperoxic conditions. In normoxic conditions, we found that augmented miR-96 significantly increased tubulogenesis (Figure 3A, upper panel) and endothelial cell migration (Figure 3B, upper panel). Conversely, miR-96 antagomiR resulted in failed HRMEC tubulogenesis and migration (Figures 3A, B, bottom panels), consistent with that seen during hyperoxia when miR-96 was down-regulated (Figures 1C and 2D); this inhibitory effect of antagomiR-96 is likely contributed at least in part by suppression



of VEGF/Ang2/FGF-2 proteins during hyperoxia (Figure 2D). On the other hand, treatment with miR-96 mimic significantly maintained endothelial cell tube formation and migration even under hyperoxic conditions (Figures 3A, B, bottom panel), probably also due to preservation of VEGF/Ang2/FGF-2 (Figure 2D).

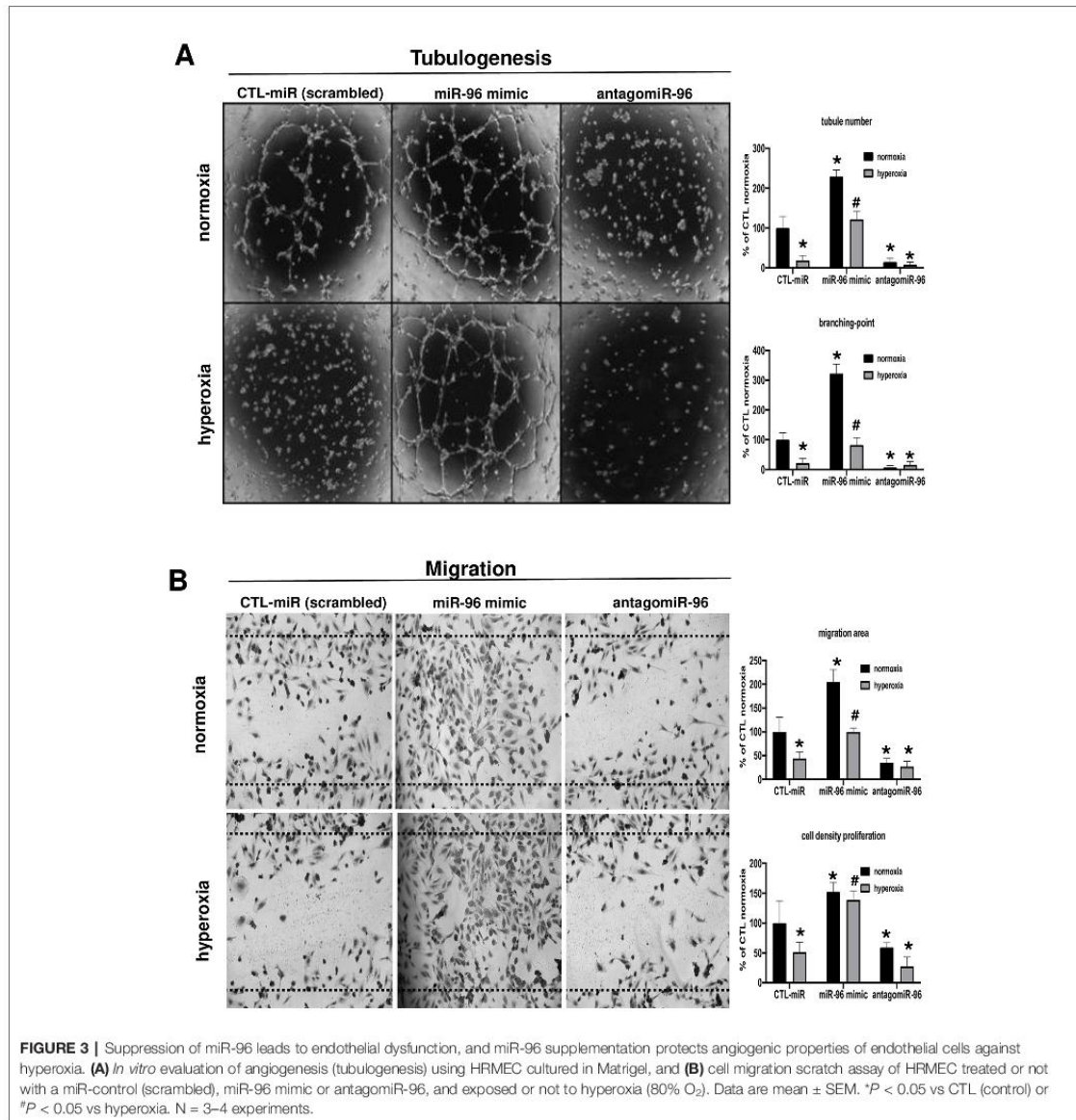
Intravitreal Administration of miR-96 Prevents Retinal and Choroidal Vasoobliteration in Oxygen-Induced Retinopathy Rats

We evaluated if miR-96 mimic can preserve retinal and choroidal vessel integrity during OIR. miR-96 was



maintained increased (till at least P10) following its intravitreal administration at P5 (**Figure 4A**). Retinal and choroidal microvascular decay is a feature of the first phase of OIR (Rivera et al., 2015; Zhou et al., 2016; Desjarlais et al., 2019b), as appreciated by an increase of total retinal vasoobliteration (**Figure 4B**), central avascular area (**Figure 4C**) and reduced

microvascular density in the peripheral retina (**Figure 4D**) after 5 days of exposure to hyperoxia (from P5 to P10); this was also associated with reduced choroidal thickness (**Figure 4E**). Interestingly, choroids from animals subjected to OIR exhibited a limited angiogenic ability (**Figure 4F**). Supplementation of miR-96 mimic (1 mg/kg, administered

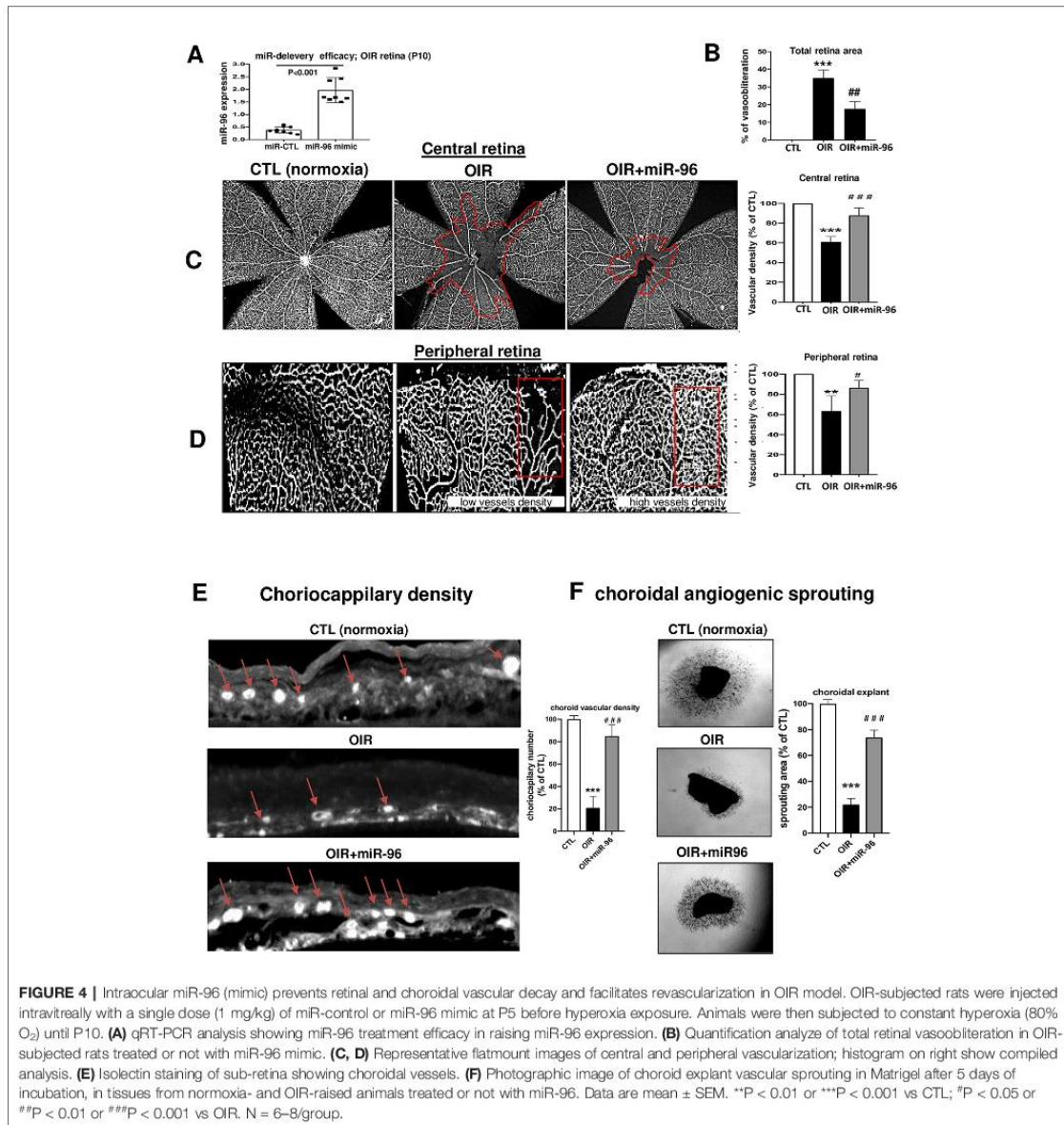


intravitreally) 30 min before hyperoxic exposure, significantly prevented retinal and choroidal vasoobliteration (Figures 4B–E). Moreover, miR-96 mimic allowed the choroid of OIR-subjected rats to retain an angiogenic property (as seen in Matrigel) similar to that seen in normoxia-raised rats (Figure 4F). Consistent with physiologic angiogenic effects of miR-96, latter augmented mRNA and protein expression levels of VEGF and Ang2 in the retina of OIR rats at P8 and P10 (Figures 5A, B, C). Increased VEGF was also detected *in situ* in choroid of miR-96 mimic-treated animals (Figure 5D).

Together these observations highlight a beneficial angiogenic role of miR-96 and potential therapeutic value of this miR in preventing microvascular degeneration while preserving angiogenic capacity during OIR.

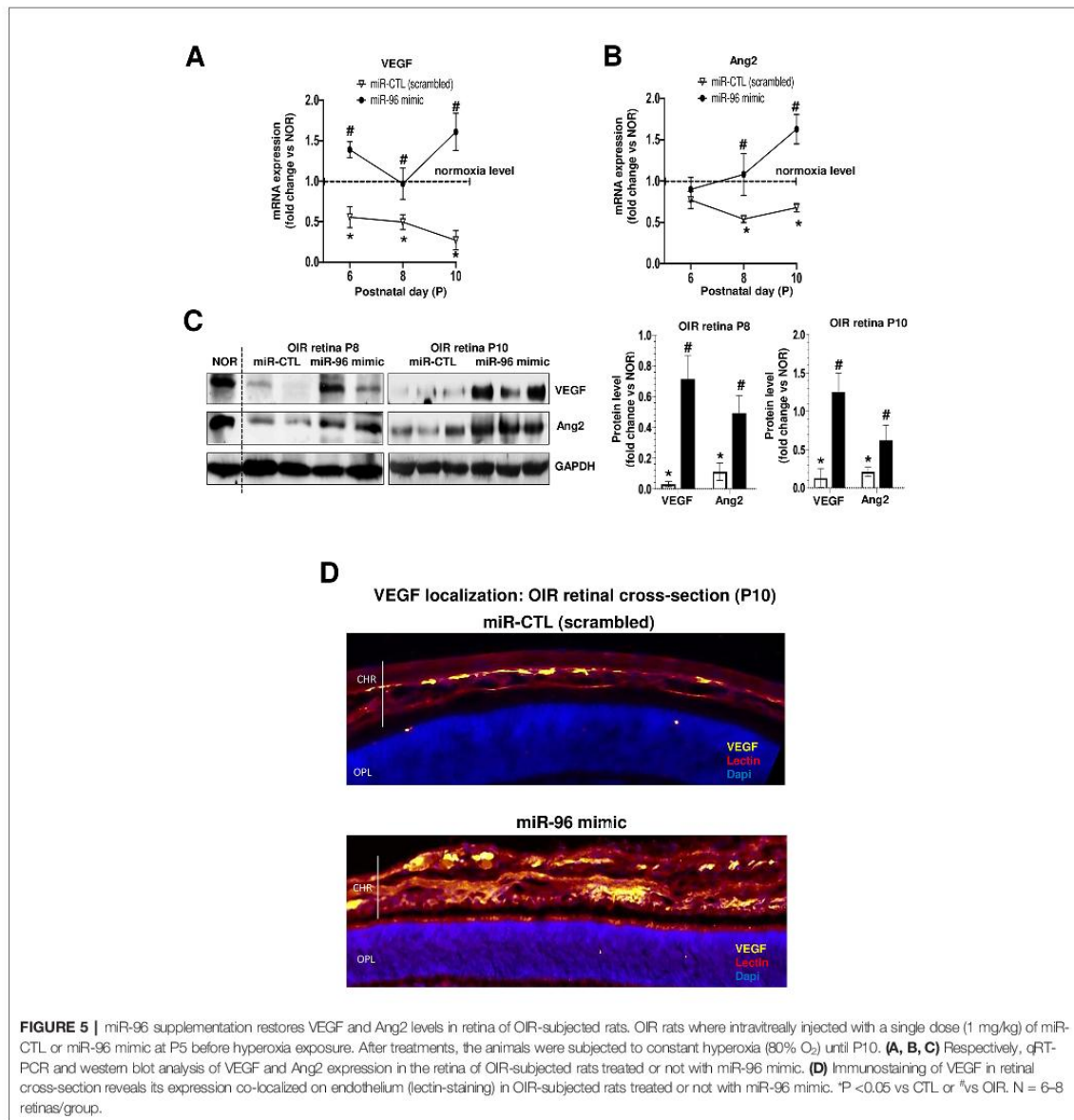
DISCUSSION

Although miRNAs are recognized as essential regulators of numerous genes resulting in the control of a variety of



physiologic and pathologic processes (O'Connell et al., 2010; Caporali and Emanuelli, 2012; Paul et al., 2018), their specific individual functions during OIR remain mostly unexplored. Recently, our group published a complete profiling of miRNAs in the retina and choroid during OIR that identified a serial of differentially expressed miRNAs during the two characteristic pathological phases in OIR (Rivera et al., 2015; Zhou et al., 2016;

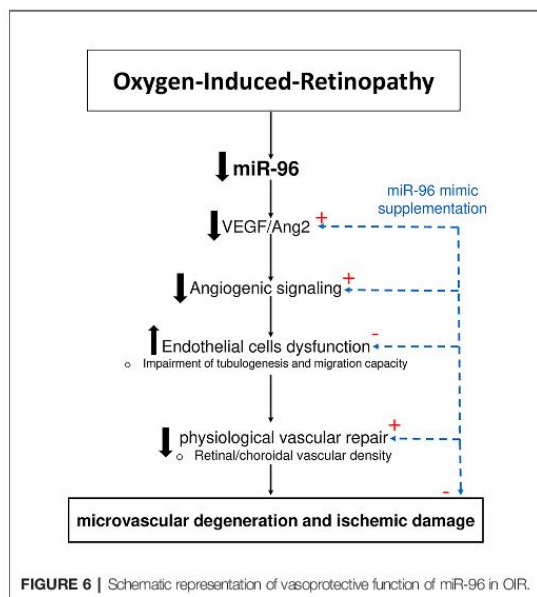
Desjarlais et al., 2019b). Here, we show that among these miRNAs, miR-96 was one of the most abundantly expressed miRNAs in the retina and choroid during ocular development. Furthermore, we found that miR-96 was downregulated in the retinal/choroidal tissues during the phase of vascular degeneration in OIR, inferring a potential critical role in the maintenance of ocular vasculature. Although previous studies



have reported that miR-96 is essential for the normal development of the auditory hindbrain (Schluter et al., 2018), integrity and maturation of photoreceptors (Xiang et al., 2017) and proliferation of cancer cells (Lin et al., 2010), its implications in angiogenesis were still unknown. In the current study, we show that miR-96 is important for endothelial cell maintenance and proliferation. During hyperoxia-associated retinal and choroidal vascular decay, miR-96 is suppressed and along with its key angiogenic factors VEGF, Ang2 and FGF-2, resulting in

curtailed endothelial function; supplementation with miR-96 (using a mimic) restored retinal and choroidal vasculature *in vivo* in model of OIR, as well as its angiogenic capacity (*ex vivo*), consistent with recently described restitution of choroidal angiogenic property by growth factors in OIR (Zhou et al., 2019). These properties of miR-96 in OIR are depicted in a schematic diagram (Figure 6).

miR-96 has been found to be modulated during various clinical conditions. For instance, miR-96 is upregulated in the retina of



streptozotocin-induced diabetes rats (Wu et al., 2012) and in the plasma of type-2 diabetic patients (Yang et al., 2017), while miR-96 is downregulated in the RHO-mouse retina, a model for common form of inherited blindness (Palfi et al., 2016). In addition, hypoxic conditions in cancer cells have shown to modify the expression profiling of miRNAs (Shen et al., 2013; Bandara et al., 2017). In breast and prostatic cancer cell lines, miR-96 has been found to be increased by hypoxia and play a role in the regulation of autophagy process (Ma et al., 2014; Shi et al., 2017). In another study a miR-183-96-182 cluster overexpressed the master regulator of angiogenesis HIF-1 α augmenting tumour progression and angiogenesis (Li et al., 2015). It is thus possible that augmented levels of VEGF/FGF-2/Ang2 in endothelial cells supplemented with miR-96 can be associated to the activation of miR-96/HIF-1 signalling; this has yet to be investigated.

Several miRNAs are modulated by reactive oxygen species (ROS) (He and Jiang, 2016; Banerjee et al., 2017), as reported in inflammation (Sonkoly and Pivarcsi, 2009), cardiovascular conditions including stroke, and in post-occlusion revascularization (Magenta et al., 2013; Jaksik et al., 2014; Gong et al., 2018). Hyperoxia in the newborn leads to a systematic increase in ROS (Kwak et al., 2006). We postulate that these ROS can downregulate miR-96 as occurs with other miRNAs under oxidative stress conditions (Magenta et al., 2013; Jaksik et al., 2014). For instance, miR-96 in human retinal pigment epithelial cell stimulated with hydrogen peroxide (ROS inducer), was found to be strongly downregulated (Ayaz and Dinc, 2018). Conversely, overexpression of the miR-183/96/182 cluster resulted in a decreased production of nitrite and ROS by macrophage (Muraleedharan et al., 2019) and a neuroprotective role in the brain, by positively regulating glutathione (GSH) levels, a major

tissue antioxidant (Kinoshita et al., 2014). Collectively, these studies support the possibility that miR-96 can be decreased in hyperoxic/oxidative stress conditions; this does not exclude other mechanisms such as extracellular vesicles (Liu and Lu, 2015; Battaglia et al., 2019).

The present study is the first to show that miRNA-based therapy is beneficial in preserving vasculature during the (first) obliterative phase of OIR. Others have shown efficacy of miRNAs-based therapies to inhibit pathological neovascularization (Bai, Bai et al., 2011; Chen et al., 2017; Liu et al., 2019), but not in prevention of vascular decay. In this context miR-96-regulated VEGF and Ang2 play a critical role. Interestingly, studies have shown that VEGF and Ang-2 play a synergistic role in angiogenic stimulation (Bhaskar et al., 2013) and that conversely the dual inhibition of these factors leads to significant vascular failure (Coutelle et al., 2015; Regula et al., 2016). Consistently with our results, some studies have previously described a proangiogenic role of miR-96 in different cancer cell lines by targeting different genes with antiangiogenic functions. For example, miR-96 was reported to suppress PTPN9 (Hong et al., 2016), an important anti-angiogenic phosphatase involved in the inactivation of STAT3 (Yuan et al., 2010), a key proangiogenic transcriptional factor (Chen and Han, 2008). As is known a constitutive activation of STAT3 leads to upregulation of VEGF (Niu et al., 2002). Here, we observed a consistent increase on VEGF levels with miR-96 mimic stimulation. In addition, another study demonstrates that suppression of PTPN9 by miR-126 in endothelial cells in a mice model of angiogenesis and neurogenesis ischemia, induced the activation of AKT and ERK signaling, two major signaling pathway promoting cellular migration, proliferation and survival (Qu et al., 2019). As it is well known that HIF1 α acting as a key pro-angiogenic transcriptional factor activated by hypoxia and translocated to the nucleus to induce the production of several endothelial growth factors, a recent study reported that miR-182, a member of miR-96/182/183 cluster, directly suppresses the expression of prolyl hydroxylase domain enzymes (PHD) and the inhibiting factor HIF-1 (FIH1) in prostatic tumor cells causing a marked increase in HIF1 α activity (Li et al., 2015). Based on this finding, it's possible to speculate that miR-96 can also target varied negative regulators of HIF1 α activities. Other potential antiangiogenic factors regulated by miR-96 include OXO1, FOXO3, RECK, EphrinA5 and SAMD9 (Hong et al., 2016). In this context, FOX family can be negatively regulated in part by FGF-2/IGF-2, and other FOX members (Essaghir et al., 2009), suggesting a complex autoregulation mechanism between miR-96/FOX/angiogenic factor. While RECK represses the expression of MMP-2 and MMP-9 (Chang et al., 2008), and EphrinA5 (Wang et al., 2016) is important in regulating endothelial migration, survival and proliferation (Hara et al., 2010). The precise mechanism by which miR-96 regulates VEGF/Ang2/FGF-2 needs further investigations.

In summary, the current study demonstrates for the first time that miR-96 regulates the expression of angiogenic factors (VEGF/Ang-2) associated with the maintenance of retinal and choroidal microvasculature during physiological and pathological conditions that lead to vascular decay. Supplementation of miR-96 mimic could constitute a novel therapeutic strategy to improve vascular repair in OIR and other ischemic retinopathies.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data generated for this article can be found in NCBI using the accession number GSE129995.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Care Committee of the Hospital Maisonneuve-Rosemont in accordance with guidelines established by the Canadian Council on Animal Care.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceived and designed the study: MD and SC. Wrote the manuscript: MD, SC, JR. Directed and planned the experiments:

MD. Performed the experiments: MD and MW, assisted by JR, RD, IL, PR, SO, CB. Analysed the data: MD, JR, SC.

FUNDING

MD is a recipient of a post-doctoral fellowship award from Hôpital Maisonneuve-Rosemont and from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal. MW is a recipient of a bursary from Université de Lorraine, Nancy, France. JR was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada and the Canadian Stroke Network. RD is recipient of an award of Excellence from the Vision Health Network of Quebec. SC holds a Canada Research Chair (Vision Science) and the Leopoldine Wolfe Chair in translational research in age-related macular degeneration. The study was financed by grants from Canadian Institutes of Health Research (grant number—MOP12532), March of Dimes Birth Defects Foundation, Fonds de la Recherche en Santé Québec—Santé (FRQS)/Québec Vision Health Network (grantee: SC).

REFERENCES

- Ayaz, L., and Dinc, E. (2018). Evaluation of microRNA responses in ARPE-19 cells against the oxidative stress. *Cutan Ocul. Toxicol.* 37 (2), 121–126. doi: 10.1080/15569527.2017.1355314
- Bai, Y., Bai, X., Wang, Z., Zhang, X., Ruan, C., and Miao, J. (2011). MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. *Exp. Mol. Pathol.* 91 (1), 471–477. doi: 10.1016/j.yexmp.2011.04.016
- Bandara, K. V., Michael, M. Z., and Gleadle, J. M. (2017). MicroRNA biogenesis in hypoxia. *Micromia* 6 (2), 80–96. doi: 10.2174/2211536606666170313114821
- Banerjee, J., Khanna, S., and Bhattacharya, A. (2017). MicroRNA regulation of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 2872156. doi: 10.1155/2017/2872156
- Battaglia, R., Palini, S., Vento, M. E., La Ferlita, A., Lo Faro, M. J., Caroppo, E., et al. (2019). Identification of extracellular vesicles and characterization of miRNA expression profiles in human blastocoe fluid. *Sci. Rep.* 9 (1), 84. doi: 10.1038/s41598-018-36452-7
- Beaudry-Richard, A., Nadeau-Vallee, M., Prairie, E., Maurice, N., Heckel, E., Nezhady, M., et al. (2018). Antenatal IL-1-dependent inflammation persists postnatally and causes retinal and sub-retinal vasculopathy in progeny. *Sci. Rep.* 8 (1), 11875. doi: 10.1038/s41598-018-30087-4
- Bhaskar, A., Gupta, R., Sreenivas, V., Rani, L., Kumar, L., Sharma, A., et al. (2013). Synergistic effect of vascular endothelial growth factor and angiopoietin-2 on progression free survival in multiple myeloma. *Leuk. Res.* 37 (4), 410–415. doi: 10.1016/j.leukres.2012.12.014
- Cabral, T., Mello, L. G. M., Lima, L. H., Polido, J., Regatieri, C. V., Belfort, R. Jr., et al. (2017). Retinal and choroidal angiogenesis: a review of new targets. *Int. J. Retina Vitreous* 3, 31. doi: 10.1186/s40942-017-0084-9
- Caporali, A., and Emanuelli, C. (2012). MicroRNAs in postischemic vascular repair. *Cardiol. Res. Pract.* 2012, 486702. doi: 10.1155/2012/486702
- Chang, C. K., Hung, W. C., and Chang, H. C. (2008). The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Cell. Mol. Med.* 12 (6b), 2781–2789. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00215.x
- Chen, Z., and Han, Z. C. (2008). STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis. *Med. Res. Rev.* 28 (2), 185–200. doi: 10.1002/med.20101
- Chen, Q., Qiu, F., Zhou, K., Matlock, H. G., Takahashi, Y., Rajala, R. V. S., et al. (2017). Pathogenic role of microRNA-21 in diabetic retinopathy through downregulation of pparalpha. *Diabetes* 66 (6), 1671–1682. doi: 10.2337/db16-1246
- Coutelle, O., Schiffmann, L. M., Liwischitz, M., Brunold, M., Goede, V., Hallek, M., et al. (2015). Dual targeting of Angiopoietin-2 and VEGF potentiates effective vascular normalisation without inducing empty basement membrane sleeves in xenograft tumours. *Br. J. Cancer* 112 (3), 495–503. doi: 10.1038/bjc.2014.629
- Desjarlais, M., Dussault, S., Dhahri, W., Mathieu, R., and Rivard, A. (2017). MicroRNA-150 modulates ischemia-induced neovascularization in atherosclerotic conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (5), 900–908. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.309189
- Desjarlais, M., Dussault, S., Rivard, F., Harel, S., Sanchez, V., Hussain, S. N. A., et al. (2019a). Forced expression of microRNA-146b reduces TRAF6-dependent inflammation and improves ischemia-induced neovascularization in hypercholesterolemic conditions. *Atherosclerosis* 289, 73–84. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.08.010
- Desjarlais, M., Rivera, J. C., Lahaie, I., Cagnone, G., Wirt, M., Omri, S., et al. (2019b). MicroRNA expression profile in retina and choroid in oxygen-induced retinopathy model. *PLoS One* 14 (6), e0218282. doi: 10.1371/journal.pone.0218282
- Erol, M. K., Coban, D. T., Ozdemir, O., Dogan, B., Tunay, Z. O., and Bulut, M. (2016). Choroidal Thickness In Infants With Retinopathy Of Prematurity. *Retina* 36 (6), 1191–1198. doi: 10.1097/IAE.0000000000000866
- Essaghir, A., Dif, N., Marbehant, C. Y., Colfer, P. J., and Demoulin, J. B. (2009). The transcription of FOXO genes is stimulated by FOXO3 and repressed by growth factors. *J. Biol. Chem.* 284 (16), 10334–10342. doi: 10.1074/jbc.M808848200
- Fernández-Hernando, C., and Suárez, Y. (2018). MicroRNAs in endothelial cell homeostasis and vascular disease. *Curr. Opin. Hematol.* 25 (3), 227–236. doi: 10.1097/MOH.0000000000000424
- Gong, Y. Y., Luo, J. Y., Wang, L., and Huang, Y. (2018). MicroRNAs regulating reactive oxygen species in cardiovascular diseases. *Antioxid. Redox Signal* 29 (11), 1092–1107. doi: 10.1089/ars.2017.7328
- Hara, Y., Nomura, T., Yoshizaki, K., Frisen, J., and Osumi, N. (2010). Impaired hippocampal neurogenesis and vascular formation in ephrin-A5-deficient mice. *Stem Cells* 28 (5), 974–983. doi: 10.1002/stem.427
- He, J., and Jiang, B. H. (2016). Interplay between reactive oxygen species and MicroRNAs in cancer. *Curr. Pharmacol. Rep.* 2 (2), 82–90. doi: 10.1007/s40495-016-0051-4

- Hong, Y., Liang, H., Uzair Ur, R., Wang, Y., Zhang, W., Zhou, Y., et al. (2016). miR-96 promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PTPN9 in breast cancer. *Sci. Rep.* 6, 37421. doi: 10.1038/srep37421
- Hosseini, N., Aghapour, M., Duijf, P. H. G., and Baradaran, B. (2018). Treating cancer with microRNA replacement therapy: a literature review. *J. Cell Physiol.* 233 (8), 5574–5588. doi: 10.1002/jcp.26514
- Isner, J. M., and Asahara, T. (1999). Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J. Clin. Invest.* 103 (9), 1231–1236. doi: 10.1172/JCI6889
- Iwai, N., Yasui, K., Tomie, A., Gen, Y., Terasaki, K., Kitaichi, T., et al. (2018). Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Oncol.* 53 (1), 237–245. doi: 10.3892/ijo.2018.4369
- Jaksik, R., Lalik, A., Skonieczna, M., Cieslar-Pobuda, A., Student, S., and Rzeszowska-Wolny, J. (2014). MicroRNAs and reactive oxygen species: are they in the same regulatory circuit? *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 764–765: 64–71. doi: 10.1016/j.mrgentox.2013.09.003
- Kinoshita, C., Aoyama, K., Matsumura, N., Kikuchi-Utsumi, K., Watabe, M., and Nakaki, T. (2014). Rhythmic oscillations of the microRNA miR-96-5p play a neuroprotective role by indirectly regulating glutathione levels. *Nat. Commun.* 5, 3823. doi: 10.1038/ncomms4823
- Kwak, D. J., Kwak, S. D., and Gauda, E. B. (2006). The effect of hyperoxia on reactive oxygen species (ROS) in rat petrosal ganglion neurons during development using organotypic slices. *Pediatr. Res.* 60 (4), 371–376. doi: 10.1203/01.pdr.0000239817.39407.61
- Li, Y., Zhang, D., Wang, X., Yao, X., Ye, C., Zhang, S., et al. (2015). Hypoxia-inducible miR-182 enhances HIF1 α signaling via targeting PHD2 and FIH1 in prostate cancer. *Sci. Rep.* 5, 12495. doi: 10.1038/srep12495
- Lin, H., Dai, T., Xiong, H., Zhao, X., Chen, X., Yu, C., et al. (2010). Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a. *PLoS One* 5 (12), e15797. doi: 10.1371/journal.pone.0015797
- Liu, Y., and Lu, Q. (2015). Extracellular vesicle microRNAs: biomarker discovery in various diseases based on RT-qPCR. *Biomark Med.* 9 (8), 791–805. doi: 10.2217/BMM.15.45
- Liu, C. H., Wang, Z., Huang, S., Sun, Y., and Chen, J. (2019). MicroRNA-145 regulates pathological retinal angiogenesis by suppression of TMOD3. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 16, 335–347. doi: 10.1016/j.omtn.2019.03.001
- Ma, Y., Yang, H. Z., Dong, B. J., Zou, H. B., Zhou, Y., Kong, X. M., et al. (2014). Biphasic regulation of autophagy by miR-96 in prostate cancer cells under hypoxia. *Oncotarget* 5 (19), 9169–9182. doi: 10.18632/oncotarget.2396
- Magenta, A., Greco, S., Gaetano, C., and Martelli, F. (2013). Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (9), 17319–17346. doi: 10.3390/ijms140917319
- Muralidharan, C. K., McClellan, S. A., Ekanayaka, S. A., Francis, R., Zmejkoski, A., Hazlett, L. D., et al. (2019). The miR-183/96/182 cluster regulates macrophage functions in response to *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Innate Immun.* 11 (4), 347–358. doi: 10.1159/000495472
- Niu, G., Wright, K. L., Huang, M., Song, L., Haura, E., Turkson, J., et al. (2002). Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21 (13), 2000–2008. doi: 10.1038/sj.onc.1205260
- O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., and Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2), 111–122. doi: 10.1038/nri2708
- Palfi, A., Hokamp, K., Hauck, S. M., Vencken, S., Millington-Ward, S., Chadderton, N., et al. (2016). microRNA regulatory circuits in a mouse model of inherited retinal degeneration. *Sci. Rep.* 6, 31431. doi: 10.1038/srep31431
- Paul, P., Chakraborty, A., Sarkar, D., Langthasa, M., Rahman, M., Bari, M., et al. (2018). Interplay between miRNAs and human diseases. *J. Cell Physiol.* 233 (3), 2007–2018. doi: 10.1002/jcp.25854
- Qiu, L., Tan, E. K., and Zeng, L. (2015). microRNAs and neurodegenerative diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 888, 85–105. doi: 10.1007/978-3-31922671-2_6
- Qu, M., Pan, J., Wang, L., Zhou, P., Song, Y., Wang, S., et al. (2019). MicroRNA-126 regulates angiogenesis and neurogenesis in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 16, 15–25. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.002
- Regula, J. T., Lundh von Leithner, P., Foxton, R., Barathi, V. A., Cheung, C. M., Bo Tun, S. B., et al. (2016). Targeting key angiogenic pathways with a bispecific CrossMAB optimized for neovascular eye diseases. *EMBO Mol. Med.* 8 (11), 1265–1288. doi: 10.15252/emmm.201505889
- Rivera, J. C., Noueheid, B., Omri, S., Barrueco, J., Hilberg, F., and Chemtob, S. (2015). BIBF1120 (vargatef) inhibits preretinal neovascularization and enhances normal vascularization in a model of vasoproliferative retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56 (13), 7897–7907. doi: 10.1167/iov.15-17146
- Rivera, J. C., Dabouz, R., Noueheid, B., Omri, S., Tahiri, H., and Chemtob, S. (2017a). Ischemic retinopathies: oxidative stress and inflammation. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017, 3940241. doi: 10.1155/2017/3940241
- Rivera, J. C., Holm, M., Austeng, D., Morken, T. S., Zhou, T. E., Beaudry-Richard, A., et al. (2017b). Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. *J. Neuroinflammation* 14 (1), 165. doi: 10.1186/s12974-017-0943-1
- Sapieha, P., Sirinyan, M., Hamel, D., Zaniolo, K., Joyal, J. S., Cho, J. H., et al. (2008). The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat. Med.* 14 (10), 1067–1076. doi: 10.1038/nm.1873
- Sapieha, P., Joyal, J. S., Rivera, J. C., Kermorant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Hardy, P., et al. (2010). Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J. Clin. Invest.* 120 (9), 3022–3032. doi: 10.1172/JCI42142
- Schluter, T., Berger, C., Rosengauer, E., Fieth, P., Krohs, C., Ushakov, K., et al. (2018). miR-96 is required for normal development of the auditory hindbrain. *Hum. Mol. Genet.* 27 (5), 860–874. doi: 10.1093/hmg/ddy007
- Shao, Z., Dorfman, A. L., Seshadri, S., Djavari, M., Kermorant-Duchemin, E., Sennlaub, F., et al. (2011). Choroidal involution is a key component of oxygen-induced retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52 (9), 6238–6248. doi: 10.1167/iov.10-6742
- Shao, Z., Friedlander, M., Hurst, C. G., Cui, Z., Pei, D. T., Evans, L. P., et al. (2013). Choroid sprouting assay: an ex vivo model of microvascular angiogenesis. *PLoS One* 8 (7), e69552. doi: 10.1371/journal.pone.0069552
- Shen, G., Li, X., Jia, Y. F., Piazza, G. A., and Xi, Y. (2013). Hypoxia-regulated microRNAs in human cancer. *Acta Pharmacol. Sin.* 34 (3), 336–341. doi: 10.1038/aps.2012.195
- Shi, Y., Zhao, Y., Shao, N., Ye, R., Lin, Y., Zhang, N., et al. (2017). Overexpression of microRNA-96-5p inhibits autophagy and apoptosis and enhances the proliferation, migration and invasiveness of human breast cancer cells. *Oncol. Lett.* 13 (6), 4402–4412. doi: 10.3892/ol.2017.6025
- Sonkoly, E., and Pivarcsi, A. (2009). microRNAs in inflammation. *Int. Rev. Immunol.* 28 (6), 535–561. doi: 10.3109/08830180903208303
- Wang, T. H., Yeh, C. T., Ho, J. Y., Ng, K. F., and Chen, T. C. (2016). OncomiR miR-96 and miR-182 promote cell proliferation and invasion through targeting ephrinA5 in hepatocellular carcinoma. *Mol. Carcinog.* 55 (4), 366–375. doi: 10.1002/mc.22286
- Wang, Y., Wu, S., Yang, Y., Peng, F., Li, Q., Tian, P., et al. (2017). Differentially expressed miRNAs in oxygen-induced retinopathy newborn mouse models. *Mol. Med. Rep.* 15 (1), 146–152. doi: 10.3892/mmr.2016.5993
- Wu, J. H., Gao, Y., Ren, A. J., Zhao, S. H., Zhong, M., Peng, Y. J., et al. (2012). Altered microRNA expression profiles in retinas with diabetic retinopathy. *Ophthalmic Res.* 47 (4), 195–201. doi: 10.1159/000331992
- Wu, W. C., Shih, C. P., Wang, N. K., Lien, R., Chen, Y. P., Chao, A. N., et al. (2013). Choroidal thickness in patients with a history of retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol.* 131 (11), 1451–1458. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2013.5052
- Xiang, L., Chen, X. J., Wu, K. C., Zhang, C. J., Zhou, G. H., Lv, J. N., et al. (2017). miR-183/96 plays a pivotal regulatory role in mouse photoreceptor maturation and maintenance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (24), 6376–6381. doi: 10.1073/pnas.1618757114
- Yang, Z. M., Chen, L. H., Hong, M., Chen, Y. Y., Yang, X. R., Tang, S. M., et al. (2017). Serum microRNA profiling and bioinformatics analysis of patients with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Mol. Med. Rep.* 15 (4), 2143–2153. doi: 10.3892/mmr.2017.6239
- Yuan, T., Wang, Y., Zhao, Z. J., and Gu, H. (2010). Protein-tyrosine phosphatase PTPN9 negatively regulates ErbB2 and epidermal growth factor receptor signaling in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 285 (20), 14861–14870. doi: 10.1074/jbc.M109.099879

- Zhou, T. E., Rivera, J. C., Bhosle, V. K., Lahaie, I., Shao, Z., Tahiri, H., et al. (2016). Choroidal involution is associated with a progressive degeneration of the outer retinal function in a model of retinopathy of prematurity: early role for IL-1beta. *Am. J. Pathol.* 186 (12), 3100–3116. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.08.004
- Zhou, S. S., Jin, J. P., Wang, J. Q., Zhang, Z. G., Freedman, J. H., Zheng, Y., et al. (2018). miRNAs in cardiovascular diseases: potential biomarkers, therapeutic targets and challenges. *Acta Pharmacol. Sin.* 39 (7), 1073–1084. doi: 10.1038/aps.2018.30
- Zhou, T. E., Zhu, T., Rivera, J. C., Omri, S., Tahiri, H., Lahaie, I., et al. (2019). The inability of the choroid to revascularize in oxygen-induced retinopathy results from increased p53/miR-Let-7b activity. *Am. J. Pathol.* 189 (11), 2340–2356. doi: 10.1016/j.ajpath.2019.07.009

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Desjarlais, Wirth, Rivera, Lahaie, Dabouz, Omri, Ruknudin, Borrás and Chemtob. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

3. Article *Nutraceutical targeting of inflammation-modulating microRNAs in severe forms of COVID-19: A novel approach tu prevent the cytokine storm*



Nutraceutical Targeting of Inflammation-Modulating microRNAs in Severe Forms of COVID-19: A Novel Approach to Prevent the Cytokine Storm

Michel Desjarlais^{1,2*}, Maëlle Wirth^{1,2}, Isabelle Lahaie¹, Pakiza Ruknudin¹, Pierre Hardy², Alain Rivard^{3†} and Sylvain Chemtob^{1,2†}

OPEN ACCESS

Edited by:

Emanuela Ricciotti,
University of Pennsylvania,
United States

Reviewed by:

Pallavi R. Devchand,
University of Calgary, Canada
Melania Dovizio,
University of Studies G. d'Annunzio
Chieti and Pescara, Italy

*Correspondence:

Michel Desjarlais

[†]These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Inflammation Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 07 September 2020

Accepted: 17 November 2020

Published: 11 December 2020

Citation:

Desjarlais M, Wirth M, Lahaie I,
Ruknudin P, Hardy P, Rivard A and
Chemtob S (2020) Nutraceutical
Targeting of Inflammation-Modulating
microRNAs in Severe Forms of COVID-
19: A Novel Approach to Prevent the
Cytokine Storm.
Front. Pharmacol. 11:602999.
doi: 10.3389/fphar.2020.602999

¹Department of Ophthalmology, Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Center, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, ² Departments of Pediatrics, Ophthalmology and Pharmacology, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine Research Center, Montréal, QC, Canada, ³Department of Medicine, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center, Montréal, QC, Canada

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic has become the number one health problem worldwide. As of August 2020, it has affected more than 18 million humans and caused over 700,000 deaths worldwide. COVID-19 is an infectious disease that can lead to severe acute respiratory syndrome. Under certain circumstances, the viral infection leads to excessive and uncontrolled inflammatory response, which is associated with the massive release of inflammatory cytokines in pulmonary alveolar structures. This phenomenon has been referred to as the “cytokine storm,” and it is closely linked to lung injury, acute respiratory syndrome and mortality. Unfortunately, there is currently no vaccine available to prevent the infection, and no effective treatment is available to reduce the mortality associated with the severe form of the disease. The cytokine storm associated with COVID-19 shows similarities with those observed in other pathologies such as sepsis, acute respiratory distress syndrome, acute lung injury and other viral infection including severe cases of influenza. However, the specific mechanisms that cause and modulate the cytokine storm in the different conditions remain to be determined. micro-RNAs are important regulators of gene expression, including key inflammatory cytokines involved in the massive recruitment of immune cells to the lungs such as IL1 β , IL6, and TNF α . In recent years, it has been shown that nutraceutical agents can modulate the expression of miRNAs involved in the regulation of cytokines in various inflammatory diseases. Here we review the potential role of inflammatory-regulating-miRNAs in the cytokine storm associated with COVID-19, and propose that nutraceutical agents may represent a supportive therapeutic approach to modulate dysregulated miRNAs in this condition, providing benefits in severe respiratory diseases.

Keywords: COVID-19, microRNA, inflammation, cytokine storm, nutraceuticals

INTRODUCTION: THE COVID-19 PANDEMIC AND THE NEED FOR NOVEL THERAPEUTIC APPROACHES

It started in December 2019, in Wuhan, China, with a cluster of cases showing clinical symptoms of viral pneumonia. Because of this presentation and in reference to its origin, this disease was initially referred to as “Wuhan pneumonia” by the press. After sequencing its genome, researchers uncovered a novel coronavirus, which was temporarily named by the World Health Organization (WHO) the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). It is the seventh member of the coronavirus family to infect humans. This new infectious disease was officially named Coronavirus disease 2019 (COVID-19) on February 12, 2020 (Liu et al., 2020). COVID-19 rapidly spread throughout the world and on March 11, 2020, WHO formally recognized the situation as a pandemic (WHO, Covid-19 reports/20200311-rep-51). On August 5, 2020, 18,318,928 cases of COVID-19 have been confirmed, including 695,043 deaths reported to the WHO.

In severe cases, deaths from COVID-19 have been found to be related to Acute Respiratory disease Syndrome (ARDS). Therefore, the International Committee on Taxonomy of Viruses referred to COVID-19 as Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). COVID-19 associated ARDS is accompanied by an uncontrolled cytokine storm, which results from the systemic release of large amounts of pro-inflammatory cytokines and chemokines by immune effector cells. The immune system attacks the host violently, causing multiple organ failure which can lead to death (Li et al., 2020).

So far, no specific treatments or anti-virus vaccines are available to treat SARS-CoV-2 infection. There is an intensive mobilization of researchers all around the world to elucidate the pathogenic mechanisms of this viral infection in order to develop a cure for this disease. Meanwhile, to mitigate the impact of this virus on morbidity and mortality, one possible avenue is to mitigate the inflammatory response in order to prevent the cytokine storm. One possibility would be to use nutraceuticals. Indeed, nutraceuticals have been shown to boost the immune system and fight viruses with encapsulated RNA such as coronavirus (McCarty and DiNicolantonio, 2020). Some nutraceutical agents are effective in suppressing inflammatory pathways by acting on the modulation of specific microRNAs (miRs) (Quintanilha et al., 2017), small noncoding RNAs that can regulate gene expression by degrading mRNAs or by inhibiting RNA translation to proteins. Several studies have shown that dysregulation of miR expression can alter various biological processes such as inflammation (He and Hannon, 2004; Lee and Dutta, 2009; Sonkoly and Pivarsci, 2009; Quintanilha et al., 2017). Moreover, dysregulation of miRs is now known to be involved in the development and the outcome of various diseases that can be associated with a cytokine storm including sepsis, ARDS, acute lung infection (ALI) and severe viral pneumonia (Quintanilha et al., 2017; Szilágyi et al., 2019; McCarty and DiNicolantonio, 2020). However, the role of miRs in the development of severe forms of COVID-19, as well as the potential use of nutraceuticals as therapeutic agents

to modulate inflammatory miRs remain to be explored. In this article we review the role of miRs in the modulation of inflammatory factors involved in the cytokine storm in severe forms of COVID-19, and explore the potential effect of nutraceuticals as alternative therapeutic approaches in this context.

PATHOPHYSIOLOGICAL ASPECTS OF COVID-19

Characteristics of Coronavirus and Classical Players Involved in Cytokine Storm

Morphologically, coronaviruses (CoVs) are single-strand RNA viruses with spherical or multifaced particle shapes. They contain on their surface a spike protein that is required to adhere and infect the host cells. CoVs are the largest RNA viruses identified, with a genome that contains ~13,000–16,000 base paired-end (Belouzard et al., 2012; Fehr and Perlman, 2015). Mechanistically, the positive viral RNA-strand serves as mRNA, allowing the production of its own replicase-transcriptase complex and also its structural proteins. Four main viral structural proteins called spike (S), envelope (E), membrane (M) and nucleocapsid (N) are found in CoVs (McBride et al., 2014). Additional viral accessory proteins are also important for the classification of CoVs. Seven CoVs members divided in two main types (α - or β -type) are able to infect humans with variations in terms of the efficiency of the infection, the specific clinical manifestations and the severity of the disease (McBride et al., 2014). The CoVs members associated with mild severity of upper respiratory tract infections include α -HCoV-229E, α -HCoV-NL63, α -HCoV-OC43 and β -HCoV-HKU1. More importantly, the members targeting the lower respiratory tract and associated with severe pathogenic acute respiratory distress syndrome (ARDS) potentially leading to fatal acute lung injury (ALI) include the β -SARS-CoV, β -MERS-CoV, and finally the β -2019-nCoV, also known as Covid-19 (van der Hoek et al., 2004; McBride et al., 2014; Jan et al., 2020; Wiersinga et al., 2020).

Over the past years, the cytokine storm has been identified as one of the common events found in critical acute pulmonary syndromes, but also as a key element in the pathogenicity and mortality related to ARDS/ALI following β -SARS-CoV and β -MERS-CoV infections (Gao et al., 2020; Tang et al., 2020). More recently, this cytokine storm has also been reported in severe forms of COVID-19 infection. In CoV infections, the cytokine storm is observed in the later stage of the infection, and is characterized by a rapid and uncontrolled release of several pro-inflammatory cytokines and chemokines by the infected lung tissue, leading to deregulated and excessive immune responses, critical inflammatory self-amplification circles, lung damage and in the more severe cases, mortality (Gao et al., 2020; Tang et al., 2020). Classically, several inflammatory factors are commonly involved in cytokine storm observed in β -SARS-CoV and β -MERS-CoV. Previous studies have shown that in the later stage of the infection, the expression level of the antiviral

factor interferon (INF) is reduced in peripheral blood, lung epithelial cells, dendritic cells, and resident macrophages (Vabret et al., 2020). This is associated with a disproportionate increase in the production of the main pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF α , and the chemokines CCL-2, -3 and -5 (Mehta et al., 2020; Vabret et al., 2020; Ye et al., 2020). These factors lead to amplification of the inflammatory circle by promoting the recruitment in infected lungs of more monocytes, macrophages, and neutrophils which in turn can produce the same cytokines and chemokines, leading to excessive and sustained inflammatory tissue damage. In the serum of covid-19 patients with bilateral pneumonia and ARDS, recent studies have identified higher expression levels of IL-1 β , IL-6, INF- γ , IP-10, gm-CSF, TNF α , and MCP-1 (Johnson and Laloraya, 2020; Mehta et al., 2020; Ye et al., 2020). Importantly, IL-6 has been identified by researchers around the world as a key primary factor involved in Covid-19 cytokine storm, and it is also highly correlated to the pathogenic progression of ARDS (Grifoni et al., 2020; Magro, 2020; Zhang et al., 2020). Moreover, other studies have established a correlation between the serum cytokine levels, the degree of ALI and mortality rates. Together, these observations suggest that the extrapulmonary organ failures observed in severe forms of COVID-19 could at least partly be related to these excessive levels of cytokines that can recirculate in the peripheral blood and reach distant organs to induce tissue damage. We next focused to compiled differentially-analysis on patient with Covid-19 severe form to identify specific key inflammatory factors and immune cells, recently identified to drive the cytokine storm.

Most Common Cytokines Identified in Severe Forms of Covid-19 Disease

The cytokine storm associated with severe forms of CoVs infections such as SARS and MERS represents a complex pathological condition involving serious pulmonary complication due to massive recruitment and infiltration of immune cells in pulmonary tissues (Gao et al., 2020; Ye et al., 2020). This can lead to epithelial and endothelial cell death, which in turn causes vascular leakage and ALI. In the case of covid-19 infection, specific biomarkers and mechanisms have recently been identified. For example, a strong upregulation of the proinflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , and IL-6 was found in patients presenting severe forms of COVID-19 compared to patients with milder forms (Gao et al., 2020; Tang et al., 2020; Vabret et al., 2020). This observation suggests that these three cytokines act as key mediators of increased immune cell infiltration in the lung. These cytokines can be produced by a variety of cell types including B- and T-lymphocytes, monocytes and macrophages, dendritic cells as well as non-immune cells such as fibroblasts and endothelial cells (Sokol and Luster, 2015). Interestingly, IL-6 production is also induced by TNF- α and IL-1 acting as main activators (Confalone et al., 2010). Other signaling pathways including Toll-like receptor (TLR), prostaglandins, ROS and other cytokines can also trigger the production of IL-6 (Turner et al., 2014). Other proinflammatory factors such as IL-2, IL-7, MCP-1, GM-CSF and MIP-1a were reported to be

increased in the peripheral blood of COVID-19 patients with severe forms of the diseases (Lingeswaran et al., 2020). This was also correlated with the severity of the disease. All of these factors are associated with immune cell recruitment that can amplify the acute and sustained inflammatory state in the lungs. Interestingly, other studies have observed an important lymphopenia characterized by a drastic decrease of CD4⁺ and CD8⁺ cells in patients with severe forms of COVID-19 (Tavakolpour et al., 2020). This was often associated with decreased circulating levels of IFN- γ , which is known to have antiviral properties by stimulating the recruitment of lymphocytes. In contrast, high leukocyte numbers and increased cytokine production have also been documented in patients with severe forms of COVID-19 (Lingeswaran et al., 2020; Mehta et al., 2020). However, in patients who died from the most severe form of COVID-19, it has been shown that monocytes and macrophages are the predominant immune cell types in lung infiltrates (Merad and Martin, 2020).

microRNA: Small RNAs With Major Impact on Gene Expression

MicroRNA (miR or miRNA) are small non-coding single-stranded RNAs of 20–22 nucleotides that negatively regulate the expression of more than 60% of genes (Catalanotto et al., 2016). They act by degrading their target mRNA or by inhibiting its translation (Almeida et al., 2011). Due to their regulatory functions, they are involved in the majority of biological processes including development, growth, metabolism, survival, apoptosis, tissue repair, angiogenesis and, notably immune response and inflammatory processes (Lee and Dutta, 2009; Sonkoly and Pivarsci, 2009; Almeida et al., 2011; Caporali and Emanuelli, 2012). Over the past decade, advances in genomics and bioinformatic technologies have revolutionized the understanding of miR mechanisms of action. Notably, their roles as regulators of gene expression has been the subject of numerous studies (Giza et al., 2014). Historically, the first miR was discovered in 1993 by the Ambros group, who identified miR lin-4 in a *c. elegans* model (Lee et al., 1993; Almeida et al., 2011). However, it was not until a decade later that the physiological and pathological expression profile and function of specific miRs were investigated. In 2010, approximately 2,200 miRs in mammals and more than 1,000 miRs in humans were identified (Ardekani and Naeini, 2010). However, identification of new miRs seems to be constantly evolving since in 2015, such that to date approximately 2,500 miRs have been identified in humans (Friedländer et al., 2014). Importantly, it is now accepted that the epigenetic modulation of miR expression plays an important role in multiple pathological processes, including the immune response after viral infections.

miR Biogenesis and Mechanism of Action

miRs are generally described as intergenic or intronic according to their genomic location (Figure 1). Intergenic miRs are transcribed by independent transcription units (TU). In the case of intronic miRs, they are transcribed at the same time as host genes generally coding for a protein (Ramalingam et al.,

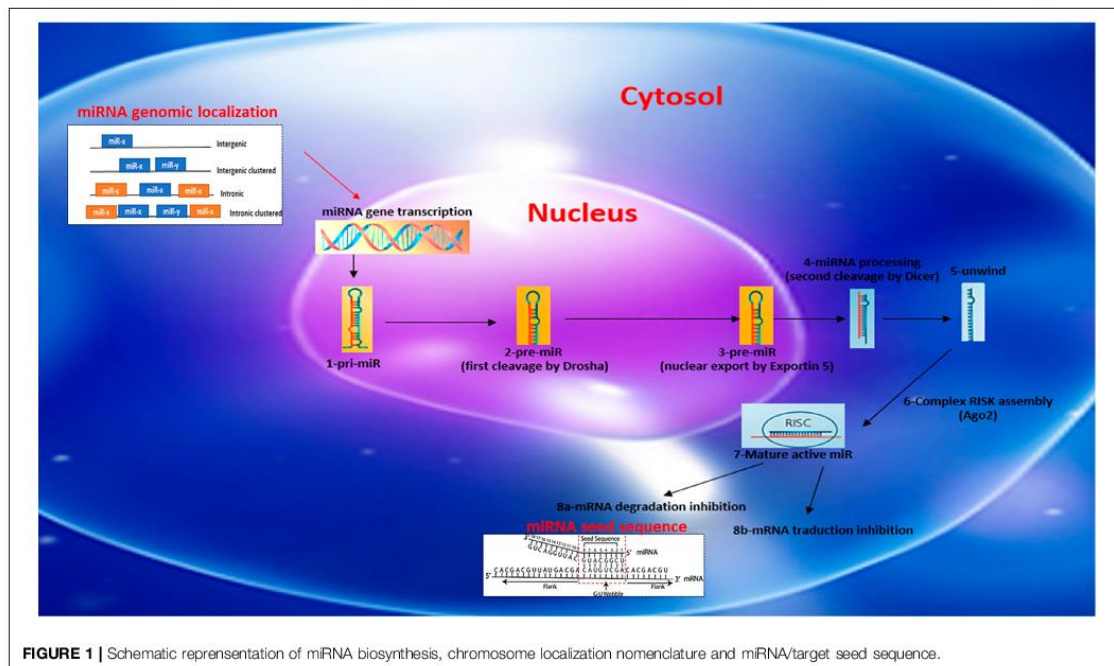


FIGURE 1 | Schematic representation of miRNA biosynthesis, chromosome localization nomenclature and miRNA/target seed sequence.

2014). miRs are synthesized autonomously from their own promoter sequences located between the genes—a process labeled as the canonical synthetic pathway (Figure 1). They can be transcribed alone or at the same time as other miRs located nearby, on the same “cluster” sharing a common promoter. The autonomous biogenesis of miRs by the canonical pathway begins with the transcription of a long primary transcript (pri-miR) of variable size and a stem-loop structure mediated by RNA polymerase 2. The pri-miR is then cleaved in the nucleus by an RNase complex (Drosha/DGCR8) to generate a precursor miR (pre-miR) of 70 nucleotides in length. The pre-miR is then exported from the nucleus to the cytoplasm by exportin-5 to undergo an enzymatic process. This second cleavage is mediated by the enzyme dicer and makes it possible to eliminate the stem-loop and to generate a mature miR duplex (double strand) of 22 nucleotides. The 5' strand is called the guide strand, while the 3' strand is called the passenger strand. Subsequently, one of the two strands will be incorporated into the RISC effector complex (RNA-induced silencing complex) with the help of a protein from the Argonaute family (Ago2). Ago2 also facilitates the binding of miRs to the target mRNA, leading to its subsequent repression. miRs recognize and bind their target mRNAs on the 3'UTR region using a specific sequence of eight nucleotides located on the 5'-UTR region of the miR called the “seed sequence” (Figure 1). The mechanisms of repression of target mRNAs are not fully defined. It is generally accepted that if the miR/mRNA pairing is perfectly complementary, the target mRNA will be degraded. In the case of an imperfect pairing, translation will be inhibited by various mechanisms. In both

cases, the expression of the target gene will be downregulated. miRs generally have around 100 targets (mRNA) (Friedman et al., 2009; Friedländer et al., 2014; Giza et al., 2014; Ramalingam et al., 2014). The mature miRs and the pre-miRs can be localized in the cells or secreted by it in the circulation in a free form or sequestered in microvesicles (exosome, apoptotic body, microparticle).

Potential Role of miRs Related to Inflammatory Diseases and COVID-19 Cytokine Storm

In response to infection or injury, inflammation is the result of biological and pathophysiological cascades that involve both the innate and the adaptive immune systems. The alteration of this process can lead to abnormal, excessive, and sustained inflammation that will lead to tissue injury and in the most severe cases, tissue destruction (Chen et al., 2018). At the molecular level and in the early stage of the inflammatory process, the recruitment of immune cells is finely regulated by a well-known complicated network of pro- and anti-inflammatory factors such as cytokines and chemokines (Cicchese et al., 2018). However, the post-transcriptional mechanisms that are involved in the regulation of the expression level of cytokines and chemokines related to immune cell recruitment into inflammatory tissues is largely unknown. Notably, the role of miRs in COVID-19 cytokine storm remains to be explored. As previously mentioned, each individual miR can act simultaneously on hundreds of

TABLE 1 | Modulation of miRNA expression in diverse inflammatory diseases, including clinical and pre-clinical studies.

Inflammatory diseases	Human or models	Upregulated miRNAs	Downregulated miRNAs	References
Sepsis (4 clinical studies included)	Human patients with sepsis	miR-486, miR-182, miR-15b, miR-223, miR-483-5p	miR-150, miR-342-5p, miR-223, miR-146b, miR-223, miR-146a, miR-122, miR-193b, miR-499-5p, miR-23a, miR-26a, miR-342	Vasilescu et al. (2009); Wang et al. (2010); Wang et al. (2012); Tudor et al. (2014)
Acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury (ALI) (2 animal studies)	Rat model of ARDS and ALI	miR-181, miR-92a, miR-424, miR-344, miR-346, miR-99a, miR-127, miR-128b, miR-135b, and miR-30a/b	miR-24, miR-26a, miR-126, and Let-7a, b, c, f	Wang et al. (2010); Zhu et al. (2017)
Lung inflammation related to influenza virus	Mice lung and human A549 lung cells infected with influenza	let7a, let7f, miR-145, miR-21, miR-223, miR-101, miR-193, miR-23b, miR-30e	miR-29, miR-200, miR-193, miR-27, miR-29, miR-30	Li et al. (2010); Huang et al. (2014)
Children respiratory syncytial virus infection (CRSVI)	Human patients with CRSVI	miR-155, miR-31, miR-203a, miR-16 and let-7days	miR-34b, miR-34c, miR-125b, miR-29c, miR-125a, miR-429 and miR-27b	Inchley et al. (2015)
Severe pneumonia	Human patients with severe pneumonia	miR-450a-5p-miR-103a-3p and miR-103b-5p-miR-98-5p	N/A	Huang et al. (2019)

different targets. Therefore one miR could fine-tune the modulation of several inflammatory signaling pathways at the same time (Sonkoly and Pivarcsi, 2009). Previous publications have reported alterations in the expression profile of miRs during inflammation in tissues, fluids and cell types (Mi et al., 2013). However, to date, no study has reported profiling of miRs in patients presenting severe forms of COVID-19. Accordingly, the following paragraphs will focus on clinical or pre-clinical studies describing examples of miR modulation during strong inflammatory responses such as sepsis, ARDS, ALI and severe pneumonias induced by the influenza virus.

As shown in **Table 1**, we have compiled miRs whose expression has been reported to be significantly altered in various diseases and inflammatory conditions, both in humans and in animal models of acute inflammation/infection (**Table 1**). For example, in the serum of patients with severe sepsis, the combined results of four clinical studies show that five miRs are strongly upregulated (miR-486, -182, -15b, -223 and -483), while 12 miRs are downregulated including miR-146 (Vasilescu et al., 2009; Wang et al., 2010; Wang et al., 2012; Tudor et al., 2014), a well-documented anti-inflammatory miR-146 that reduces the expression and activity of several pro-inflammatory mediators such IL1, TNF α , IRAK1, TRAF6 and NF- κ B (Saba et al., 2014). In addition, several miRs have been found to be modulated (10 upregulated and seven downregulated) in two preclinical studies of severe pulmonary inflammation in animal models of ARDS and ALI, two conditions that resemble the lung pathology found in patients with severe forms of COVID-19 (Huang et al., 2014; Zhu et al., 2017). Interestingly, miR-127 was found to be significantly increased in these conditions. miR-127 is a well-known pro-inflammatory miRNA that induces macrophage M1 phenotype through the induction of IL-6, TNF α , IL-1 β , and by decreasing the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Ying et al., 2015). Interestingly, in a study of influenza virus-induced lung inflammation, a cytokine storm-mediated COVID-19-like situation, the intracellular expression of several miRs were modulated in lung cells A549 infected with influenza, suggesting that altered local expression of miRs in tissue can also influence the subsequent local inflammatory response (Li

et al., 2010; Huang et al., 2014). Among the miRs found to be increased in inflammatory conditions, two members of the Let-7 family (Let-7f and Let-7a) known for their dual pro-inflammatory/pro-angiogenic functions have been reported to be induced by the influenza virus (Wang and Olson, 2009; Teng et al., 2013). Interestingly, alterations of miR expression have also been documented in children with Respiratory Syncytial Virus Infection (CRSVI) (Inchley et al., 2015) and in patients with severe bi-lateral pneumonia (Huang et al., 2019), which is directly linked to mortality in COVID-19 patients on mechanical ventilation (see **Table 1**).

In order to illustrate the importance of miRs in the regulation of inflammation, we have compiled miRs whose function is known to affect the expression of key inflammatory mediators, and that could therefore potentially be involved in the cytokine storm associated with COVID-19 (**Table 2**). For example, miR-125 is known for its anti-inflammatory properties by reducing TLR/NF- κ B activities related to myelodysplastic syndromes in Meg-01 and K562 cells, but it is also negatively correlated to CRP, IL-17 and TNF α levels in the plasma of patients with Crohn disease (Gañán-Gómez et al., 2014; Sun et al., 2017). miR-125a may act as a NF- κ B inhibitor upon TLR stimulation, and its effects may therefore depend on the status of the TLR pathway. In addition, miR-146, which is strongly reduced in sepsis (**Table 1**), is well known for its anti-inflammatory properties by negatively regulating NF- κ B activities and by directly targeting IRAK-1 and TRAF6 (Taganov et al., 2006). miR-146 also plays an anti-inflammatory function in human bronchial epithelial cells during asthma (Lambert et al., 2018). Taken together, these findings indicate that miR-146b repress IRAK-1 and TRAF6 signaling and suggest that it could be induced in certain inflammatory conditions as a feedback mechanism to limit inflammation. In alveolar macrophages during ARDS, miR-199 is known for its pro-inflammatory action contributing to the induction and release of key inflammatory cytokines such as TNF α , IL1 β and IL6 (Li et al., 2018). As previously mentioned, IL-6 has been identified as a key factor positively correlated with severe forms of COVID-19. Decreased expression of miR-199a with antagomir199 has previously been shown to play a

TABLE 2 | Examples of miRNAs regulating inflammatory processes related to cytokine/chemokine production and immune cells recruitment.

miRNAs ID	Inflammatory process involved	Model/disease and tissues or cells lines	Overall potential effects of miR modulation	References
miR-125	Anti-inflammatory properties by reducing TLR/NF- κ B activities negatively correlated with CRP and CDAI, IL-17, TNF- α production	Myelodysplastic Syndrome/Meg-01 and K562 Crohn's disease/human plasma	miR-125a may act as NF- κ B inhibitor upon TLR stimulation. These results indicate that miR-125a is involved in the fine-tuning of NF- κ B activity and that its effects may depend on the status of the TLR pathway reduced expression of miR-125 could lead to upregulation of CRP et CDAI, IL-17, TNF- α production	Gañán-Gómez et al. (2014); Sun et al., (2017)
miR-146a	Anti-inflammatory properties by negatively regulating NF- κ B activities by directly targeting IRAK-1 and TRAF6 pulmonary anti-inflammatory effects	Human acute monocytic leukemia cell line THP-1 asthma/human bronchial epithelial cells	miR-146a repress IRAK-1 and TRAF6 signaling. miR-146a is potentially induced in inflammatory conditions as a feedback mechanism to limit inflammation	Taganov et al. (2006); Lambert et al. (2018)
miR-142, -101, -29a, -29c, and -141-3p	Pro-inflammatory effects; these miRs are upregulated in sepsis and positively correlated with IL-6 and TNF- α level in blood	Still disease from sepsis/serum	Could potentially act by targeting negative regulator of IL-6 and TNF- α inducer	Hu et al. (2018)
miR-127	Pro-inflammatory effects regulating the polarization of macrophage M1 vs M2 (miR-127 expression activates the M1 phenotype)	Murine lung inflammation injury model induced by LPS	miR-127 activates the M1 phenotype by inducing the expression of IL-6, TNF α , IL-1 β , and decreasing the anti-inflammatory cytokine IL-10	Ying et al. (2015)
miR-124 miR-223	Anti-inflammatory properties	Murine macrophage stimulated with LPS	miR-124 decreases TNF α and IL-6 through STAT3 et TACE pathway miR-223 decreases IL-6 and IL1 β via TLR inhibition	Chen et al. (2012); Sun et al. (2013)
miR-199	Pro-inflammatory action	ARDS/Mice alveolar macrophage	Decreased expression of miR-199a with antagomiR199 plays a protective role in mouse alveolar macrophage ARDS through decreased expression of TNF α , IL1 β , IL6	Liu et al. (2018)

protective role in mouse alveolar macrophage during ARDS through decreased expression of TNF α , IL1 β and IL6. In addition, other miRs such as miR-124 and miR-223 have anti-inflammatory properties in macrophages stimulated with LPS. miR-124 decreases TNF α and IL-6 through STAT3 and TACE pathway (Sun et al., 2013), while miR-223 decreases IL6 and IL1 β via TLR inhibition (Chen et al., 2012). In summary, this section demonstrates that several miRs with pro- and anti-inflammatory properties are altered in inflammatory conditions, both systemically (plasma/serum) and locally in lung tissues and cells. The next section will document the potential therapeutic impact of modulating inflammatory miRs using nutraceutical agents.

NUTRACEUTICAL AGENTS MODULATING THE EXPRESSION OF INFLAMMATION-MODULATING MIRS

“Nutraceutical” is a broad term used to describe any natural compound derived from food sources, herbal products or dietary supplements. The term combines the words “nutrient” (a food component) and “pharmaceutical” (a medical drug) and was invented by Dr. Stephen DeFelice in 1989 (Kalra, 2003). In addition to their basic nutritional value, nutraceutical agents have been shown to exert physiological benefits or provide health protection against different diseases. Indeed, it was recently reported that certain nutraceuticals may boost the

immune system and help fight viruses with encapsulated RNA such as the influenza and coronavirus (McCarty and DiNicolantonio, 2020). Several pre-clinical and clinical studies have shown that nutraceutical agents are particularly effective in suppressing inflammatory pathways (Moss and Ramji, 2016; Gupta et al., 2018). Among the possible mechanisms of action of these natural compounds is their ability to modulate the expression and the activity of a number of microRNAs. In this section, we summarize studies that have demonstrated the potential effect of certain nutraceutical agents on miRNAs, especially those that regulate key inflammatory factors related to COVID-19-associated cytokine storm (Quintanilha et al., 2017; Sabino et al., 2019).

Nutraceutical Targeting of miRs Involved in the Modulation of COVID-19- Associated Cytokine Storm

Resveratrol

Resveratrol (*trans*-3,5,4'-trihydroxystilbene) (RSV), a polyphenolic compound, is found in red grapes, berries, peanuts and bamboo. It is most abundant in the skin of grapes and is principally consumed in the form of grape derived red wine. Several studies have shown that RSV has anti-inflammatory, antioxidant, anti-carcinogenic, anti-aging properties, and cardio-protective effects *in vivo* and *in vitro* (Bao et al., 2012; McCubrey et al., 2017; Alharris et al., 2018). However, it is difficult to establish the precise effective dose

TABLE 3 | Nutraceutical targeting of miRs that potentially attenuate inflammatory cell recruitment.

Nutraceutical agent	miR modulated	Modulation of Expression	Cell/sample/tissue	Pathology/disease/model	Predicted potential impact on acute lung injury mediated by cytokine storm	References
Resveratrol	miR-let7a	Upregulated	THP-1 cells	LPS-stimulated macrophages	Decreased expression of TNF- α and IL-6	Song et al. (2016)
	miR-132	Upregulated	PC-12 cells	LPS-induced inflammatory injury of PC-12 neuroblastic cells	Decreased IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression	Zhang et al. (2019)
	miR-146b	Upregulated	Mouse chondrogenic cell line ATDC5	LPS-induced inflammatory injury of ATDC5 cells	Decreased IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression	Jin et al. (2018)
	miR-146a-5p	Upregulated	BV2 mouse microglial cells	LPS-induced inflammatory injury of BV2 cells	Decreased mRNA levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6	(Ge, Zhong et al., 2019)
Quercetin	miR-221	Downregulated	WI-38 lung fibroblasts	LPS-caused inflammatory damage of WI-38 lung fibroblasts	Decreased mRNA levels and expression of TNF- α and IL-6	(Wang et al., 2019)
	miR-369-3p	Upregulated	Bone marrow derived dendritic cells (BMDCs)	LPS-stimulated BMDCs	Decreased mRNA levels and expression of TNF- α and IL-6	(Galleggiante et al., 2019)
	miR-124	Upregulated	Human kidney-2 cells	LPS-induced inflammatory injury of HK-2 cells	Decreased expression of TNF- α and IL-6	Guo et al. (2020)
Vitamin D	miR-125b	Downregulated	THP-1 cells and in lamina propria mononuclear cells (LPMC)	LPS-stimulated macrophages and DSS-induced colitis mice	Decreased expression of TNF- α and IL-6	Zhu et al. (2019)
	miR-155	Downregulated	Raw264.7 cells and serum	LPS-treated macrophages and LPS-induced sepsis mice in WT and miR155 KO mice	Decreased expression of TNF- α and IL-6	Chen et al. (2013)
Curcumin	miR-155	Downregulated	Raw264.7 and THP-1 cells; liver and kidney tissues	LPS-treated macrophages LPS-induced sepsis in mice	Decreased expression of TNF- α and IL-6	Ma et al. (2017)
	miR-199b-5p	Upregulated	BV2 microglial cells	LPS-induced BV2 cells	Decreased expression of TNF- α and IL-1 β	Gao et al. (2019)
Ginseng	miR-132	Upregulated	Lung fibroblast MRC-5 cells	LPS-induced MRC-5 cell injury	Decreased IL-1 β , IL-6, and TNF- α expression	Cong et al. (2019)
	miR-181a	Upregulated	WI-38 lung fibroblasts	LPS-caused inflammatory damage of WI-38 lung fibroblasts	Decreased mRNA levels and expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6	Qian et al. (2019)
	miR-26a	Upregulated	Human renal proximal tubular epithelial cells and human kidney-2 cells	LPS-treated human RPTECs and HK-2 cells	Decreased mRNA levels and expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6	Liu et al. (2019)
Green tea polyphenols	miR-9	Upregulated	Mouse chondrocytic ATDC5 cells	LPS-induced osteoarthritis in ATDC5 cells	Decreased expression of TNF- α , IL-6 and MCP-1	Zhang et al. (2019)

related to the beneficial anti-inflammatory effects in humans because studies have used a large range of doses (150 mg–2.5 g per day). Concentrated extracts of resveratrol have been used in order to overcome the difficulty of obtaining this concentration from the diet (Ramírez-Garza et al., 2018). For instance the amount of resveratrol in a 150 ml glass of red wine is 0.015–2.15 mg, while small fruits such as blueberries, raspberries and cranberries contain between 0.6 and 2.4 mg (Chachay et al., 2011). The recommended amount of RSV in the diet is around 12.5 mg/kg body weight. These concentrations are obtained by rough extrapolations from animal experiments, most of which required daily dosages of 5–100 mg/kg body weight to reach a specific biological effect. Several experts claim that a daily dosage of 1 g of resveratrol is effective for the treatment of diverse disorders in humans. It is not possible to ingest up to 1 g of resveratrol/day by consuming conventional food products. Alternatives that are offered by many companies include a variety of (sometimes outrageously expensive)

nutritional supplements with precisely defined resveratrol content (Weiskirchen and Weiskirchen, 2016). It has been shown that RSV also exhibits antiviral properties against a variety of viral pathogens. In particular, RSV at a concentration of 125–250 μ M was shown to suppress the replication of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Vero E6 cells *in vitro* (Lin et al., 2017; Marinella, 2020). RSV may be a promising molecule since no adverse effect was observed *in vivo*, even when high doses were administered to animals for prolonged periods of time. RSV was or is currently being tested in over 110 clinical trials (Latruffe et al., 2015; McCubrey et al., 2017; Marinella, 2020). Although the molecular mechanisms related to the pleiotropic activities of RSV are still largely unknown, a few studies have investigated the potential role of miRNAs in resveratrol-mediated anti-inflammatory effects (Alharris et al., 2018). In lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human THP-1 macrophages, a previous study found that RSV used at a

concentration of 25–200 μM (with maximal peak effect at 25 μM) markedly increases the expression of miR-Let-7A (Song, et al., 2016), which attenuates the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-6 (see **Table 3**). Also, in LPS-induced inflammatory injury in PC-12 neuroblastic cells, it was reported that RSV at a concentration of 10–25 μM can decrease IL1 β , IL6, and TNF α expression through upregulation of miR-132. This effect of RSV improves cell viability and reduces apoptosis by suppressing the inflammatory response (Zhang et al., 2019). Both miR-132 and miR-Let-7A have been shown to be important for the modulation of the inflammatory response, and for cell survival/apoptosis. RSV was reported to be a promising oral supplement for the treatment of osteoarthritis (Gu et al., 2016). The levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α were significantly reduced by a treatment of RSV (30 μM) in LPS-induced inflammatory injury of ATDC5 cells. RSV thus seems to act by upregulating miR-146b (Jin et al., 2018). Similarly, RSV significantly inhibited LPS-induced generation of TNF α , IL1 β and IL6 in BV2 mouse microglial cells via upregulation of miR-146a-5p (Ge et al., 2019). The cells were treated with RSV (3, 10, and 30 μM) 24 h prior to LPS treatment for 6 h. Pretreatment with RSV at the concentration of 3 μM showed no effect on LPS-induced upregulation of cytokines. However, RSV (10 and 30 μM) pre-exposure significantly attenuated LPS-induced mRNAs increase of TNF- α by 54.6 and 77.9%, IL-1 β by 38.9 and 65.9%, IL-6 by 21.7 and 43.6%, respectively. Pretreatment with 10 and 30 μM of RSV 24 h before LPS exposure resulted in significantly increased levels of the anti-inflammatory miR-146a-5p in LPS treated cells (5.21-fold vs. LPS at 10 μM ; 8.41-fold vs. LPS at 30 μM). MiR-146b as well as miR-146a-5p are important regulators of innate immune responses. Through the modulation of different miRNAs, *in vitro* studies suggest that RSV (25–250 μM) mediates anti-inflammatory effects by targeting the three main cytokines commonly involved in severe forms of COVID-19.

Quercetin

Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-pentahydroxyflvanone) is part of the flavonoid family. Due to its high abundance (4–79 mg/100 g) in many fruits and vegetables including apples, grapes, onions, artichoke/fennel/celery, beans, apricots, plums, turnips, peppers, strawberries, tomatoes and broccoli, quercetin can be consumed in appreciable amounts, with an average daily absorption via the diet estimated at 50–800 mg (Boesch-Saadatmandi et al., 2012; Li et al., 2016; Kocic et al., 2019). Other studies found that in determined food, the highest concentration is 234 mg/100 g of edible portion in capers (raw), the lowest concentration is 2 mg/100 g of edible portion in black or green tea (*Camellia sinensis*), and the estimated absorption is from 3% to 17% in healthy individuals receiving 100 mg of quercetin. The relatively low bioavailability of quercetin may be attributed to its low absorption, extensive metabolism and/or rapid elimination (Li et al., 2016). Among its pharmacological properties, quercetin has anti-inflammatory effects, antiproliferative effects on tumor cells, and cytoprotective effects against oxidative stress. As mentioned above for resveratrol, the effective dose of quercetin supplementation is

highly variable in animal and human studies. For example, in a rat arthritis model, a daily dose of 80 mg/kg, inhibited both acute and chronic inflammatory phases (Guardia et al., 2001). In humans, in a 12 weeks clinical trial, quercetin at a dose of 1,000 mg/day exerted anti-inflammatory properties characterized by a reduction of the upper respiratory tract infection rates in middle and older age subjects (Heinz et al., 2010). In addition, an intake of 500 mg of quercetin significantly decreased inflammatory markers such as TNF- α and IL-6 in women with type 2 diabetes, a risk factor for CVD (Zahedi et al., 2013). *In vitro*, the effective anti-inflammatory concentration of quercetin to inhibit IL-1 and TNF α expression is between 10 and 100 μM in N9 microglial cells (Bureau et al., 2008). It can potentially boost natural immunity and contribute to prevent a number of chronic diseases (Galleggiante et al., 2019). A few studies have investigated the modulation of miRNAs by quercetin in the context of inflammation. Another group (Wang et al., 2019) showed that downregulation of miRNA-221 by quercetin in the setting of LPS-induced inflammatory damage leads to decreased mRNA and protein expression levels of IL6 and TNF α in WI-38 lung fibroblasts. miR-221 is known to activate factors related to inflammation such as NF- κB and c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Zhao et al., 2016; Qian et al., 2017). Another study found that treatment of LPS-stimulated bone marrow derived dendritic cells (BMDCs) with quercetin significantly increases miR-369-3p expression levels. This upregulation of miR-369-3p leads to decreased mRNA and protein levels of TNF α and IL6 (Galleggiante et al., 2019). A recent study also showed that quercetin, by up-regulating miR-124 in LPS-induced inflammatory injury of human kidney-2 cells (HK-2 cells), can reduce generation of IL6 and TNF α (Guo et al., 2019).

Vitamin D

Vitamin D, a fat-soluble vitamin, exists in two forms: D₂, which comes from vegetable origin and D₃, which is mainly synthesized in the skin when a cholesterol precursor, 7-dehydroxycholesterol, is exposed to UVB radiation. Dietary sources of vitamin D include oily fish such as cod liver oil (210 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and salmon (5–13 $\mu\text{g}/100\text{ g}$), mushrooms (13–30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$) and foods fortified with vitamin D like dairy products (O'Mahony et al., 2011). There is much debate in the literature as to which cut-offs to use for defining vitamin D deficiency. However, recent studies suggested serum concentrations of 75 nmol/L or higher as adequate levels, with values below this level indicating deficiency (O'Mahony et al., 2011). Vitamin D₃ or oral vitamin D is first converted to 25(OH)D in the liver, then to its active form, 1,25-Dihydroxyvitamin D (1,25(OH)₂D₃) (calcitriol), in the kidneys or sometimes in other organs and in cells of the immune system. In fact, in these cells, 1,25(OH)₂D₃ plays an important role in the control of inflammatory responses (Carvalho et al., 2017; Grant et al., 2020; Zabetakis et al., 2020).

The precise dose of vitamin D supplementation that exerts anti-inflammatory effects in humans remained to be determined. A previous study showed that a consumption of 500–5,000 IU of vitamin D₃ per day exerts a dose-dependent anti-inflammatory effect on gingivitis in patients (Hiremath et al., 2013). A meta-analysis combining seven clinical studies concluded that vitamin

D-supplemented in patients leads to lower plasmatic concentrations of TNF α compared to controls ($n = 380$; $p = 0.04$). However, no effects were observed on the levels of C-reactive protein, IL-10 or IL-6. These findings suggest that vitamin D supplementation may have specific, but modest effects on inflammatory markers (Rodríguez et al., 2018). Recent animal and *in vitro* studies have investigated the anti-inflammatory effects of vitamin D through the modulation on miRNAs. Zhu X et al. observed that in LPS-stimulated THP-1 cells, as well as in lamina propria mononuclear cells (LPMCs) isolated from DSS-induced colitis mice, the downregulation of miR-125b expression by 1,25(OH) $_2$ D $_3$ induces M1 macrophage polarization toward the M2 anti-inflammatory subtype. As a consequence, TNF- α and IL-6 expression are decreased (Curtale et al., 2019). Another study showed *in vivo* that 1,25(OH) $_2$ D $_3$ supplementation (200 ng/kg per day for one week) downregulates miR-155, TNF α and IL6 in LPS-treated mouse macrophage RAW264.7 (Chen et al., 2013) and the specificity of the effect was validated by comparing wild type mice to miR-155-null (KO) mice after intraperitoneal LPS challenge. Since respiratory tract infections cause an increase in production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, 1,25(OH) $_2$ D $_3$ may participate in attenuating the susceptibility to acute (severe) viral-induced respiratory distress syndrome, like COVID-19.

Curcumin

Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione] is a natural polyphenol extracted from the rhizomes of the plant *Curcuma longa*. It is the bioactive ingredient of turmeric and it is also found in other plants like ginger. Curcumin is commonly used as a spice, being responsible for the yellow pigmentation of the curry (Bao et al., 2012; Hewlings and Kalman, 2017; McCubrey et al., 2017). This bioactive dietary compound exerts beneficial potential protective effects against various diseases including virus infections and cancers, particularly those associated with inflammation and interlinked oxidative stress (Quintanilha et al., 2017; Zahedipour et al., 2020). Animal studies have shown that curcumin is rapidly metabolized, conjugated in the liver, and excreted in the feces, therefore having limited systemic bioavailability suggesting that high doses are required to reach beneficial anti-inflammatory effects. For example, a 40 mg/kg intravenous dose of curcumin in rats resulted in complete plasma clearance after 1-h. An oral dose of 500 mg/kg in rats resulted in a peak plasma concentration of only 1.8 ng/ml, with the major metabolites identified being curcumin sulfate and curcumin glucuronide. The dose used in humans in clinical studies (mostly in cancer patients) varies between 0.5 and 10 g per day administered orally (Jurenka, 2009). Here we review studies describing a link between miRNAs and the modulating effect of curcumin on the inflammatory response.

Ma et al. showed *in vitro* that curcumin exerts dose dependent (5–15 μ M) anti-inflammatory effects through miR-155, leading to decreased secretion of TNF α and IL6 in LPS-stimulated mouse macrophages RAW264.7, and in human monocyte THP-1 macrophages cells. In a mouse model of LPS-induced sepsis *in vivo*, these authors found that 20 mg/kg of curcumin treatment

for 3 days before LPS intraperitoneal injection suppresses the inflammatory response in liver and kidney by inhibiting the cytokines TNF α and IL-6 through targeting miR-155 (Ma et al., 2017). miR-155 has emerged as a key regulator of immune functions and a factor involved in the development of inflammation-related diseases (Testa et al., 2017). *In vitro*, curcumin (2–8 μ M) was recently found to diminish the expression of TNF α and IL1 β in LPS-treated BV2 microglial cells, by increasing the level of miR-199b-5p (Gao et al., 2019). Although miR-199b-5p is a well-documented tumor suppressor, it was also recently proposed as a potential biomarker of sepsis and septic shock (Reithmair et al., 2017). Therefore, since curcumin has been shown to strongly inhibit several pro-inflammatory cytokines, particularly those implicated in the cytokine storm, and considering its antiviral activities, this nutraceutical compound may be a promising candidate for the management of severe coronavirus infections.

Ginseng

Ginseng has been used for a long time as a health supplement and a traditional herbal medicine. It is extracted from the root of a *Panax ginseng*, one of the 13 species of perennial plant of genus *Panax*, family of Araliaceae, cultivated in Eastern Asia and North America. Studies on the pharmacological and medicinal effects of ginseng have focused on ginsenosides, which are the main bioactive compounds in ginseng. Ginsenosides are steroid-like saponins and numerous types of ginsenosides have been reported to have physiological effects in a number of human illnesses such as cancers, diabetes, as well as neuronal, cardiovascular and inflammatory diseases (Paik et al., 2019; Yu et al., 2019). To date, more than 150 ginsenosides have been isolated from ginseng, 40 of which have been found in *Panax ginseng* in very low and variable quantity, therefore needing to be concentrated in therapeutic studies in order to reach effective dosing (Liu et al., 2019). Pharmacokinetic studies of selected ginsenosides in rats, dogs or human plasma, have shown that supplementation with different ginsenosides at doses of 10–300 mg/kg resulted in variable bioactivity (1–64%) depending on the compound and the model, highlighting the complexity of extrapolating these results to humans (Lü et al., 2009). In a study investigating whether Korean red ginseng (KRG) can play a role in repressing the development of chronic nonbacterial prostatitis (CNP) in male Wistar rats, KRG injected subcutaneously at doses of 0.25 and 0.5 mg/kg significantly decreased the expression of key pro-inflammatory cytokines such as IL-6, IL-1, TNF α and COX2 (Tabolacci et al., 2019). *In vitro*, a study evaluated the anti-inflammatory effects of ginsenoside Rg1 against LPS-induced microglia activation in BV2 microglial cells and ventral mesencephalic primary microglial culture, and concluded that a concentration of 10 μ M of Rg1 could attenuate LPS-induced upregulation of TNF α , IL-1b, iNOS, COX-2 mRNA and protein levels (Gao et al., 2019). It has recently been reported that various ginsenosides can directly modulate miRNAs, providing an alternative pathway through which ginseng can exert its anti-inflammatory function (Dong et al., 2019). miRNA-132 is upregulated by notoginsenoside R1

(NGR1), the main active component extracted from the roots of *Panax notoginseng* (Burk.), in a model of cell injury involving LPS-treated lung fibroblast MRC-5 (Cong et al., 2019). miRNA-132 upregulation leads to decreased expression of the inflammatory cytokines IL1 β , IL6 and TNF α (Salvi et al., 2019). Similarly, NGR1 was also found to upregulate miR-181a in LPS-induced inflammatory damaged WI-38 lung fibroblasts, leading to decreased mRNA and protein expression of IL1 β , IL6 and TNF α (Qian et al., 2019). Pro-inflammatory regulatory miR26a was also found to augment in response to NGR1 in LPS-treated human kidney-2 cells (HK-2 cells) and human renal proximal tubular epithelial cells (RPTECs); this resulted in reduced release of IL1 β , IL6 and TNF α (Liu et al., 2019).

Green Tea Polyphenols and Other Compounds

Green tea is extracted from the leaves and buds of the plant *Camellia sinensis*. Because of its many health benefits, green tea is one of the most widely consumed beverages worldwide. Green tea polyphenols (GTP) are the active compounds in green tea and they are also commonly known as catechins. The main ones are epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin gallate, epicatechins and flavanols, which are responsible for many of the biological activities of green tea including the antioxidant, anti-inflammatory, anti-angiogenesis, antidiabetic and anticarcinogenic effects (Otton et al., 2018; Torres et al., 2019; Yan et al., 2020). A 250 ml cup of brewed green tea provides approximately 25–60 mg of EGCG (roughly 50–60% of the catechins are EGCG). *In vitro*, a study in human gingival epithelial keratinocytes (HGEK) treated with LPS showed that green tea extracts (2.5, 5, and 10 mg/ml) decreased IL- β 1, IL-6 and TNF α gene expression by more than 10-fold (Hagiu et al., 2020). Another study in rats with acetic acid-induced colitis demonstrated that EGCG (50 mg/kg/day for seven days) exerts anti-inflammatory activity by inhibiting the production of TNF α , IFN- γ and NF- κ Bp65 (Ran et al., 2008). Importantly, Zhang Q et al. have shown that GTP can directly modulate the expression of miRNAs implicated in the control of inflammation. They observed in a model of LPS-induced inflammation in mouse chondrocyte ATDC5 cells that GTP increases miRNA-9, which suppresses pro-inflammatory cytokines and chemokines (Zhang et al., 2019). It would thus be tempting to speculate efficacy of GTP in severe COVID-19 infections.

Several other nutraceutical compounds could also help modulating inflammation in the context of COVID-19. For example the potential therapeutic effect of lactoferrin, a non-toxic pleiotropic glycoprotein, has been studied in several viruses including severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV), which is closely related to the novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) causing COVID-19. In fact, lactoferrin exhibits several interesting immunomodulatory and anti-inflammatory characteristics that could positively modify the host response to infections. However, additional studies are needed to specifically define the modulating effect of lactoferrin on the expression of miRNAs, especially in the context of severe inflammatory diseases (Chang et al., 2020).

CONCLUSION

ARDS is by far the main cause of mortality associated with severe coronavirus infections such as MERS, SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 (COVID-19), for which there are no pharmacological treatments to date. Management of ARDS remains largely supportive using different ventilatory modalities. The rapidly progressive nature of respiratory failure corresponds with a cytokine storm, including IL1 β , IL6, IL8, TNF α , detected in broncho-alveolar lavage fluids (Butt et al., 2016; Felsenstein et al., 2020; Schett et al., 2020). Concordantly, IL6 promoter variant is associated with reduced severity of ARDS (Martin-Loeches et al., 2012), likewise, IL-1 receptor antagonist-null mice have delayed resolution of lung inflammation in ARDS (Hudock et al., 2012). Attempts to treat patients using approved anti-IL-1 and IL-6 have been somewhat successful in ARDS (Shakoory et al., 2016; Toniati et al., 2020), albeit there are concerns with consequent risks of immunosuppression using currently available anti-IL-1 and anti-IL-6 (respectively, Kineret and Tocilizumab (Felsenstein et al., 2020; Zhang et al., 2020). Concomitant down-regulation of numerous (potentially detrimental) pro-inflammatory cytokines lends itself to better solutions to treat ARDS in COVID-19. Accordingly, safe modulators of miRNAs would be well-suited for this purpose. In this context, nutraceuticals (administered individually or in combination) such as the ones presented in this review (RSV, quercetin, vitamin D, curcumin, ginseng, GTP), that exert anti-inflammatory properties by affecting key miRNAs, may be plausible alternatives to single target therapeutics to effectively attenuate the severity of ARDS associated with COVID-19 and the likes, and improve outcome.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD conceptualized and designed the study. MD, MW, IL, PR carried out the literature research of the review. MD prepared the initial draft of the manuscript and **Figure 1**. AR and SC revised the manuscript and figures. PH, AR, SC provided expert advice and recommendations. All authors read and approved the final manuscript.

FUNDING

MD is a recipient of a post-doctoral fellowship award from Hôpital Maisonneuve-Rosemont and from the Fonds de Recherche en Ophtalmologie de l'Université de Montréal. AR holds a grant from the Canadian Institute of Q17 Health Research (CIHR MOP-123490) and the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC G-17-0019106). SC holds a Canada Research Chair (Vision Science) and the Leopoldine Wolfe Chair in translational research in age-related macular degeneration. The study was financed by grants from Canadian Institutes of Health Research (grant number—MOP12532), March of Dimes Birth Defects Foundation, Fonds de la Recherche du Québec—Santé (FRQS)/Québec Vision Health Network (grantee: SC).

REFERENCES

- Alharris, E., Alghetaa, H., Seth, R., Chatterjee, S., Singh, N. P., Nagarkatti, M., et al. (2018). Resveratrol attenuates allergic asthma and associated inflammation in the lungs through regulation of miRNA-34a that targets FoxP3 in mice. *Front. Immunol.* 9, 2992. doi:10.3389/fimmu.2018.02992
- Almeida, M. L., Reis, R. M., and Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat. Res.* 717 (1–2), 1–8. doi:10.1016/j.mrfmm.2011.03.009
- Ardekani, A. M., and Nacini, M. M. (2010). The role of MicroRNAs in human diseases. *Avicenna J. Med. Biotechnol. (AJMB)* 2 (4), 161–179. doi:10.1007/978-1-62703-748-8_3
- Bao, B., Li, Y., Ahmad, A., Azmi, A. S., Bao, G., Ali, S., et al. (2012). Targeting CSC-related miRNAs for cancer therapy by natural agents. *Curr. Drug Targets* 13 (14), 1858–1868. doi:10.2174/138945012804545515
- Belouzard, S., Millet, J. K., Licitra, B. N., and Whittaker, G. R. (2012). Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. *Viruses* 4 (6), 1011–1033. doi:10.3390/v4061011
- Boesch-Saadatmandi, C., Wagner, A. E., Wolfram, S., and Rimbach, G. (2012). Effect of quercetin on inflammatory gene expression in mice liver *in vivo*-role of redox factor 1, miRNA-122 and miRNA-125b. *Pharmacol. Res.* 65 (5), 523–530. doi:10.1016/j.phrs.2012.02.007
- Bureau, G., Longpré, F., and Martinoli, M. G. (2008). Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *J. Neurosci. Res.* 86 (2), 403–410. doi:10.1002/jnr.21503
- Butt, Y., Kurdowska, A., and Allen, T. C. (2016). Acute lung injury: a clinical and molecular review. *Arch. Pathol. Lab Med.* 140 (4), 345–350. doi:10.5858/arpa.2015-0519-RA
- Caporali, A., and Emanuelli, C. (2012). MicroRNAs in postischemic vascular repair. *Cardiol. Res. Pract.* 2012, 486702. doi:10.1155/2012/486702
- Carvalho, J. T. G., Schneider, M., Cuppari, L., Grabulosa, C. C., T Aoiike, D., Q Redublo, B. M., et al. (2017). Cholecalciferol decreases inflammation and improves vitamin D regulatory enzymes in lymphocytes in the uremic environment: a randomized controlled pilot trial. *PLoS One* 12 (6), e0179540. doi:10.1371/journal.pone.0179540
- Catalanotto, C., Cogoni, C., and Zardo, G. (2016). MicroRNA in control of gene expression: an overview of nuclear functions. *Int. J. Mol. Sci.* 17 (10), 1712. doi:10.3390/ijms17101712
- Chachay, V. S., Kirkpatrick, C. M., Hickman, I. J., Ferguson, M., Prins, J. B., and Martin, J. H. (2011). Resveratrol-pills to replace a healthy diet? *Br. J. Clin. Pharmacol.* 72 (1), 27–38. doi:10.1111/j.1365-2125.2011.03966.x
- Chang, R., Ng, T. B., and Sun, W. Z. (2020). Lactoferrin as potential preventative and adjunct treatment for COVID-19. *Int. J. Antimicrob. Agents* 56 (3), 106118. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106118
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., et al. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget* 9 (6), 7204–7218. doi:10.18632/oncotarget.23208
- Chen, Q., Wang, H., Liu, Y., Song, Y., Lai, L., Han, Q., et al. (2012). Inducible microRNA-223 down-regulation promotes TLR-triggered IL-6 and IL-1 β production in macrophages by targeting STAT3. *PLoS One* 7 (8), e42971. doi:10.1371/journal.pone.0042971
- Chen, Y., Liu, W., Sun, T., Huang, Y., Wang, Y., Deb, D. K., et al. (2013). 1,25-Dihydroxyvitamin D promotes negative feedback regulation of TLR signaling via targeting microRNA-155-SOCS1 in macrophages. *J. Immunol.* 190 (7), 3687–3695. doi:10.4049/jimmunol.1203273
- Cicchese, J. M., Evans, S., Hult, C., Joslyn, L. R., Wessler, T., Millar, J. A., et al. (2018). Dynamic balance of pro- and anti-inflammatory signals controls disease and limits pathology. *Immunol. Rev.* 285 (1), 147–167. doi:10.1111/imr.12671
- Confalone, E., D'Alessio, G., and Furia, A. (2010). IL-6 induction by TNF α and IL-1 β in an osteoblast-like cell line. *Int. J. Biomed. Sci.* 6 (2), 135–140.
- Cong, S., Xiang, L., Yuan, X., Bai, D., and Zhang, X. (2019). Notoginsenoside R1 up-regulates microRNA-132 to protect human lung fibroblast MRC-5 cells from lipopolysaccharide-caused injury. *Int. Immunopharm.* 68, 137–144. doi:10.1016/j.intimp.2018.12.065
- Curtale, G., Rubino, M., and Locati, M. (2019). MicroRNAs as molecular switches in macrophage activation. *Front. Immunol.* 10, 799. doi:10.3389/fimmu.2019.00799
- Dong, Y., Chen, H., Gao, J., Liu, Y., Li, J., and Wang, J. (2019). Bioactive ingredients in Chinese herbal medicines that target non-coding RNAs: promising new choices for disease treatment. *Front. Pharmacol.* 10, 515. doi:10.3389/fphar.2019.00515
- Fehr, A. R., and Perlman, S. (2015). Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 1282, 1–23. doi:10.1007/978-1-4939-2438-7_1
- Felsenstein, S., Herbert, J. A., McNamara, P. S., and Hedrich, C. M. (2020). COVID-19: immunology and treatment options. *Clin. Immunol.* 215, 108448. doi:10.1016/j.cim.2020.108448
- Friedländer, M. R., Lizano, E., Houben, A. J., Bezdán, D., Báñez-Coronel, M., Kudla, G., et al. (2014). Evidence for the biogenesis of more than 1,000 novel human microRNAs. *Genome Biol.* 15 (4), R57. doi:10.1186/gb-2014-15-4-r57
- Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19 (1), 92–105. doi:10.1101/gr.082701.108
- Galleghiane, V., De Santis, S., Liso, M., Verna, G., Sommella, E., Mastronardi, M., et al. (2019). Quercetin-induced miR-369-3p suppresses chronic inflammatory response targeting C/EBP- β . *Mol. Nutr. Food Res.* 63 (19), e1801390. doi:10.1002/mnfr.201801390
- Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Pierce, S., Bueso-Ramos, C., Calin, G., et al. (2014). Overexpression of miR-125a in myelodysplastic syndrome CD34+ cells modulates NF- κ B activation and enhances erythroid differentiation arrest. *PLoS One* 9 (4), e93404. doi:10.1371/journal.pone.0093404
- Gao, F., Shen, J., Zhao, L., Hao, Q., and Yang, Y. (2019). Curcumin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-Activated neuroinflammation via modulation of miR-199b-5p/i κ B kinase β (IKK β)/Nuclear factor kappa B (NF- κ B) pathway in microglia. *Med. Sci. Mon. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 25, 9801–9810. doi:10.12659/MSM.918237
- Gao, X. Q., Du, Z. R., Yuan, L. J., Zhang, W. D., Chen, L., Teng, J. J., et al. (2019). Ginsenoside Rg1 exerts anti-inflammatory effects via G protein-coupled estrogen receptor in lipopolysaccharide-induced microglia activation. *Front. Neurosci.* 13, 1168. doi:10.3389/fnins.2019.01168
- Gao, Y. M., Xu, G., Wang, B., and Liu, B. C. (2020). Cytokine storm syndrome in coronavirus disease 2019: a narrative review. *J. Intern. Med.* doi:10.1111/joim.13144
- Ge, Y. T., Zhong, A. Q., Xu, G. F., and Lu, Y. (2019). Resveratrol protects BV2 mouse microglial cells against LPS-induced inflammatory injury by altering the miR-146a-5p/TRAF6/NF- κ B axis. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 41 (5), 549–557. doi:10.1080/08923973.2019.1666406
- Giza, D. E., Vasilescu, C., and Calin, G. A. (2014). Key principles of miRNA involvement in human diseases. *Discoveries* 2 (4), e34. doi:10.15190/d.2014.26
- Grant, W. B., Lahore, H., McDonnell, S. L., Baggerly, C. A., French, C. B., Aliano, J. L., et al. (2020). Evidence that vitamin D supplementation could reduce risk of influenza and COVID-19 infections and deaths. *Nutrients* 12 (4), 988. doi:10.3390/nu12040988
- Grifoni, E., Valoriani, A., Cei, F., Lamanna, R., Gelli, A. M. G., Ciambotti, B., et al. (2020). Interleukin-6 as prognosticator in patients with COVID-19. *J. Infect.* 81 (3), 452–482. doi:10.1016/j.jinf.2020.06.008
- Gu, H., Li, K., Li, X., Yu, X., Wang, W., Ding, L., et al. (2016). Oral resveratrol prevents osteoarthritis progression in C57bl/6j mice fed a high-fat diet. *Nutrients* 8 (4), 233. doi:10.3390/nu8040233
- Guardia, T., Rotelli, A. E., Juarez, A. O., and Pelzer, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *Farmacol.* 56 (9), 683–687. doi:10.1016/s0014-827x(01)01111-9
- Guo, S., Sun, J., and Zhuang, Y. (2020). Quercetin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses by up-regulation miR-124 in human renal tubular epithelial cell line HK-2. *Biofactors* 46 (3), 402–410. doi:10.1002/biof.1596
- Guo, Y., Hong, W., Wang, X., Zhang, P., Körner, H., Tu, J., et al. (2019). MicroRNAs in microglia: how do MicroRNAs affect activation, inflammation, polarization of microglia and mediate the interaction between microglia and glioma? *Front. Mol. Neurosci.* 12, 125. doi:10.3389/fnmol.2019.00125
- Gupta, S. C., Kunnumakkara, A. B., Aggarwal, S., and Aggarwal, B. B. (2018). Inflammation, a double-edge sword for cancer and other age-related diseases. *Front. Immunol.* 9, 2160. doi:10.3389/fimmu.2018.02160

- Hagi, A., Attin, T., Schmidlin, P. R., and Ramenzoni, L. L. (2020). Dose-dependent green tea effect on decrease of inflammation in human oral gingival epithelial keratinocytes *in vitro* study. *Clin. Oral Invest.* 24 (7), 2375–2383. doi:10.1007/s00784-019-03096-4
- He, L., and Hannon, G. J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5 (7), 522–531. doi:10.1038/nrg1379
- Heinz, S. A., Henson, D. A., Austin, M. D., Jin, F., and Nieman, D. C. (2010). Quercetin supplementation and upper respiratory tract infection: a randomized community clinical trial. *Pharmacol. Res.* 62 (3), 237–242. doi:10.1016/j.phrs.2010.05.001
- Hewlings, S. J., and Kalman, D. S. (2017). Curcumin: a review of its' effects on human health. *Foods* 6 (10), 92. doi:10.3390/foods6100092
- Hiremath, V. P., Rao, C. B., Naik, V., and Prasad, K. V. (2013). Anti-inflammatory effect of vitamin D on gingivitis: a dose-response randomised control trial. *Oral Health Prev. Dent.* 11 (1), 61–69. doi:10.3290/j.ohpd.a29377
- Hu, Q., Gong, W., Gu, J., Geng, G., Li, T., Tian, R., et al. (2018). Plasma microRNA profiles as a potential biomarker in differentiating adult-onset still's disease from sepsis. *Front. Immunol.* 9, 3099. doi:10.3389/fimmu.2018.03099
- Huang, C., Xiao, X., Chintagari, N. R., Breshars, M., Wang, Y., and Liu, L. (2014). MicroRNA and mRNA expression profiling in rat acute respiratory distress syndrome. *BMC Med. Genom.* 7, 46. doi:10.1186/1755-8794-7-46
- Huang, F., Bai, J., Zhang, J., Yang, D., Fan, H., Huang, L., et al. (2019). Identification of potential diagnostic biomarkers for pneumonia caused by adenovirus infection in children by screening serum exosomal microRNAs. *Mol. Med. Rep.* 19 (5), 4306–4314. doi:10.3892/mmr.2019.10107
- Hudock, K. M., Liu, Y., Mei, J., Marino, R. C., Hale, J. E., Dai, N., et al. (2012). Delayed resolution of lung inflammation in IL-1 α -/- mice reflects elevated IL-17A/granulocyte colony-stimulating factor expression. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 47 (4), 436–444. doi:10.1165/rccb.2012-0104OC
- Inchley, C. S., Sonerud, T., Fjærli, H. O., and Nakstad, B. (2015). Nasal mucosal microRNA expression in children with respiratory syncytial virus infection. *BMC Infect. Dis.* 15 (1), 150. doi:10.1186/s12879-015-0878-z
- Jan, H., Faisal, S., Khan, A., Khan, S., Usman, H., Liaqat, R., et al. (2020). COVID-19: review of epidemiology and potential treatments against 2019 novel coronavirus. *Discoveries* 8 (2), e108. v doi:10.15190/d.2020.5
- Jin, H., Zhang, H., Ma, T., Lan, H., Feng, S., Zhu, H., et al. (2018). Resveratrol protects murine chondrogenic ATDC5 cells against LPS-induced inflammatory injury through up-regulating MiR-146b. *Cell. Physiol. Biochem.* 47 (3), 972–980. doi:10.1159/000490141
- Johnson, B. S., and Laloraya, M. (2020). A cytokine super cyclone in COVID-19 patients with risk factors: the therapeutic potential of BCG immunization. *Cytokine Growth Factor Rev.* 54, 32–42. doi:10.1016/j.cytogr.2020.06.014
- Jurenka, J. S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of Curcuma longa: a review of preclinical and clinical research. *Alternative Med. Rev.* 14 (2), 141–153.
- Kalra, E. K. (2003). Nutraceutical—definition and introduction. *AAPS PharmSci* 5 (3), E25. doi:10.1208/ps050325
- Kocsic, H., Damiani, G., Stamenkovic, B., Tirant, M., Jovic, A., Tiodorovic, D., et al. (2019). Dietary compounds as potential modulators of microRNA expression in psoriasis. *Ther. Adv. Chronic Dis.* 10, 2040622319864805. doi:10.1177/2040622319864805
- Lambert, K. A., Roff, A. N., Pangniban, R. P., Douglas, S., and Ishmael, F. T. (2018). MicroRNA-146a is induced by inflammatory stimuli in airway epithelial cells and augments the anti-inflammatory effects of glucocorticoids. *PLoS One* 13 (10), e0205434. doi:10.1371/journal.pone.0205434
- Latruffe, N., Lançon, A., Frazzi, R., Aires, V., Delmas, D., Michaille, J. J., et al. (2015). Exploring new ways of regulation by resveratrol involving miRNAs, with emphasis on inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1348 (1), 97–106. doi:10.1111/nyas.12819
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75 (5), 843–854. doi:10.1016/0092-8674(93)90529-y
- Lee, Y. S., and Dutta, A. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* 4, 199–227. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222
- Li, X., Geng, M., Peng, Y., Meng, L., and Lu, S. (2020). Molecular immune pathogenesis and diagnosis of COVID-19. *J. Pharm. Anal.* 10 (2), 102–108. doi:10.1016/j.jpaha.2020.03.001
- Li, Y., Chan, E. Y., Li, J., Ni, C., Peng, X., Rosenzweig, E., et al. (2010). MicroRNA expression and virulence in pandemic influenza virus-infected mice. *J. Virol.* 84 (6), 3023–3032. doi:10.1128/JVI.02203-09
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., et al. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 8 (3), 167. doi:10.3390/nu8030167
- Lin, S. C., Ho, C. T., Chuo, W. H., Li, S., Wang, T. T., and Lin, C. C. (2017). Effective inhibition of MERS-CoV infection by resveratrol. *BMC Infect. Dis.* 17 (1), 144. doi:10.1186/s12879-017-2253-8
- Lingeswaran, M., Goyal, T., Ghosh, R., Suri, S., Mitra, P., Misra, S., et al. (2020). Inflammation, immunity and immunogenetics in COVID-19: a narrative review. *Indian J. Clin. Biochem.* 35 (3), 260–273. doi:10.1007/s12291-020-00897-3
- Liu, J., Hou, C., Chen, X., Wu, L., and Wang, X. (2019). Notoginsenoside R1 protects human renal proximal tubular epithelial cells from lipopolysaccharide-stimulated inflammatory damage by up-regulation of miR-26a. *Chem. Biol. Interact.* 308, 364–371. doi:10.1016/j.cbi.2019.05.053
- Liu, L., Anderson, G. A., Fernandez, T. G., and Doré, S. (2019). Efficacy and mechanism of Panax ginseng in experimental Stroke. *Front. Neurosci.* 13, 294. doi:10.3389/fnins.2019.00294
- Liu, Y., Guan, H., Zhang, J. L., Zheng, Z., Wang, H. T., Tao, K., et al. (2018). Acute downregulation of miR-199a attenuates sepsis-induced acute lung injury by targeting SIRT1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 314 (4), C449–C455. doi:10.1152/ajpcell.00173.2017
- Liu, Y. C., Kuo, R. L., and Shih, S. R. (2020). COVID-19: the first documented coronavirus pandemic in history. *Biomed. J.* 43 (4), 328–333.
- Lü, J. M., Yao, Q., and Chen, C. (2009). Ginseng compounds: an update on their molecular mechanisms and medical applications. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 7 (3), 293–302.
- Ma, F., Liu, F., Ding, L., You, M., Yue, H., Zhou, Y., et al. (2017). Anti-inflammatory effects of curcumin are associated with down regulating microRNA-155 in LPS-treated macrophages and mice. *Pharm. Biol.* 55 (1), 1263–1273. doi:10.1080/13880209.2017.1297838
- Magro, G. (2020). SARS-CoV-2 and COVID-19: is interleukin-6 (IL-6) the 'culprit lesion' of ARDS onset? What is there besides Tocilizumab? *SGP130Fc. Cytokine X* 2 (2), 100029. doi:10.1016/j.cyttox.2020.100029
- Marinella, M. A. (2020). Indomethacin and resveratrol as potential treatment adjuncts for SARS-CoV-2/COVID-19. *Int. J. Clin. Pract.* 74, e13535. doi:10.1111/ijcp.13535
- Martin-Loeches, I., Solé-Violán, J., Rodríguez de Castro, F., García-Laorden, M. I., Borderias, L., Blanquer, J., et al. (2012). Variants at the promoter of the interleukin-6 gene are associated with severity and outcome of pneumococcal community-acquired pneumonia. *Intensive Care Med.* 38 (2), 256–262. doi:10.1007/s00134-011-2406-y
- McBride, R., van Zyl, M., and Fielding, B. C. (2014). The coronavirus nucleocapsid is a multifunctional protein. *Viruses* 6 (8), 2991–3018. doi:10.3390/v6082991
- McCarty, M. F., and DiNicolantonio, J. J. (2020). Nutraceuticals have potential for boosting the type 1 interferon response to RNA viruses including influenza and coronavirus. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 63 (3), 383–385. doi:10.1016/j.pcad.2020.02.007
- McCubrey, J. A., Lertpiriyapong, K., Steelman, L. S., Abrams, S. L., Yang, L. V., Murata, R. M., et al. (2017). Effects of resveratrol, curcumin, berberine and other nutraceuticals on aging, cancer development, cancer stem cells and microRNAs. *Aging* 9 (6), 1477–1536. doi:10.18632/aging.101250
- Mehta, P., McAuley, D. F., Brown, M., Sanchez, E., Tattersall, R. S., and Manson, J. J. (2020). COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet* 395 (10229), 1033–1034. doi:10.1016/S0140-6736(20)30628-0
- Merad, M., and Martin, J. C. (2020). Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 20 (6), 355–362. doi:10.1038/s41577-020-0331-4
- Mi, S., Zhang, J., Zhang, W., and Huang, R. S. (2013). Circulating microRNAs as biomarkers for inflammatory diseases. *MicroRNA* 2 (1), 63–71. doi:10.2174/2211536611302010007
- Moss, J. W., and Ramji, D. P. (2016). Nutraceutical therapies for atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* 13 (9), 513–532. doi:10.1038/nrcardio.2016.103
- O'Mahony, L., Stepien, M., Gibney, M. J., Nugent, A. P., and Brennan, L. (2011). The potential role of vitamin D enhanced foods in improving vitamin D status. *Nutrients* 3 (12), 1023–1041. doi:10.3390/nu3121023

- Otton, R., Bolin, A. P., Ferreira, L. T., Marinovic, M. P., Rocha, A. L. S., and Mori, M. A. (2018). Polyphenol-rich green tea extract improves adipose tissue metabolism by down-regulating miR-335 expression and mitigating insulin resistance and inflammation. *J. Nutr. Biochem.* 57, 170–179. doi:10.1016/j.jnutbio.2018.03.024
- Paik, S., Choe, J. H., Choi, G. E., Kim, J. E., Kim, J. M., Song, G. Y., et al. (2019). Rg6, a rare ginsenoside, inhibits systemic inflammation through the induction of interleukin-10 and microRNA-146a. *Sci. Rep.* 9 (1), 4342. doi:10.1038/s41598-019-40690-8
- Qian, D., Shao, X., Li, Y., and Sun, X. (2019). Notoginsenoside R1 protects WI-38 cells against lipopolysaccharide-triggered injury via adjusting the miR-181a/TLR4 axis. *J. Cell. Biochem.* 120 (12), 19764–19774. doi:10.1002/jcb.29282
- Qian, L. B., Jiang, S. Z., Tang, X. Q., Zhang, J., Liang, Y. Q., Yu, H. T., et al. (2017). Exacerbation of diabetic cardiac hypertrophy in OVE26 mice by angiotensin II is associated with JNK/c-Jun/miR-221-mediated autophagy inhibition. *Oncotarget* 8 (63), 106661–106671
- Quintanilha, B. J., Reis, B. Z., Duarte, G. B. S., Cozzolino, S. M. F., and Rogero, M. M. (2017). Nutrimicros: role of microRNAs and nutrition in modulating inflammation and chronic diseases. *Nutrients* 9 (11). doi:10.3390/nu911168
- Ramalingam, P., Palanichamy, J. K., Singh, A., Das, P., Bhagat, M., Kassab, M. A., et al. (2014). Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *Rna* 20 (1), 76–87. doi:10.1261/ma.041814.113
- Ramírez-Garza, S. L., Laveriano-Santos, E. P., Marhuenda-Muñoz, M., Storniolo, C. E., Tresserra-Rimbau, A., Vallverdú-Queralt, A., et al. (2018). Health effects of resveratrol: results from human intervention trials. *Nutrients* 10 (12). doi:10.3390/nu10121892
- Ran, Z. H., Chen, C., and Xiao, S. D. (2008). Epigallocatechin-3-gallate ameliorates rats colitis induced by acetic acid. *Biomed. Pharmacother.* 62 (3), 189–196. doi:10.1016/j.biopha.2008.02.002
- Reithmair, M., Buschmann, D., Märte, M., Kirchner, B., Hagl, D., Kaufmann, I., et al. (2017). Cellular and extracellular miRNAs are blood-compartment-specific diagnostic targets in sepsis. *J. Cell Mol. Med.* 21 (10), 2403–2411. doi:10.1111/jcmm.13162
- Rodriguez, A. J., Mousa, A., Ebeling, P. R., Scott, D., and de Courten, B. (2018). Effects of vitamin D supplementation on inflammatory markers in heart failure: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Sci. Rep.* 8 (1), 1169. doi:10.1038/s41598-018-19708-0
- Saba, R., Sorensen, D. L., and Booth, S. A. (2014). MicroRNA-146a: a dominant, negative regulator of the innate immune response. *Front. Immunol.* 5, 578. doi:10.3389/fimmu.2014.00578
- Sabino, J., Verstockt, B., Vermeire, S., and Ferrante, M. (2019). New biologics and small molecules in inflammatory bowel disease: an update. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 12, 1756284819853208. doi:10.1177/1756284819853208
- Salvi, V., Gianello, V., Tiberio, L., Sozzani, S., and Bosisio, D. (2019). Cytokine targeting by miRNAs in autoimmune diseases. *Front. Immunol.* 10, 15. doi:10.3389/fimmu.2019.00015
- Schett, G., Sticherling, M., and Neurath, M. F. (2020). COVID-19: risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases?. *Nat. Rev. Immunol.* 20 (5), 271–272. doi:10.1038/s41577-020-0312-7
- Shakoory, B., Carcillo, J. A., Chatham, W. W., Amdur, R. L., Zhao, H., Dinarello, C. A., et al. (2016). Interleukin-1 receptor blockade is associated with reduced mortality in sepsis patients with features of macrophage activation syndrome: reanalysis of a prior phase III trial. *Crit. Care Med.* 44 (2), 275–281. doi:10.1097/CCM.0000000000001402
- Sokol, C. L., and Luster, A. D. (2015). The chemokine system in innate immunity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7 (5). doi:10.1101/cshperspect.a016303
- Song, J., Jun, M., Ahn, M. R., and Kim, O. Y. (2016). Involvement of miR-Let7A in inflammatory response and cell survival/apoptosis regulated by resveratrol in THP-1 macrophage. *Nutr. Res. Pract.* 10 (4), 377–384. doi:10.4162/nrp.2016.10.4.377
- Sonkoly, E., and Pivarcsi, A. (2009). microRNAs in inflammation. *Int. Rev. Immunol.* 28 (6), 535–561. doi:10.3109/08830180903208303
- Sun, C. M., Wu, J., Zhang, H., Shi, G., and Chen, Z. T. (2017). Circulating miR-125a but not miR-125b is decreased in active disease status and negatively correlates with disease severity as well as inflammatory cytokines in patients with Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* 23 (44), 7888–7898. doi:10.3748/wjg.v23.i44.7888
- Sun, Y., Li, Q., Gui, H., Xu, D. P., Yang, Y. L., Su, D. F., et al. (2013). MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines. *Cell Res.* 23 (11), 1270–1283. doi:10.1038/cr.2013.116
- Szilágyi, B., Fejes, Z., Pócsi, M., Kappelmayr, J., and Nagy, B., Jr. (2019). Role of sepsis modulated circulating microRNAs. *Ejfc* 30 (2), 128–145.
- Tabolacci, C., Forni, C., Jadeja, R. N., and Facchiano, F. (2019). Natural compounds against cancer, inflammation, and oxidative stress. *BioMed Res. Int.* 2019, 9495628. doi:10.1155/2019/9495628
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K. J., and Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (33), 12481–12486. doi:10.1073/pnas.0605298103
- Tang, Y., Liu, J., Zhang, D., Xu, Z., Ji, J., and Wen, C. (2020). Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front. Immunol.* 11, 1708. doi:10.3389/fimmu.2020.01708
- Tavakolpour, S., Rakhshandehroo, T., Wei, E. X., and Rashidian, M. (2020). Lymphopenia during the COVID-19 infection: what it shows and what can be learned. *Immunol. Lett.* 225, 31–32. doi:10.1016/j.imlet.2020.06.013
- Teng, G. G., Wang, W. H., Dai, Y., Wang, S. J., Chu, Y. X., and Li, J. (2013). Let-7b is involved in the inflammation and immune responses associated with *Helicobacter pylori* infection by targeting Toll-like receptor 4. *PLoS One* 8 (2), e56709. doi:10.1371/journal.pone.0056709
- Testa, U., Pelosi, E., Castelli, G., and Labbaye, C. (2017). miR-146 and miR-155: two key modulators of immune response and tumor development. *Noncoding RNA* 3 (3). doi:10.3390/ncrna3030022
- Toniati, P., Piva, S., Cattalini, M., Garrafa, E., Regola, F., Castelli, F., et al. (2020). Tocilizumab for the treatment of severe COVID-19 pneumonia with hyperinflammatory syndrome and acute respiratory failure: a single center study of 100 patients in Brescia, Italy. *Autoimmun. Rev.* 19 (7), 102568. doi:10.1016/j.autrev.2020.102568
- Torres, J. D., Dueik, V., Carré, D., and Bouchon, P. (2019). Effect of the addition of soluble dietary fiber and green tea polyphenols on acrylamide formation and in vitro starch digestibility in baked starchy matrices. *Molecules* 24 (20). doi:10.3390/molecules24203674
- Tudor, S., Giza, D. E., Lin, H. Y., Fabris, L., Yoshiaki, K., D'Abundo, L., et al. (2014). Cellular and Kaposi's sarcoma-associated herpes virus microRNAs in sepsis and surgical trauma. *Cell Death Dis.* 5 (12), e1559. doi:10.1038/cddis.2014.515
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., and Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1843 (11), 2563–2582. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.05.014
- Vabret, N., Britton, G. J., Gruber, C., Hegde, S., Kim, J., Kuksin, M., et al. (2020). Immunology of COVID-19: current state of the science. *Immunity* 52 (6), 910–941. doi:10.1016/j.immuni.2020.05.002
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M. F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R. J., Wolthers, K. C., et al. (2004). Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10 (4), 368–373. doi:10.1038/nm1024
- Vasilescu, C., Rossi, S., Shimizu, M., Tudor, S., Veronese, A., Ferracin, M., et al. (2009). MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* 4 (10), e7405. doi:10.1371/journal.pone.0007405
- Wang, C., Qu, Z., Kong, L., Xu, L., Zhang, M., Liu, J., et al. (2019). Quercetin ameliorates lipopolysaccharide-caused inflammatory damage via down-regulation of miR-221 in WI-38 cells. *Exp. Mol. Pathol.* 108, 1–8. doi:10.1016/j.yexmp.2019.03.002
- Wang, H. J., Zhang, P. J., Chen, W. J., Feng, D., Jia, Y. H., and Xie, L. X. (2012). Four serum microRNAs identified as diagnostic biomarkers of sepsis. *J. Trauma Acute Care Surg.* 73 (4), 850–854. doi:10.1097/TA.0b013e31825a7560
- Wang, J. F., Yu, M. L., Yu, G., Bian, J. J., Deng, X. M., Wan, X. J., et al. (2010). Serum miR-146a and miR-223 as potential new biomarkers for sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394 (1), 184–188. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.145
- Wang, S., and Olson, E. N. (2009). AngiomiRs—key regulators of angiogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19 (3), 205–211. doi:10.1016/j.gde.2009.04.002

- Weiskirchen, S., and Weiskirchen, R. (2016). Resveratrol: how much wine do you have to drink to stay healthy?. *Adv Nutr* 7 (4), 706–718. doi:10.3945/an.115.011627
- Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., and Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*. 324 (8), 782–793. doi:10.1001/jama.2020.12839
- Yan, Z., Zhong, Y., Duan, Y., Chen, Q., and Li, F. (2020). Antioxidant mechanism of tea polyphenols and its impact on health benefits. *Anim Nutr* 6 (2), 115–123. doi:10.1016/j.aninu.2020.01.001
- Ye, Q., Wang, B., and Mao, J. (2020). The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. *J. Infect.* 80 (6), 607–613. doi:10.1016/j.jinf.2020.03.037
- Ying, H., Kang, Y., Zhang, H., Zhao, D., Xia, J., Lu, Z., et al. (2015). MiR-127 modulates macrophage polarization and promotes lung inflammation and injury by activating the JNK pathway. *J. Immunol.* 194 (3), 1239–1251. doi:10.4049/jimmunol.1402088
- Yu, S. E., Mwesige, B., Yi, Y. S., and Yoo, B. C. (2019). Ginsenosides: the need to move forward from bench to clinical trials. *J. Ginseng Res.* 43 (3), 361–367. doi:10.1016/j.jgr.2018.09.001
- Zabetakis, I., Lordan, R., Norton, C., and Tsoupras, A. (2020). COVID-19: the inflammation link and the role of nutrition in potential mitigation. *Nutrients* 12 (5), 1466. doi:10.3390/nu12051466
- Zahedi, M., Ghiasvand, R., Feizi, A., Asgari, G., and Darvish, L. (2013). Does quercetin improve cardiovascular risk factors and inflammatory biomarkers in women with type 2 diabetes: a double-blind randomized controlled clinical trial. *Int. J. Prev. Med.* 4 (7), 777–785.
- Zahedipour, F., Hosseini, S. A., Sathyapalan, T., Majeed, M., Jamialahmadi, T., Al-Rasadi, K., et al. (2020). Potential effects of curcumin in the treatment of COVID-19 infection. *Phytother Res.* 34 (11), 2911–2920 doi:10.1002/ptr.6738
- Zhang, C., Wu, Z., Li, J. W., Zhao, H., and Wang, G. Q. (2020). Cytokine release syndrome in severe COVID-19: interleukin-6 receptor antagonist tocilizumab may be the key to reduce mortality. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55 (5), 105954. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.105954
- Zhang, G., Liu, Y., Xu, L., Sha, C., Zhang, H., and Xu, W. (2019). Resveratrol alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation in PC-12 cells and in rat model. *BMC Biotechnol.* 19 (1), 10.
- Zhang, Q., Wang, Y., Zhang, M., and Ying, H. (2019). Green tea polyphenols attenuate LPS-induced inflammation through upregulating microRNA-9 in murine chondrogenic ATDC5 cells. *J. Cell. Physiol.* 234 (12), 22604–22612. doi:10.1002/jcp.28826
- Zhang, S., Li, L., Shen, A., Chen, Y., and Qi, Z. (2020). Rational use of tocilizumab in the treatment of novel coronavirus pneumonia. *Clin. Drug Invest.* 40 (6), 511–518. doi:10.1007/s40261-020-00917-3
- Zhao, D., Zhuang, N., Ding, Y., Kang, Y., and Shi, L. (2016). MiR-221 activates the NF- κ B pathway by targeting A20. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472 (1), 11–18
- Zhu, X., Zhu, Y., Li, C., Yu, J., Ren, D., Qiu, S., et al. (2019). 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates macrophage polarization and ameliorates experimental inflammatory bowel disease by suppressing miR-125b. *Int. Immunopharm.* 67, 106–118. doi:10.1016/j.intimp.2018.12.015
- Zhu, Z., Liang, L., Zhang, R., Wei, Y., Su, L., Tejera, P., et al. (2017). Whole blood microRNA markers are associated with acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med. Exp.* 5 (1), 38. doi:10.1186/s40635-017-0155-0

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Desjarlais, Wirth, Lahaie, Ruknudin, Hardy, Rivard and Chemtob. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.