

Université de Montréal

**Pharmacologie des variations de débit sanguin oculaires chez le
rat au moyen de la débitmétrie au laser par effet Doppler**

Par

Simon Héту

Département de physiologie
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise es sciences
en physiologie

janvier 2011

© Simon Héту, 2011

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Pharmacologie des variations de débit sanguin oculaires chez le rat au moyen de la débitmétrie au laser par effet Doppler

Présenté par :

Simon Hétu

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Éric Thorin
Président-rapporteur

Dre Elvire Vaucher
Directrice de recherche

Dr Réjean Couture
Codirecteur

Dre Hélène Kergoat
Membre du jury

RÉSUMÉ

La débitmétrie au laser à effet Doppler (LDF) constitue une méthode prometteuse et non-invasive pour l'étude du débit sanguin local dans l'œil. Cette technique est basée sur un changement de fréquence subi par la lumière lors du mouvement des globules rouges dans les vaisseaux. Une nouvelle sonde LDF a été testée pour sa sensibilité à évaluer la circulation rétinienne/choroïdienne sous des conditions hypercapniques et en présence de diverses substances vasoactives ou suivant la photocoagulation des artères rétiniennes chez le rat. Après dilatation pupillaire, la sonde LDF a été placée en contact avec la cornée de rats anesthésiés et parallèle à l'axe optique. L'hypercapnie a été provoquée par inhalation de CO₂ (8% dans de l'air médical), alors que les agents pharmacologiques ont été injectés de façon intravitréenne. La contribution relative à la circulation choroïdienne a été évaluée à la suite de la photocoagulation des artères rétiniennes. Le débit sanguin s'est trouvé significativement augmenté à la suite de l'hypercapnie (19%), de l'adénosine (14%) ou du nitroprusside de sodium (16%) comparativement au niveau de base, alors que l'endothéline-1 a provoqué une baisse du débit sanguin (11%). La photocoagulation des artères rétiniennes a significativement diminué le débit sanguin (33%).

Des mesures en conditions pathologiques ont ensuite été obtenues après l'injection intravitréenne d'un agoniste sélectif du récepteur B₁ (RB₁). Ce récepteur des kinines est surexprimé dans la rétine des rats rendus diabétiques avec la streptozotocine (STZ) en réponse à l'hyperglycémie et au stress oxydatif. Les résultats ont montré que le RB₁ est surexprimé dans la rétine chez les rats

diabétiques-STZ à 4 jours et 6 semaines. À ces moments, le débit sanguin rétinien/choroïdien a été significativement augmenté (15 et 18 %) après l'injection de l'agoniste, suggérant un effet vasodilatateur des RB₁ dans l'œil diabétique.

Bien que la circulation choroïdienne contribue probablement au signal LDF, les résultats démontrent que le LDF représente une technique efficace et non-invasive pour l'étude de la microcirculation rétinienne *in-vivo* en continu. Cette méthode peut donc être utilisée pour évaluer de façon répétée les réponses du débit sanguin pendant des modifications métaboliques ou pharmacologiques dans des modèles animaux de maladies oculaires.

Mots clés : choroïde, circulation, débit sanguin, diabète, kinines, laser Doppler, œil, récepteur B₁, rétine.

ABSTRACT

Laser Doppler Flowmetry (LDF) is a promising, non-invasive technique to assess local ocular blood flow. This technique is based on a Doppler frequency shift of the backscattered light due to the movement of the red blood cells in the vessels. A new LDF probe was tested for its sensitivity to assess the retinal/choroidal blood flow variations in response to hypercapnia, diverse vasoactive agents and following retinal arteries photocoagulation in the rat. After pupil dilation, a LDF probe was placed in contact to the cornea of anaesthetised rats in the optic axis. Hypercapnia was induced by inhalation of CO₂ (8% in medical air) while pharmacological agents were injected intravitreously. The relative contribution of the choroidal circulation to the LDF signal was determined after retinal artery occlusion by photocoagulation. Blood flow was significantly increased by hypercapnia (19%), adenosine (14%) and sodium nitroprusside (16%) as compared to baseline values while endothelin-1 decreased blood flow (11%). Photocoagulation of retinal arteries significantly decreased blood flow level (33%).

Measurements in pathological conditions were then obtained after intravitreal injections of a B₁R agonist. This kinin receptor is overexpressed in the retina of streptozotocin (STZ) diabetic rats in response to hyperglycaemia and oxidative stress. Data showed that B₁R was upregulated in the STZ-diabetic retina at 4 days and 6 weeks. At these time points, retinal/choroidal blood flow was significantly increased (15 and 18 %) upon injection of the agonist, suggesting a vasodilatory effect of B₁R in the diabetic eye.

Although choroidal circulation most likely contributes to the LDF signal in this setting, the results demonstrate that LDF represents a suitable *in vivo* non-invasive technique to monitor online relative changes of retinal microcirculation. This technique could be used for repeatedly assessing blood flow reactivity to metabolic or pharmacologic challenges in rodent models of ocular diseases.

Keywords : blood flow, circulation, choroid, diabetes, eye, kinins, laser Doppler B₁ receptor, retina.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	iii
ABSTRACT	v
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES FIGURES	ix
ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xii
INTRODUCTION	1
Anatomie de la rétine	2
La circulation de l'œil	5
<i>Anatomie de la circulation oculaire</i>	5
<i>La microcirculation rétinienne</i>	7
<i>Régulation du débit sanguin rétinien</i>	10
Le Diabète	17
Les Kinines	20
La Rétinopathie diabétique	23
La débitmétrie au laser à effet Doppler	27
Objectifs spécifiques à l'étude	31
ARTICLE	34
ABSTRACT	36
1. Introduction	37
2. Material and methods	40
2.1. Animals	40
2.2. <i>Animal preparation</i>	40
2.3. <i>Laser Doppler Flowmetry</i>	42
2.4. <i>Hypercapnia</i>	44
2.5. <i>Intravitreal injections</i>	44
2.6. <i>Retinal arteries photocoagulation</i>	45
2.7. <i>Statistical analysis</i>	45
3. Results	47
3.1. <i>Recording of blood flow</i>	47
3.2. <i>Hypercapnia</i>	47
3.3. <i>Intravitreal administration of drugs</i>	48
3.4. <i>Retinal vessels photocoagulation</i>	48
3.5. <i>Comparison with measurements obtained with the DP3 probe</i>	49
4. Discussion	49
5. Conclusion	54
Acknowledgements	54
References	55
MÉTHODES (Diabète)	66
Rats diabétiques	67
Mesure du débit sanguin rétinien chez les rats diabétiques avec le LDF	68

RÉSULTATS (Diabète).....	69
Paramètres physiologiques.....	70
Réponse hémodynamique oculaire à la stimulation du RB1 lors d'un diabète de 4 jours.....	70
Réponse hémodynamique oculaire à la stimulation du RB1 lors d'un diabète de 6 semaines.....	72
DISCUSSION.....	75
Les Composés pharmacologiques.....	76
Le LDF.....	84
Le récepteur B ₁ des kinines et le diabète.....	87
Les avantages de la technique du LDF.....	92
CONCLUSION.....	95
BIBLIOGRAPHIE.....	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Anatomie de l'œil humain.....	2
Figure 2 : Coupe de rétine	3
Figure 3 : Représentation schématique des micro-vaisseaux rétiens	8
Figure 4 : Facteurs régulant le débit sanguin rétinien	10
Figure 5 : Balance entre facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs	13
Figure 6 : Détails des systèmes Rénine-Angiotensine et Kallicréine-Kinine... ..	22
Figure 7 : Représentation schématique des interactions potentielles entre le système kallicréine-kinines dans la rétinopathie diabétique	23
Figure 8 : Implication de l'anhydrase carbonique	26
Figure 9 : Représentation de l'effet Doppler	28
Figure 10 : Représentation schématique de la spectroscopie à mélange optique.....	30
Figure 11 : Tracé de la perfusion oculaire par LDF après injection d'agoniste B1 chez un rat diabétique de 4 jours	71
Figure 12 : Tracé de la perfusion oculaire par LDF après injection de saline chez un rat diabétique de 4 jours	71
Figure 13 : Pourcentage de la variation de la perfusion oculaire lors de l'injection d'agoniste B1 chez le groupe de rats diabétiques de 4 jours comparé au groupe contrôle	71
Figure 14 : Tracé de la perfusion oculaire par LDF après injection d'agoniste B1 chez un rat diabétique de 6 semaines.....	73
Figure 15 : Tracé de la perfusion oculaire par LDF après injection de saline chez un rat diabétique de 6 semaines.....	73
Figure 16 : Pourcentage de la variation de la perfusion oculaire lors de l'injection d'agoniste B1 chez le groupe de rats diabétiques de 6 semaines comparé au groupe contrôle	73
Figure 17 : Tracé de la perfusion oculaire par LDF après injection d'agoniste B1 chez un rat contrôle de 6 semaines	74
Figure 18 : Pourcentage de la variation de la perfusion oculaire lors de l'injection de saline chez le groupe de rats diabétiques de 6 semaines	74

Figure 19 : Comparaison du temps de latence entre le groupe de rats diabétiques 6 semaines et le groupe de rats diabétiques 4 jours	74
Figure 20 : Représentation schématique de la voie NOS/GC dans les cellules de la paroi vasculaire	77
Figure 21 : Effets neuroprotecteurs de l'adénosine	78
Figure 22 : Actions vasculaires de l'adénosine	80
Figure 23 : Rôles du NO et de ET-1 dans la régulation du tonus vasculaire.....	81

ABRÉVIATIONS

ACE, enzyme de conversion de l'angiotensine; AMPc, adénosine monophosphate cyclique; ANG II, angiotensine II; BK, bradykinine; CA-I, anhydrase carbonique I; CA-II, anhydrase carbonique II; CO₂, dioxyde de carbone; COX, cyclooxygénase; DAG, diacylglycérol; ET-1, endothéline-1; GAD, décarboxylase de l'acide glutamique; GMPc, guanosine monophosphate cyclique; HRF, débitmètre rétinien Heidelberg; IP₃, inositol triphosphate; LDF, débitmétrie au laser à effet Doppler; KBP, protéine de liaison de la kallikréine; NEP, endopeptidase neutre; NF-κB, facteur de transcription nucléaire kappa B; NO, monoxyde d'azote; NOS, NO synthase; PG, prostaglandines; PKC, protéine kinase C; RB₁, récepteur B₁; RB₂, récepteur B₂; ROS, espèces réactives de l'oxygène; RPE, cellules épithéliales pigmentées; RRF, facteur de relaxation rétinien; TXA₂, tromboxane A₂; VEGF, facteur de croissance endothélial vasculaire;

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes deux directeurs, Dre Elvire Vaucher et Dr Réjean Couture, qui m'ont permis, par leur soutien technique et moral, de mener à bien ce projet de recherche et de m'avoir soutenu même dans les passages à vide. Tous les membres du laboratoire Vaucher, et plus particulièrement Mylène Pouliot et Florence Dotigny qui sont devenues des confidentes en plus de m'apporter conseil et soutien et enfin le Réseau de recherche en santé de la vision pour le soutien financier. Sur une note plus personnelle, mes parents et ma conjointe qui m'ont apporté amour et support, ainsi que mon fils qui me procure la joie de vivre.

INTRODUCTION

Anatomie de la rétine

Avant d'entamer le sujet principal de ce travail, il importe de décrire brièvement l'anatomie de la rétine et les cellules qui la composent.

La rétine est à la base de la vision en convertissant la lumière en signal nerveux afin d'être traité par le cortex visuel. Brièvement, la lumière entre par la

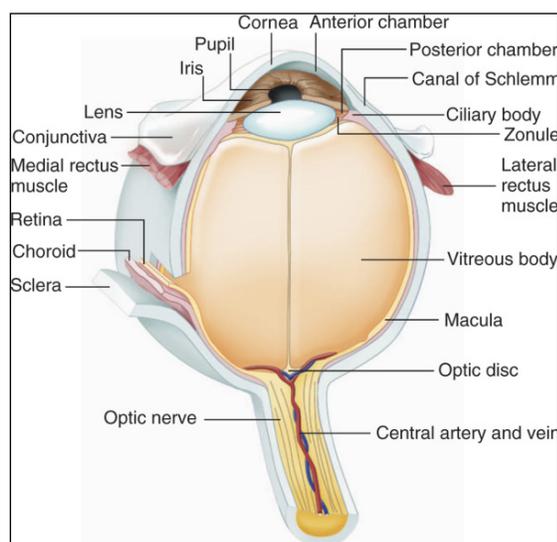


Figure 1 : Anatomie de l'oeil humain. (Tiré de Cecil, Goldman et al. 2008)

pupille et est focalisée par le cristallin sur la rétine qui se chargera de convertir ces signaux lumineux en signal nerveux et de relayer cette information vers le cortex visuel. La rétine tapisse la majeure partie du segment postérieur de l'œil, à l'arrière de la chambre vitrée et elle est composée de six types de cellules

neurales : les photorécepteurs, les cellules horizontales, les cellules bipolaires, les cellules amacrines, les cellules interplexiformes et les cellules ganglionnaires; chacune présentant une fonctionnalité propre. Celles-ci sont en contact étroit avec les cellules gliales ou les cellules de Muller (Purves, Augustine et al. 2005).

L'arrangement de ces cellules est a priori contraire à ce que dicte la logique : les rayons lumineux devant pénétrer l'ensemble de ces couches cellulaires avant d'atteindre les photorécepteurs situés sur la couche la plus interne de la rétine. Par contre, cet agencement s'explique aisément par la relation étroite entre les photorécepteurs et l'épithélium pigmentaire sur lequel ils

reposit. En effet, ce dernier est essentiel au recyclage et au renouvellement de ces cellules (Purves, Augustine et al. 2005).

Les photorécepteurs sont des cellules hautement spécialisées, afin de convertir la lumière en signaux nerveux selon un processus appelé *phototransduction*. Ceux-ci comprennent

deux types distincts de cellules : les cônes et les bâtonnets. Les premiers sont responsables de la vision lorsque la luminosité est élevée et où la vision des couleurs est accentuée. Ils se déclinent alors sous trois formes, selon leur sensibilité à une certaine couleur (bleu, vert ou rouge). Ils prédominent en

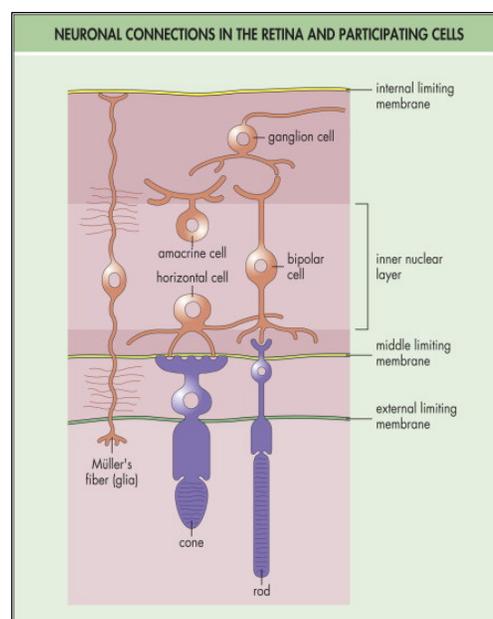


Figure 2 : Coupe de rétine montrant l'organisation d'ensemble des couches cellulaires. (Tiré de Yanoff, Duker et al. 2004)

bâtonnets quant à eux, sont responsables de la vision sous de faibles luminosités et constituent la majorité des photorécepteurs. Ils prédominent dans toutes les autres régions de la rétine mais sont absents en périphérie (Kaufman and Alm 2003).

Les cellules horizontales possèdent un nombre élevé de dendrites qui permettent plusieurs contacts entre eux, avec les photorécepteurs (cônes et/ou bâtonnets) ainsi qu'avec les cellules bipolaires. Les cellules horizontales apportent une rétro-inhibition aux photorécepteurs ou une rétro-inhibition *feed-forward* aux cellules bipolaires. Ces dernières sont alors chargées de relayer le

signal des photorécepteurs (où ils peuvent faire contact avec une ou plusieurs cellules selon leur emplacement) vers les cellules amacrines ou ganglionnaires (Kaufman and Alm 2003).

Globalement, les cellules amacrines sont responsables des interactions latérales entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires, en permettant au système visuel de garder sa sensibilité sur une large gamme de contrastes (Purves, Augustine et al. 2005). Par contre, ces dernières font l'objet d'une grande diversité et peuvent être classées selon le diamètre de leur champ récepteur (étroit, petit, moyen et large). Ainsi, leur fonction principale peut varier selon le type et ces cellules peuvent être impliquées dans le relais du signal des bâtonnets vers les cellules ganglionnaires via les cellules bipolaires. Elles peuvent, de plus, être impliquées dans la détection du mouvement par la rétine. Par contre, plusieurs de leurs rôles restent encore à être élucidés (Kaufman and Alm 2003).

Les cellules interplexiformes régulent les synapses citées précédemment en étant postsynaptiques quant aux cellules amacrines et présynaptiques quant aux photorécepteurs et aux cellules bipolaires. Les cellules ganglionnaires constituent quant à elles l'étape ultime de la chaîne d'information, relayant les signaux neuronaux vers le corps genouillé latéral du cerveau. Elles forment des synapses avec les cellules bipolaires et amacrines et leur axone sont myélinisés à l'extérieur de l'œil pour composer le nerf optique (Kaufman and Alm 2003).

Les cellules gliales comprennent quatre types cellulaires : les cellules de Müller, les astrocytes, les cellules microgliales (rôle phagocytaire) et les cellules gliales entourant les axones myélinisés des cellules ganglionnaires. Elles ont

toutes un rôle de soutien et de support pour les cellules neuronales citées précédemment (Kaufman and Alm 2003).

Les cellules de Muller constituent la majorité de ces cellules gliales. Elles couvrent, par leurs nombreuses extensions, la fente synaptique de plusieurs neurones et les isolent donc électriquement et chimiquement. De plus, elles couvrent, avec les astrocytes, les vaisseaux sanguins de la rétine. En plus d'apporter un support structural, elles jouent un rôle dans la régulation du milieu extracellulaire (Kaufman and Alm 2003).

Les astrocytes, avec leurs extensions, font contact autant avec les cellules ganglionnaires qu'avec les capillaires sanguins. Ils sont situés à proximité des vaisseaux sanguins de la rétine où ils peuvent être impliqués dans la régulation du débit sanguin rétinien. Cette implication sera d'ailleurs soulevée tout au long de ce travail (Kaufman and Alm 2003).

La circulation de l'œil

Anatomie de la circulation oculaire

La rétine qui tapisse le fond de l'œil est un des organes les plus fortement perfusés. Elle constitue un organe tout à fait particulier dans le sens que ses vaisseaux sanguins sont directement visibles sans avoir recours à des méthodes invasives. Sa vasculature est complexe, car elle doit pourvoir aux importants besoins métaboliques des cellules, et ce sans obstruer le passage de la lumière (Wu, Kawamura et al. 2003).

Pour ce faire, deux systèmes vasculaires distincts, autant anatomiquement que fonctionnellement, sont impliqués dans la livraison des substrats métaboliques et de l'oxygène dans la rétine : soit le système rétinien, qui irrigue les deux tiers antérieurs de la rétine (rétine interne) et le système choroïdien qui irrigue quant à lui, le tiers postérieur, incluant la région des photorécepteurs qui est avasculaire (rétine externe). Le premier est caractérisé par un bas débit et une forte extraction de l'O₂ tandis qu'au contraire, le second est caractérisé par un fort débit sanguin et une faible extraction de l'O₂ (la circulation choroïdienne fournit environ 85% du débit sanguin oculaire total (Delaey and Van De Voorde 2000).

Ainsi, l'artère rétinienne centrale quitte la tête du nerf optique et se divise alors en deux branches. Ces dernières se divisent à leur tour pour irriguer chacun des quadrants de la rétine (Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008). Les vaisseaux de plus gros calibre se trouvent principalement dans la portion interne de la rétine et leur paroi se trouve en contact direct avec les cellules gliales, surtout des astrocytes, qui ont pour fonction de maintenir leur intégrité (Zhang and Stone 1997). La structure des artères rétiniennes diffère, d'ailleurs, des artères de grosseur comparable à d'autres organes en ce sens qu'elles possèdent une couche musculaire lisse très développée et sont dépourvues de la limitante élastique interne.

Un large lit capillaire reliant les artérioles pré-capillaires et les veinules post-capillaires serait arrangé en couches et comprendrait des capillaires d'environ 5 µm. La paroi des capillaires est composée de trois éléments : des cellules endothéliales orientées dans l'axe du vaisseau et reliées entre elles par des

jonctions serrées, des péricytes en nombre presque aussi important que les cellules endothéliales et d'une lame basale. Enfin, une zone avasculaire d'environ 1.5 mm peut être observée en périphérie de la rétine, de même qu'une zone exempte de capillaires qui entoure les artérioles. Une description plus détaillée de la microcirculation rétinienne sera abordée plus tard. La veine rétinienne centrale quitte, elle aussi, l'œil par la tête du nerf optique pour se drainer dans les sinus caveaux (Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008).

Les vaisseaux choroïdiens, contrairement aux vaisseaux rétiens, bénéficient d'une riche innervation sympathique originant du ganglion cervical supérieur qui innerve le lit vasculaire choroïdien de même que l'artère rétinienne centrale jusqu'à la lamina cribrosa. Ces nerfs, vasoactifs, pourraient agir directement sur la régulation du débit sanguin. Par contre, même si la rétine n'est pas innervée par le système sympathique, elle possède toutefois des récepteurs α et β -adrénergiques (Denis and Elena 1989), de même que des récepteurs à l'angiotensine II (Ferrari-Dileo, Davis et al. 1987; Senanayake, Drazba et al. 2007) en plus d'une innervation par les neurones locaux.

La microcirculation rétinienne

Des études récentes suggèrent une microcirculation rétinienne répartie sur trois niveaux. Le palier superficiel, du côté artériel, est composé majoritairement d'artérioles (se trouvant dans la couche des cellules ganglionnaires), se divisant ensuite dans le plan vertical pour aller former le niveau intermédiaire. Ce dernier est ainsi composé de courts segments capillaires dans le plan horizontal avant de

changer une nouvelle fois de direction vers le niveau le plus profond, composé presque exclusivement d'un réseau anastomotique. La majorité du débit sanguin artériel (70%) est ainsi dirigée des couches superficielles vers la couche

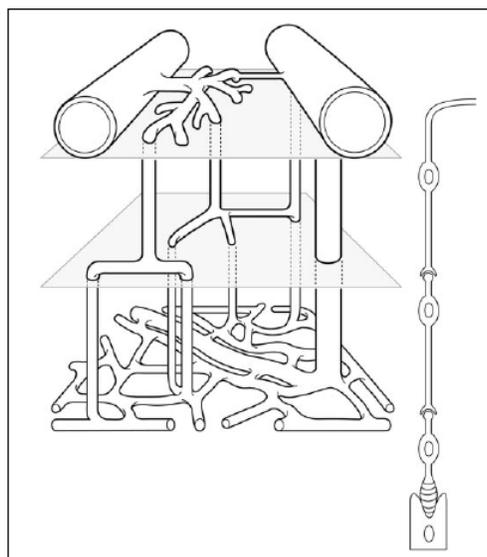


Figure 3 : Représentation schématique des microvaisseaux rétiens. Les artérioles sont situées au coin supérieur gauche et les veinules au coin supérieur droit. Les cellules ganglionnaires sont schématisées en haut, les cellules bipolaires au centre et les photorécepteurs en bas. (tiré de (Paques, Tadayoni et al. 2003))

inférieure. Le réseau veineux comprend, quant à lui, des veinules post-capillaires au niveau profond, changeant abruptement de direction pour aller rejoindre une veine plus importante, située au niveau superficiel, par des veinules transversales. De plus, des connexions entre les réseaux artériel et veineux, au moyen de veinules de plus petit calibre, sont visibles aux paliers superficiels et intermédiaires, créant ainsi

une dérivation du niveau inférieur (Paques, Tadayoni et al. 2003). Les deux paliers superficiels irriguent ainsi la couche des cellules ganglionnaires et des cellules bipolaires. La couche des photorécepteurs, tel que mentionné précédemment, est avasculaire et elle est irriguée par la circulation choroïdienne. Ce schéma de la microcirculation s'est d'ailleurs avéré présent chez plusieurs espèces tels que la souris (Paques, Tadayoni et al. 2003), le rat, le porc (Simoens, De Schaepdrijver et al. 1992) et le macaque (Snodderly, Weinhaus et al. 1992), mais n'a pu être trouvé chez l'humain (Foreman, Bagley et al. 1996).

Cet arrangement sur trois paliers, de même que les liaisons entre les réseaux veineux et artériel, permettrait ainsi une autorégulation locale aux niveaux de la microcirculation en plus de l'autorégulation dite vasomotrice des artères de plus gros calibres. En effet, les dérivations superficielles pourraient rediriger le flux sanguin directement vers la circulation veineuse lors d'une hausse soudaine de la pression de perfusion. Une étude chez le chat a d'ailleurs démontré qu'une hausse de la pression artérielle réduit la proportion du flux sanguin se dirigeant vers les couches inférieures de la rétine (Ben-Nun, Alder et al. 2000). Au contraire, une hausse des besoins métaboliques permettrait de réduire l'impédance de la couche profonde et ainsi augmenter l'apport sanguin. Un autre facteur influençant l'apport d'oxygène à la rétine est l'hématocrite. Il a en effet été démontré que l'hématocrite, de même que la vitesse sanguine, sont plus élevés au niveau des capillaires rétinien qu'ailleurs. Une forte vitesse pourrait ainsi permettre un apport uniforme en sang et réduire l'aggrégation des globules rouges et ce, malgré l'hématocrite élevé. Ce dernier pourrait, quant à lui, augmenter l'apport en oxygène au niveau de la rétine interne dont la demande en oxygène est forte (Paques, Tadayoni et al. 2003).

Une autre particularité de la circulation oculaire réside dans la présence d'une barrière hémato-rétinienne similaire à celle retrouvée au niveau du cerveau (barrière hémato-encéphalique), bien que la première possède des vaisseaux sensiblement plus perméables (Patton, Aslam et al. 2005). En effet, le fonctionnement optimal des cellules nécessite un environnement hautement régulé, ce qui est permis principalement par les propriétés des cellules

endothéliales. La présence de jonctions serrées entre ces cellules, la faible densité de vésicules de pinocytose et l'absence de fenestration confèrent ainsi un haut contrôle de la perméabilité intercellulaire (Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008). Cette fonction de l'endothélium vasculaire rétinien constitue donc un paramètre important à considérer dans l'absorption des médicaments.

Régulation du débit sanguin rétinien

Globalement, la perfusion sanguine est contrôlée par le débit cardiaque, lui-même principalement régulé par le système nerveux autonome et les hormones circulantes. Ce débit est ensuite distribué aux différents organes qui le régulent localement

en

modulant la

résistance

(Flammer

and

Mozaffarieh

2008). Cette

dernière est

ainsi

coordonnée

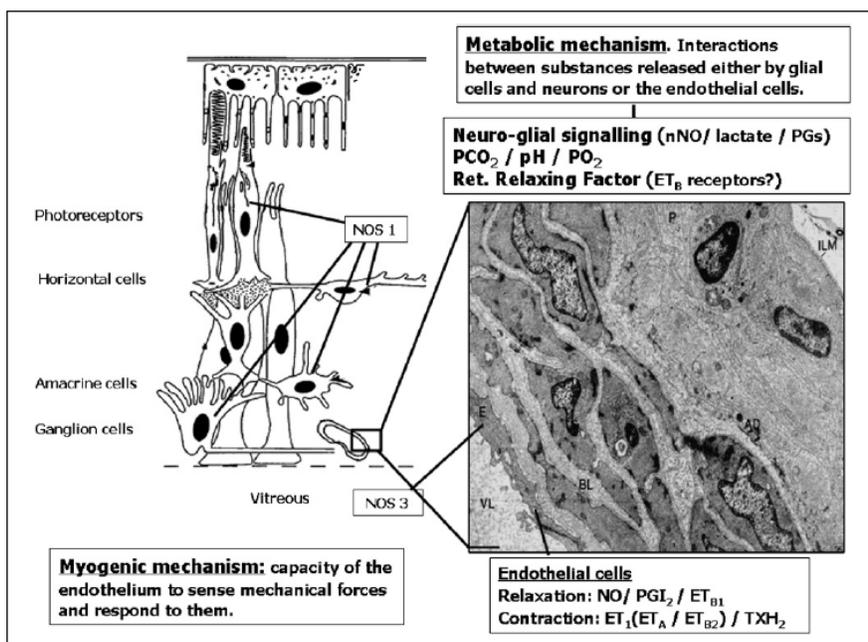


Figure 4 : Le débit sanguin rétinien est régulé par des facteurs métaboliques et myogéniques. Les facteurs métaboliques tels que le NO, les PGs et les ETs sont constitutivement relâchés par les cellules neuronales ou endothéliales pour agir sur les cellules musculaires lisses ou les péricytes. (tiré de (Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008)

par une balance entre facteurs vasodilatateurs et vasoconstricteurs (Thijssen, Rongen et al. 2008). La lumière des vaisseaux, contrôlant ainsi le débit, est sous

l'influence de trois principaux mécanismes vasorégulateurs impliqués à différents niveaux de l'arbre vasculaire. Ainsi, le contrôle dépendant du débit (flow induced) est impliqué dans la régulation des artérioles de gros calibre (100-200 μm) qui produisent une réponse vasomotrice à la suite d'une augmentation des forces de cisaillement (shear stress) produites par la hausse de pression. Le diamètre des artérioles de taille moyenne (20-30 μm), quant à lui, est principalement contrôlé par des facteurs myogéniques. On observe alors une diminution du diamètre des vaisseaux à la suite d'une contraction des muscles lisses, lorsqu'une augmentation de la pression intravasculaire se produit. Enfin, un contrôle neurogène et métabolique domine sur les plus petites artérioles (<20 μm), où la sécrétion de différentes substances influence le diamètre artériolaire (Kuo, Davis et al. 1992). Ce serait d'ailleurs à ce palier que se situerait le principal site de la vasorégulation au niveau de la rétine (Kiss, Polska et al. 2002).

La régulation du débit sanguin oculaire joue plusieurs rôles. En plus d'adapter le débit aux besoins métaboliques relatifs à l'activité rétinienne (couplage neurovasculaire), elle permet aussi de contrebalancer les changements dans la pression sanguine et la perfusion, en plus de maintenir l'arrière de l'oeil à température constante (thermorégulation) (Flammer and Mozaffarieh 2008). Ce contrôle de la circulation oculaire est très complexe et dépend d'une multitude de facteurs qui s'influencent les uns les autres pour ultimement produire une réponse physiologique. L'étude des mécanismes impliqués dans cette régulation est d'ailleurs d'une grande importance, car des troubles affectant la circulation sont impliqués dans plusieurs pathologies oculaires tels que la rétinopathie diabétique

(Schmetterer and Wolzt 1999; De La Cruz, Gonzalez-Correa et al. 2004; Clermont and Bursell 2007) ou le glaucome (Flammer, Orgul et al. 2002; Grieshaber and Flammer 2005).

Alors que le débit sanguin choroïdien est principalement contrôlé par le système nerveux autonome, la régulation de la circulation rétinienne dépend quant à elle des mécanismes d'autorégulation et de facteurs locaux (Delaey and Van De Voorde 2000). Pour la suite de ce travail, nous nous concentrerons principalement sur les mécanismes impliqués dans la régulation de cette dernière.

La circulation rétinienne, de par les contraintes imposées par la nécessité du passage de la lumière (absence d'innervation par le système nerveux autonome et faible densité relative des capillaires) (Funk 1997), est ainsi fortement régulée localement afin de fournir un débit constant même lors de l'activation des neurones (hyperhémie fonctionnelle) (Metaa and Newman 2007). Cette régulation s'effectue par le biais de plusieurs cellules telles que les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les cellules gliales (principalement les cellules de Müller) ou les péricytes. Les cellules de Müller, dont les pieds terminaux entourent les cellules musculaires lisses, semblent ainsi être un intermédiaire essentiel dans le couplage neurovasculaire. En effet, ces dernières peuvent provoquer une hyperpolarisation de cellules musculaires lisses et ainsi créer une vasodilatation (Metaa and Newman 2007). De plus, les péricytes semblent jouer un rôle incontournable dans la régulation du débit sanguin local. Situés sur le côté externe des capillaires et possédant des propriétés contractiles, ces cellules peuvent contrôler la perfusion au niveau des capillaires (Wu, Kawamura et al.

2003; Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008). Ces cellules sont d'ailleurs présentes dans la rétine en plus grande densité que dans tout autre organe (Shepro and Morel 1993; Patton, Aslam et al. 2005).

Tel qu'il a été expliqué précédemment, la régulation de la perfusion rétinienne peut être effectuée à l'aide d'un mécanisme myogénique : où le glycocalyx et les canaux ioniques des cellules endothéliales jouent le rôle de mécanorécepteurs afin de percevoir les forces mécaniques (Lansman, Hallam et al. 1987) ou à l'aide de mécanismes de contrôle métabolique (Delaey and Van De Voorde 2000). Ainsi, le diamètre des vaisseaux peut être modulé par des facteurs systémiques, tels que les gaz du sang, le pH ou les hormones circulantes (bien que

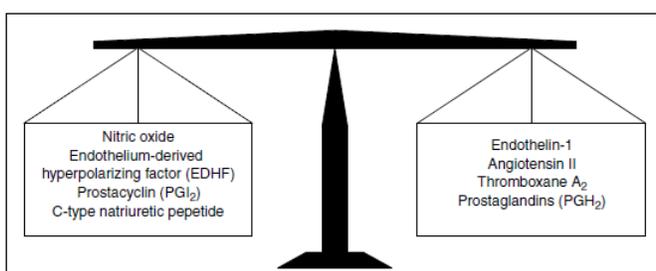


Figure 5 : Le tonus vasculaire dépend de la délicate balance entre les facteurs vasodilatateurs (à gauche) et vasoconstricteurs (à droite). (tiré de (Thijssen, Rongen et al. 2008)

leur effet soit réduit au minimum par la présence de la barrière hémato-rétinienne) (Flammer and Mozaffarieh 2008) ou des facteurs locaux. On peut ainsi

citer la pression partielle de O_2 ou de CO_2 ou encore le pH, en plus d'une multitude de facteurs sécrétés par les cellules endothéliales ou gliales. Ces facteurs peuvent être vasodilatateurs (NO, PGI_2 ...) ou vasoconstricteurs (ET-1, Angiotensine II, TXA_2 ...) (Haefliger, Flammer et al. 2001) et seront décrits plus en détail ci-après.

Parmi les substances vasodilatatrices, le monoxyde d'azote (NO) constitue certainement l'une des molécules les plus importantes dans la régulation du débit

sanguin oculaire. Cette molécule, produite par les cellules endothéliales en conditions basales, serait ainsi impliquée dans la régulation de la circulation oculaire chez le porc (Meyer, Champion et al. 1999) de même que le maintien du tonus basal rétinien chez l'humain (Dorner, Garhofer et al. 2003). Il serait libéré localement en réponse aux forces de cisaillement créées par le mouvement des globules rouges sur les cellules endothéliales (Hein, Rosa et al. 2010 ; Koss 1999; Moncada and Higgs 2006). Le NO est un gaz non polaire qui diffuse librement au travers des membranes après avoir été synthétisé par l'enzyme NO synthase (NOS) qui se décline en trois isoformes (Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008).

La NOS-1 ou neuronale se retrouve dans les neurones du système nerveux central et périphérique. Au niveau de la rétine, elle se retrouve principalement dans les photorécepteurs, les cellules ganglionnaires, amacrines, horizontales et de Müller. La NOS-3 ou endothéliale est exprimée au niveau des cellules endothéliales et des péricytes des vaisseaux et des capillaires de la rétine et de la choroïde (Meyer, Champion et al. 1999) (Chakravarthy, Stitt et al. 1995). Ces deux isoformes sont activées par les complexes calcium/calmoduline. La NOS-2, indépendante du calcium, est principalement présente lors d'inflammation ou d'une réponse immunitaire. Elle est alors en mesure de produire une forte concentration de NO.

Les prostaglandines (PG) constituent d'autres types de molécules ayant des effets vasomodulateurs. Parmi celles-ci, les prostacyclines PGE1, PGE2 et PGI2 sont considérées comme vasodilatatrices dans plusieurs organes (Mori, Saito et al. 2007), alors que les thromboxanes-B2 et A2 (TXB2 et TXA2), PGF2 α et PGH2

sont vasoconstrictrices (Chemtob, Beharry et al. 1991). PGI₂ est issue de l'acide arachidonique et elle est produite en conditions autant physiologiques que pathologiques (Haefliger, Flammer et al. 2001) au niveau de la rétine et de la choroïde. Elle est sécrétée au niveau des péricytes, tout comme d'autres types de prostaglandines tels que les PGE₂ et PGF₂ (Hudes, Li et al. 1988) qui pourraient, eux aussi, jouer un rôle dans le maintien du tonus basal (Pournaras, Tsacopoulos et al. 1978). PGE₁ et PGE₂ produisent leurs effets principalement par l'activation des récepteurs EP₂ et EP₄. Les récepteurs aux prostaglandines E (EP) sont divisés en quatre sous-types : EP₁-EP₄ couplés aux protéines G afin de produire une relaxation des cellules musculaires lisses (Mori, Saito et al. 2007).

Les endothélines (ET) constituent, pour leur part, les vasoconstricteurs les plus puissants en agissant sur plusieurs types de cellules tels que les péricytes et les cellules musculaires lisses (Haefliger, Meyer et al. 1994). Trois isoformes ont été identifiées dans l'endothélium vasculaire (Inoue, Yanagisawa et al. 1989) (ET-1, ET-2 et ET-3) lesquels sont sécrétés au niveau des neurones rétiniens et des astrocytes (Ripodas, de Juan et al. 2001), ET-1 constituant le vasoconstricteur le plus fort. Ces trois isoformes se lient à deux types de récepteurs (ET_A et ET_B) possédant une affinité différente pour chacun d'eux et élicitant même différentes réponses physiologiques. ET_A présente ainsi une plus forte affinité pour ET-1 et il est exprimé à la surface des cellules musculaires lisses ainsi que sur les péricytes pour produire une vasoconstriction (McDonald, Bailie et al. 1995). ET_B quant à lui est exprimé sur les cellules endothéliales et les péricytes (Hirata, Emori et al. 1993) et se décline en deux sous-types : ET_{B1} et ET_{B2}. Le premier possède autant

d'affinité pour chaque isoforme et, contrairement aux autres sous types de récepteur, produit une vasodilatation à la suite de la libération de NO (Hirata, Emori et al. 1993), probablement via une activation de eNOS (Izumi, Nagaoka et al. 2008). Le second possède quant à lui une forte affinité pour ET-3 et sous-tend une vasoconstriction (Sokolovsky, Ambar et al. 1992). Le récepteur ET_{B1} serait impliqué dans le maintien de l'homéostasie de la pression artérielle en réduisant les niveaux plasmatiques de ET-1 et en diminuant, par le fait même, l'activation de ET_A (Reinhart, Preusser et al. 2002).

Un autre métabolite non négligeable impliqué dans la régulation du débit sanguin rétinien est le lactate. En effet, la rétine démontre un taux très élevé de glycolyse où près de 90 % du glucose est converti en lactate (Winkler, Starnes et al. 2004) et ensuite sécrété à l'extérieur des cellules pour prévenir l'acidose. Cette molécule, selon sa concentration extracellulaire, peut alors jouer le rôle de signal pour dicter la réponse vasomotrice. Ainsi, le lactate peut provoquer une vasoconstriction lorsque les ressources en énergie sont suffisantes ou, au contraire, une vasodilatation lorsque les vaisseaux sont en conditions hypoxiques (Yamanishi, Katsumura et al. 2006). Une injection intravitréenne de lactate cause ainsi une dilatation des artéioles de la rétine, principalement par une hausse dans l'activité de la NOS (Hein, Xu et al. 2006), en plus d'agir au niveau des péricytes (Yamanishi, Katsumura et al. 2006).

Enfin l'adénosine, modulateur de la transmission synaptique, est elle aussi impliquée dans la modulation du tonus artériolaire dans la rétine. Celle-ci constitue en effet un puissant vasodilatateur en agissant principalement sur le

sous-type de récepteur A_{2A} et l'activation de la NOS et l'ouverture des canaux K_{ATP} (Hein, Yuan et al. 2005). De plus, une étude récente démontre que cette réponse physiologique serait dépendante de la production de NO (Hein, Rosa et al. 2010). Plus de détails sur les mécanismes d'actions seront apportés ultérieurement.

Pour terminer, une substance encore méconnue : le facteur de relaxation rétinien ou Retinal Relaxing Factor (RRF) semble aussi être impliqué dans le mécanisme de vasodilatation au niveau de la rétine (Delaey and Van de Voorde 1998). Ce facteur semble être indépendant de la présence de l'endothélium vasculaire, de la NOS, de l'adénylate cyclase, de la guanylate cyclase et de la cyclooxygénase (Pournaras, Rungger-Brandle et al. 2008).

L'étude des composés mentionnés précédemment est d'une forte importance clinique puisque certains de ceux-ci seraient impliqués dans le développement de plusieurs pathologies oculaires. En effet, une baisse dans la libération de NO et une formation excessive de ET-1 seraient des événements déterminants dans le dysfonctionnement endothélial qui survient lors du glaucome ou de la rétinopathie diabétique (Lam, Chan et al. 2003; Toda and Nakanishi-Toda 2007).

Le Diabète

Le diabète constitue la sixième cause de mortalité dans le monde chez les adultes de 60 ans et plus (Mathers, Bernard et al. 2003) et son incidence ne cesse d'augmenter dans les pays industrialisés. En effet, pour le Canada, 4,5 % de la

population (environ 1,1 million de personnes) était atteinte de diabète en 2003 contre 3,4 % en 1994-1995 (Statistiques Canada 82-003, 2003). Cette maladie chronique est caractérisée par une dysfonction ou absence d'insuline produite par les cellules bêta des îlots de Langerhans du pancréas. L'insuline est une hormone polypeptidique de 51 résidus composée de deux chaînes reliées par des ponts disulfures (Voet et al. 1998). Elle a pour fonction de permettre l'entrée du glucose dans la cellule afin que ce dernier y soit converti en énergie. En conséquence, on constate, lors du diabète, une augmentation de la concentration du glucose sanguin (la glycémie normale se situe entre 4,0 et 7,0 mmol/L à jeun, et entre 5,0 et 10,0 mmol/L deux heures après le repas) (Association Canadienne du Diabète, 2007).

On distingue deux grands types de diabète. Tout d'abord, le diabète de type 1 est caractérisé par une très faible production ou une absence totale de production d'insuline. Bien que la cause exacte ne soit pas connue, il semble s'agir d'une maladie auto-immune où les cellules immunitaires de la personne affectée détruiraient les cellules bêta du pancréas. En effet, on retrouve souvent chez ces personnes, des anticorps anti-cellules bêta, anti-GAD (Glutamic Acid Decarboxylase) ou anti-insuline. Cette maladie semble avoir une composante génétique et environnementale (Organisation Mondiale de la Santé, 1999). Il en résulte alors une grave carence dans cette hormone et un apport externe d'insuline s'avère essentiel. Ce type est par contre relativement rare, ne constituant que 10 à 15 % des cas et se manifeste relativement tôt, soit dès l'enfance ou au début de l'âge adulte (Statistiques Canada 82-003, 2003).

Le diabète de type 2 est beaucoup plus fréquent et compte pour 85 à 90 % des cas. Il est caractérisé par une faible production d'insuline, une résistance à l'insuline ou à une perte de ses fonctions (Organisation Mondiale de la Santé, 1999). Étant donné ces caractéristiques, l'apport en insuline est souvent inutile, par contre la glycémie peut plus facilement être contrôlée en modifiant son alimentation ou en contrôlant certains facteurs de risque. Parmi ceux-ci, on peut citer une composante génétique (plusieurs gènes liés au diabète de type 2 ont été découverts), un manque d'activité physique, une alimentation riche en gras et l'obésité. Le diabète de type 2 apparaît le plus souvent après l'âge de 30 ans et sa fréquence augmente avec le vieillissement (Statistiques Canada 82-003, 2003). Celui-ci reste plus souvent non diagnostiqué et reste souvent silencieux, car il est rarement associé, contrairement au type 1, à une perte de poids.

Enfin, le diabète gestationnel constitue une troisième forme marginale, touchant environ 4 % des femmes enceintes. Celui-ci est un état temporaire et disparaît après la grossesse. Il est lié aux besoins accrus de l'organisme en insuline qui, lorsqu'il ne peut suffire, entraîne une augmentation du glucose dans le sang. Par contre, ce dernier type peut accroître le risque de développer un diabète de type 2 ultérieurement (Statistiques Canada 82-619-MIF, 2005).

Plusieurs symptômes et pathologies sont associés au diabète et sont la conséquence de l'augmentation de la concentration de glucose dans le sang sur de longues périodes (Brownlee 2001) qui provoque des lésions aux vaisseaux sanguins, aux nerfs, en plus de dommages à d'autres structures internes (Couture and Girolami 2004). En effet, l'hyperglycémie provoque une baisse des défenses

antioxydantes de l'organisme et une hausse des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ceci a pour conséquence d'augmenter le stress oxydatif des cellules qui entraîne alors des dommages à l'ADN, une hausse de la perméabilité vasculaire et enfin une augmentation des caspases et de l'apoptose (Kowluru and Chan 2007). On observe ainsi, chez les diabétiques, une augmentation de la fréquence des maladies cardio-vasculaires, de lésions nerveuses, de maladies cutanées ainsi que d'insuffisance rénale (Feldman 2003). De plus, l'une des graves conséquences fréquemment observées chez les diabétiques est l'apparition de cécité suite au développement de la rétinopathie diabétique. Cette dernière pathologie, et plus particulièrement le rôle des kinines qui y a été associé, fera d'ailleurs l'objet d'une partie de la présente étude et sera développée davantage ci-dessous.

Les Kinines

Parmi les mécanismes menant aux dysfonctions physiologiques caractérisant le diabète, nous nous intéressons au rôle des kinines, agents participant à la réponse inflammatoire.

Le système kallicréine-kinines inclut la kallicréine tissulaire et plasmatique, la protéine de liaison de la kallikréine (kallikreine binding protein ou KBP), les kinines et leurs précurseurs, les kininogènes, et leurs récepteurs et enfin les kininases. Les kinines sont des peptides vasoactifs impliqués dans la réponse inflammatoire, le tonus vasomoteur et la douleur. Étant donné cette importante contribution, ce système se doit d'être fortement contrôlé. À cette fin, la KBP est présumée réguler l'effet des kinines en se liant à elles pour ainsi diminuer leur

biodisponibilité. Il est donc peu surprenant d'apprendre qu'une dérégulation de ce système soit impliquée dans plusieurs pathologies telle que la rétinopathie diabétique. Une baisse de la KBP a d'ailleurs été démontrée dans cette maladie, augmentant du même coup les effets délétères des kinines (Hatcher, Ma et al. 1997).

La bradykinine (BK), la principale kinine, est un peptide de neuf acides aminés qui démontre des effets bien connus pro-inflammatoire, vasodilatateur et natriurétique. Elle est aussi impliquée dans les mécanismes de la douleur, dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire et du débit sanguin (Abdouh, Khanjari et al. 2003). De plus, son rôle dans la prolifération cellulaire et la synthèse de protéines matricielles a été mis à jour (Bascands, Schanstra et al. 2003).

La BK est formée après l'hydrolyse des kininogènes par la kallibréine (Figure 6). La BK peut être à son tour métabolisée en des-Arg⁹ BK ou BK 1-8 par la kininase I ou être transformée en BK 1-7 inactive par la kininase II, par l'endopeptidase neutre (NEP) ou par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE). Cette dernière établit donc un lien entre le système Rénine-Angiotensine et le système Kallibréine-Kinine.

La BK et la des-Arg⁹ BK sont toutes deux associées à deux récepteurs à sept domaines trans-membranaires, dotés de caractéristiques distinctes, couplés aux protéines G. Par contre, il semble que certains des effets puissent être indépendants de ces protéines G. Le récepteur B₂ (RB₂), activé par la BK, est exprimé de façon ubiquitaire (Bascands, Schanstra et al. 2003). Le récepteur B₁

(RB₁) est quant à lui activé par la des-Arg⁹ BK. Ce dernier est très peu exprimé de façon normale, mais le devient fortement lors d'apparition de pathologies telles que des infections, des dommages tissulaires, de l'inflammation ou de diabète. Il

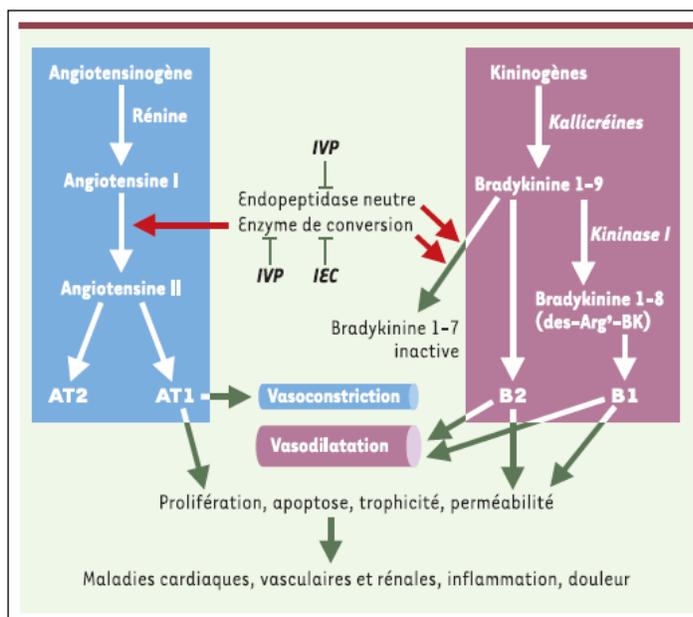


Figure 6 : Détails des systèmes Rénine-Angiotensine et Kallibréine-Kinine. (tiré de (Bascands, Schanstra et al. 2003))

jouerait un rôle dans la guérison post-ischémique (Couture and Girolami 2004). En effet, tel qu'il a été mentionné précédemment, l'hyperglycémie entraîne un stress oxydatif des cellules par la production d'espèces réactives de l'oxygène

(ROS). Le stress oxydatif entraîne l'activation du facteur de transcription nucléaire kappa B (NF- κ B) qui induit alors l'expression de RB₁ (Couture and Girolami 2004; Lim, Han et al. 2009).

La kininase II ou l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) est impliquée dans la dégradation de la bradykinine. Ainsi, en bloquant la formation de l'angiotensine II par des inhibiteurs de l'ACE on prévient ses effets angiogéniques et vasoconstricteurs, puis on favorise l'augmentation de la concentration de BK (en diminuant sa dégradation en bradykinine 1-7 inactive) et ainsi l'activation des récepteurs B₁ et B₂ (Tschöpe, Schultheiss et al. 2001). Il est alors possible de favoriser la vasodilatation et de baisser l'angiogenèse provoquée

par l'angiotensine II qui induit la formation de VEGF via les récepteurs AT_1 (Gilbert, Kelly et al. 2000; Wilkinson-Berka 2004). De plus, il a été démontré dans le diabète que les inhibiteurs de l'ACE amélioreraient la sensibilité à l'insuline et réduisaient le stress oxydatif causé par cette maladie.

La Rétinopathie diabétique

Bien que l'implication au niveau du cerveau des kinines et de leurs récepteurs ait fait l'objet de quelques publications (Walker, Perkins et al. 1995; Raidoo and Bhoola 1998), leur rôle dans le développement de la rétinopathie diabétique ou dans le débit sanguin rétinien en général a fait

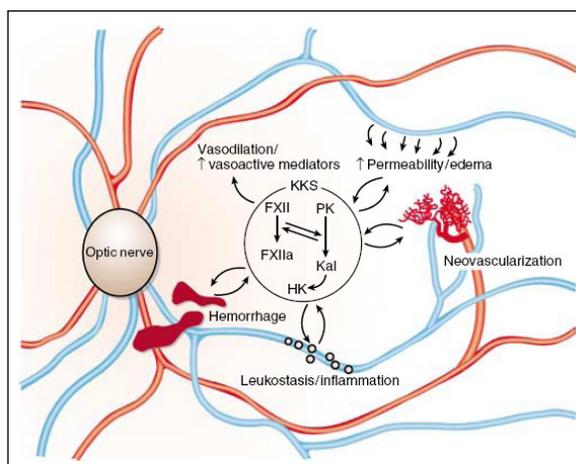


Figure 7 : Représentation schématique des interactions potentielles entre le système kallibréine-kinines dans la rétinopathie diabétique. (les artères sont représentées en rouge et les veines en bleu). (tiré de (Phipps and Feener 2008))

l'objet de très peu d'études et son rôle mérite donc une attention particulière (Abdouh, Khanjari et al. 2003; Abdouh, Talbot et al. 2008). En effet, le système kallibréine-kinines semble intimement lié au développement de la rétinopathie diabétique en augmentant, notamment la perméabilité vasculaire, la néovascularisation et l'inflammation (Phipps and Feener 2008).

La rétinopathie diabétique consiste notamment en une altération de la microvasculature de la rétine et constitue la principale cause de cécité chez l'adulte en plus de toucher, à tous les ans, près de 400 Canadiens. L'incidence et la gravité de cette maladie sont directement liées à la durée du diabète et au taux

de glucose dans le sang (Statistiques Canada 82-619-MIF, 2005). En effet, l'hyperglycémie affecte les voies de transmission des facteurs vasoactifs. Plus précisément, l'hyperglycémie active les voies du diacylglycérol (DAG) et de la protéine kinase C (PKC) (King, Shiba et al. 1994).

Lors des premiers stades, ou stades non prolifératifs, la vision reste le plus souvent normale, mais peut, avec le temps, devenir floue (Statistiques Canada 82-619-MIF, 2005). Pendant cette période, l'hyperglycémie fragilise la membrane basale des capillaires et augmente la perméabilité vasculaire, causant des microanévrismes et une fuite vasculaire. Cette modification du flux sanguin provoque alors des zones d'hypoxie. Avec le temps, les cellules touchées mourront, entraînant le blocage de certains capillaires et la formation de régions non perfusées (Wilkinson-Berka 2004). Lors du stade suivant, ou pré-prolifératif, les zones d'hypoxie augmentent et de multiples hémorragies surviennent, causant un œdème de la rétine.

Bien que certaines études soient toujours contradictoires, on semble observer, lors des premiers stades du diabète oculaire, une baisse du débit sanguin rétinien. Cette baisse est attribuable à la vasoconstriction de la microcirculation rétinienne entraînant l'augmentation de la résistance. L'augmentation de PKC entraînerait alors l'activation de l'endothéline-1 (ET-1) vasoconstrictrice (Clermont and Bursell 2007). Cette réduction du débit sanguin réduit par le fait même l'apport de nutriments aux cellules de la rétine l'exposant à l'hypoxie.

Tout en gardant en tête l'existence d'autres études contradictoires, le débit sanguin rétinien semble, dans un deuxième temps, augmenter au fur et à mesure

que la rétinopathie non proliférative progresse. Cette augmentation peut être due à la baisse de ET-1 (Properzi, Terenghi et al. 1995) et à la hausse concurrente des facteurs causant la vasodilatation telle que la prostacycline (PGI₂) (Clermont and Bursell 2007).

Il y a aussi induction, lors du développement du diabète, du récepteur B₁ de la bradykinine. Celui-ci est induit dans les vaisseaux pré-capillaires, les capillaires et dans les veinules de la rétine de rats diabétiques (Ma, Song et al. 1996; Abdouh, Khanjari et al. 2003; Abdouh, Talbot et al. 2008) et peut ainsi déclencher une vasodilatation, effet qui s'ajoutera à celui provoqué par les récepteurs B₂ déjà présents. En effet, ces derniers récepteurs, une fois stimulés, entraînent une augmentation du calcium intracellulaire et ainsi la libération de prostaglandines (principalement la prostacycline) via l'induction de son enzyme de synthèse, la cyclooxygénase-2 (COX-2). Or, il a été démontré que la vasodilatation induite par les récepteurs B₁ (RB₁) était plus importante que celle induite par les récepteurs B₂. En effet, la des-Arg⁹ bradykinine, en liant RB₁, provoque non seulement la relâche de prostaglandines via COX-2, mais aussi la relâche de monoxyde d'azote (NO), relaxant des cellules endothéliales. De plus, certaines études démontrent une hausse transitoire des RB₂ et une hausse continue des RB₁ entre 4 et 21 jours après l'induction du diabète chez les rats traités à la STZ. Ceci peut signifier que les effets des RB₁ prennent le relais des RB₂ au cours de l'évolution de la maladie.

Cette augmentation du débit sanguin rétinien pourrait jouer un rôle important dans la progression de la maladie. En effet, l'augmentation du débit

sanguin augmente le stress mécanique sur les cellules endothéliales, augmentant du même coup le dysfonctionnement de ces cellules (Clermont and Bursell 2007). Ainsi, la hausse du débit sanguin rétinien associée à une augmentation de la pression intracapillaire entraînerait l'hyperperméabilité vasculaire ou l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne.

Dans un stade plus avancé, ou stade prolifératif, l'augmentation des zones non perfusées stimule la production de facteurs angiogéniques tels que le VEGF (Properzi, Terenghi et al. 1995), entraînant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins plus fragiles. Ces derniers sont souvent accompagnés par la formation de tissu conjonctif fréquemment suivi d'une fibrose. La contraction de ce tissu conjonctif peut entraîner le décollement de la rétine et une grave baisse de vision ou la cécité.

Il a récemment été démontré que les anhydrases carboniques I et II (CA-I et II) seraient impliquées dans le développement de la rétinopathie diabétique. En effet, leur présence semble grandement augmentée chez les patients diabétiques souffrant ou non de

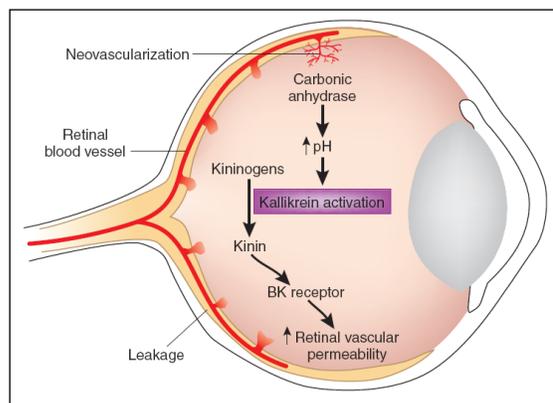


Figure 8 : L'anhydrase carbonique augmenterait le pH qui augmenterait à son tour l'activité enzymatique de la kallikréine et la formation de bradykinine. (tiré de (Gardner and Antonetti 2007))

rétinopathie (Gao, Clermont et al. 2007). Celle-ci, en augmentant le pH, active la kallikréine et accentue donc la formation de bradykinine et ses effets métaboliques (Gao, Clermont et al. 2007; Gardner and Antonetti 2007).

L'apparition de ce nouveau joueur ouvre donc la porte à de nouvelles avenues thérapeutiques.

En plus du système vasculaire, le système kallibréine-kinines et leurs récepteurs RB_1 et RB_2 agissent sur d'autres types cellulaires lors de la rétinopathie diabétique, dont les cellules épithéliales pigmentées (RPE). Ces dernières sont partie intégrante de la barrière hémato-rétinienne et peuvent donc grandement affecter la pathogenèse de la rétinopathie diabétique. Ainsi, l'activation des RB_1 et RB_2 lors de l'hyperglycémie provoque une activation de COX-2 et de NF- κ B dans ces cellules, provoquant ultimement la prolifération cellulaire et amenant au développement de la rétinopathie (Lim, Han et al. 2009).

La débitmétrie au laser à effet Doppler

Le LDF constitue une méthode non invasive pour le calcul du débit sanguin, en plus de fournir une mesure en continu et presque instantanée de la perfusion tissulaire. Elle est en conséquence tout indiquée pour l'étude de la régulation du débit sanguin à la suite d'une variation des paramètres physiologiques ou pharmacologiques.

Le principe de base du LDF est l'effet Doppler, décrit pour la première fois en 1842 par le physicien autrichien Christian Johann Doppler et publié sous le titre *On the Colored Light of Double Stars and Some Other Heavenly Bodies*. Ce principe décrit un changement de fréquence subi par une onde qui est émise par un objet qui se déplace en direction ou qui s'éloigne d'un observateur. Ce principe

se manifeste d'ailleurs par une augmentation de l'intensité d'une sirène lorsque celle-ci se déplace en direction de l'observateur.

Le LDF tire d'autant plus profit de ce principe par l'apparition du laser, instrument optique qui procure une onde lumineuse d'une grande cohérence et presque monochromatique. En effet, la lumière émise est d'une pureté inégalée et où l'onde lumineuse est composée presque exclusivement d'une seule fréquence. Cet instrument permet ainsi de détecter des changements de fréquence avec une très forte résolution sur une échelle de vitesse variant du $\mu\text{m}/\text{sec}$ jusqu'à plusieurs Km/sec (Riva 2001). De plus, l'apparition des lasers utilisant une longueur d'onde près de l'infra-rouge (entre 750-830 nm) est d'autant plus appropriée pour l'étude du débit sanguin oculaire. En effet, contrairement au laser He-Ne d'une longueur de 633 nm et se trouvant par conséquent dans le visible, ces premiers lasers n'ont que très peu d'influence sur l'activité rétinienne et le contrôle hémodynamique de la rétine. Leur apparition a ainsi permis l'étude du phénomène du couplage neurovasculaire dans la rétine étant donné l'absence de contamination par la

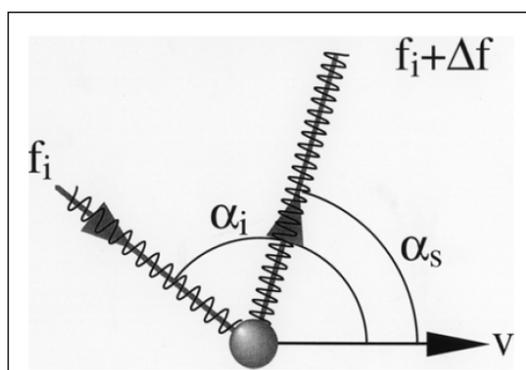


Figure 9 : Représentation de l'effet Doppler. f_i est la fréquence de la lumière émise en direction d'une particule. La direction de la lumière est définie par l'angle α_i avec la vitesse de la particule V . $f_i + \Delta f$ est la fréquence de la lumière réfléchie selon une direction définie par l'angle α_s . (tiré de (Riva 2001))

lumière incidente du laser (Feke 2006).

Ainsi, un faisceau laser issu de la fibre émettrice et dirigé vers un vaisseau sanguin subira un changement de fréquence lorsqu'il sera déplacé par le mouvement des globules rouges, alors qu'aucun

changement de fréquence ne se produira lorsque le faisceau sera réfléchi par la paroi vasculaire. Le faisceau réfléchi est alors collecté au niveau de la fibre réceptrice. Le changement de fréquence est proportionnel à la vitesse des globules rouges. Plus précisément, la majorité du faisceau émergeant du tissu n'aura subi aucun changement de fréquence puisqu'il aura été réfléchi par les composantes structurelles immobiles. En effet, 1 à 5 % de la lumière détectée aura été réfléchie par les globules rouges en mouvement. Au niveau des photodétecteurs, la portion du signal inchangée en fréquence agira alors comme signal de référence. Comme le signal issu des composantes vasculaires immobiles est beaucoup plus intense que le signal provenant du mouvement des globules rouges et que le changement de fréquence est relativement assez faible, la technique de spectroscopie à mélange optique (Feke 2006), permet d'en déduire l'information nécessaire au calcul du débit sanguin. Les changements de fréquence détectés peuvent alors être positifs ou négatifs selon la direction des globules rouges et la direction du faisceau laser. Par contre, comme la technique de la spectroscopie à mélange optique ne fournit que des valeurs absolues, les valeurs de débits ne sont que positives (Riva 2001).

Les paramètres hémodynamiques fournis par le LDF sont les suivants:

$$F = \textit{Constante} \times \textit{vélocité} \times \textit{volume}$$

où F réfère au débit sanguin, la *vélocité* (en Hz) est proportionnelle à la vitesse moyenne des globules rouges dans le volume échantillonné et le *volume* est proportionnel au nombre de globules rouges dans ce volume. Le volume et F sont exprimés en unités arbitraires. Ceci est dû au fait que le rayon incident est

réfléchi, dispersé et absorbé de plusieurs façons et affecte alors sa pénétration à l'intérieur des tissus. Celle-ci peut alors varier selon la structure du tissu et sa vascularisation (Riva 2001).

Ces paramètres hémodynamiques sont déterminés selon la théorie de Bonner et Nossal qui est à la base de la technique du LDF. Sans entrer dans les

détails, cette théorie tente de prédire le comportement des photons dans la microcirculation après leur collision avec une multitude de types cellulaires

comme les cellules somatiques, les cellules endothéliales, le tissu conjonctif et ultimement les globules rouges en mouvement.

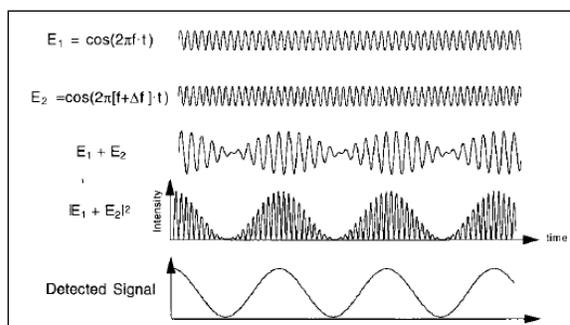


Figure 10 : Représentation schématique de la spectroscopie à mélange optique. E_1 représente l'amplitude du signal réfléchi par les tissus immobiles et agissent comme signal de référence. E_2 représente l'amplitude du signal réfléchi par les globules rouges et ayant subi un changement de fréquence Δf suite au mouvement des particules. Ces derniers se confondront au niveau du photodétecteur et donneront une vague d'amplitude $E_1 + E_2$. Le signal de sortie du photodétecteur sera proportionnel à $|E_1 + E_2|^2$. Par contre, le photodétecteur ne transmettra que l'enveloppe de ces fluctuations. (tiré de (Riva 2001))

Ces multiples interactions auront pour conséquence de refléter aléatoirement le faisceau incident et d'affecter ultimement le changement de fréquence subi par le faisceau au contact des globules rouges en mouvement. Il a alors été démontré que le signal montre une corrélation linéaire avec le débit sanguin réel (Bonner and Nossal 1981). Ainsi, bien que l'on nomme le signal analysé comme étant du débit sanguin, c'est plutôt une mesure de la vitesse des globules rouges qui est observée. Si l'hématocrite est maintenu constant, le débit sanguin et la vitesse sont proportionnels et varient de façon linéaire. Ce rapport linéaire a d'ailleurs été observé dans plusieurs tissus tels que la peau, le cortex cérébral, les muscles

squelettiques et plusieurs autres (Shepherd 1990) Par contre, si l'hématocrite varie en cours d'expérience, le rapport entre les deux changera en conséquence (Riva 2001).

Une question centrale à l'application du LDF dans le calcul du débit sanguin est l'épaisseur de la colonne de tissu échantillonnée par l'appareil. Cette question est d'autant plus importante dans l'application de cette méthode pour l'évaluation du débit sanguin oculaire. En effet, tel qu'il a été mentionné précédemment, la circulation du segment postérieur de l'oeil est composée de la circulation rétinienne, qui nous intéresse particulièrement pour cette étude, juxtaposée à la circulation choroïdienne. Or, ces types de circulations varient autant morphologiquement et physiologiquement que par le volume de sang qui y circule. Il est donc essentiel d'avoir une idée plus précise du type de circulation qui est étudié par cette méthode. Plusieurs théories ont été avancées jusqu'à présent, sans qu'une réponse définitive ait été apportée. Ce sujet sera d'ailleurs abordé plus en détail ultérieurement.

Objectifs spécifiques à l'étude

La grande majorité des techniques disponibles présentement pour la mesure du débit sanguin oculaire sont invasives et/ou ne permettent pas de mesure en continu du débit. Ainsi, plusieurs des techniques couramment utilisées en recherche (comme la technique des microsphères ou celle d'autoradiographie) impliquent l'injection systémique de microsphères ou d'un traceur radioactif. Ces derniers diffusent alors dans les tissus proportionnellement au débit sanguin. Ces

deux techniques sont par contre invasives et ne permettent pas de mesures en continu (Cioffi and Alm 2001).

Même si, tel qu'il a été précisé précédemment, le LDF est par nature non invasif, ce dernier a souvent été employé avec une sonde de type needle-probe (une fibre émettrice et une fibre réceptrice) qui était alors souvent utilisée après dissection du cristallin afin de permettre la proximité avec le tissu échantillonné et une mesure locale du débit (Hotta, Ito et al. 1998). Cette utilisation, en plus de revêtir un caractère invasif, ne permettait pas de maintenir l'homéostasie de l'œil et la pression intraoculaire, paramètres qui peuvent influencer grandement le débit sanguin oculaire. Récemment, la sonde LDF DP7a de Moor instruments, comportant une fibre émettrice entourée de huit fibres réceptrices, a été mise au point. Celle-ci possède une superficie de collection de la lumière près de 10 fois supérieure à celle des autres types de sonde couramment utilisés. Nous avons donc jugé important d'utiliser les spécifications de cette sonde en la combinant à un montage expérimental non invasif afin de respecter le plus possible l'équilibre interne de l'œil. Nous l'avons ainsi placée en contact avec la cornée et avons testé sa sensibilité à l'aide d'administration intravitreuse de différents composés reconnus comme étant impliqués dans la régulation du débit sanguin oculaire, le tout en limitant au maximum les manipulations à l'œil. De plus, afin de tester la spécificité de la sonde suite au problème de l'origine du signal LDF rétinien et/ou choroïdien expliqué précédemment, nous avons effectué des mesures après une photocoagulation des artères rétiniennes.

Une fois la validité de la technique établie chez le rat, nous l'avons utilisée dans un contexte plus clinique chez le même modèle animal. Nous avons donc appliqué cette méthode dans l'étude de l'implication du récepteur B₁ des kinines dans la régulation du débit sanguin lors de la rétinopathie diabétique. Ainsi, afin d'obtenir cet effet à différents stades de la maladie, un agoniste B₁ a été injecté par voie intra-vitréenne chez des rats diabétiques à 4 jours et à 6 semaines après l'induction du diabète avec la streptozotocine.

ARTICLE

**Assessment of retinal and choroidal blood flow changes using laser Doppler
flowmetry in rats**

(Current Eye Research, Soumis)

**Assessment of retinal and choroidal blood flow changes using
laser Doppler flowmetry in rats**

Simon Héту^{1,2}, Mylène Pouliot^{1,2}, Ghassan Cordahi³, Réjean Couture²

and Elvire Vaucher^{1*}

¹ School of Optometry, University of Montreal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7. Tel: +1 514 343 7537, Fax: +1 514 343 2382

² Department of Physiology, University of Montreal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7. Tel: +1 514 343 7060, Fax: +1 514 343 2111

³ Department of Ophthalmology, University of Montreal, C.P. 6128, Succursale Centre-Ville, Montréal, QC, Canada, H3C 3J7

Running head: **Assessment of rat retinal/choroidal blood flow using LDF**

ABSTRACT

Purpose: A new non-invasive laser Doppler flowmetry (LDF) probe (1 emitting fibre surrounded by a ring of 8 collecting fibres, 1 mm inter-axis distance) was tested for its sensitivity to assess the retinal/choroidal blood flow variations in response to hypercapnia, diverse vasoactive agents and following retinal arteries photocoagulation in the rat.

Materials and methods: After pupil dilation, a LDF probe was placed in contact to the cornea of anaesthetised rats in the optic axis. Hypercapnia was induced by inhalation of CO₂ (8% in medical air) while pharmacological agents were injected intravitreously. The relative contribution of the choroidal circulation to the LDF signal was estimated after retinal artery occlusion by photocoagulation.

Results: Blood flow was significantly increased by hypercapnia (19%), adenosine (14%) and sodium nitroprusside (16%) as compared to baseline values while endothelin-1 decreased blood flow (11%). Photocoagulation of retinal arteries significantly decreased blood flow level (33%).

Conclusions: Although choroidal circulation most likely contributes to the LDF signal in this setting, the results demonstrate that LDF represents a suitable *in vivo* non-invasive technique to monitor online relative changes of retinal perfusion. This technique could be used for repeatedly assessing blood flow reactivity to metabolic or pharmacologic challenges in rodent model of ocular diseases.

Keywords: blood flow, microcirculation, choroid, retina, rodents.

1. Introduction

Alteration in blood supply to the retina is involved in most retinal pathologies, such as glaucoma^{1, 2} or diabetic retinopathy.³⁻⁵ An understanding of the hemodynamic mechanisms generated during retina damage is essential for the development of new therapeutic avenues. Laser Doppler flowmetry (LDF) is used to assess ocular blood flow in the clinical setting.⁶ LDF is attractive because it is non-invasive, it enables continuous assessment of the blood flow changes, and can be used at near infra-red wavelength so that it does not influence retinal activity. It is based on the Doppler effect, which describes the frequency shift that a photon undergoes when scattered from a moving particle (such as a red blood cell) whereas light scattered by stationary cells remains un-shifted.^{7, 8} When a laser beam illuminates a number of red blood cells moving through a network of capillaries at various velocities and in different directions, the light scattered by the red blood cells consists of a summation of waves with various frequency shifts. The difference between frequency of the emitted light and the spectrum of backscattered light is directly proportional to the mean velocity of the blood and the amplitude is proportional to the number of cells; the product of these gives a measure of the tissue perfusion.⁹ When directly apposed to the tissue, the temporal resolution of the probe is in the tenth of second range and the spatial resolution is in the range of 0.1 to 1 mm.^{6, 10-12} LDF was previously used in a number of animal models like rabbits and cats to assess choroidal blood flow¹³⁻¹⁶ or optic nerve head blood flow.^{17, 18}

Rodents are used to model common pathological conditions that affect ocular blood flow in humans. To date the ability to measure retinal blood flow in rodent models has relied on terminal techniques such as microspheres trapping or autoradiography. Different LDF set-ups have been tested to investigate blood flow changes in the fundus of rat in order to provide a follow-up of the pathological changes in retinal disease models but none of them are ideal. The *Heidelberg* retinal flowmeter provides good spatial resolution since the laser beam can scan the eye fundus, although it is not considered appropriate for measuring pure retinal microcirculation in rats.^{19, 20} Its use is moreover not well adapted for small animals.^{19, 20} LDF settings using LDF needle probes (containing one light-emitting optical fibre and 1-2 collecting optical fibres) are more affordable in terms of costs. They have been used to assess retinal/choroidal blood flow in rats after removing the lens to allow proximity to the retina and localized measurement.²¹ This model, however, does not reproduce *in vivo* intraocular pressure conditions and in turn retinal perfusion pressure. Recently, a new LDF probe design has been developed in which the Moor instruments DP7a type probe possesses 8 collecting fibres positioned in a ring around the central light delivery fibre which increases the collecting light area approximately 3 times more than a standard probe composed of 1-2 collecting fibres. Moreover, the DP7a is an opaque 6 mm plastic cylinder that covers the diameter of the rat eye, which avoids light exposure of the retina whilst enabling easy positioning of the probe. For these reasons, we assumed that this design could represent an affordable

technique to assess retinal/choroidal blood flow in rodent models, to detect the presence and vasoreactivity of molecules/receptors in the posterior segment.

In the current study, the use of the DP7a probe was tested for its sensitivity to assess blood perfusion changes of the posterior segment of the rat when placed at the corneal surface. The vasoreactivity was measured in rats under various paradigms, i.e. hypercapnia or intravitreal administration of vasoactive pharmacological agents that are usually involved in retinal blood flow regulation.^{22, 23} adenosine, sodium nitroprusside and endothelin-1, Et-1.²⁴ Moreover, the relative contribution of the choroidal circulation to the LDF signal was estimated after retinal arteries occlusion by photocoagulation. Partial comparison with the measurement obtained with a DP3 needle probe (1 emitting fibre, 1 collecting fibre, 0.5 mm separation, 0.8 mm external diameter), which assesses a smaller sampling volume was performed to evaluate the effect of fibre separation and the possibility to use this probe for mice experiments.

2. Material and methods

2.1. Animals

Albinos male Wistar rats (200-250g) and C56BL/6 mice (25-30g, n=5) from Charles River (St-Constant, Qc, Canada) were used. The animals were housed individually and placed in a room at 23° C with a 12 h light/dark photoperiod, with food and water provided *ad libitum*. All experimental methods and animal care procedures were approved by the local institutional Animal Care Committee at the Université de Montréal, under the auspices of the Canadian Council on Animal Care. The ocular blood flow was measured in rats using the DP7a probe during hypercapnia (n=15), intravitreal injection of saline (n=9), adenosine (n=12), sodium nitroprusside (n=8) or Et-1 (n=6). The DP3 probe was used in rats during hypercapnia to compare the signals delivered by DP3 or DP7a probe in this condition. Adenosine reactivity was also tested in the C56BL/6 mice (25-30g, n=5) from Charles River (St-Constant, Qc, Canada) using the DP3 probe (more adapted to the diameter of the mouse eye) to test a pharmacological challenge for further use of LDF in these species.

2.2. Animal preparation

Rats were anaesthetised with urethane (1.2 g/kg, i.p.) (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA). Urethane was used for the design of this study because multiple measures were made and it provides a stable anaesthesia over time, however, ketamine-xylazine anaesthesia has also been tested and is adequate for a shorter

experiment (data not shown). During the entire extent of the experimental period, body temperature was monitored with a rectal thermometer and maintained at 37°C by a heating pad (FHC, Bowdoinham, ME, USA). Both blood pressure and heart rate were monitored from the tail using a non-invasive blood pressure cuff system (BP1000, Kent Scientific Corporation, Torrington, CT, USA). Once the animal was anesthetised, polyurethane catheters were inserted into the femoral artery (Tygon Micro Bore, I.D. 0.01000, O.D. 0.03000, Small Parts, Miramar, FL, USA) in order to further monitor the arterial blood gases. Before and immediately after the surgery, the topical anaesthetic lidocaine hydrochloride 2% (AstraZeneca, Mississauga, On, Canada) was applied on the skin incision to minimize pain. The animal was placed in a stereotaxic frame (David Kopf instruments, Tujunga, CA, USA) to immobilize the head and the superior and inferior eyelids were sutured open. The pupil was dilated with 1 drop of atropine sulphate 1% (Isopto Atropine solution, Alcon, Toronto, On, Canada) and the corneal hydration was maintained over the measurement period with the regular topical administration of 0.9% saline solution. Local ocular anaesthesia was provided by regular topical administration of proparacaine 2.5% (Alcaine, Alcon) to prevent pain. In this condition, no obvious ocular movements were apparent under surgical microscope observation. A cannula (30 G, Small Parts, USA), linked to a 10 µL Hamilton syringe by tubing was inserted into the vitreous body just behind the limbus with an angle of approximately 45° from the equator.

2.3. Laser Doppler Flowmetry

The basis of LDF is the Doppler effect, which describes the frequency shift that a photon undergoes when scattered from a moving particle (such as a red blood cell). This shift, Δf , is proportional to the velocity of the moving red blood cell. Δf is extremely small but can be detected using optical mixing spectroscopy.⁶ When a laser beam illuminates a number of red blood cells moving through a network of capillaries at various velocities and in different directions, the light scattered by the red blood cells consists of a summation of waves with various Δf 's. It can be generally noted that most of the light emerging from a tissue has been scattered solely by *static* structural components of the tissue. This non-shifted light acts as a reference signal that is detected together with the Doppler-shifted light scattered by the moving red blood cells. The output current of the detector contains only the components oscillating at the various Δf 's, not the original laser frequency. A plot of the power of the photocurrent as a function of Δf constitutes the Doppler shift power spectrum, from which the mean velocity of the red blood cells, the number and the flux of these cells, all expressed in perfusion units (PU) can be determined.²⁵

The DP7a probe (8 collecting fibres positioned in a ring around the central light delivery fibre, 1 mm separation, 6 mm external diameter, numerical aperture of the optic fibers: 0.22, Moor Instruments) was tested in rats. The DP3 probe (1 emitting fibre, 1 collecting fibre, 0.5 mm separation, 0.8 mm external diameter, Moor Instruments) was also used in rat in order to compare the LDF signal in

function of the fibres separation and further tested in mice. The LDF probe was fixed on a probe holder adapted to the stereotaxic frame (Kopf instruments, Tujunga, CA, USA) and was stereotaxically placed in contact with the center of the cornea and parallel to the optic axis (Fig. 1). The beam divergence from the LDF probe, in air, is about 12 degrees but when refractive index matching at the cornea and the focussing effect of the lens are taken into account, this will lead to sampling a circular area with a diameter of about 0.5 mm at the fundus. It should be mentioned that this volume is an estimate since the beam could not be visualized on the fundus. It is possible that diffuse multiscattered photons could reach the probe but it has been shown that the power of diffuse intraocular scatter is of order 10^{-3} weaker compared to the scattered laser light seen by the probe.²⁶ So even if diffuse multiscattered photons reach the probe, the maximal signal will be detected from the overlap between the diverging laser beam of the emitting fiber and the field of view of the collecting fibers.

The tissue perfusion was continuously monitored non-invasively with the blood flow monitoring system (laser wavelength: 780 nm \pm 10 nm, output power: 1.6 mW, DRT4, Moor instruments Ltd, Axminster, Devon, UK). The probe was positioned so a stable signal around 600-700 PU (assuming absence of significant large vessels) was recorded continuously. Zones providing a saturated signal were avoided (which might correspond to orientation of the laser beam on large vessels). Baseline perfusion was recorded for a period of 10 min to ascertain the stability of the signal. The baseline as well as the maximal effect of treatment was obtained by averaging flux values of 90 recordings over a 3 min period.

2.4. Hypercapnia

A small mask was placed on the nose and mouth of the rats 5 min before administration of the CO₂. Rats were allowed to breathe a gentle flow of medical air (3 L/min; 21% O₂, 79% N₂). Hypercapnia was then induced by inhalation of 8% CO₂ in medical air for 3 min. Before and during the CO₂ inhalation period, partial pressure of the blood gases was measured using a veterinarian clinical blood gases and electrolytes analyzer (I-stat, HESKA, Fort Collins, CO), from arterial blood samples collected via the arterial catheter.

2.5. Intravitreal injections

The vasoactive agents tested were chosen for their vasodilatory properties (adenosine, sodium nitroprusside) or vasoconstrictive effects (Et-1) and their preferential effect on endothelial or smooth muscles cells. These agents all play a significant role in the physiological regulation of blood flow in the retina.^{24, 27} The nucleoside adenosine is a potent neuromodulator that induces vasodilation in various organs, including the brain and the eye.²⁸⁻³¹ Sodium nitroprusside, a vasodilator, is a nitric oxide donor.^{32, 33} Sodium nitroprusside acts independently of the vascular endothelium and causes vasodilation by increasing cGMP in vascular smooth muscle cells.^{34, 35} Et-1 is a potent vasoconstrictor peptide secreted by the endothelial cells.^{36, 37} The concentration of the drugs was adapted from previous studies taking into account the dilution and slow diffusion of the drugs into the vitreous: 2 mM adenosine (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, USA) (Kocharyan et al., 2008), 10 μM sodium nitroprusside^{33, 38} or 40 μM Et-1 (Peninsula Laboratories Inc., Torrance, CA, USA).³⁹ 5 μL of the pharmacological

agents in 0.9% saline were injected at a constant rate over 30s through the cannula both in the rat and mice eyes.

2.6. Retinal arteries photocoagulation

Three rats were anesthetised with a mixture of ketamine (85 mg/kg), acepromazine (2.5 mg/kg) and xylazine (15 mg/kg) i.p. The head was stabilized with a stereotaxic frame (Kopf instruments) and the superior eyelid was sutured. The pupil was dilated with 1 drop of topical atropine sulphate 1% (Isopto Atropine solution, Alcon) and the mean baseline blood flow value was obtained as previously described (see above). Photocoagulation of the retinal arteries^{19, 20} of the right eye was then made with a red laser light (300 mW, 300 ms) using a photocoagulator (Novus Varia, Lumenis, Santa Clara, CA, USA). The LDF probe was replaced at the same coordinates and angle to measure the tissue perfusion immediately after the lesion. The left eye was kept intact. Two days later, the rats were sacrificed and the eyes enucleated. The lens was removed and the eye cup immersed in a solution of 4% paraformaldehyde for post-fixation. After a 1 h fixation, retinas were removed from the eye cup, dissected into four quadrants, whole-mounted and stained with cresyl violet for visualization of the arterial lesions.

2.7. Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM of values. Statistical differences between drug effect and baseline were evaluated with Student's *t*-test on paired samples

using the SPSS 15.0 software (SPSS inc. Chicago Illinois). Probability values less than 0.05 were considered to be statistically significant.

3. Results

3.1. Recording of blood flow

The design of the DP7a LDF probe (same diameter as the rat eye bulb, plan surface) allowed its easy positioning tangent to the eye bulb and centered on the external diameter of the eye (Fig. 1). In this position, a stable tissue perfusion signal of 600-700 PU was recorded (Fig. 2). The signal recorded was not affected by a voluntary variation of a 1-2° angle of the probe from the optic axis or a slight translation of the probe of 0.1-0.2 mm from the center of the eye. The signal did not show periodic fluctuation that could be assimilated to heart rate or arterial pulsation. These parameters ascertained that the measurements were made within the same region across rats and most probably assessed microcirculation (Fig. 1). Other positioning of the probe could result in a rapid rise in and saturation of the signal amplitude which might correspond to the positioning of the probe over large vessels. The intravitreal injection of saline did not affect the signal baseline, except an artefact at the beginning of the injection (Fig. 3).

3.2. Hypercapnia

The arterial pCO₂ was significantly increased (p=0.029) and the arterial pH significantly decreased (p=0.028) during the hypercapnia compared to the pre-hypercapnic values, as commonly found in hypercapnia studies.^{40, 41} Blood pressure, heart rate, arterial pO₂, arterial HCO₃ and hematocrit were not affected by hypercapnia (p>0.05) (Table 1). A rapid and strong augmentation of LDF signal using the DP7a LDF probe was recorded upon the initiation of 8% CO₂

inhalation (Fig. 2, 3B). This was maintained over the period of administration of CO₂. The basal level was recovered at the end of the inhalation period (Fig. 3 B). The values of the tissue perfusion obtained with the LDF showed a significant augmentation of $18\% \pm 11$ ($p=0.001$) using the DP7a compared to baseline (Fig. 2 A, B).

3.3. Intravitreal administration of drugs

Adenosine as well as sodium nitroprusside induced a significant 14-16% increase of perfusion (Fig. 3C, D, F) compared to baseline (adenosine, $p<0.0001$; sodium nitroprusside, $p=0.002$) measured by the DP7a probe. The augmentation observed was evoked with a slow onset, corresponding to the diffusion of the agent. The response was maintained for more than 10 min before returning slowly towards basal level, depending on the drug used. Et-1 induced a significant decrease in the tissue perfusion, which was maintained for about 5 min before returning to the basal level (11%, $p=0.016$, Fig. 3E, F).

3.4. Retinal vessels photocoagulation

The values of posterior segment perfusion obtained with the DP7a LDF probe after photocoagulation of the central retinal arteries showed a significant drop of 33% ($p=0.04$) from the mean baseline (Fig. 4). Whole-mount lesioned retina stained with cresyl violet showed a visible cell damage compared to the contralateral intact eye (Fig. 4 A). Coagulated blood could also be seen in the vessel for the retina subjected to this treatment on cresyl violet whole mount

retina (Fig. 4 B). However, the ischemia was not total since reperfusion of retinal collaterals by vascular shunt was observed immediately after photocoagulation.

3.5. Comparison with measurements obtained with the DP3 probe

Although the main objective of this study was to test the sensitivity of the DP7a probe, comparison with the measurements obtained with DP3 probe were made. DP3 (1.5 mm external diameter) is composed of only 1 receiving fibre which is less distant to the emitting fibre than in the DP7a. These complementary experiments were performed first to evaluate the consequence of a 0.5 mm (DP3) distance between emitting and receiving fibres rather than 1 mm (DP7a) on the LDF signal, and second to test the possibility to use the DP3 probe for mice research (in which DP7a probe diameter would be too large for the eye globe). Similar to the DP7a, the basal signal recorded by DP3 ranged from 600 to 700 PU but the baseline signal showed greater fluctuation amplitude over the recording period with the DP3 (DP3: 22% fluctuation compared to average baseline vs 14% for the DP7a, Fig. 2). Hypercapnia induced similar vasoreactivity, i.e. blood flow increase ($20\% \pm 10$, $p=0.03$). In the mice, intravitreal injection of adenosine induced a significant increase of the tissue perfusion compared with the baseline ($57\% \pm 42$, $p=0.04$) using the DP3 LDF probe.

4. Discussion

In the present study, we tested a non-invasive and sensitive LDF method able to assess the hemodynamic variations in rodent posterior segment under the local

influence of various pharmacological or metabolic agents. Intravitreal vasoactive agents induced a modulation of blood flow detected by DP7a LDF probe that was reproducible and stable, which is interesting for repeated measurement over days to test pathological conditions and the effectiveness of treatment paradigms. Whether these changes could be attributed to retina or choroid circulation is discussed below. Moreover, this study shows that use of a needle probe (DP3) could be beneficial for mice experiments.

All pharmacological agents injected intravitreally induced significant blood flow changes compared to baseline, i.e., vasodilation for hypercapnia, adenosine, sodium nitroprusside and vasoconstriction for Et-1. Endothelium-dependent vasodilation was assessed by hypercapnia⁴² and direct action on smooth muscles was assessed by sodium nitroprusside. Adenosine has a more complex action which could involve endothelium through the prostaglandin pathway, smooth muscle cells and pericytes in capillaries⁴³⁻⁴⁶ through K-ATP channels and A2 receptors.⁴⁷⁻⁴⁹ Et-1 mostly exerts its physiological response through the activation of two G protein-coupled receptors, named ET-A and ET-B located on vascular smooth muscles cells.^{37, 50, 51} This suggests that the LDF technique using the DP7a probe is sensitive enough to assess relative retinal/choroidal blood flow changes by drugs or endogenous factors at the level of endothelium, smooth muscle cells or pericytes.

A striking feature of our findings is the quite modest amplitude (10-19%), of the significant changes measured using the DP7a probe in the rat eye. The observed hypercapnic response (18% increase) was slightly lower than measured previously in retina using autoradiography (30% increase)⁴¹ or microsphere techniques (80% increase).⁵² The intravitreal injection of adenosine (2 mM) induced a significant augmentation of posterior segment perfusion (14%) which was also lower than previous results using microspheres trapping in rabbits (100%)^{27, 47} or using fluorescein angiography in newborn pigs (5 nM adenosine, 79%; 50nM, 323%).⁴⁷ However, the effect of adenosine on mice eye was stronger (57%). The vasodilation observed after intravitreal administration of sodium nitroprusside (16%) was consistent with other studies, although lower (103% at 15 nM sodium nitroprusside).⁴⁷ The difference of amplitude changes amongst studies may be attributable to experimental set-up, like the concentration and mode of administration of the drug, the animal model and the anaesthetics used. Moreover, the vascular bed assessed by the microsphere or angiography techniques –mostly larger microvessels- are different from the one assessed by LDF (microcirculation). The larger vessels embedded by smooth muscles are more reactive to pharmacological, metabolic or shear stress than microcirculation composed with endothelial cells and pericytes. Moreover, the long light path from the LDF probe to the fundus implied divergence of the beam resulting in increased probability that 1) an incident photon hits a larger vessel which will affect the Doppler-shift spectrum and 2) photons undergo multiple scattering. This would consequently affects the flow value, however, would not obliterate the

validity of the results. Indeed, it was previously demonstrated that the Doppler signal varies linearly with the blood flow within larger vessels or tubes.⁵³

Another important factor that can explain the modest changes in blood flow recorded with this technique compared to other which measured more purely retinal blood flow is the contribution of the choroidal blood flow to the LDF signal. As the choroid is highly perfused and blood flow not regulated the same way as the retina,^{52, 54} the portion of the LDF signal derived for the choroid might dominate the recorded LDF signal. The absence of pigment in the albino rat eye and the near infrared wavelength used are in favour of a good penetration of the laser beam through the eye. The distance between the two emitting or receiving optic fibres seemed however to have little effect on the depth of the volume sampled in the present set-up since the results obtained with DP3 or DP7a probe were similar both in perfusion unit and percentage of change – the depth of the sampled volume is theoretically proportional to the distance between the illuminating fibre and the fibres detecting the scattered light.^{6, 11, 12, 55} Because the probes were not in contact with the retina, there was most likely overlap between the area illuminated and collected. However, the photocoagulation of the retinal arteries experiment suggested a contribution of the choroidal circulation to the LDF signal. The exact proportion of this contribution could not be quantified because of residual blood supply via collateral vessels of the retina. The possible lack of response of the choroid to the intravitreously drugs would thus lead to an underestimation of the changes in retinal perfusion. As drugs were injected

intravitreously, it could reasonably be hypothesized that they principally target the internal retina vascular bed rather than the external choroid. Many pharmaceuticals like anti-VEGF molecules are not able to diffuse throughout the retina to the choroid,⁵⁶ which could also be the case in our study. For example, sodium nitroprusside did not induce increase of choroidal blood flow in humans after an intravitreal injection.⁵⁷ Thus, although it has been shown that the choroid was vasoreactive to intravenous adenosine⁵⁸ or endothelin,¹⁴ the volume and concentration of the drugs used in the present study might not be sufficient to diffuse to the choroid and induce changes in the choroidal blood flow. The weak effect of hypercapnia is more puzzling since it usually induces increase in choroidal blood flow in most species. However, some recent studies using microspheres and magnetic resonance imaging showed that the choroidal blood flow was not significantly affected by hypercapnia,^{52, 54} which could support the present finding. In addition, the increase of blood flow induced by adenosine was stronger in mice than in rats, which could be due to the lower influence of the choroid blood flow to the LDF signal due to absorption of the photon by the pigmented epithelium (which is absent in the albino rat). Thus, the relative blood flow changes recorded with the current LDF method matched better the previous data of blood flow regulation measured in the retina rather than in the choroid. It could be claimed that the changes measured here are attributable mainly to perfusion changes within the internal part of the retina. The amplitude of these changes is however difficult to quantify due to an unknown contribution of the highly perfused choroid to the LDF signal.

5. Conclusion

Notwithstanding the limitation that the LDF signal presented here could not evaluate with accuracy the portion of retinal or choroidal circulations, this method can assess the variation of retinal/choroidal blood fluxes under a variety of local pharmacological agents or metabolic challenges. The LDF signal was stable over a long period of time and was sensitive enough to detect blood flow changes over several minutes after the administration of the agents. The method presented here allows for a continuous relatively non-invasive technique to assess ocular blood flow which will be useful to assess changes in hemodynamics due to the presence of specific receptors upregulated in pathological conditions.

Acknowledgements

The authors would like to thank Charles Riva (Medical School, University of Lausanne, Switzerland) and Rodney Gush (Moor Instruments, UK) for a careful reading and discussion of the manuscript, Florence Dotigny for her technical assistance and Denis Latendresse for the graphic work. This study was supported by the Vision Research Network (FRSQ). SH and MP are recipients of a Studentship from the Vision Research Network (FRSQ) and the Foundation Fighting Blindness, respectively.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper. This work was presented at the ARVO meeting, Fort Lauderdale, 2010 and International Society for Eye Research, Montreal, 2010.

References

- [1] Flammer J, Orgul S, Costa VP, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res.* 2002;21:359-393.
- [2] Grieshaber MC, Flammer J. Blood flow in glaucoma. *Curr Opin Ophthalmol.* 2005;16:79-83.
- [3] De La Cruz JP, Gonzalez-Correa JA, Guerrero A, et al. Pharmacological approach to diabetic retinopathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2004;20:91-113.
- [4] Schmetterer L, Wolzt M. Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 1999;42:387-405.
- [5] Pemp B, Schmetterer L. Ocular blood flow in diabetes and age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol.* 2008;43:295-301.
- [6] Riva CE, Geiser M, Petrig BL. Ocular blood flow assessment using continuous laser Doppler flowmetry. *Acta Ophthalmol.* 2010;88:622-629.
- [7] Riva C, Ross B, Benedek GB. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. *Invest Ophthalmol.* 1972;11:936-944.
- [8] Stern MD. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature.* 1975;254:56-58.
- [9] Stern MD, Lappe DL, Bowen PD, et al. Continuous measurement of tissue blood flow by laser-Doppler spectroscopy. *Am J Physiol.* 1977;232:H441-448.

- [10] Barfod C, Akgoren N, Fabricius M, et al. Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation. *Acta Physiol Scand.* 1997;160:123-132.
- [11] Fabricius M, Akgoren N, Dirnagl U, et al. Laminar analysis of cerebral blood flow in cortex of rats by laser-Doppler flowmetry: a pilot study. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1997;17:1326-1336.
- [12] Riva CE, Geiser M, Petrig BL. Ocular blood flow assessment using continuous laser Doppler flowmetry. *Acta Ophthalmol.* 2009;
- [13] Reitsamer HA, Kiel JW. A rabbit model to study orbital venous pressure, intraocular pressure, and ocular hemodynamics simultaneously. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43:3728-3734.
- [14] Kiel JW. Endothelin modulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Exp Eye Res.* 2000;71:543-550.
- [15] Kiel JW, van Heuven WA. Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:579-585.
- [16] Riva CE, Cranstoun SD, Mann RM, et al. Local choroidal blood flow in the cat by laser Doppler flowmetry. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:608-618.
- [17] Buerk DG, Atochin DN, Riva CE. Simultaneous tissue PO₂, nitric oxide, and laser Doppler blood flow measurements during neuronal activation of optic nerve. *Adv Exp Med Biol.* 1998;454:159-164.

- [18] Buerk DG, Riva CE. Adenosine enhances functional activation of blood flow in cat optic nerve head during photic stimulation independently from nitric oxide. *Microvasc Res.* 2002;64:254-264.
- [19] Chauhan BC, Yu PK, Cringle SJ, et al. Confocal scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina: origin of flow signals and dependence on scan depth. *Arch Ophthalmol.* 2006;124:397-402.
- [20] Yu DY, Townsend R, Cringle SJ, et al. Improved interpretation of flow maps obtained by scanning laser Doppler flowmetry using a rat model of retinal artery occlusion. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46:166-174.
- [21] Hotta H, Ito H, Kagitani F, et al. Cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor, dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats. *Eur J Pharmacol.* 1998;344:49-52.
- [22] Bill A, Nilsson SF. Control of ocular blood flow. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985;7 Suppl 3:S96-102.
- [23] Harris A, Ciulla TA, Chung HS, et al. Regulation of retinal and optic nerve blood flow. *Arch Ophthalmol.* 1998;116:1491-1495.
- [24] Pournaras CJ, Rungger-Brandle E, Riva CE, et al. Regulation of retinal blood flow in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* 2008;27:284-330.
- [25] Bonner R, Nossal R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Appl Opt.* 1981;20:2097-2107.
- [26] Faubert J, Diaconu V, Ptito M, et al. Residual vision in the blind field of hemidecorticated humans predicted by a diffusion scatter model and

- selective spectral absorption of the human eye. *Vision Res.* 1999;39:149-157.
- [27] Braunagel SC, Xiao JG, Chiou GC. The potential role of adenosine in regulating blood flow in the eye. *J Ocul Pharmacol.* 1988;4:61-73.
- [28] Dragunow M, Faull RL. Neuroprotective effects of adenosine. *Trends Pharmacol Sci.* 1988;9:193-194.
- [29] Rudolphi KA, Schubert P, Parkinson FE, et al. Neuroprotective role of adenosine in cerebral ischaemia. *Trends Pharmacol Sci.* 1992;13:439-445.
- [30] Larsen AK, Osborne NN. Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2603-2611.
- [31] Blazynski C, Perez MT. Adenosine in vertebrate retina: localization, receptor characterization, and function. *Cell Mol Neurobiol.* 1991;11:463-484.
- [32] Noack E, Feelisch M. Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation. *Basic Res Cardiol.* 1991;86 Suppl 2:37-50.
- [33] Hein TW, Rosa RH, Jr., Yuan Z, et al. Divergent roles of nitric oxide and rho kinase in vasomotor regulation of human retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51:1583-1590.
- [34] Fiscus RR. Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation. *Semin Thromb Hemost.* 1988;14 Suppl:12-22.
- [35] Ogawa N, Mori A, Hasebe M, et al. Nitric oxide dilates rat retinal blood vessels by cyclooxygenase-dependent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;297:R968-977.

- [36] Tune JD, Gorman MW, Feigl EO. Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Physiol*. 2004;97:404-415.
- [37] Rigosi E, Ensini M, Bottari D, et al. Loss of retinal capillary vasoconstrictor response to Endothelin-1 following pressure increments in living isolated rat retinas. *Exp Eye Res*. 2010;90:33-40.
- [38] Hardy P, Nuyt AM, Abran D, et al. Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins. *Pediatr Res*. 1996;39:487-493.
- [39] Ichikawa M, Okada Y, Asai Y, et al. Effects of topically instilled bunazosin, an alpha1-adrenoceptor antagonist, on constrictions induced by phenylephrine and ET-1 in rabbit retinal arteries. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:4041-4048.
- [40] Dauphin F, Lacombe P, Sercombe R, et al. Hypercapnia and stimulation of the substantia innominata increase rat frontal cortical blood flow by different cholinergic mechanisms. *Brain Res*. 1991;553:75-83.
- [41] Pouliot M, Deschenes MC, Hetu S, et al. Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[14C]-iodoamphetamine ([14C]-IMP). *Exp Eye Res*. 2009;89:960-966.
- [42] Venkataraman ST, Hudson C, Fisher JA, et al. Novel methodology to comprehensively assess retinal arteriolar vascular reactivity to hypercapnia. *Microvasc Res*. 2006;72:101-107.

- [43] Matsugi T, Chen Q, Anderson DR. Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:2695-2701.
- [44] Li Q, Puro DG. Adenosine activates ATP-sensitive K(+) currents in pericytes of rat retinal microvessels: role of A1 and A2a receptors. *Brain Res.* 2001;907:93-99.
- [45] Hirao M, Oku H, Goto W, et al. Effects of adenosine on optic nerve head circulation in rabbits. *Exp Eye Res.* 2004;79:729-735.
- [46] Ishizaki E, Fukumoto M, Puro DG. Functional K(ATP) channels in the rat retinal microvasculature: topographical distribution, redox regulation, spermine modulation and diabetic alteration. *J Physiol.* 2009;587:2233-2253.
- [47] Gidday JM, Maceren RG, Shah AR, et al. KATP channels mediate adenosine-induced hyperemia in retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1996;37:2624-2633.
- [48] Jeppesen P, Aalkjaer C, Bek T. Adenosine relaxation in small retinal arterioles requires functional Na-K pumps and K(ATP) channels. *Curr Eye Res.* 2002;25:23-28.
- [49] Maenhaut N, Boussery K, Delaey C, et al. Adenosine enhances the relaxing influence of retinal tissue. *Exp Eye Res.* 2009;88:71-78.
- [50] Neylon CB. Vascular biology of endothelin signal transduction. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:149-153.

- [51] Alonso D, Radomski MW. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev.* 2003;8:107-115.
- [52] Wang L, Grant C, Fortune B, et al. Retinal and choroidal vasoreactivity to altered PaCO₂ in rat measured with a modified microsphere technique. *Exp Eye Res.* 2008;86:908-913.
- [53] Riva CE, Cranstoun SD, Grunwald JE, et al. Choroidal blood flow in the foveal region of the human ocular fundus. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35:4273-4281.
- [54] Duong TQ, Pardue MT, Thule PM, et al. Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina. *NMR Biomed.* 2008;21:978-996.
- [55] Riva CE, Harino S, Petrig BL, et al. Laser Doppler flowmetry in the optic nerve. *Exp Eye Res.* 1992;55:499-506.
- [56] Mordenti J, Cuthbertson RA, Ferrara N, et al. Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration. *Toxicol Pathol.* 1999;27:536-544.
- [57] Schmidl D, Polska E, Kiss B, et al. Ocular hemodynamic effects of nitrovasodilators in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87:87-92.
- [58] Portellos M, Riva CE, Cranstoun SD, et al. Effects of adenosine on ocular blood flow. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1995;36:1904-1909.

Table 1. Physiological parameters

	Normocapnia	Hypercapnia
Systolic BP (mmHg)	139 ± 8	136 ± 8
Diastolic BP (mmHg)	110 ± 8	107 ± 4
Mean BP (mmHg)	120 ± 8	116 ± 5
Heart Rate (Beats/min)	491 ± 51	477 ± 34
Arterial pH	7.32 ± 0.01	7.23 ± 0.04*
Arterial pO ₂ (mmHg)	75.33 ± 4.16	82.33 ± 8.33
Arterial pCO ₂ (mmHg)	50.17 ± 5.1	67.07 ± 10.19*
Arterial HCO ₃ (mmol/L)	26.57 ± 2.33	27.53 ± 1.59
Hematocrit (% PVC)	42.67 ± 2.08	44.67 ± 2.89

Results are expressed as means ± SEM of values obtained from four rats.

* $p \leq 0.05$, Student's t-test, compared to normocapnia.

Figure legends

Figure 1: Measurement of the ocular blood flow using laser Doppler flowmetry in the rat. The DP7a LDF probe was placed in contact with the cornea and parallel to the optic axis (A). The DP7a LDF probe was designed with 1 emitting optical fibre with 8 collecting fibres in periphery (B). The LDF signal was not affected by a slight translation or angle from the perpendicularity of the probe. Other positioning of the probe could result in a rapid rise in and saturation of the signal amplitude which might correspond to the positioning of the probe over large vessels. (C) The area of the spot was estimated at 500 μm (see text), which might scan an area deprived of large vessels as shown on this microphotograph of whole-mounted rat retina labelled with ADPase histochemistry. Scale bar 500 μm .

Figure 2: Comparison of the basal LDF signal recorded with the DP7a or the DP3 probe and the effect of hypercapnia (black line). The DP7a gives a more stable signal compared to the DP3 probe. The amplitude of the hypercapnia effect is similar with the two probes.

Figure 3: Variation of the tissue perfusion (percentage of baseline) after systemic or intravitreal injections of various substances. (A) Saline intravitreal injection (arrow). No significant physiological response was visible after the injection. (B) Hypercapnic conditions (CO_2 8%, 3 minutes, line). A rapid increase of the tissue perfusion was visible at the beginning of the induction and lasted for the time of the hypercapnia. (C) Adenosine intravitreal injection (arrow). A gradual increase

of the tissue perfusion was visible after the injection and maintained for several minutes before returning to the basal level. (D) sodium nitroprusside intravitreal injection (arrow). An increase in the tissue perfusion was visible a few minutes after the injection and the response is maintained for several minutes. (E) endothelin-1 intravitreal injection (arrow). A brief and strong increase in the tissue perfusion was visible shortly after the injection, followed by an abrupt decrease that was maintained for several minutes before returning to the basal level. (F) Histograms of the changes from baseline in tissue perfusion induced by the different pharmacological agents. *, Student's *t*-test, compared to baseline.

Figure 4: Effect of the retinal arteries photocoagulation. (A) Healthy retina stained with cresyl violet. (B) Retina stained with cresyl violet after laser photocoagulation of the retinal arteries. As expected, hypoxia created by the photocoagulation of the retinal arteries destroyed the retinal cells. (C) Variation of the tissue perfusion (percentage of baseline) after laser lesion of the retinal arteries provoked a statistically significant decrease of 33% from the basal level ($p < 0.01$, Student's *t*-test, $n=4$).

Figure 1

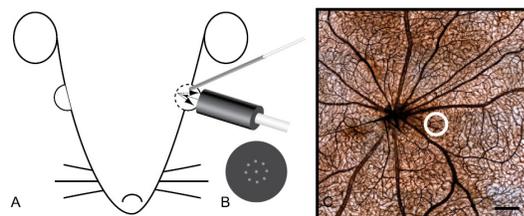


Figure 2

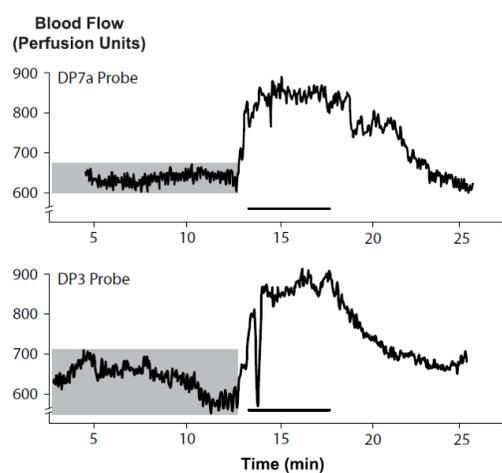


Figure 4

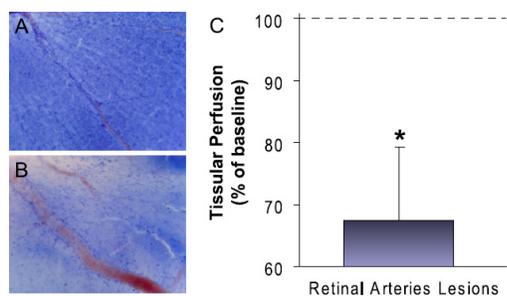
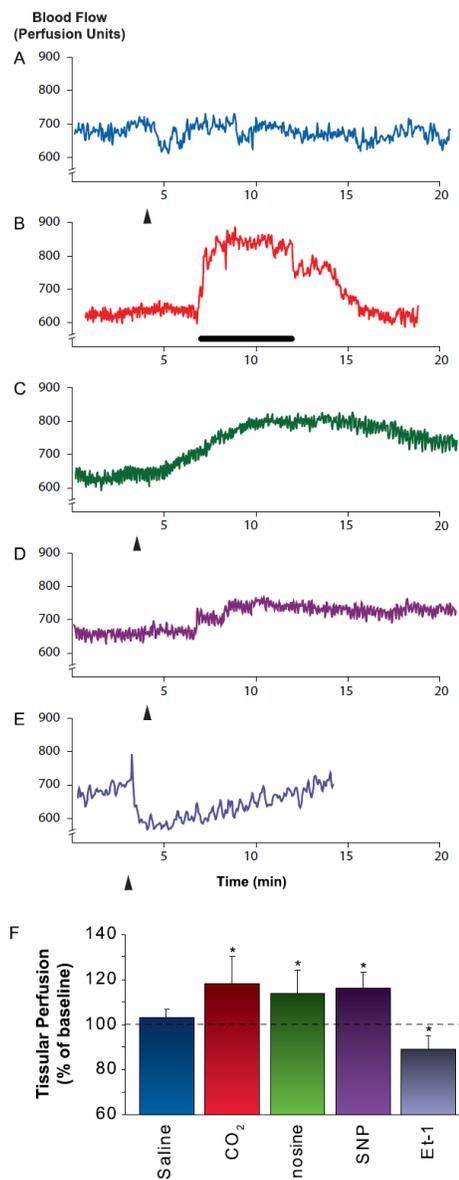


Figure 3



MÉTHODES (Diabète)

Rats diabétiques

Des rats Wistar mâles pesant entre 200 et 250 g ont été achetés du fournisseur Charles River (St-Constant, QC, Canada) et gardés deux par cage dans une pièce à température (23°C), humidité (50%) et luminosité (cycle de 12 heures lumière/noirceur) contrôlées avec nourriture et eau à volonté. Pour l'induction du diabète, les rats ont reçu une injection intrapéritonéale (i.p.) unique de Streptozotocine (STZ, 65 mg/kg, Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). Les rats témoins, du même âge, ont quant à eux reçu une injection du véhicule (saline stérile, 0.9%, pH 7.4). La concentration en glucose sanguin a été obtenue à l'aide d'échantillons de sang prélevés à partir de la veine caudale et analysés avec un glucomètre commercial (Accusoft, Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) 48 heures après l'injection de STZ. Seuls les rats traités au STZ et affichant une glycémie plus élevée que 20 mmol/L ont été considérés comme étant diabétiques. Les rats affichant une glycémie normale après une injection de STZ ont été éliminés de l'étude. La glycémie a ensuite été mesurée une fois par semaine et juste avant l'expérimentation pour confirmer que les rats traités au STZ étaient toujours diabétiques. L'agoniste du récepteur B₁ (RB₁) [Sar-D-Phe⁸-des-Arg⁹]-BK (0.5 nmol) a été administré par voie intravitréenne avant l'expérimentation au LDF afin d'éviter un effet systémique. Selon une étude préliminaire, une injection intravitréenne de 0.1 et 1 nmol d'agoniste du RB₁ était suffisant pour induire une augmentation de la perméabilité vasculaire chez des rats diabétiques (Abdoun, Talbot et al. 2008).

Mesure du débit sanguin rétinien chez les rats diabétiques avec le LDF

La fonctionnalité du RB1 chez des rats après un diabète de 4 jours et de 6 semaines a été testée au moyen du LDF selon la méthode décrite précédemment. Après l'obtention d'un niveau basal stable du débit sanguin sur une période de 30 min, le [Sar-D-Phe⁸-des-Arg⁹]-BK (Research Institute of Biotechnology, National Research Council of Canada, Montréal, QC, Canada) (0.5 nmol) dissout dans 5 µL de saline (solution de NaCl 0.9 %) a été injecté sur une période de 30 sec. L'œil opposé a été injecté avec 5 µL de saline comme témoin.

RÉSULTATS (Diabète)

Paramètres physiologiques

La glycémie des rats diabétiques s'est trouvée augmentée autant chez le groupe de rats diabétiques de 4 jours ($p < 0,001$) que de 6 semaines ($p < 0,001$) comparativement au groupe témoin apparié selon l'âge. De plus, selon les résultats obtenus dans une autre étude (Pouliot, Héту et al. 2011) et utilisant des animaux traités de façon identique, tous les autres paramètres physiologiques sont restés inchangés chez les rats diabétiques de 4 jours. Ainsi, aucune différence significative n'a été observée dans le poids corporel, la température corporelle, la pression artérielle moyenne, la fréquence cardiaque, le pH artériel, la pO_2 artérielle, la pCO_2 artérielle, le HCO_3 artériel ou l'hématocrite ($p > 0,05$).

Dans le groupe de rats diabétiques de 6 semaines, le poids corporel, la pCO_2 et le HCO_3 étaient significativement diminués ($p < 0,01$) comparativement au groupe témoin, alors que l'hématocrite était significativement augmenté ($p = 0,02$). La température corporelle, la pression artérielle, les battements cardiaques, le pH ou la pO_2 restaient inchangés ($p > 0,05$).

Réponse hémodynamique oculaire à la stimulation du RB1 lors d'un diabète de 4 jours

L'injection intravitréenne de 5 μL d'agoniste B_1 (0.5 nmol) ($n=4$) a provoqué une hausse significative ($p = 0,008$) et graduelle de la perfusion sanguine rétinienne de 18 % (± 12 %) par rapport au niveau de base chez le

groupe diabétique de 4 jours. Après le maintien de la réponse pendant plusieurs minutes, la perfusion retourne au niveau basal (Figures 11 et 13).

Une injection similaire effectuée chez le groupe témoin apparié selon l'âge (n=4) n'a pu provoquer une réponse semblable; une hausse non-significative ($p = 0,679$) de la perfusion oculaire de 2 % (± 6 %) a pu être observée (Figures 12 et 13).

Figure 11

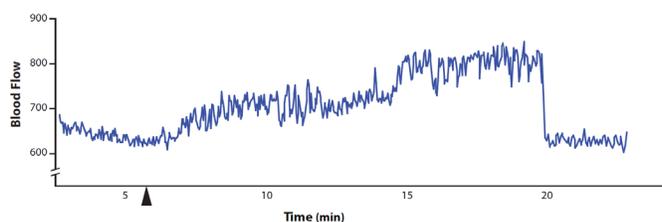


Figure 11 : Tracé représentatif de la perfusion oculaire mesurée par LDF en fonction du temps après injection intravitréenne de 5 μ L d'agoniste B₁ (0.5 nmol, flèche) chez un rat diabétique de 4 jours. Une hausse de la perfusion tissulaire est observable et se maintient pendant plusieurs minutes avant de retourner au niveau de base.

Figure 12

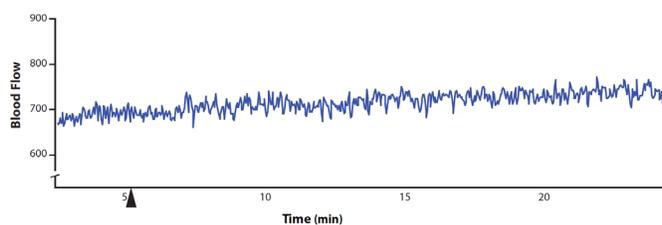


Figure 12 : Tracé représentatif de la perfusion oculaire mesurée par LDF en fonction du temps après injection intravitréenne de 5 μ L de saline physiologique (flèche) chez un rat diabétique de 4 jours. Aucune réponse physiologique n'est observable suite à l'injection.

Figure 13

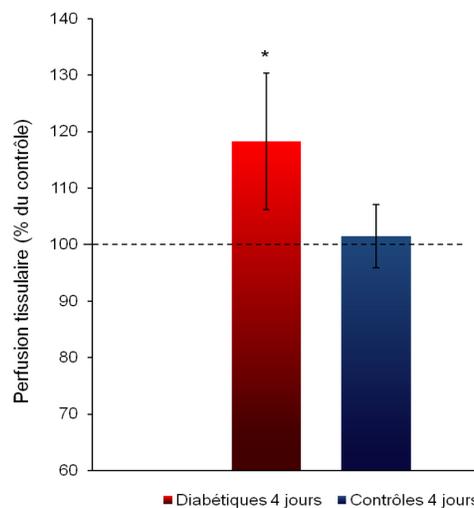


Figure 13 : Pourcentage de la variation de la perfusion oculaire par rapport au niveau de base (ligne pointillée) lors de l'injection intravitréenne de 5 μ L d'agoniste B₁ (0.5 nmol) chez le groupe de rats diabétiques de 4 jours comparé au groupe témoin apparié selon l'âge.

Réponse hémodynamique oculaire à la stimulation du RB1 lors d'un diabète de 6 semaines

L'injection intravitréenne de 5 μ L d'agoniste B₁ (0.5 nmol) (n=5) a provoqué une hausse significative ($p = 0,001$) et graduelle de la perfusion sanguine rétinienne de 15 % (± 2 %) par rapport au niveau de base chez le groupe diabétique de 6 semaines (Figures 14 et 16). Après le maintien de la réponse pendant plusieurs minutes, la perfusion retourne au niveau basal. Tel qu'il peut être remarqué sur la figure 14, une baisse transitoire du signal LDF est visible immédiatement après le début de l'injection avant de revenir à son niveau de base. Cet effet peut être attribuable à un artefact, car une réponse semblable a été observée chez plusieurs animaux et ce suite à l'injection de plusieurs substances pharmacologiques et de saline. Bien qu'il puisse être difficile d'en expliquer précisément la cause sans autre investigation, l'intégrité des vaisseaux et du tissu rétinien en général est grandement compromis lors d'un diabète avancé. Ainsi, bien que nous ayons tenté de maintenir au minimum le volume injecté, les vaisseaux peuvent réagir par une vasoconstriction immédiatement après l'injection, probablement dû à une hausse de la pression intraoculaire. Les autres groupes, étant moins avancé dans le stade de la maladie en seraient alors moins affectés.

Une injection similaire effectuée chez le groupe témoin apparié selon l'âge (n=4) n'a pu provoquer une réponse semblable et une baisse non significative ($p = 0,468$) de la perfusion tissulaire de 1 % (± 4 %) a pu être observée (Figures 16 et 17).

L'injection intravitréenne de saline physiologique (5 μ L) chez le groupe diabétique de 6 semaines (n=5) a été incapable de produire l'effet observé lors de l'injection de l'agoniste B₁ et une baisse non-significative de 2 % (\pm 4 %) ($p > 0,05$) a été observée par rapport au niveau de base (Figures 15 et 18).

Figure 14

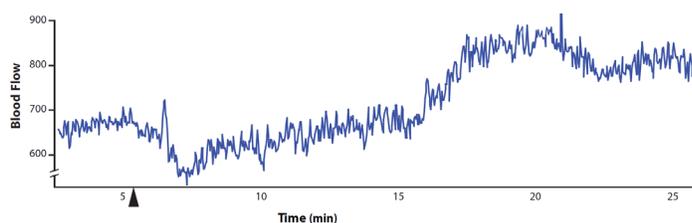


Figure 14 : Tracé représentatif de la perfusion oculaire mesurée par LDF en fonction du temps après injection intravitréenne de 5 μ L d'agoniste B₁ (0.5 nmol, flèche) chez un rat diabétique de 6 semaines. Une hausse de la perfusion tissulaire est observable et se maintient pendant plusieurs minutes avant de retourner au niveau de base.

Figure 15

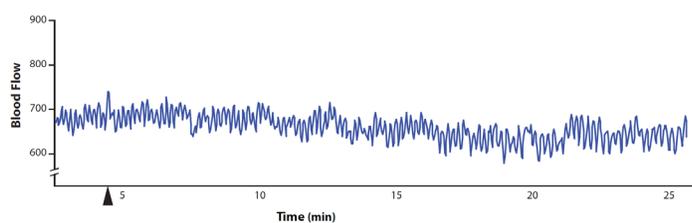


Figure 15 : Tracé représentatif de la perfusion oculaire mesurée par LDF en fonction du temps après injection intravitréenne de 5 μ L de saline physiologique (flèche) chez un rat diabétique de 6 semaines. Aucune réponse physiologique n'est observable suite à l'injection.

Figure 16

Figure 16 : Pourcentage de la variation de la perfusion oculaire par rapport au niveau de base (ligne pointillée) lors de l'injection intravitréenne de 5 μ L d'agoniste B₁ (100 μ M) chez le groupe de rats diabétiques de 6 semaines comparé au groupe témoin apparié selon l'âge.

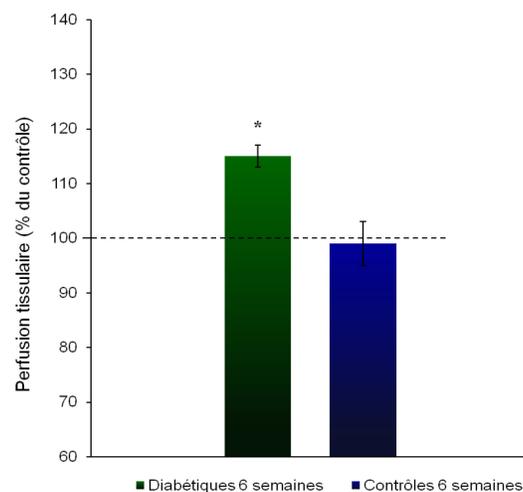


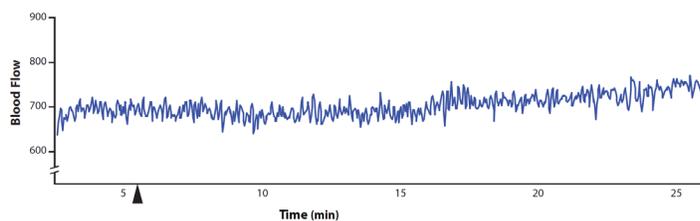
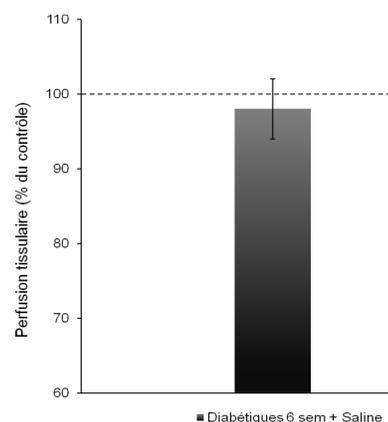
Figure 17

Figure 17 : Tracé représentatif de la perfusion oculaire mesurée par LDF en fonction du temps après injection intravitréenne de 5 µL d'agoniste B₁ (0.5 nmol, flèche) chez un rat témoin de 6 semaines. Aucune réponse physiologique n'est observable suite à l'injection.

Figure 18

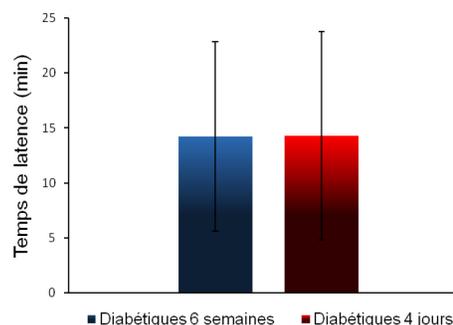
Figure 18 : Pourcentage de la variation de la perfusion oculaire par rapport au niveau de base (ligne pointillée) lors de l'injection intravitréenne de 5 µL de saline physiologique chez le groupe de rats diabétiques de 6 semaines.



Le temps de latence entre le début de l'injection et le début de la réponse physiologique a été calculé. Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre le temps de réponse du groupe diabétique 4 jours (858 sec ± 569) et diabétique 6 semaines (853 sec ± 518) ($p > 0,05$) (Figure 19).

Figure 19

Figure 19 : Comparaison du temps de latence suite au début de l'injection intravitréenne et le début de la réponse physiologique entre le groupe de rats diabétiques 6 semaines (n=5) et le groupe de rats diabétiques 4 jours (n=4).



DISCUSSION

Les Composés pharmacologiques

L'ensemble des substances pharmacologiques ont causé une variation significative du débit sanguin oculaire dans notre modèle. Ainsi, l'hypercapnie de même que l'injection intravitréenne d'adénosine et de nitroprusside de sodium ont provoqué une vasodilatation alors que l'injection intravitréenne d'endothéline-1 (Et-1) a provoqué une vasoconstriction.

Même si une revue de la littérature a précédemment été effectuée dans la discussion de l'article, et les mécanismes d'action des différents composés pharmacologiques brièvement expliqués, il convient maintenant de préciser un peu plus les mécanismes impliqués dans les réponses physiologiques, en plus d'apporter quelques précisions, lorsque cela est nécessaire, sur les caractéristiques des réponses observées.

Le dioxyde de carbone (CO₂) semble être impliqué dans la régulation locale du débit sanguin (Lipowsky, Kovalcheck et al. 1978; Harrison, Birkenhake et al. 1990; Riva, Cranstoun et al. 1994; Lietz, Hendrickson et al. 1998; Schmetterer and Polak 2001) et une dysfonction de cette régulation vasculaire semble d'ailleurs être impliquée chez les fumeurs ou lors de différentes pathologies telle que le glaucome (Drance, Sweeney et al. 1973; Nicoleta, Hnik et al. 1996; Roff, Harris et al. 1999; Steigerwalt, Laurora et al. 2000; Wimpissinger, Resch et al. 2004; Venkataraman, Hudson et al. 2005).

Une inhibition de l'activité de la NOS a été démontrée comme réduisant significativement la réponse physiologique suite à une hypercapnie (Schmetterer, Findl et al. 1997; Venkataraman, Hudson et al. 2006). Par contre, un effet produit

par une baisse locale du pH extracellulaire peut aussi jouer un rôle dans cette régulation (Harris, Arend et al. 1995; Schmetterer, Findl et al. 1997; Huber, Adams et al. 2006).

Plus précisément, l'hypercapnie, qui est une augmentation de la pression partielle de CO_2 dans la circulation artérielle, est reconnue pour être un puissant vasodilatateur (Harris, Arend et al. 1995; Dorner, Garhoefer et al. 2002; Meadows, Dunroy et al. 2003). Ainsi, les cellules endothéliales, en présence d'une augmentation de la pression partielle de CO_2 , produisent

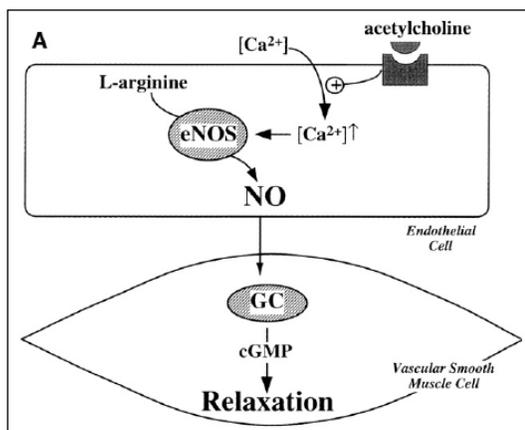


Figure 20 : Représentation schématique de la voie NOS/GC dans les cellules de la paroi vasculaire. (tiré de (Grieshaber, Mozaffarieh et al. 2007))

le NO via l'activation des enzymes eNOS et iNOS. Le NO diffuse alors vers les cellules musculaires lisses et provoque une augmentation de la 3,5 guanosine monophosphate cyclique (GMPc) sous l'activation de la guanylate cyclase soluble. Il y a alors une baisse du calcium intracellulaire et une déphosphorylation des chaînes légères de myosine entraînant leur relaxation et une vasodilatation (Orgul, Gugleta et al. 1999; Venkataraman, Hudson et al. 2006).

Le nitroprusside de sodium est un donneur de NO en le relâchant spontanément. Il agit donc directement sur les cellules musculaires lisses selon le mécanisme identifié pour l'hypercapnie (via un mécanisme dépendant du GMPc). Il provoque aussi la relaxation des péricytes par un mécanisme semblable (Haefliger, Zschauer et al. 1994; Haefliger, Chen et al. 1997). Le NO joue une

multitude de rôles physiologiques, incluant le maintien du tonus basal des vaisseaux rétiniens (Koss 1999), la facilitation des échanges intercellulaires et la suppression de la prolifération et de la migration cellulaire (Ortega Mateo and Amaya Aleixandre de 2000). Ce rôle dans la régulation du débit sanguin peut alors indiquer une participation dans plusieurs pathologies. Entre autres, une concentration élevée de NO participe au dysfonctionnement vasculaire et aux dommages rétiniens lors d'un diabète de type I (Tilton, Chang et al. 1993; Alder, Su et al. 1997; do Carmo, Lopes et al. 1998) en plus d'élever la pression intraoculaire lors du glaucome (Koss 1999).

L'adénosine est un neuromodulateur en conditions physiologiques. En plus de jouer un rôle dans l'activité des neurones et dans de multiples autres réponses physiologiques (telles que l'agrégation plaquettaire, la glycogénolyse, la suppression des neutrophiles...) ce nucléoside possède un effet vasculaire en induisant une vasodilatation, effet qui nous intéresse particulièrement pour cette étude (Macaluso, Frishman et al. 2003). Cette action vasodilatatrice a d'ailleurs été démontrée dans le système nerveux central et périphérique (Phillis 1989). Plus particulièrement, elle constitue un médiateur intercellulaire majeur qui est

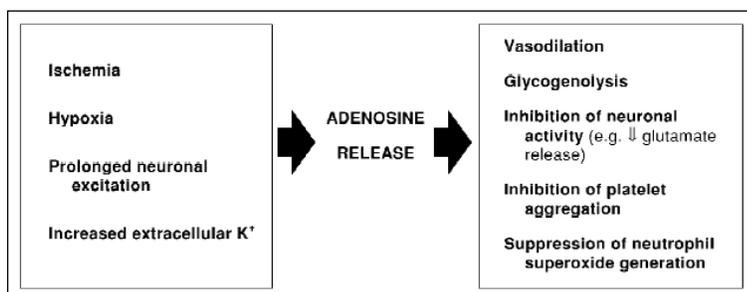


Figure 21 : Effets neuroprotecteurs de l'adénosine. (tiré de (Macaluso, Frishman et al. 2003)

grandement distribué dans la rétine de plusieurs espèces (Blazynski and Perez 1991).

Il existe plusieurs sous-types de récepteurs à l'adénosine: A_1 , A_2 et A_3 , chacun possédant sa propre distribution dans les organes (Fredholm, Abbracchio et al. 1994; Nyce 1999). Le récepteur A_2 est lui-même subdivisé en 2 sous-types : le récepteur A_{2a} possédant une forte affinité et le récepteur A_{2b} une faible affinité. Alors que le récepteur A_1 est situé principalement au niveau de la rétine interne et des cellules ganglionnaires (Braas, Zarbin et al. 1987), il semble que l'effet vasculaire soit, quant à lui, principalement relayé par le récepteur A_{2a} (Gidday and Park 1993). Ce dernier est aussi présent dans la rétine externe (Kvanta, Seregard et al. 1997; Hirao, Oku et al. 2004). Le récepteur A_3 semble, pour sa part, n'avoir aucune activité dans la rétine (Ghiardi, Gidday et al. 1999).

Ainsi, le récepteur A_{2a} étant présent sur les cellules endothéliales et musculaires lisses, induirait son effet vasodilatateur en réponse à une augmentation de l'AMPc et du GMPc (de Jong, de Jonge et al. 2000; Oxhorn, Cheek et al. 2000). En effet, ce récepteur est lié à une protéine G_{α} activant l'adénylate cyclase et la guanylate cyclase provoquant la relaxation des cellules musculaires lisses (Schubert, Rudolphi et al. 1994; Polska, Ehrlich et al. 2003). Dans la rétine, il semble de plus en plus probable qu'un mécanisme additionnel ait lieu. Ce récepteur, ainsi que le récepteur A_1 , agiraient alors sur les péricytes via les canaux potassiques sensibles à l'ATP (canaux K^+_{ATP}) (Gidday, Maceren et al. 1996; Macaluso, Frishman et al. 2003). L'ouverture de ces canaux changerait alors le potentiel membranaire de ces cellules en provoquant une hyperpolarisation et la relaxation des péricytes (Li and Puro 2001; Ishizaki, Fukumoto et al. 2009).

Ce récepteur A_{2a} jouerait d'ailleurs un rôle dans la régulation du tonus artériolaire en conditions physiologiques (Macaluso, Frishman et al. 2003) ainsi que dans la survie de la rétine à la suite d'une ischémie (Larsen and Osborne 1996). Une telle ischémie pouvant être le résultat de plusieurs pathologies diminuant ou perturbant le débit sanguin rétinien telles que le glaucome, l'athérosclérose ou le diabète (Miller, Adamis et al. 1997). En présence d'une baisse de l'oxygène ou de l'énergie cellulaire, il y aurait transformation de l'ATP en adénosine afin d'augmenter l'apport sanguin par vasodilatation (Ghiardi, Gidday et al. 1999). L'adénosine serait aussi impliquée dans la néovascularisation en déclenchant la formation de VEGF et en modulant l'expression de son récepteur (Ghiardi, Gidday et al. 1999).

L'effet observé lors de l'injection intravitréenne d'adénosine est probablement

dû à une réponse rétinienne. En effet, il a été démontré dans une étude

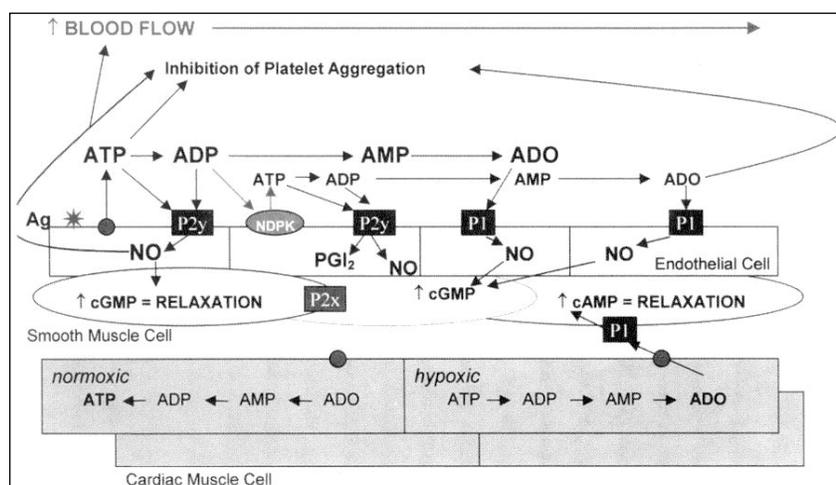


Figure 22 : Actions vasculaires de l'adénosine. (tiré de (Oxhorn, Cheek et al. 2000))

antérieure (Portellos, Riva et al. 1995) qu'une administration intraveineuse d'adénosine ne provoque qu'une réponse choroïdienne, ce composé étant incapable de traverser la barrière hémato-rétinienne et de rejoindre les cellules de

la rétine : le récepteur A_{2a} étant probablement situé du côté abluminal des vaisseaux. L'administration intravitréenne est alors la méthode tout indiquée pour simuler les conditions physiologiques dans la rétine plutôt qu'une administration systémique.

Tel qu'il a été mentionné précédemment, l'endothéline se décline en 3 isoformes (ET-1, ET-2 et ET-3) et l'ET-1, sécrétée du côté basal des cellules endothéliales, est la principale impliquée dans la régulation du débit sanguin (Yanagisawa, Kurihara et al. 1988; Takahashi, Brooks et al. 1989; Alonso and Radomski 2003). La réponse physiologique nette produite par ce peptide dépendra de la balance entre son interaction avec les récepteurs ETB1 vasodilatateur et ETA vasoconstricteur. Ces récepteurs sont abondamment exprimés et grandement distribués dans les différents tissus oculaires (MacCumber,

Jampel et al. 1991; Murata, Nakagawa et al. 1998; Nagano, Wei et al. 2007). Les récepteurs ETA et ETB sont

tous deux couplés

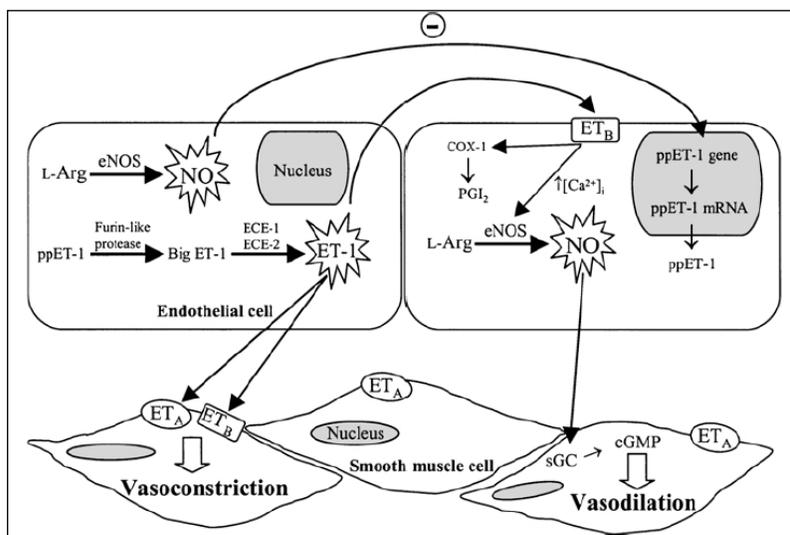


Figure 23 : Rôles du NO et de ET-1 dans la régulation du tonus vasculaire. (tiré de (Alonso and Radomski 2003))

à des protéines G de différente nature. Ainsi, la liaison avec le récepteur ETB1, principalement situé sur les cellules musculaires lisses et les cellules

endothéliales, produit une vasodilatation selon un mécanisme dépendant du NO. Une liaison avec le récepteur ETA, lié à une protéine Gq, produit quant à elle une vasoconstriction. Ce dernier, principal auteur de la réponse physiologique, se trouve entre autres sur les cellules musculaires lisses et sur les péricytes de la rétine (Lam, Lee et al. 2003; Tune, Gorman et al. 2004). La liaison avec ce récepteur entraîne l'activation de la phospholipase C qui provoque l'accumulation d'inositol triphosphate (IP3) et de diacylglycerol. Ceci a alors pour conséquence de faire augmenter la concentration de calcium intracellulaire et de provoquer une dépolarisation et la contraction des cellules musculaires lisses (Alonso and Radomski 2003). Un mécanisme similaire semble se produire lors de la contraction des péricytes sous l'effet de l'ET-1. En effet, il a été démontré que ces cellules jouent un rôle non négligeable dans la régulation du débit sanguin rétinien. Ces dernières cellules se contractent donc en réponse à une augmentation du calcium intracellulaire et entraînent une vasoconstriction et par conséquent une baisse de la perfusion sanguine (Kawamura, Oku et al. 2002).

En plus de jouer un rôle important dans la régulation du débit sanguin rétinien, l'ET-1 induit aussi plusieurs autres réponses physiologiques. Ainsi, selon sa liaison aux différents récepteurs, l'ET-1 joue un rôle dans la prolifération et l'adhésion cellulaire et un effet mitogène sur les péricytes (Chakravarthy, Gardiner et al. 1992).

Enfin, ce vaste champ d'action de l'ET-1 ne peut que soutenir son implication dans de nombreuses pathologies. Ainsi, tout comme plusieurs autres composés présentés antérieurement, elle est reliée à la dérégulation des

paramètres hémodynamiques et à la progression de la rétinopathie diabétique (Lam, Lee et al. 2003). Plus précisément, une baisse de la concentration de l'ET-1 a été démontrée dans la rétine des animaux diabétiques. Ceci peut alors favoriser une vasodilatation et une augmentation du débit sanguin rétinien, augmentant du même coup les microanévrismes et la fuite du sang à l'extérieur des vaisseaux (Lam 2001). De plus, l'ET-1 est impliquée au niveau du dysfonctionnement endothélial par son interaction avec le VEGF et la prolifération des vaisseaux (Kalani 2008). L'ET-1 serait impliquée dans le développement du glaucome (Chauhan, LeVatte et al. 2004; Goto, Oku et al. 2005; Sasaoka, Taniguchi et al. 2006). Elle pourrait ainsi participer au dysfonctionnement hémodynamique fréquemment observé lors de cette maladie et être responsable des épisodes ischémiques conduisant probablement aux dommages neuronaux.

Ainsi, même si l'effet principal de l'ET-1 peut être considéré comme étant vasoconstricteur, ce dernier peut être atténué par l'expression plus ou moins grande du récepteur ETB1 (Lam, Lee et al. 2003). Ce double rôle peut aussi expliquer, en plus des hypothèses émises précédemment (telles que la concentration ou les méthodes utilisées), la relative faiblesse de la réponse observée dans notre étude chez le rat diabétique STZ comparativement aux autres études. De plus, la réponse observée lors de l'administration intravitréenne de ce peptide semble provenir principalement de la rétine, car il a été démontré dans une étude antérieure chez le chat que la circulation choroïdienne, qui nourrit la portion postérieure de la rétine, est moins sensible à l'action de l'ET-1 (Granstam, Wang et al. 1992; Nagano, Wei et al. 2007).

Tel qu'il a été spécifié antérieurement, la régulation du débit sanguin rétinien dépend principalement des facteurs métaboliques locaux étant donné son absence d'innervation. En plus de mesurer la réponse physiologique présente dans différents types cellulaires impliqués dans la régulation du débit sanguin oculaire, le LDF peut être utilisé pour analyser l'effet de divers médiateurs impliqués dans la pathogenèse ou la régulation de la circulation oculaire.

Le LDF

Il est difficile d'évaluer avec précision la pénétration du laser à l'intérieur des tissus qui semble dépendre de plusieurs facteurs. Il importe donc d'en discuter plus en détail.

L'indice de réfraction du milieu, la longueur d'onde du laser utilisé ou la séparation entre la fibre émettrice et les fibres réceptrices sont autant d'éléments à considérer pour la pénétration du laser (Riva, Geiser et al. 2010). Sur ce dernier point, plus la distance entre ces dernières augmente, plus la colonne de tissu échantillonnée semble profonde (Fabricius, Akgoren et al. 1997). La théorie de la dispersion multiple (theory of multiple scattering) suggère, quant à elle, une profondeur de pénétration du laser équivalente à sa dispersion latérale (Stern, Lappe et al. 1977). Une analyse théorique, mise sur pied par Bonner et Nossal (Bonner and Nossal 1981), suggère une profondeur de pénétration moyenne avant de sortir du tissu et être détectée égale à $0.4 s^{1/2} m^{-1/4}$, où m est le coefficient d'absorption par unité de dispersion du tissu (absorption coefficient per unit scattering length), s est égal à r/L où L est la longueur moyenne du trajet parcouru

par un photon avant d'être réfléchi par un globule rouge et r est la distance entre le faisceau incident et le site de détection. Selon cette formule, une augmentation de r implique une augmentation de la profondeur échantillonnée (Riva 2001).

Ce qui précède semble indiquer que pour la sonde DP7a utilisée (1 mm de séparation entre la fibre émettrice et les fibres réceptrices) et son placement sur la cornée, il existe une distance de pénétration du laser relativement profonde. Par contre, cette hypothèse doit être modulée en fonction du montage expérimental utilisé. En effet, puisque la sonde est placée en contact avec la cornée et non à proximité de la zone d'intérêt comme dans plusieurs autres études, ceci peut très bien influencer la profondeur de pénétration. En effet, comme le laser doit traverser plusieurs milieux comme la cornée, la chambre antérieure, le cristallin et la chambre postérieure avant d'atteindre la rétine, tous des milieux possédant des indices de réfractions différents, ceux-ci ne peuvent qu'influencer le faisceau laser en le déviant et ainsi peut minimiser sa profondeur de pénétration.

De plus, une étude utilisant le débitmètre rétinien Heidelberg (Heidelberg retina flowmeter ou HRF), a tenté de préciser la source du signal du laser Doppler (Chauhan, Yu et al. 2006). Brièvement, cet appareil permet le balayage d'une zone par un faisceau laser (longueur d'onde 780 nm) après une mise au point sur le plan axial et permet ainsi l'obtention d'une carte de la perfusion en 2 dimensions. Ces images ont ensuite été comparées avec un angiogramme provenant du même animal afin d'en déduire anatomiquement l'origine du signal. Il a ainsi été démontré que le HRF permet de détecter les artères et les veines de même que les artérioles et veinules jusqu'au 2^{ème} et 3^{ème} ordre. Il a aussi été démontré que les

capillaires ne produisent aucun signal visible avec le HRF et qu'un bruit provenant de la choroïde est indissociable du signal HRF.

Une seconde étude effectuée avec le même type d'appareil a tenté d'élucider la proportion attribuable aux différents lits vasculaires (Yu, Townsend et al. 2005). Ainsi, il a été démontré que les artères et les veines contribuent majoritairement au signal, et ce sur une large gamme de profondeurs. De plus, la circulation choroïdienne contribue au signal obtenu avec le HRF, mais dans une part moindre que les artères et les veines. Enfin, en conformité avec l'étude précédente, les capillaires ne contribuent que très faiblement au signal total, se confondant avec le bruit de fond.

Ainsi, bien qu'on ne puisse appliquer en détail les résultats de ces études étant donné que le type d'appareillage (HRF) diffère de celui utilisé ici, nous pouvons quand même en tirer certaines conclusions qui peuvent préciser un peu l'origine du signal obtenu avec le LDF. En effet, les deux appareils sont basés sur le même principe de l'effet Doppler et utilisent tous deux un laser à diode de 780 nm. Ainsi, nous pouvons penser que la circulation choroïdienne contribue très certainement au signal obtenu avec le LDF, conclusion appuyée par les résultats obtenus suite à la photocoagulation des artères rétinienne. Par contre, nous pouvons avancer que cette proportion peut potentiellement être surévaluée étant donné la présence d'une reperfusion par les collatérales immédiatement après la procédure.

Le récepteur B₁ des kinines et le diabète

Après avoir évalué la méthode et discuté de la pénétration du faisceau laser, il était utile d'appliquer cette méthode sur un modèle pathologique qu'est le diabète.

Avant d'aborder l'implication du récepteur B₁ des kinines dans la rétinopathie diabétique, il peut être opportun de brièvement rappeler les mécanismes impliqués dans la réponse vasodilatatrice du RB₁. Ainsi, le RB₁ (tout comme le récepteur B₂), est couplé à une protéine G de la famille G_q/G_i. Par contre, contrairement à son homologue RB₂ (qui, lors de son activation, ne mobilise que le calcium intracellulaire), l'activation du RB₁ produit une hausse du calcium intracellulaire provoquée autant par la libération de calcium intracellulaire des réserves sensibles et insensibles à l'inositol triphosphate (IP₃) que par un influx de calcium extracellulaire. Cette hausse du calcium intracellulaire provoque alors une libération de prostacycline (PGI₂) via l'activation de la cyclo-oxygénase-2, ainsi qu'une libération de NO pour produire une vasodilatation. Cette double activation par le RB₁ est donc plus complexe que celle provoquée par l'activation du RB₂ et potentiellement de plus forte amplitude (Abdouh, Khanjari et al. 2003).

Étant donné la nature de la rétinopathie diabétique et les différents stades qui interviennent tout au long de son évolution, il était nécessaire d'obtenir des résultats à différentes étapes de la maladie. C'est pourquoi un premier bloc de données a été obtenu au début du diabète, soit à 4 jours post-induction, nous situant alors pendant la période de la rétinopathie non proliférative. Un deuxième

bloc a ensuite été obtenu plus tardivement à 6 semaines post-induction. À cette époque, les dommages dus à l'hyperglycémie sont réputés être bien établis, situant probablement l'évolution de la maladie au stade de la rétinopathie proliférative. Tel qu'il a été discuté plus tôt, chaque stade est caractérisé par des manifestations physiologiques et pathologiques bien distinctes et le débit sanguin qui y prévaut semble lui aussi caractéristique de ces stades de la maladie. En effet, les manifestations observées chez les diabétiques sont grandement reliées au taux de glucose dans le sang et à la durée de cette hyperglycémie. Ainsi, il a été démontré qu'une longue exposition à des concentrations élevées de glucose augmente le stress oxydatif et les dommages cellulaires. Ces dommages augmenteront à leur tour la formation de kinines comme la bradykinine (Rothschild, Melo et al. 1999).

Tel qu'il a été expliqué plus haut, très peu d'études ont été effectuées sur l'implication des kinines dans la régulation du débit rétinien. Par contre, une certaine analogie est possible entre la circulation cérébrale et rétinienne. En effet, hormis le nombre réduit de péricytes, la microvasculature du cerveau possède une composition semblable à celle de la rétine, incluant des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des péricytes. Par contre, la microvasculature du cerveau semble moins affectée que celle de la rétine lors d'une glycémie non contrôlée (McCall 2004).

Ainsi, la littérature démontre une hausse du récepteur B_1 des kinines dans certaines régions du cerveau de rats diabétiques. Cette augmentation de la transcription survient dès les jours 2 à 7 suivant l'induction du diabète. Par contre, la radioliation avec le ligand ne se produit qu'au jour 7 suivant l'induction. Cette

observation a été expliquée par le délai requis pour le transport de ces récepteurs du corps cellulaire où il est produit à la membrane de son axone terminal ou des dendrites. Cette hausse du récepteur B₁ semble être attribuable à l'activation de la voie NF-κB suite au stress oxydatif induit par l'hyperglycémie (Campos, Ongali et al. 2005). De façon similaire, la littérature a bien établi la présence grandissante du récepteur B₁, dans la rétine, entre 4 et 21 jours suivant le début de l'induction du diabète (Abdouh, Khanjari et al. 2003; Abdouh, Talbot et al. 2008).

Il importe de préciser que l'augmentation du débit sanguin *in vivo* obtenue avec l'agoniste du RB₁ reproduit sensiblement la vasodilatation *in vitro* observée sur les microvaisseaux isolés provenant de rétines de rats STZ de 4, 7 et 21 jours (Abdouh, Khanjari et al. 2003). De plus, la vasodilatation obtenue suite à l'injection de l'agoniste du RB₁ est d'une amplitude semblable à celle induite par l'adénosine, l'hypercapnie et le nitroprusside de sodium.

Étant donné ce qui précède, il est peu étonnant de constater que les résultats tendent à démontrer une implication du récepteur B₁ dans la régulation du débit sanguin dès le début du développement de la rétinopathie diabétique. En effet, dans un stade précoce de diabète, où l'on observe, selon la littérature, une baisse du débit sanguin, le récepteur B₁ pourrait apporter un effet protecteur, en concurrençant les facteurs vasoconstricteurs, et ainsi permettre de maintenir à un niveau plus ou moins normal le débit sanguin afin de prévenir la formation de zones hypoxiques dans la rétine.

De façon similaire, la présence du récepteur B₁ à 6 semaines de diabète était tout aussi prévisible étant donné que les dommages causés par l'hyperglycémie sont déjà bien établis.

Par contre, ce qui est plus surprenant, est l'amplitude de cette augmentation. En effet, aucune différence significative ne peut être établie entre les groupes diabétiques à 4 jours et 6 semaines. Ceci signifie probablement que l'ensemble des récepteurs B₁ est déjà exprimé et fonctionnel dès les premiers temps suivant l'induction du diabète. On aurait attendu une vasodilatation plus faible à l'injection intravitréenne de l'agoniste B₁ pour le groupe diabétique 4 jours comparativement au groupe 6 semaines. Par contre, il peut être mal aisé de comparer, étant donné notre protocole, l'amplitude de la réponse vasculaire observée et d'en déduire des conclusions directement applicables en conditions physiologiques.

De plus, vouloir caractériser le stade de la maladie à 4 jours et 6 semaines suivant l'induction du diabète peut constituer, en soi, un exercice délicat. Bien qu'en général l'on constate, lors des premiers stades de diabète, une baisse du débit sanguin rétinien à la suite d'une vasoconstriction de la microcirculation rétinienne, une hausse du débit sanguin est observée par la suite (entre autres par la diminution de l'ET-1) (Properzi, Terenghi et al. 1995) ou par la hausse des facteurs favorisant la vasodilatation tel que la prostacycline. Cette période de transition entre baisse et hausse du débit sanguin rétinien ne semble pas être définie clairement dans la littérature. De plus, des résultats contradictoires ont été obtenus sur la mesure du débit sanguin rétinien chez des sujets diabétiques avec

ou sans rétinopathie diabétique non proliférative (Hammer, Vilser et al. 2009). En effet, lorsque comparés au groupe témoin, certaines études ont démontré un débit sanguin plus élevé (Yoshida, Feke et al. 1983; Grunwald, Riva et al. 1992; Patel, Rassam et al. 1992; Grunwald, DuPont et al. 1996), réduit (Bursell, Clermont et al. 1996; Clermont, Aiello et al. 1997) ou aucun changement (Guan, Hudson et al. 2006; Gilmore, Hudson et al. 2007). Étant donné cette incertitude, il peut être périlleux de comparer une réponse physiologique après un diabète de 4 jours, qui n'est peut-être pas suffisamment long pour induire un stade avancé de rétinopathie diabétique non proliférative, et un diabète de 6 semaines.

Enfin, l'étude s'est déroulée sur un modèle *in vivo*. Bien que cette manière de procéder soit le plus près de la réalité, et que les paramètres physiologiques des rats lors de l'expérience aient été le plus possible contrôlés, il est impossible de faire abstraction des autres mécanismes physiologiques qui affectent aussi le débit sanguin comme la présence d'agents vasoconstricteurs. La nature évolutive de la rétinopathie diabétique et l'implication d'une multitude de facteurs qui influencent le débit sanguin tout au long de cette évolution, facteurs que nous ne pouvons exclure de nos résultats, rendent difficile la comparaison entre les deux stades.

En effet, le système kallibréine-kinine est complexe et interagit sur plusieurs niveaux avec le système rénine-angiotensine. Plusieurs facteurs favorisant la vasoconstriction ou la vasodilatation agissent donc de façon concurrente. D'ailleurs, le système rénine-angiotensine a lui aussi été prouvé comme étant impliqué dans la rétinopathie diabétique (Wilkinson-Berka 2004).

Ainsi, l'angiotensine II influence une grande variété d'effets physiologiques tels que la rétention d'eau ou de sel ou la régulation de la pression artérielle. Ce système agit lui-même souvent de façon contradictoire. Le récepteur AT1 soutient la plupart des effets de l'angiotensine, incluant la vasoconstriction, l'homéostasie des électrolytes ou le comportement de la soif. Ceux-ci sont présents, entre autres, dans les différents vaisseaux, le cerveau ou l'œil (Wilkinson-Berka 2004). Par contre, le récepteur AT2, bien que moins important, possède des effets qui s'opposent souvent au premier en induisant, entre autres, une vasodilatation. La présence de ces derniers récepteurs a d'ailleurs été mise en évidence dans la rétine (Wheeler-Schilling, Kohler et al. 1999) et le cerveau.

Comme on peut le constater, plusieurs mécanismes interdépendants et possédant des effets souvent antagonistes régissent la vasculature de la rétine et du cerveau et par conséquent le débit sanguin observé dans ces organes. Le modèle utilisé ne nous permettant pas de faire abstraction de ces autres mécanismes, la vasodilatation induite par l'agoniste du récepteur B₁ a pu entrer en concurrence avec ces derniers et masquer leur effet.

Pour terminer, comme il a été démontré plus tôt, il nous est impossible, étant donné les limites du LDF, d'exclure une contamination par la circulation choroïdienne qui peut masquer la véritable ampleur de la réponse.

Les avantages de la technique du LDF

Bien sûr, malgré les désavantages explicités plus haut inhérents à notre technique, tels que l'absence de valeur absolue et les imprécisions concernant le

ou les lit(s) vasculaires échantillonnés (rétine et/ou choroïde), cette dernière ne prétend pas se substituer aux autres techniques déjà disponibles pour l'étude du débit sanguin oculaire. En effet, les autres techniques couramment utilisées, telles que la technique d'autoradiographie ou d'injection de microsphères ont plusieurs avantages, principalement de procurer une valeur absolue de débit sanguin et de permettre un degré de régionalisation raisonnable. Par contre, elles comportent aussi des désavantages indéniables résidant principalement dans leur nature invasive et étant d'exécution complexe.

Bien que la technique du LDF ne nous permette pas, contrairement aux méthodes citées plus haut, d'obtenir des valeurs absolues de débit sanguin, elle apporte quand même plusieurs informations importantes. En effet le LDF, tel qu'utilisé ici, permet indéniablement une évaluation d'une réponse spécifique après l'administration de diverses substances pharmacologiques. En plus de fournir des valeurs de débit sanguin en continu et en temps réel, le LDF permet, de surcroît, une analyse rapide, simple et surtout non invasive, qualités non négligeables pour la recherche en science de la vision ou en ophtalmologie. En effet, l'appareil de LDF et ses accessoires sont relativement compacts et facilement transportables. Lorsque combiné à une méthode expérimentale non invasive, comme celle développée dans la présente étude, il devient un outil de choix dans l'analyse du débit sanguin oculaire.

De plus, cette technique atteint son plein potentiel lorsqu'elle est utilisée en combinaison avec une autre méthode; les inconvénients de l'une devenant les forces de l'autre, et les informations impossibles à obtenir dans une circonstance

le devenant dans l'autre. Cette combinaison a d'ailleurs été récemment utilisée dans notre laboratoire, permettant de mettre plus en lumière le rôle du récepteur B₁ dans le diabète (Pouliot, Héту et al. 2010 *Soumis*). Les résultats obtenus avec le LDF montrés dans le présent travail, ont été combinés avec l'étude du débit sanguin rétinien par autoradiographie au [C¹⁴]-IMP. L'administration orale d'un antagoniste du récepteur B₁ a alors démontré une baisse significative du débit sanguin rétinien chez des rats diabétiques de 4 jours, mais aucune baisse supplémentaire n'était observable chez le groupe diabétique de 6 semaines. Ces résultats tendent à démontrer que les récepteurs B₁ sont activés par les kinines endogènes chez les rats STZ à 4 jours et qu'ils auraient un effet protecteur dans le maintien de la microcirculation rétinienne lors des premiers stades du diabète, mais que cet effet ne dure pas lors des stades plus avancés.

Comme nous avons pu le constater, le développement d'une technique utilisant l'effet Doppler qui serait en mesure de discriminer la circulation rétinienne de la circulation choroïdienne apporterait un avantage certain pour l'étude de la circulation oculaire dans les sciences de la vision. Par contre, bien qu'une telle percée doterait la science d'une nouvelle méthode quasi parfaite de par sa précision et sa nature non invasive, la venue d'une telle technique reste hypothétique et se fait toujours attendre. Entre-temps, la méthode développée ici peut donc être utilisée pour évaluer de façon répétée les réponses du débit sanguin pendant des modifications métaboliques ou pharmacologiques dans des modèles animaux de maladies oculaires.

CONCLUSION

La méthode de LDF développée ici a réussi à démontrer sa sensibilité après l'injection intra-vitréenne de divers composés pharmacologiques et à procurer des variations semi-quantitatives du débit sanguin oculaire. De plus, il a été démontré qu'une partie non négligeable du signal LDF est attribuable à la circulation choroïdienne, sans qu'il soit possible de réellement discriminer la circulation rétinienne de cette dernière.

Par contre, malgré ces quelques désavantages, le LDF reste une méthode simple pour l'analyse de la circulation oculaire. Cet appareil peut être utilisé, tel que démontré dans le présent document, en suivant une approche expérimentale non-invasive afin de conserver le plus possible l'homéostasie interne de l'œil.

Suite à ces résultats, il devenait utile d'appliquer cette technique à des questions plus cliniques. L'implication du récepteur B_1 des kinines lors du diabète s'est alors posé. Ainsi, les résultats obtenus après l'injection intra-vitréenne d'agoniste B_1 démontrent clairement la présence de ce récepteur dès les premiers stades du diabète et cette présence semble se maintenir tout au long de la maladie. La présence de ce récepteur du système kallibréine-kinines peut ainsi constituer une cible thérapeutique intéressante. Par contre, une compréhension plus approfondie de ce système et de ses différentes implications est nécessaire avant d'aboutir à de telles thérapies. Il est de plus difficile d'appliquer directement les découvertes obtenues chez le rat, car ce dernier ne démontre pas les signes pathologiques associés à la rétinopathie diabétique identiques à ceux observés chez l'humain.

BIBLIOGRAPHIE

Abdouh, M., A. Khanjari, et al. (2003). "Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat." Br J Pharmacol **140**(1): 33-40.

Abdouh, M., S. Talbot, et al. (2008). "Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors." Br J Pharmacol **154**(1): 136-143.

Alder, V. A., E. N. Su, et al. (1997). "Diabetic retinopathy: early functional changes." Clin Exp Pharmacol Physiol **24**(9-10): 785-788.

Alonso, D. and M. W. Radomski (2003). "The nitric oxide-endothelin-1 connection." Heart Fail Rev **8**(1): 107-115.

Association canadienne du diabète (2007). "Ce qu'on devrait savoir." [en ligne]; disponible au site : http://www.diabetes.ca/section_main/francais.asp. (Consulté le 14 juillet 2010).

Barfod, C., N. Akgoren, et al. (1997). "Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation." Acta Physiol Scand **160**(2): 123-132.

Bascands, J. L., J. P. Schanstra, et al. (2003). "[Bradykinin receptors: towards new pathophysiological roles]." Med Sci (Paris) **19**(11): 1093-1100.

Benedeck, G. B. (1969). "Optical mixing spectroscopy, with applications to problems in physics, chemistry, biology and engineering." In : French Physical Society (eds.) *Polarisation, Matière et Rayonnement*, volume jubilaire en l'honneur d'Alfred Kastler. Presses universitaire de France, Paris 1969 : 49-84.

Ben-Nun, J., V. A. Alder, et al. (2000). "The effects of induced acute hyperglycemia in the cat on the retinal capillary blood flow." Ophthalmic Res **32**(4): 143-150.

Bhoola, K. D., C. D. Figueroa, et al. (1992). "Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases." Pharmacol Rev **44**(1): 1-80.

Bill, A. and S. F. Nilsson (1985). "Control of ocular blood flow." J Cardiovasc Pharmacol **7 Suppl 3**: S96-102.

Blazynski, C. and M. T. Perez (1991). "Adenosine in vertebrate retina: localization, receptor characterization, and function." Cell Mol Neurobiol **11**(5): 463-484.

Bonner, R. and R. Nossal (1981). "Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue." Appl Opt **20**(12): 2097-2107.

Braas, K. M., M. A. Zarbin, et al. (1987). "Endogenous adenosine and adenosine receptors localized to ganglion cells of the retina." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(11): 3906-3910.

Braunagel, S. C., J. G. Xiao, et al. (1988). "The potential role of adenosine in regulating blood flow in the eye." J Ocul Pharmacol **4**(1): 61-73.

Brownlee, M. (2001). "Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications." Nature **414**(6865): 813-820.

Buerk, D. G., D. N. Atochin, et al. (1998). "Simultaneous tissue PO₂, nitric oxide, and laser Doppler blood flow measurements during neuronal activation of optic nerve." Adv Exp Med Biol **454**: 159-164.

Buerk, D. G. and C. E. Riva (2002). "Adenosine enhances functional activation of blood flow in cat optic nerve head during photic stimulation independently from nitric oxide." Microvasc Res **64**(2): 254-264.

Bursell, S. E., A. C. Clermont, et al. (1996). "Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(5): 886-897.

Campos, M. M., B. Ongali, et al. (2005). "Expression and distribution of kinin B1 receptor in the rat brain and alterations induced by diabetes in the model of streptozotocin." Synapse **57**(1): 29-37.

Cecil, R.L., L. Goldman et al. (2008). "Cecil medicine." 23rd edition, Saunders Elsevier, 3078 pages.

Chakravarthy, U., T. A. Gardiner, et al. (1992). "The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte." Microvasc Res **43**(3): 241-254.

Chakravarthy, U., A. W. Stitt, et al. (1995). "Nitric oxide synthase activity and expression in retinal capillary endothelial cells and pericytes." Curr Eye Res **14**(4): 285-294.

Chauhan, B. C., T. L. LeVatte, et al. (2004). "Model of endothelin-1-induced chronic optic neuropathy in rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(1): 144-152.

Chauhan, B. C., P. K. Yu, et al. (2006). "Confocal scanning laser Doppler flowmetry in the rat retina: origin of flow signals and dependence on scan depth." Arch Ophthalmol **124**(3): 397-402.

Chemtob, S., K. Beharry, et al. (1991). "Ibuprofen enhances retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn piglets." Invest Ophthalmol Vis Sci **32**(6): 1799-1807.

Cioffi, G. A. and A. Alm (2001). "Measurement of ocular blood flow." J Glaucoma **10**(5 Suppl 1): S62-64.

Clermont, A. C., L. P. Aiello, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor and severity of nonproliferative diabetic retinopathy mediate retinal hemodynamics in vivo: a potential role for vascular endothelial growth factor in the progression of nonproliferative diabetic retinopathy." Am J Ophthalmol **124**(4): 433-446.

Clermont, A. C. and S. E. Bursell (2007). "Retinal blood flow in diabetes." Microcirculation **14**(1): 49-61.

Couture, R. and J. P. Girolami (2004). "Putative roles of kinin receptors in the therapeutic effects of angiotensin 1-converting enzyme inhibitors in diabetes mellitus." Eur J Pharmacol **500**(1-3): 467-485.

Dauphin, F., P. Lacombe, et al. (1991). "Hypercapnia and stimulation of the substantia innominata increase rat frontal cortical blood flow by different cholinergic mechanisms." Brain Res **553**(1): 75-83.

de Jong, J. W., R. de Jonge, et al. (2000). "The role of adenosine in preconditioning." Pharmacol Ther **87**(2-3): 141-149.

De La Cruz, J. P., J. A. Gonzalez-Correa, et al. (2004). "Pharmacological approach to diabetic retinopathy." Diabetes Metab Res Rev **20**(2): 91-113.

Delaey, C. and J. Van de Voorde (1998). "Retinal arterial tone is controlled by a retinal-derived relaxing factor." Circ Res **83**(7): 714-720.

Delaey, C. and J. Van De Voorde (2000). "Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation." Ophthalmic Res **32**(6): 249-256.

Denis, P. and P. P. Elena (1989). "[Retinal vascular beta-adrenergic receptors in man]." Ophthalmologie **3**(1): 62-64.

do Carmo, A., C. Lopes, et al. (1998). "Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats." Gen Pharmacol **30**(3): 319-324.

Dorner, G. T., G. Garhofer, et al. (2002). "Response of retinal blood flow to CO₂-breathing in humans." Eur J Ophthalmol **12**(6): 459-466.

Dorner, G. T., G. Garhofer, et al. (2003). "Nitric oxide regulates retinal vascular tone in humans." Am J Physiol Heart Circ Physiol **285**(2): H631-636.

Dragunow, M. and R. L. Faull (1988). "Neuroprotective effects of adenosine." Trends Pharmacol Sci **9**(6): 193-194.

Drance, S. M., V. P. Sweeney, et al. (1973). "Studies of factors involved in the production of low tension glaucoma." Arch Ophthalmol **89**(6): 457-465.

Duong, T. Q., M. T. Pardue, et al. (2008). "Layer-specific anatomical, physiological and functional MRI of the retina." NMR Biomed **21**(9): 978-996.

Fabricius, M., N. Akgoren, et al. (1997). "Laminar analysis of cerebral blood flow in cortex of rats by laser-Doppler flowmetry: a pilot study." J Cereb Blood Flow Metab **17**(12): 1326-1336.

Feke, G. T. (2006). "Laser Doppler instrumentation for the measurement of retinal blood flow: theory and practice." Bull Soc Belge Ophtalmol(302): 171-184.

Feldman, E. L. (2003). "Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem." J Clin Invest **111**(4): 431-433.

Ferrari-Dileo, G., E. B. Davis, et al. (1987). "Angiotensin binding sites in bovine and human retinal blood vessels." Invest Ophthalmol Vis Sci **28**(11): 1747-1751.

Fiscus, R. R. (1988). "Molecular mechanisms of endothelium-mediated vasodilation." Semin Thromb Hemost **14 Suppl**: 12-22.

Flammer, J. and M. Mozaffarieh (2008). "Autoregulation, a balancing act between supply and demand." Can J Ophthalmol **43**(3): 317-321.

Flammer, J., S. Orgul, et al. (2002). "The impact of ocular blood flow in glaucoma." Prog Retin Eye Res **21**(4): 359-393.

Foreman, D. M., S. Bagley, et al. (1996). "Three dimensional analysis of the retinal vasculature using immunofluorescent staining and confocal laser scanning microscopy." Br J Ophthalmol **80**(3): 246-251.

Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, et al. (1994). "Nomenclature and classification of purinoceptors." Pharmacol Rev **46**(2): 143-156.

Funk, R. H. (1997). "Blood supply of the retina." Ophthalmic Res **29**(5): 320-325.

Gao, B. B., A. Clermont, et al. (2007). "Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation." Nat Med **13**(2): 181-188.

Gardner, T. W. and D. A. Antonetti (2007). "A prize catch for diabetic retinopathy." Nat Med **13**(2): 131-132.

Ghiardi, G. J., J. M. Gidday, et al. (1999). "The purine nucleoside adenosine in retinal ischemia-reperfusion injury." Vision Res **39**(15): 2519-2535.

Gidday, J. M., R. G. Maceren, et al. (1996). "KATP channels mediate adenosine-induced hyperemia in retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(13): 2624-2633.

Gidday, J. M. and T. S. Park (1993). "Microcirculatory responses to adenosine in the newborn pig retina." Pediatr Res **33**(6): 620-627.

Gilbert, R. E., D. J. Kelly, et al. (2000). "Angiotensin converting enzyme inhibition reduces retinal overexpression of vascular endothelial growth factor and hyperpermeability in experimental diabetes." Diabetologia **43**(11): 1360-1367.

Gilmore, E. D., C. Hudson, et al. (2007). "Retinal arteriolar diameter, blood velocity, and blood flow response to an isocapnic hyperoxic provocation in early sight-threatening diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(4): 1744-1750.

Goto, W., H. Oku, et al. (2005). "Amelioration of endothelin-1-induced optic nerve head ischemia by topical bunazosin." Curr Eye Res **30**(2): 81-91.

Granstam, E., L. Wang, et al. (1992). "Ocular effects of endothelin-1 in the cat." Curr Eye Res **11**(4): 325-332.

Grieshaber, M. C. and J. Flammer (2005). "Blood flow in glaucoma." Curr Opin Ophthalmol **16**(2): 79-83.

Grieshaber, M. C., M. Mozaffarieh, et al. (2007). "What is the link between vascular dysregulation and glaucoma?" Surv Ophthalmol **52 Suppl 2**: S144-154.

Grunwald, J. E., J. DuPont, et al. (1996). "Retinal haemodynamics in patients with early diabetes mellitus." Br J Ophthalmol **80**(4): 327-331.

Grunwald, J. E., C. E. Riva, et al. (1992). "Total retinal volumetric blood flow rate in diabetic patients with poor glycemic control." Invest Ophthalmol Vis Sci **33**(2): 356-363.

Guan, K., C. Hudson, et al. (2006). "Retinal hemodynamics in early diabetic macular edema." Diabetes **55**(3): 813-818.

Haefliger, I. O., Q. Chen, et al. (1997). "Effect of oxygen on relaxation of retinal pericytes by sodium nitroprusside." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **235**(6): 388-392.

Haefliger, I. O., J. Flammer, et al. (2001). "Endothelium-dependent vasoactive modulation in the ophthalmic circulation." Prog Retin Eye Res **20**(2): 209-225.

Haefliger, I. O., P. Meyer, et al. (1994). "The vascular endothelium as a regulator of the ocular circulation: a new concept in ophthalmology?" Surv Ophthalmol **39**(2): 123-132.

Haefliger, I. O., A. Zschauer, et al. (1994). "Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(3): 991-997.

Hammer, M., W. Vilser, et al. (2009). "Diabetic patients with retinopathy show increased retinal venous oxygen saturation." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **247**(8): 1025-1030.

Hardy, P., A. M. Nuyt, et al. (1996). "Nitric oxide in retinal and choroidal blood flow autoregulation in newborn pigs: interactions with prostaglandins." Pediatr Res **39**(3): 487-493.

Harris, A., O. Arend, et al. (1995). "CO₂ dependence of retinal arterial and capillary blood velocity." Acta Ophthalmol Scand **73**(5): 421-424.

Harris, A., T. A. Ciulla, et al. (1998). "Regulation of retinal and optic nerve blood flow." Arch Ophthalmol **116**(11): 1491-1495.

Harrison, D. K., S. Birkenhake, et al. (1990). "Local oxygen supply and blood flow regulation in contracting muscle in dogs and rabbits." J Physiol **422**: 227-243.

Hatcher, H. C., J. X. Ma, et al. (1997). "Kallikrein-binding protein levels are reduced in the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(3): 658-664.

Hein, T. W., R. H. Rosa, Jr., et al. (2010). "Divergent roles of nitric oxide and rho kinase in vasomotor regulation of human retinal arterioles." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(3): 1583-1590.

Hein, T. W., W. Xu, et al. (2006). "Dilation of retinal arterioles in response to lactate: role of nitric oxide, guanylyl cyclase, and ATP-sensitive potassium channels." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(2): 693-699.

Hein, T. W., Z. Yuan, et al. (2005). "Requisite roles of A2A receptors, nitric oxide, and KATP channels in retinal arteriolar dilation in response to adenosine." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(6): 2113-2119.

Hirao, M., H. Oku, et al. (2004). "Effects of adenosine on optic nerve head circulation in rabbits." Exp Eye Res **79**(5): 729-735.

Hirata, Y., T. Emori, et al. (1993). "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." J Clin Invest **91**(4): 1367-1373.

Hotta, H., H. Ito, et al. (1998). "Cilostazol, a selective cAMP phosphodiesterase inhibitor, dilates retinal arterioles and increases retinal and choroidal blood flow in rats." Eur J Pharmacol **344**(1): 49-52.

Huber, K. K., H. Adams, et al. (2006). "Retrolbulbar haemodynamics and contrast sensitivity improvements after CO2 breathing." Acta Ophthalmol Scand **84**(4): 481-487.

Hudes, G. R., W. Y. Li, et al. (1988). "Prostacyclin is the major prostaglandin synthesized by bovine retinal capillary pericytes in culture." Invest Ophthalmol Vis Sci **29**(10): 1511-1516.

Ichikawa, M., Y. Okada, et al. (2004). "Effects of topically instilled bunazosin, an alpha1-adrenoceptor antagonist, on constrictions induced by phenylephrine and ET-1 in rabbit retinal arteries." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(11): 4041-4048.

Inoue, A., M. Yanagisawa, et al. (1989). "The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(8): 2863-2867.

Ishizaki, E., M. Fukumoto, et al. (2009). "Functional K(ATP) channels in the rat retinal microvasculature: topographical distribution, redox regulation, spermine modulation and diabetic alteration." J Physiol **587**(Pt 10): 2233-2253.

Izumi, N., T. Nagaoka, et al. (2008). "Role of nitric oxide in regulation of retinal blood flow in response to hyperoxia in cats." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(10): 4595-4603.

Jeppesen, P., C. Aalkjaer, et al. (2002). "Adenosine relaxation in small retinal arterioles requires functional Na-K pumps and K(ATP) channels." Curr Eye Res **25**(1): 23-28.

Kalani, M. (2008). "The importance of endothelin-1 for microvascular dysfunction in diabetes." Vasc Health Risk Manag **4**(5): 1061-1068.

- Kaufman, P. L., A. Alm, et al. (2003). "Adler's physiology of the eye." 10th edition, Mosby, 876 p.
- Kawamura, H., H. Oku, et al. (2002). "Endothelin-induced changes in the physiology of retinal pericytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **43**(3): 882-888.
- Kiel, J. W. (2000). "Endothelin modulation of choroidal blood flow in the rabbit." Exp Eye Res **71**(6): 543-550.
- Kiel, J. W. and W. A. van Heuven (1995). "Ocular perfusion pressure and choroidal blood flow in the rabbit." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(3): 579-585.
- King, G. L., T. Shiba, et al. (1994). "Cellular and molecular abnormalities in the vascular endothelium of diabetes mellitus." Annu Rev Med **45**: 179-188.
- Kiss, B., E. Polska, et al. (2002). "Retinal blood flow during hyperoxia in humans revisited: concerted results using different measurement techniques." Microvasc Res **64**(1): 75-85.
- Koss, M. C. (1999). "Functional role of nitric oxide in regulation of ocular blood flow." Eur J Pharmacol **374**(2): 161-174.
- Kowluru, R. A. and P. S. Chan (2007). "Oxidative stress and diabetic retinopathy." Exp Diabetes Res **2007**: 43603.
- Kuo, L., M. J. Davis, et al. (1992). "Endothelial modulation of the arteriolar tone." Int. Union Physiol./Am. Physiol. (7) : 5-9.
- Kvanta, A., S. Seregard, et al. (1997). "Localization of adenosine receptor messenger RNAs in the rat eye." Exp Eye Res **65**(5): 595-602.
- Lam, A. K., S. T. Chan, et al. (2003). "The effect of age on ocular blood supply determined by pulsatile ocular blood flow and color Doppler ultrasonography." Optom Vis Sci **80**(4): 305-311.
- Lam, H. C. (2001). "Role of endothelin in diabetic vascular complications." Endocrine **14**(3): 277-284.
- Lam, H. C., J. K. Lee, et al. (2003). "Role of endothelin in diabetic retinopathy." Curr Vasc Pharmacol **1**(3): 243-250.
- Lansman, J. B., T. J. Hallam, et al. (1987). "Single stretch-activated ion channels in vascular endothelial cells as mechanotransducers?" Nature **325**(6107): 811-813.
- Larsen, A. K. and N. N. Osborne (1996). "Involvement of adenosine in retinal ischemia. Studies on the rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **37**(13): 2603-2611.

Li, Q. and D. G. Puro (2001). "Adenosine activates ATP-sensitive K(+) currents in pericytes of rat retinal microvessels: role of A1 and A2a receptors." Brain Res **907**(1-2): 93-99.

Lietz, A., P. Hendrickson, et al. (1998). "Effect of carbogen, oxygen and intraocular pressure on Heidelberg retina flowmeter parameter 'flow' measured at the papilla." Ophthalmologica **212**(3): 149-152.

Lim, S. K., H. J. Han, et al. (2009). "Both B1R and B2R act as intermediate signaling molecules in high glucose-induced stimulation of glutamate uptake in ARPE cells." J Cell Physiol **221**(3): 677-687.

Lipowsky, H. H., S. Kovalcheck, et al. (1978). "The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery." Circ Res **43**(5): 738-749.

Ma, J. X., Q. Song, et al. (1996). "Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues." Exp Eye Res **63**(1): 19-26.

Macaluso, C., L. J. Frishman, et al. (2003). "Multiple effects of adenosine in the arterially perfused mammalian eye. Possible mechanisms for the neuroprotective function of adenosine in the retina." Doc Ophthalmol **106**(1): 51-59.

MacCumber, M. W., H. D. Jampel, et al. (1991). "Ocular effects of the endothelins. Abundant peptides in the eye." Arch Ophthalmol **109**(5): 705-709.

Maenhaut, N., K. Boussery, et al. (2009). "Adenosine enhances the relaxing influence of retinal tissue." Exp Eye Res **88**(1): 71-78.

Mathers, C. D., C. Bernard, et al. (2003). "Burden of Diseases in 2002: data sources, methods and results." Global Program on Evidence for Health Policy, Discussion Paper no. 54, Genève: Organisation mondiale de la santé, décembre 2003 (révisé en février 2004).

Matsugi, T., Q. Chen, et al. (1997). "Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(13): 2695-2701.

McCall, A. L. (2004). "Cerebral glucose metabolism in diabetes mellitus." Eur J Pharmacol **490**(1-3): 147-158.

McDonald, D. M., J. R. Bailie, et al. (1995). "Characterization of endothelin A (ETA) and endothelin B (ETB) receptors in cultured bovine retinal pericytes." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(6): 1088-1094.

Meadows, G. E., H. M. Dunroy, et al. (2003). "Hypercapnic cerebral vascular reactivity is decreased, in humans, during sleep compared with wakefulness." J Appl Physiol **94**(6): 2197-2202.

Metea, M. R. and E. A. Newman (2007). "Signalling within the neurovascular unit in the mammalian retina." Exp Physiol **92**(4): 635-640.

Meyer, P., C. Champion, et al. (1999). "Localization of nitric oxide synthase isoforms in porcine ocular tissues." Curr Eye Res **18**(5): 375-380.

Miller, J. W., A. P. Adamis, et al. (1997). "Vascular endothelial growth factor in ocular neovascularization and proliferative diabetic retinopathy." Diabetes Metab Rev **13**(1): 37-50.

Moncada, S. and E. A. Higgs (2006). "Nitric oxide and the vascular endothelium." Handb Exp Pharmacol(176 Pt 1): 213-254.

Mordenti, J., R. A. Cuthbertson, et al. (1999). "Comparisons of the intraocular tissue distribution, pharmacokinetics, and safety of 125I-labeled full-length and Fab antibodies in rhesus monkeys following intravitreal administration." Toxicol Pathol **27**(5): 536-544.

Mori, A., M. Saito, et al. (2007). "Intravenously administered vasodilatory prostaglandins increase retinal and choroidal blood flow in rats." J Pharmacol Sci **103**(1): 103-112.

Murata, M., M. Nakagawa, et al. (1998). "Selective expression of endothelin 1 mRNA in rat retina." Ophthalmologica **212**(5): 331-333.

Nagano, H., P. Z. Wei, et al. (2007). "Effects of kallidinogenase on ischemic changes induced by repeated intravitreal injections of endothelin-1 in rabbit retina." Curr Eye Res **32**(2): 113-122.

Neylon, C. B. (1999). "Vascular biology of endothelin signal transduction." Clin Exp Pharmacol Physiol **26**(2): 149-153.

Nicolela, M. T., P. Hnik, et al. (1996). "Scanning laser Doppler flowmeter study of retinal and optic disk blood flow in glaucomatous patients." Am J Ophthalmol **122**(6): 775-783.

Noack, E. and M. Feelisch (1991). "Molecular mechanisms of nitrovasodilator bioactivation." Basic Res Cardiol **86 Suppl 2**: 37-50.

Nyce, J. W. (1999). "Insight into adenosine receptor function using antisense and gene-knockout approaches." Trends Pharmacol Sci **20**(2): 79-83.

Ogawa, N., A. Mori, et al. (2009). "Nitric oxide dilates rat retinal blood vessels by cyclooxygenase-dependent mechanisms." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **297**(4): R968-977.

Organisation mondiale de la santé, (1999). "Definition, Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus and its Complications." Rapport d'une consultation de l'OMS, WHO/NCD/NCS/99.2.

Orgul, S., K. Gugleta, et al. (1999). "Physiology of perfusion as it relates to the optic nerve head." Surv Ophthalmol **43 Suppl 1**: S17-26.

Ortega Mateo, A. and A. Amaya Aleixandre de (2000). "Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects." Pharmacol Res **42**(5): 421-427.

Oxhorn, B. C., D. J. Cheek, et al. (2000). "Role of nucleotides and nucleosides in the regulation of cardiac blood flow." AACN Clin Issues **11**(2): 241-251.

Paques, M., R. Tadayoni, et al. (2003). "Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(11): 4960-4967.

Patel, V., S. Rassam, et al. (1992). "Retinal blood flow in diabetic retinopathy." BMJ **305**(6855): 678-683.

Patton, N., T. Aslam, et al. (2005). "Retinal vascular image analysis as a potential screening tool for cerebrovascular disease: a rationale based on homology between cerebral and retinal microvasculatures." J Anat **206**(4): 319-348.

Pemp, B. and L. Schmetterer (2008). "Ocular blood flow in diabetes and age-related macular degeneration." Can J Ophthalmol **43**(3): 295-301.

Phillis, J. W. (1989). "Adenosine in the control of the cerebral circulation." Cerebrovasc Brain Metab Rev **1**(1): 26-54.

Phipps, J. A. and E. P. Feener (2008). "The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney." Kidney Int **73**(10): 1114-1119.

Polska, E., P. Ehrlich, et al. (2003). "Effects of adenosine on intraocular pressure, optic nerve head blood flow, and choroidal blood flow in healthy humans." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(7): 3110-3114.

Portellos, M., C. E. Riva, et al. (1995). "Effects of adenosine on ocular blood flow." Invest Ophthalmol Vis Sci **36**(9): 1904-1909.

Pouliot, M., Deschenes, M.C., et al. (2009). Quantitative and regional measurement of retinal blood flow in rats using N-isopropyl-p-[14C]-iodoamphetamine ([14C]-IMP). Exp Eye Res **89**: 960-966.

Pouliot, M., Héту, S., et al. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B1 receptor in Streptozotocin-diabetic rats. Exp Eye Res **92**: 482-489.

Pournaras, C., M. Tsacopoulos, et al. (1978). "Studies on the role of prostaglandins in the regulation of retinal blood flow." Exp Eye Res **26**(6): 687-697.

Pournaras, C. J., E. Rungger-Brandle, et al. (2008). "Regulation of retinal blood flow in health and disease." Prog Retin Eye Res **27**(3): 284-330.

Properzi, G., G. Terenghi, et al. (1995). "Early increase precedes a depletion of endothelin-1 but not of von Willebrand factor in cutaneous microvessels of diabetic patients. A quantitative immunohistochemical study." J Pathol **175**(2): 243-252.

Purves, G., G. J. Augustine, et al. (2005). "Neurosciences." Traduction de la 3^{ème} édition, De Boeck Université, 811 pages.

Raidoo, D. M. and K. D. Bhoola (1998). "Pathophysiology of the kallikrein-kinin system in mammalian nervous tissue." Pharmacol Ther **79**(2): 105-127.

Reinhart, G. A., L. C. Preusser, et al. (2002). "Hypertension induced by blockade of ET(B) receptors in conscious nonhuman primates: role of ET(A) receptors." Am J Physiol Heart Circ Physiol **283**(4): H1555-1561.

Ripodas, A., J. A. de Juan, et al. (2001). "Localisation of endothelin-1 mRNA expression and immunoreactivity in the retina and optic nerve from human and porcine eye. Evidence for endothelin-1 expression in astrocytes." Brain Res **912**(2): 137-143.

Riva, C. E. (2001). "Basic principles of laser Doppler flowmetry and application to the ocular circulation." Int Ophthalmol **23**(4-6): 183-189.

Riva, C. E., S. D. Cranstoun, et al. (1994). "Choroidal blood flow in the foveal region of the human ocular fundus." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(13): 4273-4281.

Riva, C. E., S. D. Cranstoun, et al. (1994). "Local choroidal blood flow in the cat by laser Doppler flowmetry." Invest Ophthalmol Vis Sci **35**(2): 608-618.

Riva, C. E., M. Geiser, et al. (2010). "Ocular blood flow assessment using continuous laser Doppler flowmetry." Acta Ophthalmol **88**(6): 622-629.

Roff, E. J., A. Harris, et al. (1999). "Comprehensive assessment of retinal, choroidal and retrobulbar haemodynamics during blood gas perturbation." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **237**(12): 984-990.

Rothschild, A. M., V. L. Melo, et al. (1999). "Kininogen and prekallikrein increases in the blood of streptozotocin-diabetic rats are normalized by insulin in vivo and in vitro." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **360**(2): 217-220.

Sasaoka, M., T. Taniguchi, et al. (2006). "Intravitreal injection of endothelin-1 caused optic nerve damage following to ocular hypoperfusion in rabbits." Exp Eye Res **83**(3): 629-637.

Schmetterer, L., O. Findl, et al. (1997). "Role of NO in the O₂ and CO₂ responsiveness of cerebral and ocular circulation in humans." Am J Physiol **273**(6 Pt 2): R2005-2012.

Schmetterer, L. and K. Polak (2001). "Role of nitric oxide in the control of ocular blood flow." Prog Retin Eye Res **20**(6): 823-847.

Schmetterer, L. and M. Wolzt (1999). "Ocular blood flow and associated functional deviations in diabetic retinopathy." Diabetologia **42**(4): 387-405.

Schubert, P., K. A. Rudolphi, et al. (1994). "Modulation of nerve and glial function by adenosine--role in the development of ischemic damage." Int J Biochem **26**(10-11): 1227-1236.

Senanayake, P., J. Drazba, et al. (2007). "Angiotensin II and its receptor subtypes in the human retina." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(7): 3301-3311.

Shepherd, A. P. (1990). "History of laser-Doppler blood flowmetry." In: Shepherd AP & Oberg PA (eds). Laser-Doppler flowmetry. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1-16

Shepro, D. and N. M. Morel (1993). "Pericyte physiology." FASEB J **7**(11): 1031-1038.

Simoens, P., L. De Schaepdrijver, et al. (1992). "Morphologic and clinical study of the retinal circulation in the miniature pig. A: Morphology of the retinal microvasculature." Exp Eye Res **54**(6): 965-973.

Snodderly, D. M., R. S. Weinhaus, et al. (1992). "Neural-vascular relationships in central retina of macaque monkeys (*Macaca fascicularis*)." J Neurosci **12**(4): 1169-1193.

Sokolovsky, M., I. Ambar, et al. (1992). "A novel subtype of endothelin receptors." J Biol Chem **267**(29): 20551-20554.

Statistique Canada, (2003). "Évolution du diabète, prévalence, incidence et facteurs de risques." publié sous la direction de Wayne J. Millar et T. Kue Young, produit no. 82-003 au catalogue de Statistique Canada, Ottawa, Ontario, 14 p.

Statistique Canada, (2005). "Description des états de santé au Canada: Diabète." publié sous la direction de Kellie Murphy, Sarah Connor Gorber, Anik O'Dwyer, produit no. 82-619-MIF au catalogue de Statistique Canada, Ottawa, Ontario, 23 p.

Steigerwalt, R. D., Jr., G. Laurora, et al. (2000). "Ocular and orbital blood flow in cigarette smokers." Retina **20**(4): 394-397.

Stern, M. D. (1975). "In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering." Nature **254**(5495): 56-58.

Takahashi, K., R. A. Brooks, et al. (1989). "Production of endothelin 1 by cultured bovine retinal endothelial cells and presence of endothelin receptors on associated pericytes." Diabetes **38**(9): 1200-1202.

Thijssen, D. H., G. A. Rongen, et al. (2008). "Physical (in)activity and endothelium-derived constricting factors: overlooked adaptations." J Physiol **586**(2): 319-324.

Tilton, R. G., K. Chang, et al. (1993). "Prevention of diabetic vascular dysfunction by guanidines. Inhibition of nitric oxide synthase versus advanced glycation end-product formation." Diabetes **42**(2): 221-232.

Toda, N. and M. Nakanishi-Toda (2007). "Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res **26**(3): 205-238.

Tschöpe, C., H. P. Schultheiss, et al. (2001). "Multiple Interactions Between the Renin-Angiotensin and the Kallikrein-Kinin Systems: Role of ACE inhibition and AT1 Receptor Blockade." J. Cardiovas. Pharmacol. **39**: 478-487.

Tune, J. D., M. W. Gorman, et al. (2004). "Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption." J Appl Physiol **97**(1): 404-415.

Venkataraman, S. T., C. Hudson, et al. (2005). "The impact of hypercapnia on retinal capillary blood flow assessed by scanning laser Doppler flowmetry." Microvasc Res **69**(3): 149-155.

Venkataraman, S. T., C. Hudson, et al. (2006). "Novel methodology to comprehensively assess retinal arteriolar vascular reactivity to hypercapnia." Microvasc Res **72**(3): 101-107.

Voet, D. and J. G. Voet. (1998). "Biochimie.", Traduction de la 2^{ème} édition, De Boeck Université, 1361 pages.

Walker, K., M. Perkins, et al. (1995). "Kinins and kinin receptors in the nervous system." Neurochem Int **26**(1): 1-16; discussion 17-26.

Wheeler-Schilling, T. H., K. Kohler, et al. (1999). "Angiotensin II receptor subtype gene expression and cellular localization in the retina and non-neuronal ocular tissues of the rat." Eur J Neurosci **11**(10): 3387-3394.

Wilkinson-Berka, J. L. (2004). "Diabetes and retinal vascular disorders: role of the renin-angiotensin system." Expert Rev Mol Med **6**(15): 1-18.

Wimpissinger, B., H. Resch, et al. (2004). "Response of choroidal blood flow to carbogen breathing in smokers and non-smokers." Br J Ophthalmol **88**(6): 776-781.

Winkler, B. S., C. A. Starnes, et al. (2004). "Cultured retinal neuronal cells and Muller cells both show net production of lactate." Neurochem Int **45**(2-3): 311-320.

Wu, D. M., H. Kawamura, et al. (2003). "Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(6): H2083-2090.

Yamanishi, S., K. Katsumura, et al. (2006). "Extracellular lactate as a dynamic vasoactive signal in the rat retinal microvasculature." Am J Physiol Heart Circ Physiol **290**(3): H925-934.

Yanagisawa, M., H. Kurihara, et al. (1988). "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells." Nature **332**(6163): 411-415.

Yanoff, M., J.S. Duker, et al. (2004). "Ophthalmology." 2nd edition, Mosby, 1652 pages.

Yoshida, A., G. T. Feke, et al. (1983). "Retinal blood flow alterations during progression of diabetic retinopathy." Arch Ophthalmol **101**(2): 225-227.

Yu, D. Y., R. Townsend, et al. (2005). "Improved interpretation of flow maps obtained by scanning laser Doppler flowmetry using a rat model of retinal artery occlusion." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(1): 166-174.

Zhang, Y. and J. Stone (1997). "Role of astrocytes in the control of developing retinal vessels." Invest Ophthalmol Vis Sci **38**(9): 1653-1666.