

Université de Montréal

**Expression, distribution et fonction du récepteur B1 des
kinines dans la rétine lors du diabète et de la néovascularisation
choroïdienne chez le rat**

Par

Soumaya Hachana

Département de pharmacologie et physiologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine en vue de l'obtention du grade de

Philosophia Doctor (Ph. D.) en Physiologie moléculaire, cellulaire et
intégrative

Novembre 2018

©Soumaya Hachana 2019

Université de Montréal

Faculté de Médecine

Cette thèse intitulée :

Expression, distribution et fonction du récepteur B1 des kinines dans la rétine lors du diabète et de la néovascularisation choroïdienne chez le rat

Présentée par

Soumaya Hachana

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Rémy Sauvé, Ph. D. : Président-rapporteur

Elvire Vaucher, Ph. D. : Directrice de recherche

Réjean Couture, Ph. D. : Co-directeur de recherche

Bruno Larrivée, Ph. D. : Membre du jury

Pedro Miguel Gerlades, Ph. D. : Examineur externe

Résumé

Les kinines sont d'importants médiateurs peptidiques impliqués dans la perméabilité vasculaire, le tonus vasomoteur et l'expression de cytokines pro-inflammatoires. De nombreuses études ont mis en évidence le rôle du récepteur B1 des kinines (RB1) dans l'inflammation systémique et celle de la rétine. L'inflammation joue un rôle prépondérant dans la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), deux pathologies qui représentent les premières causes de cécité dans la population active et la population retraitée. L'objectif principal de cette thèse consiste à évaluer l'implication du RB1 dans ces deux pathologies oculaires.

Les objectifs spécifiques sont définis comme suit : 1) étudier l'effet inflammatoire du RB1 et les altérations vasculaires conséquentes dans la rétine de modèles animaux de diabète et de néovascularisation choroïdienne ; 2) préciser la localisation cellulaire du RB1 dans ces rétines ; 3) évaluer la possibilité de traiter ces pathologies par un antagoniste du RB1 ; 4) étudier l'interaction possible entre le RB1 et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), connu pour son rôle clé dans la néovascularisation choroïdienne.

Nos résultats confirment le rôle néfaste du RB1 dans les phases aiguës et avancées de la rétinopathie diabétique dans un modèle de diabète de type 1 induit par la streptozotocine (STZ) chez le rat. Le RB1 est fortement localisé sur les cellules endothéliales, la glie et les cellules ganglionnaires dans la rétine STZ. Les taux d'ARNm des récepteurs B1 et B2 des kinines, du VEGF et de son récepteur VEGF-R2 sont significativement élevés à 2 et 6 semaines dans la rétine STZ par rapport à la rétine contrôle. Les niveaux d'ARNm du RB1 demeurent augmentés à 6 mois. L'expression des récepteurs B1 (ARNm et immunodétection) et B2 (ARNm) est amplifiée par l'injection intravitréenne d'un agoniste du RB1 (R-838). En revanche, l'inhibition intravitréenne du RB1 (siRNA-RB1) inhibe l'expression génique des récepteurs des kinines, du VEGF et du VEGF-R2 dans la rétine STZ (Article 1).

Les résultats du 2^e article soulignent la contribution du RB1 dans une néovascularisation d'origine choroïdienne (CNV) dans un modèle de dégénérescence maculaire liée à l'âge chez le rat. Le RB1 est détecté par immunofluorescence sur les cellules endothéliales et gliales et il est

co-localisé avec le VEGF-R2 sur les vaisseaux sanguins des rétines CNV. L'effet de l'application topique d'un antagoniste du RB1 (R-954) ou l'injection intravitréenne d'un anti-VEGF a été étudié sur la surexpression de plusieurs médiateurs inflammatoires impliqués dans la CNV. Ces deux traitements réduisent significativement la surexpression (ARNm) des récepteurs B1 et B2 des kinines, du TNF α et de l'ICAM-1 dans la rétine CNV. L'anti-VEGF bloque aussi la surexpression de VEGF, VEGF-R2, HIF-1 α , MCP-1 et VCAM-1, tandis que le R-954 inhibe l'expression des médiateurs inflammatoires IL-1 β et COX-2. Il est important de noter qu'un traitement topique avec le R-954 bloque l'hyperperméabilité vasculaire et l'infiltration leucocytaire dans les modèles de rétinopathie diabétique et de DMLA et diminue la taille de la CNV.

Dans un 3^e article, nous avons étudié les altérations morphologiques du lit vasculaire rétinien dans un modèle héréditaire de diabète de type 2, le rat Goto-Kakizaki (GK). Nous avons observé une accumulation de lipides dans la rétine et la choroïde associée à la surexpression du RB1 et du VEGF, à la production de macrophages et à la réactivité de la microglie.

L'ensemble de ces études supporte un rôle délétère pour le RB1 dans la rétinopathie diabétique et la DMLA et pour lesquelles l'application topique d'un antagoniste de ce récepteur (R-954) peut s'avérer une nouvelle approche thérapeutique.

Mots clés : Récepteur B1 des kinines, rétinopathie diabétique, dégénérescence maculaire liée à l'âge, microglie, VEGF

Abstract

Kinins are potent peptide autacoids involved in different physiological functions associated to enhanced vascular permeability, vascular tone and the expression of pro-inflammatory cytokines. Numerous studies have demonstrated the role of the kinin B1 receptor (B1R) in systemic and retinal inflammation. Inflammation plays a major role in diabetic retinopathy (DR) and age-related macular degeneration (AMD), two pathologies that represent the leading causes of blindness in the working and the retired population. The main objective of this thesis is to evaluate the involvement of B1R in these two ocular pathologies.

Specific objectives are defined as follows: 1) to study the inflammatory effect of B1R and the consequent vascular alterations in retina of animal models of diabetes and choroidal neovascularization; 2) to specify the cellular localization of B1R in these retinas; 3) to evaluate the possibility of treating these pathologies by an B1R antagonist; 4) to investigate the possible interaction between B1R and vascular endothelial growth factor (VEGF), known for its key role in choroidal neovascularization.

Our results confirm the detrimental role of B1R in the acute and advanced phases of diabetic retinopathy in streptozotocin-induced type 1 diabetes in rats. B1R is highly localized on endothelial cells, glial and ganglion cells in the STZ retina. The mRNAs expression of kinin B1 and B2 receptors, VEGF and VEGF-R2 are significantly elevated at 2 and 6 weeks in the STZ retina compared to control retina. B1R mRNA levels remain increased at 6 months. The expression of the B1 (mRNA and immunodetection) and B2 (mRNA) receptors is amplified by the intravitreal injection of a B1R agonist (R-838). In contrast, intravitreal inhibition of B1R (siRNA-RB1) inhibits gene expression of both kinin receptors, VEGF and VEGF-R2 in the STZ retina (Article 1).

The results of the second article highlight the contribution of B1R in choroidal neovascularization (CNV) in a rat model of age-related macular degeneration. B1R is detected by immunofluorescence on endothelial and glial cells and co-located with VEGF-R2 on blood vessels of CNV retinas. The effect of topical application of B1R antagonist (R-954) or intravitreal injection of anti-VEGF was studied on the overexpression of several inflammatory

mediators involved in CNV. These two treatments significantly reduce the overexpression (mRNA) of the B1 and B2 receptors of kinins, TNF- α and ICAM-1 in the CNV retina. Anti-VEGF also blocks the overexpression of VEGF, VEGF-R2, HIF-1, MCP-1 and VCAM-1, while R-954 inhibits the expression of inflammatory mediators IL-1 β and COX-2. It is important to note that topical treatment with R-954 blocks vascular hyperpermeability and leukocyte infiltration in models of diabetic retinopathy and AMD and decreases the size of CNV.

In a third article, we studied the morphological alterations of retinal vascular bed in a hereditary type 2 diabetes model, the Goto-Kakizaki rat (GK). We observed an accumulation of lipids in the retina and choroid associated with overexpression of B1R and VEGF, macrophage production and microglia reactivity.

Collectively, these studies support a deleterious role for B1R in diabetic retinopathy and AMD and for which the topical application of an antagonist of this receptor (R-954) may be a new therapeutic approach.

Key words: Kinin B1 receptor, diabetic retinopathy, age-related macular degeneration, microglia, VEGF

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	I
ABSTRACT	III
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	X
LISTE DES TABLEAUX	XI
PRÉAMBULE.....	XII
REMERCIEMENTS	XVII
CHAPITRE 1	1
INTRODUCTION.....	1
1 LE DIABÈTE	2
1.1 LE DIABÈTE DE TYPE 1	2
1.2 LE DIABÈTE DE TYPE 2	3
1.3 ANATOMIE DE L'ŒIL.....	4
1.4 LA CORNÉE	5
1.5 L'IRIS	7
1.6 LA PUPILLE	7
1.7 LA SCLÈRE	7
1.8 LE CRISTALLIN	7
1.9 LE CORPS VITRÉ	8
1.10 HISTOLOGIE DE LA RÉTINE.....	8
1.11 LES CELLULES GLIALES	9
1.11.1 Les cellules de Müller	9
1.11.2 Les astrocytes.....	9
1.11.3 Les microglies.....	10
1.12 LES PHOTORÉCEPTEURS.....	10
1.13 LES DIFFÉRENTES COUCHES RÉTINIENNES	12

1.14	LE SYSTÈME VASCULAIRE RÉTINIEN.....	14
1.15	LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE.....	16
1.16	L'APPROVISIONNEMENT VASCULAIRE DE LA RÉTINE ET DE LA CHOROÏDE.....	17
1.17	LA RÉGULATION DU FLUX SANGUIN RÉTINIEN.....	18
1.18	L'AUTORÉGULATION DU DÉBIT SANGUIN RÉTINIEN.....	19
1.19	LA RÉGULATION DU FLUX SANGUIN CHOROÏDIEN.....	20
1.20	COMPARAISON DES MÉCANISMES DE RÉGULATION RÉTINIENNE ET CHOROÏDIENNE.....	21
1.21	LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	22
1.22	LES SIGNES CLINIQUES DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	22
1.23	PHYSIOPATHOLOGIE DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	24
1.24	LES DIFFÉRENTES VOIES IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	27
1.24.1	<i>La voie Polyol</i>	27
1.24.2	<i>Activation des produits finaux de glycation avancée (AGEs)</i>	28
1.24.3	<i>La voie PKC</i>	28
1.24.4	<i>L'inflammation</i>	28
1.24.4.1	Rôle des cellules gliales dans l'inflammation.....	30
1.24.4.2	Rôle des cellules de Müller dans l'inflammation.....	30
1.24.4.3	Rôle des astrocytes dans l'inflammation.....	31
1.24.4.4	La leucostase.....	32
1.25	CHANGEMENT DU FLUX SANGUIN RÉTINIEN DANS LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	32
1.26	LES ATTEINTES MICROVASCULAIRES DANS LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	33
1.27	LES TRAITEMENTS DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	34
1.28	LES MODÈLES UTILISÉS EN RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE.....	35
1.29	MODÈLE À LA STREPTOZOTOCINE ET À L'ALLOXAN.....	36
1.30	MODÈLE NUTRITIONNEL : DIÈTE RICHE EN SUCRE.....	36
1.31	MODÈLES GÉNÉTIQUES DE DIABÈTE.....	37
1.32	LA DÉGÉNÉRESCENCE MACULAIRE LIÉE À L'ÂGE (DMLA).....	37
1.33	L'ÉPITHÉLIUM PIGMENTAIRE RÉTINIEN (EPR).....	37
1.34	FORMES HISTOLOGIQUES DE LA DMLA.....	39
1.34.1	<i>DMLA atrophique</i>	40
1.34.2	<i>DMLA exudative</i>	40
1.34.2.1	Les différents types de néovascularisation.....	41
1.34.2.2	Facteurs angiogéniques dans la CNV.....	42
1.35	RÔLE DU VEGF DANS LA PATHOGENÈSE DE LA DMLA.....	42
1.36	AUTRES FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LA PATHOGENÈSE DE LA DMLA.....	43

1.36.1	<i>PEDF (Pigment epithelium-derived factor)</i>	43
1.36.2	<i>Thrombospondine-1 (TSP-1)</i>	43
1.36.3	<i>L'angiostatine et l'endostatine</i>	44
1.36.4	<i>La molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1)</i>	44
1.37	CHANGEMENT DU FLUX SANGUIN RÉTINIEN DANS LA DMLA.....	44
1.38	TRAITEMENT THÉRAPEUTIQUE DE LA DMLA	45
1.39	LES MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS DANS LA DMLA	46
1.39.1	<i>Induction d'une CNV par laser chez le rat ou la souris</i>	46
1.39.2	<i>Les modèles génétiques</i>	46
1.40	LE SYSTÈME KALLIKRÉINE-KININES (SKK).....	46
1.41	LES RÉCEPTEURS B1 ET B2 DES KININES.....	48
1.41.1	<i>La voie de signalisation des récepteurs des kinines</i>	49
1.41.2	<i>Régulation des récepteurs des kinines</i>	50
1.42	LE SKK DANS LA RÉTINE DIABÉTIQUE.....	51
1.43	IMPLICATION DU SKK DANS LES CHANGEMENTS DE PERMÉABILITÉ VASCULAIRE	52
1.44	IMPLICATION DU SKK DANS LA NÉOVASCULARISATION	53
1.45	RELATION ENTRE VEGF ET LES RÉCEPTEURS DES KININES	53
1.46	INTERACTION ENTRE LE SKK ET LE SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE	54
CHAPITRE 2		56
PREMIER ARTICLE		56
2 ARTICLE 1		57
2.1	PROBLÉMATIQUE.....	57
2.2	HYPOTHÈSE.....	57
2.2	OBJECTIF PRINCIPAL ET OBJECTIFS SPÉCIFIQUES	57
2.3	CONTRIBUTION	58
CHAPITRE 3		75
DEUXIÈME ARTICLE		75
3 ARTICLE 2		76
3.1	PROBLÉMATIQUE.....	76
3.2	HYPOTHÈSE	77
3.3	OBJECTIFS.....	77
3.4	CONTRIBUTION	77

CHAPITRE 4	116
TROISIÈME ARTICLE	116
4 ARTICLE 3	117
4.1 PROBLÉMATIQUE.....	117
4.2 HYPOTHÈSE	117
4.3 OBJECTIFS	117
4.4 CONTRIBUTION	118
CHAPITRE 5	143
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	143
5 FAITS SAILLANTS DE LA THÈSE	144
5.1 IDENTIFICATION ET LOCALISATION CELLULAIRE DES RÉCEPTEURS DES KININES	144
5.2 SUREXPRESSION FONCTIONNELLE DU RB1 DANS LA RÉTINE DIABÉTIQUE À DIFFÉRENTS STADES.....	146
5.3 RÔLE DU RÉCEPTEUR B1 DANS L'INFLAMMATION MICROVASCULAIRE	147
5.4 LE PROCESSUS INFLAMMATOIRE DANS LA DMLA NÉOVASCULAIRE	148
5.5 RÔLE DU RÉCEPTEUR B1 DANS UNE NÉOVASCULARISATION RÉTINIENNE	150
5.6 DES MÉCANISMES INDÉPENDANTS IMPLIQUANT LE RB1 ET LE SYSTÈME VEGF DANS LA PATHOGENÈSE DE LA RD ET DE LA DMLA	151
5.7 AVANTAGE DE L'UTILISATION DE L'ANTAGONISTE DU RB1, LE R-954	152
5.8 LES CHANGEMENTS RÉTINIENS CHEZ LE RAT GOTO-KAKIZAKI: CORRÉLATION AVEC LA PERMÉABILITÉ DE LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE.....	154
5.9 MODIFICATIONS STRUCTURELLES DE LA RÉTINE DIABÉTIQUE : ACCUMULATION DE LIPIDES ET DE COLLAGÈNES CONTRIBUTANT À LA PATHOGENÈSE DE LA RD	156
5.10 AVANTAGES ET LIMITATIONS DES MODÈLES ANIMAUX UTILISÉS.....	157
5.10.1 <i>Le modèle de diabète de type 1 induit par la STZ</i>	157
5.10.2 <i>Le modèle de rats Goto-Kakizaki (GK)</i>	158
5.10.3 <i>Modèle de néovascularisation</i>	159
5.11 PERSPECTIVES DE RECHERCHE.....	159
6 CONCLUSION	162
7 BIBLIOGRAPHIE	163

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie de l'œil.....	5
Figure 2 : Structure de la cornée.....	6
Figure 3 : Organisation des différents types cellulaires de la rétine.....	11
Figure 4: Les différentes couches rétinienne.....	13
Figure 5: Changement de la structure des différentes couches vasculaires rétinienne.....	13
Figure 6: Microvasculature dans la rétinopathie diabétique.....	15
Figure 7: Structure de la barrière hémato-rétinienne.....	16
Figure 8: Organisation de l'unité neurovasculaire capillaire.....	20
Figure 9: Formation des micro-anévrismes au stade non prolifératif.....	23
Figure 10: Néovascularisation rétinienne.....	24
Figure 11: Les différentes voies impliquées dans le développement de la rétinopathie diabétique.....	27
Figure 12: Interaction entre cellules gliales et endothéliales et implication des médiateurs de l'inflammation.....	31
Figure 13: Les structures impliquées dans la DMLA.....	38
Figure 14: Évolution des drusen dans la DMLA.....	39
Figure 15: Photo du fond d'œil d'une DMLA exudative avec présence d'une néovascularisation d'origine choroïdienne.....	41
Figure 16: Les voies de synthèse de dégradation du système kallikréine-kinine.....	48
Figure 17: La voie de signalisation des récepteurs des kinines.....	50

Liste des abréviations

ACE : enzyme de conversion de l'angiotensine-1
AGEs : les produits finaux de glycation avancée
AMPc : adénosine monophosphate cyclique
BHR : barrière hémato-rétinienne
BK : bradykinine
COX-1 : cyclo-oxygénase 1
COX-2 : cyclo-oxygénase 2
CPN : carboxypeptidase N du plasma
CPM : carboxypeptidase M de la membrane cellulaire
DAG : diacylglycérol
des-Arg⁹-BK : des-Arg⁹-bradykinine
des-Arg¹⁰-KD : des-Arg¹⁰-kallidine
DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge
eNOS : NO synthase endothéliale
EPR : épithélium pigmentaire rétinien
ERG : électrorétinogramme
ET-1 : endothéline-1
GK : Goto-Kakizaki
GMPc : guanosine monophosphate cyclique
GSH : glutathion
HIF-1 : *hypoxia inducible factor-1*
ICAM-1 : molécule d'adhésion intercellulaire-1
IECA : inhibiteur de l'enzyme de conversion de l'angiotensine
Il-6 : interleukine-6
IL-8 : interleukine-8
IL-1 β : interleukine-1 beta
iNOS: NO synthase inductible
IP₃: inositol-1-4-5-triphosphate
KBPM : kininogène de bas poids moléculaire
KD : kallidine
KHPM : kininogène de haut poids moléculaire
KT : kallikréine tissulaire
KP : kallikréine plasmatique
LDF : débitmétrie au laser par effet Doppler
LPS : lipopolysaccharide
MCP-1 : Monocyte Chemoattractant Protein-1
NF- κ B : facteur de transcription nucléaire κ B
NO: monoxyde d'azote
NOS: NO synthase
nNOS : NO synthase neuronale
OCT : tomographie en cohérence optique
PGG₂: prostaglandine G₂

PI3-K: phosphatidylinositol-3 kinase
PLA₂ : phospholipase A₂
PLC : phospholipase C
pO₂ : pression partielle d'oxygène
PKC: protéine kinase C
PKP: proenzyme prekallikréine
RB1 : récepteur B1 des kinines
RB2 : récepteur B2 des kinines
RD : rétinopathie diabétique
ROS : espèces réactives oxygénées
SKK : système kallikrein-kinin
STZ : streptozotocine
TNF- α : facteur de nécrose tumorale alpha
VCAM : vascular cell adhesion protein
VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGF-R1 : VEGF récepteur 1
VEGF-R2 : VEGF récepteur 2
ZO-1 : zonula occludens 1

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques de la rétinopathie diabétique.....	26
-----------------------------------------------------------------	----

Préambule

Le vieillissement de la population dans les sociétés occidentales augmente la prévalence des maladies chroniques, notamment les maladies oculaires. Parmi les premières causes de cécité dans la population active et la population retraitée, la rétinopathie diabétique (RD) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) arrivent au premier rang.

La RD est l'une des complications les plus fréquentes du diabète. Les altérations vasculaires, incluant les modifications du débit sanguin rétinien, le dysfonctionnement des cellules endothéliales, la rupture de la barrière hémato-rétinienne (BHR), l'ischémie et la néovascularisation, contribuent largement au développement de la maladie. Ces altérations lentes et progressives de la microvasculature de la rétine dues à l'hyperglycémie et à l'inflammation entraînent la mort des cellules nerveuses de la rétine, donc une perte de vision sévère chez les patients atteints de RD.

La DMLA est la principale cause de cécité chez les personnes âgées. Elle se caractérise par une atteinte visuelle progressive due à la dégénérescence de la choriocapillaire, de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) et de la couche des photorécepteurs. La perte de vision résulte de la forme néovasculaire, appelée encore « humide », caractéristique de la maladie. Cette forme se manifeste par une prolifération pathologique de nouveaux vaisseaux sanguins d'origine choroïdienne (CNV).

Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est surexprimé aussi bien dans la RD que dans la DMLA. De nombreuses études mettent en évidence le rôle du VEGF dans la néovascularisation choroïdienne. De ce fait, les molécules inhibant la bioactivité du VEGF sont devenues le nouveau paradigme dans le traitement de la DMLA. L'inhibition du VEGF a permis de réduire la prolifération cellulaire, la migration et la formation des néovaisseaux pathologiques. Le VEGF est ainsi devenu la cible de choix pour le traitement de l'angiogenèse oculaire pathologique à l'aide d'anticorps anti-VEGF.

Malgré l'efficacité de ces molécules dans l'amélioration de l'acuité visuelle, les injections intravitréennes répétées d'anti-VEGF peuvent entraîner des complications oculaires à long terme

en raison des nombreux rôles physiologiques connus de ce facteur de croissance. Il n'existe donc toujours pas de traitement non invasif, efficace et ciblant les stades les plus précoces de la maladie pour soigner ces deux pathologies oculaires inflammatoires. Des études récentes suggèrent un rôle du système kallikréine-kinine (SKK) dans le développement de l'inflammation tant au niveau systémique que rétinien. Les kinines sont des peptides vasoactifs impliqués dans divers effets biologiques, et sont parmi les premiers médiateurs à être libérés dans le tissu enflammé. Les différentes composantes du SKK, notamment les récepteurs des kinines, sont exprimées dans la rétine de plusieurs espèces, y compris l'homme. Le récepteur B1 des kinines (RB1) est fortement exprimé dans la rétine des rats et des humains atteints de diabète de type 1 et de type 2, comme montré dans cette thèse et quelques études précédentes. Toutefois peu d'études ont montré un rôle possible du SKK dans l'étiologie de la DMLA bien que cette maladie oculaire partage une ressemblance avec la RD au niveau du statut inflammatoire.

L'objectif principal de cette thèse consiste à mieux caractériser le rôle physiopathologique du RB1 dans la RD et la DMLA. Ces travaux de recherche ont pour objectifs spécifiques de déterminer la distribution cellulaire et l'expression du RB1 au cours du diabète et dans une néovascularisation d'origine choroïdienne. On ignore jusqu'à présent sur quel type cellulaire se situe le RB1 dans la rétine. L'utilisation de notre anticorps spécifique du RB1 nous a permis de détecter la présence de ce récepteur sur les couches les plus vascularisées de la rétine diabétique (Article 1). Nous avons également démontré que le RB1 est localisé sur les cellules endothéliales et gliales dans les rétines néovasculaires (Article 2). Alors que dans les tissus rétiniens témoins, le RB1 est peu exprimé et demeure non fonctionnel.

En plus de son effet sur l'inflammation, la bradykinine favorise l'angiogenèse en stimulant la formation de VEGF dans un modèle de néovascularisation non oculaire. Néanmoins, le rôle spécifique des récepteurs des kinines et leur interaction avec le système VEGF dans la RD et la DMLA néovasculaire sont encore mal compris. Dans la présente étude, l'interconnexion entre le RB1, le VEGF et son récepteur VEGF-R2 a été étudiée chez le rat STZ (modèle animal de rétinopathie diabétique- Article 1) et le rat ayant subi une lésion induite par laser (modèle de DMLA- Article 2). Nos résultats ont montré une absence de co-localisation du RB1 et du VEGF-R2 sur les cellules rétiniennes. De plus, l'activation du RB1 par injection intravitréenne avec un

agoniste sélectif du RB1 (R-838) dans la rétine diabétique n'a pas permis d'obtenir une surexpression du VEGF et du VEGF-R2 (Article 1). Ces résultats sont soutenus par des études montrant que le SKK favorise l'hyperperméabilité vasculaire et l'œdème maculaire, indépendamment des effets biologiques du système VEGF.

Des stratégies pharmacologiques ont été développées pour inhiber les kallikréines ou antagoniser les récepteurs des kinines. Dans cette thèse, nous avons montré que l'application topique d'un antagoniste spécifique et sélectif du RB1 de nature peptidique (R-954) renverse l'augmentation de la perméabilité vasculaire, la leucostasie et l'expression accrue de plusieurs médiateurs inflammatoires dans la rétine du rat diabétique (Article 1). Ce traitement non invasif a permis également de réduire la taille d'une néovascularisation d'origine rétinienne dans le modèle animal de DMLA (Article 2). D'autres études ont montré que l'inhibition du RB1 permet de réduire l'inflammation vasculaire dans un modèle de résistance à l'insuline et la production plus élevée d'espèces réactives de l'oxygène chez le rat diabétique STZ.

Pendant le diabète, la morphologie du lit vasculaire est également altérée, avec un épaissement de la membrane basale et une perte de péricytes qui modulent le tonus vasculaire, suivies de tortuosités et de microanévrismes. Le rat Goto-Kakizaki (GK) représente un modèle de diabète de type 2 approprié pour étudier les processus de dysfonction vasculaire inflammatoire au cours de la RD et permet une surveillance prolongée de la maladie. Pour ce faire, dans le cadre de notre troisième article, nous avons examiné le lit vasculaire rétinien à 30 et 36 semaines, le niveau d'accumulation de lipides, la perméabilité vasculaire ainsi que l'immunomarquage du RB1 dans la rétine diabétique. Nos données montrent que les dépôts lipidiques sont principalement situés entre la rétine et la choroïde, ce qui pourrait suggérer un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire rétinien. Nos résultats sont en accord avec des études précédentes montrant que les dépôts lipidiques sont liés à une diminution du flux sanguin chez les rats GK. L'accumulation de collagène dans la rétine diabétique suggère la présence de fibrose et l'épaississement de la membrane basale, affectant la fonction rétinienne pendant le diabète. Aucun changement n'a cependant été mesuré sur la perméabilité vasculaire dans la rétine du rat GK, possiblement attribuable aux taux d'hyperglycémie relativement faible chez le

rat GK contrairement au rat Wistar rendu diabétique par la streptozotocine. L'étude qualitative par immunohistochimie a montré la localisation du RB1 dans la rétine GK.

À travers ces trois articles, nous avons présenté un aperçu des principales caractéristiques des mécanismes microvasculaires et inflammatoires associés à deux pathologies oculaires pouvant entraîner une déficience visuelle et la cécité.

Ces différentes études ont permis aussi de mieux caractériser le rôle, la fonction et le mécanisme d'action du récepteur B1 dans le processus inflammatoire affectant l'intégrité microvasculaire de la rétine par un mécanisme qui semble indépendant du système VEGF mais consistant avec sa localisation sur les cellules endothéliales et gliales. Les stratégies de traitements actuels de la RD et de la DMLA se limitent principalement aux traitements au laser, aux stéroïdes et aux anti-VEGF, qui sont souvent associés à des effets secondaires indésirables entraînant d'autres complications. Notre étude nous a permis d'apporter des preuves solides suggérant que le RB1 des kinines joue un rôle primordial dans le développement de la RD et de la DMLA néovasculaire par ses effets sur la perméabilité vasculaire, l'infiltration des leucocytes et d'autres mécanismes inflammatoires. Le traitement topique avec un antagoniste du RB1 des kinines représente donc une nouvelle approche thérapeutique très prometteuse pour le traitement non invasif des pathologies inflammatoires rétinienne.

À ma maman, pour son amour inconditionnel

À mon conjoint Olivier, pour son soutien infaillible

Remerciements

Tout le cheminement de cette thèse m'a convaincue de l'importance d'être bien entouré pour mener à bien cette tâche ardue. Je n'aurais jamais pu réaliser ce doctorat de recherche sans le soutien d'un grand nombre de personnes :

En premier lieu, je tiens à remercier mon président de jury Monsieur le Professeur Rémi SAUVÉ, vous me faites l'honneur de présider ce jury et de juger mon travail.

Mes remerciements vont également à Messieurs les Professeurs Pedro Miguel GERALDES et Bruno LARRIVÉE pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Veuillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de thèse Madame le professeure Elvire VAUCHER. Merci d'avoir apporté votre expérience à la critique de ce travail. Merci pour votre aide et de m'avoir initiée aux techniques de laboratoire en lien avec mon travail de thèse. Merci aussi de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur l'œil, un organe absolument fascinant. Je vous prie de bien vouloir accepter ma respectueuse considération.

Un merci tout particulier à mon directeur de thèse, Monsieur le professeur Réjean COUTURE, vous avez accepté de me soutenir et de m'accompagner tout au long de ce travail. Je vous remercie également pour votre patience, votre accueil chaleureux à chaque fois que j'ai sollicité votre aide, ainsi que pour vos multiples appuis et encouragements lors des moments difficiles. Cela a été un honneur et un plaisir de travailler avec vous. Recevez ma plus sincère gratitude.

Je souhaiterais aussi adresser mon plus profond respect et toute ma gratitude à Madame la professeure Michelle BROCHU pour avoir accepté de faire partie de mon comité de parrainage et d'avoir pris votre tâche à cœur.

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à notre technicien de laboratoire Monsieur Jacques Sénécal, pour son aide précieuse et ses conseils éclairés qu'il m'a prodiguée tout au long de mes expériences. Merci aussi pour l'ambiance de travail agréable et détendue qu'il a su créer

au sein de notre laboratoire. Je garderai longtemps le souvenir de ces heures passées au Confocal à travailler fort mais aussi à plaisanter en sa compagnie!

Mes remerciements vont également aux membres du laboratoire Marianne, Mira, Véronica, Visou, Marie Charlotte, Jacqueline et Guillaume ainsi qu'à notre assistant de recherche Monsieur Frédéric Huppé-Gourgues qui a été très impliqué dans l'élaboration de mon premier article.

Je souhaiterais remercier ma collègue de travail et amie Menakshi Bhat, j'ai été extrêmement sensible à ses qualités humaines, ses qualités d'écoute et de compréhension. Merci pour nos heures de travaux communes, nos francs moments de rigolade et notre passion pour les films bollywoodiens.

Ma reconnaissance va à ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif de ce travail doctoral, ma petite famille:

Merci maman pour toutes ces années où tu m'as soutenue sans faille, merci d'avoir toujours été là pour moi dans les moments difficiles. Tu es une maman formidable. Merci pour tout.

Je voudrais remercier particulièrement mon amoureux Olivier Fontaine, pour toutes ces années de doctorat où tu n'as cessé de me soutenir. Tu es l'épaule sur laquelle je m'appuie, tu m'es si précieux. Je t'aime.

Je tiens également à remercier mes frères et particulièrement ma sœur Rym, qui a su trouver les mots justes dans les périodes difficiles du doctorat étant elle-même passée par là. Miracle j'y ai survécu! Merci à ma nièce et petite sœur Eya, qui elle aussi malgré son jeune âge m'a soutenue. Je suis peinée de la distance qui nous sépare. Nos fous rires et nos chamailleries me manquent. Je vous adore.

Un grand merci à ma belle famille et à mes amies de toujours Asma et Khawla. À tous ces bons moments passés ensemble. Je vous souhaite de belles années à venir.

CHAPITRE 1

Introduction

1 Le diabète

Le diabète sucré est un syndrome métabolique caractérisé par un taux de glucose sanguin inapproprié (hyperglycémie) dû à une déficience absolue ou relative en insuline. Les effets du diabète sucré comprennent des dommages à long terme, un dysfonctionnement et une défaillance de divers organes. L'une des principales complications du diabète sucré est la rétinopathie diabétique (RD), qui est une cause importante de cécité. Selon l'Organisation mondiale de la santé, plus de 382 millions de personnes sont actuellement touchées par le diabète dans le monde et ce nombre est en augmentation en raison du vieillissement de la population. La rétinopathie diabétique est donc une cause majeure de perte de vision sévère chez les personnes adultes dans les pays industrialisés.

Le dérèglement de l'insuline dans le diabète peut être dû à différents types de mécanismes pathologiques et étiologiques connus : type 1, type 2, d'autres types spécifiques (diabète secondaire à certaines maladies, diabète secondaire à la prise de médicaments) et le diabète gestationnel (World Health Organisation Diabetes Unit, 2003).

Dans cette étude, nous allons nous intéresser au diabète de types 1 et 2. Rappelons que l'insuline est normalement libérée dans le sang par les cellules β du pancréas lorsque la glycémie est élevée. L'insuline augmente l'absorption du glucose dans les cellules en stimulant la translocation du transporteur de glucose GLUT4 des sites intracellulaires vers la surface cellulaire (Saltiel et Kahn, 2001). Elle stimule également la croissance et la différenciation cellulaires et favorise le stockage des substrats dans les graisses, le foie et les muscles en stimulant la lipogenèse, la synthèse du glycogène et des protéines et en inhibant la lipolyse, la glycogénolyse et la dégradation des protéines (Saltiel et Kahn, 2001).

1.1 Le diabète de type 1

Le diabète de type 1 est une maladie d'origine auto-immune dans plus de 95% des cas. Plus de 300 000 Canadiens vivent avec le diabète de type 1. Il est estimé qu'à travers le monde, son taux d'incidence augmente de trois pour cent par année chez les enfants de moins de 14 ans (<http://www.idf.org/diabetesatlas/diabetes-young-global-perspective>).

Il s'agit d'un trouble catabolique dans lequel l'insuline circulante est pratiquement absente, le glucagon plasmatique (hormone hyperglycémisante) est élevé, et les cellules β pancréatiques ne répondent plus à tous les stimuli insulino-gènes connus (Harrison *et al.*, 2006)). En absence d'insuline, les trois principaux tissus cibles de l'insuline (foie, muscle et graisse) ne parviennent plus à absorber correctement le glucose, et continuent à libérer du glucose, des acides aminés et des acides gras à partir de leurs réserves respectives. De plus, des altérations du métabolisme des graisses conduisent à la production et à l'accumulation de corps cétoniques (Harrison *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2011). Dans les conditions physiologiques, le thymus supprime les lymphocytes T autoréactifs pendant le développement, de sorte que le système immunitaire devient tolérant aux auto-antigènes. De plus, certaines de ces cellules T spécialisées sont capables de prévenir davantage les attaques contre les tissus sains (Harrison *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2011) Dans le diabète de type 1, ce processus d'auto-tolérance dans le système immunitaire est complètement dysfonctionnel. Le taux de destruction des cellules β du pancréas peut varier, mais dans la plupart des cas, le processus se prolonge sur plusieurs mois voire plusieurs années (Harrison *et al.*, 2006).

1.2 Le diabète de type 2

Précédemment appelé diabète non insulino-dépendant, le diabète de type 2 résulte d'une déficience relative en insuline, contrairement à la carence absolue en insuline des patients atteints de diabète de type 1 (Harrison *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2011). Il représente 90% à 95% de tous les cas de diabète. Considéré il y a longtemps comme une maladie d'adulte, la prévalence du diabète de type 2 a considérablement augmenté chez les enfants et les jeunes à l'échelle mondiale (<https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/diabete-type-2.html>). Au Canada, les nouveaux cas diagnostiqués étaient de 1,54 cas pour 100 000 jeunes en 2010 (Amed *et al.*, 2010).

La résistance à l'insuline associée au diabète de type 2 peut être généralement définie comme une diminution de la réactivité des tissus à l'insuline. Une augmentation des taux d'insuline avec un taux de glucose plasmatique normal indique une résistance à l'insuline. La plupart des patients atteints de diabète de type 2 présentent à l'âge adulte un certain degré d'obésité. Quel que soit leur poids, les diabétiques de type 2 présentent généralement un certain

degré d'insensibilité tissulaire à l'insuline attribuable à plusieurs facteurs interdépendants tel que les facteurs génétiques (Harrison *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2011). Au fur et à mesure que les réserves lipidiques des adipocytes augmentent, la libération accrue d'acides gras libres et d'adipokines pro-inflammatoires favorisent le recrutement des macrophages dans le tissu adipeux et tend à les activer. Ces macrophages activés libèrent à leur tour une variété de molécules (TNF α , IL-6, NO et autres) qui diminuent la sensibilité à l'insuline des adipocytes et augmentent la libération d'acides gras et de peptides pro-inflammatoires, créant ainsi une boucle de rétroactivité positive qui maintient un état chronique d'inflammation locale et une résistance à l'insuline (Leahy, 2005; Harrison *et al.*, 2006; Gardner *et al.*, 2011).

1.3 Anatomie de l'œil

Le diabète affecte la vision, un des sens les plus indispensables pour l'homme. L'œil est un organe neuro-sensoriel se présentant sous forme d'un globe recevant l'image du monde qui nous entoure. Il représente à la fois le système optique capable de traiter l'image quel que soit la distance d'observation et la première ligne de traitement de l'information visuelle avant sa transmission vers le cortex occipital.

Plus de 50% des récepteurs sensoriels dans le corps humain sont situés dans les yeux, et une partie importante du cortex cérébral est consacrée à l'interprétation de l'information visuelle (Shumway *et al.*, 2018). L'œil est constitué de plusieurs structures incluant la cornée, l'iris, la pupille, le cristallin, le vitré, la rétine, la choroïde et le nerf optique (Fig.1).

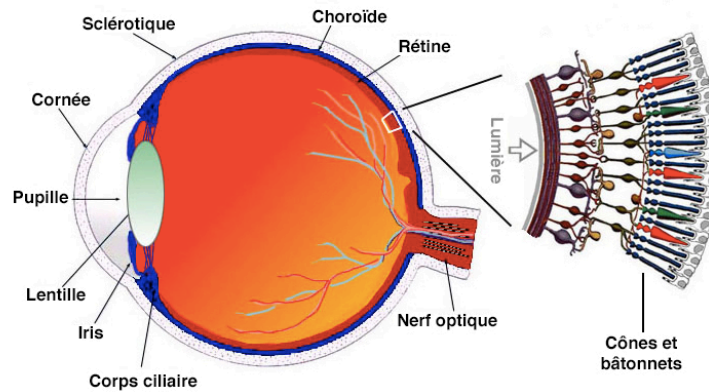


FIGURE 1 : ANATOMIE DE L'ŒIL

L'œil est constitué de trois couches de tissus. La couche externe, composée de la sclérotique et de la cornée. La couche intermédiaire comprend trois structures distinctes mais continues: l'iris, le corps ciliaire et la choroïde. La choroïde est composée d'un lit capillaire riche qui constitue la principale source d'irrigation sanguine des photorécepteurs de la rétine.

Seule la couche interne de l'œil, la rétine, contient des neurones sensibles à la lumière et capables de transmettre des signaux visuels aux cibles centrales (Tirée de

<http://www.blueconemonochromacy.org>)

Pour obtenir l'effet pharmacologique escompté au niveau de la rétine, le principe actif instillé à la surface de l'œil doit traverser l'ensemble des structures oculaires afin de se rendre au niveau du site d'action.

1.4 La cornée

La cornée est un tissu hautement organisé qui représente la partie antérieure du globe oculaire. Contrairement à la plupart des tissus du corps, la cornée ne contient aucun vaisseau sanguin pour la nourrir ou la protéger contre l'infection. La cornée reçoit sa nourriture à partir des larmes et de l'humeur aqueuse. Les tissus de la cornée humaine sont disposés en cinq couches (épithélium, membrane de Bowman, stroma, membrane de descemet, endothélium) (Fig. 2).

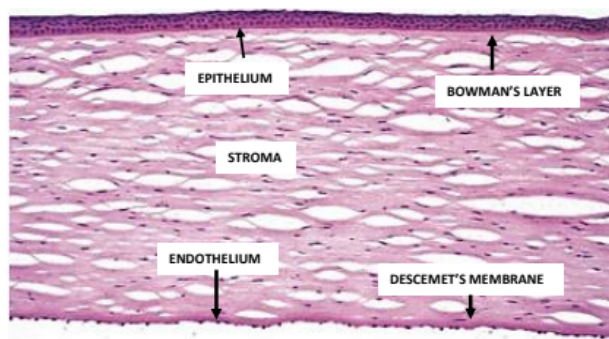


FIGURE 2 : STRUCTURE DE LA CORNÉE

L'épithélium cornéen : est une couche de tissu épithélial multicellulaire extrêmement mince de cellules à croissance rapide et à régénération facile, elle est maintenue humide avec des larmes. La couche de Bowman: est une région acellulaire condensée du stroma apical, composée principalement de fibrilles de collagène organisées de manière aléatoire mais étroitement tissées (Hayashi *et al.*, 2000). Le stroma cornéen: est une couche intermédiaire épaisse et transparente, constituée de fibres de collagène régulièrement disposées et de kératocytes interconnectés peu dispersés (Hayashi *et al.*, 2000). La membrane de Descemet: est une mince couche acellulaire qui sert de membrane basale modifiée de l'endothélium cornéen, à partir de laquelle des cellules sont dérivées (Dua *et al.*, 2013). L'endothélium cornéen: est une monocouche squameuse composée de cellules riches en mitochondries. Ces cellules sont responsables de la régulation du transport des fluides et des solutés entre les compartiments du stroma cornéen.

La cornée agit comme une sorte de barrière contre les germes et les autres particules qui peuvent nuire à l'œil. C'est un tissu mécaniquement résistant et transparent. Cette résistance est en partie due à la présence des couches des fibres de collagène. Plus de 200 fibres de collagène sillonnent la cornée dans différentes directions. Ces fibres sont entreposées sur une couche épaisse et aqueuse de glycosaminoglycanes. Cet arrangement de fibres permet de produire un élément optique transparent (Shumway, 2018).

1.5 L'iris

C'est un organe interne protégé de l'œil, situé derrière la cornée et l'humeur aqueuse. Il se compose de deux couches: le stroma et, sous le stroma, les cellules épithéliales pigmentées. L'iris est une structure contractile, constituée principalement de muscle lisse avec des actions opposées: dilatation et contraction. Ces muscles contrôlent la taille de la pupille et déterminent ainsi la quantité de lumière qui atteint le tissu sensoriel de la rétine (Shumway, 2018).

1.6 La pupille

C'est l'ouverture située au milieu de l'iris qui permet à la lumière de traverser la rétine. Chez l'homme et certains animaux, la taille de la pupille est contrôlée par une contraction et une dilatation de l'iris, afin de réguler l'intensité de la lumière pénétrant dans l'œil, c'est le réflexe pupillaire sous contrôle du système nerveux autonome. Une constriction pupillaire se produit également quand une personne regarde un objet de proche. Ainsi, l'accommodation et la constriction pupillaire se produisent ensemble de façon réflexe et sont excitées par le même stimulus (Shumway, 2018).

1.7 La sclère

La sclère humaine est un tissu conjonctif grossièrement sphérique, relativement avasculaire, rigide et dense recouvrant le globe postérieur à la cornée. Bien que la sclère ait de faibles besoins métaboliques de base, elle se renouvelle constamment tout au long de la vie pour maintenir ses fonctions. La principale fonction de la sclère est de fournir un cadre externe solide et résistant afin de protéger les structures intraoculaires délicates et dans le but de maintenir la forme du globe pour que l'image rétinienne ne soit pas perturbée (Shumway, 2018).

1.8 Le cristallin

C'est un tissu épithélial spécialisé, responsable de l'ajustement de l'image qui est projetée sur la rétine. Afin d'accomplir cette fonction, le cristallin doit être transparent, avoir un indice de réfraction plus élevé que le milieu dans lequel il est suspendu et avoir des surfaces de réfraction ayant la courbure appropriée. Pour maintenir la transparence et un indice de réfraction élevé, les cellules fibreuses du cristallin sont précisément alignées les unes à côté des autres et

ont la propriété d'accumuler des concentrations élevées de protéines cytoplasmiques, les cristallines (Shumway, 2018). La perturbation de l'organisation précise de ces cellules fibreuses du cristallin ou l'agrégation des protéines à l'intérieur de celles-ci peut détruire la transparence du cristallin, on parle de la formation de cataracte. Le cristallin est suspendu dans la partie antérieure de l'œil par une bande de microfibrilles, les *zonules*, qui s'insèrent dans la capsule du cristallin. Ces fibrilles proviennent de la couche non pigmentée de l'épithélium ciliaire, un tissu situé juste en arrière de l'iris. Les propriétés de réfraction du cristallin sont le résultat de la concentration élevée et de la distribution graduelle des protéines dans le cytoplasme des cellules des fibres du cristallin ainsi que de la courbure des surfaces de réfraction du cristallin (Lambert *et al.*, 1983).

1.9 Le corps vitré

Il constitue la plus grande structure unique de l'œil puisqu'il représente environ 80% du volume total de l'œil. Au niveau du segment antérieur de l'œil, le corps vitré est délimité par le corps ciliaire, les *zonules* et le cristallin. Dans le segment postérieur de l'œil, il est délimité par la rétine. Le corps vitré assure un rôle de support à la rétine, prévient et retarde le décollement de la rétine, réduit les déformations mécaniques du globe oculaire et fournit un support mécanique pour le cristallin lors de traumatisme causé à l'œil. Un détachement du corps vitré postérieur peut causer une traction sur la rétine, en particulier dans la région fovéale. Ceci est particulièrement visible dans les yeux des patients atteints de rétinopathie diabétique (O'DAY *et al.*, 1955; Hejtmancik *et al.*, 2015).

1.10 Histologie de la rétine

La rétine est un tissu neurosensoriel qui permet de transformer une image de son environnement en signal électrique avec un certain degré de traitement de l'information pour la rendre interprétable par le cortex humain. La rétine est le tissu le plus métaboliquement actif du corps humain. Comme beaucoup d'autres structures du système nerveux central, la rétine contient cinq types de neurones : les photorécepteurs, les cellules bipolaires, les cellules ganglionnaires, les cellules horizontales et les cellules amacrines. Les corps cellulaires et les prolongements de ces neurones rétiniens sont empliés en couches alternées (Fig. 1). Toutes les

cellules neuronales rétiniennes impliquées dans la phototransduction et la transmission du signal nerveux nécessitent des cellules de soutien ayant tout autant un rôle de structure que de neuroprotection et de régénération.

1.11 Les cellules gliales

1.11.1 Les cellules de Müller

Les cellules de Müller représentent le principal type de cellules gliales de la rétine qui contribuent à la structure rétinienne et à l'homéostasie (Reichenbach et Bringmann, 2013). Les cellules de Müller servent de barrières et de conduits pour le transfert d'une grande variété de molécules entre différentes cellules et compartiments de la rétine. Ils soutiennent également les neurones en libérant des facteurs trophiques, en recyclant les neurotransmetteurs et en contrôlant l'équilibre ionique dans l'espace extracellulaire (Bringmann *et al.*, 2009). Les cellules de Müller répondent aux lésions et aux maladies de la rétine en modifiant leur morphologie, leur biochimie et leur physiologie. Cette réaction aux lésions est souvent appelée gliose réactive. Cette gliose réactive peut être bénéfique pour les neurones en empêchant la neurotoxicité du glutamate et en libérant divers facteurs qui protègent les neurones de la mort cellulaire (Bringmann *et al.*, 2009). Le TNF α , cytokine pro-inflammatoire, régule la prolifération des cellules de Müller. Ce facteur est produit au niveau des cellules de Müller lorsqu'il y a mort neuronale (Nelson *et al.*, 2013). La présence de TNF α contribue aux lésions rétiniennes par l'induction dépendante de facteurs de transcription dont l'expression est nécessaire à la génération de progéniteurs dérivés de la glie de Müller. Enfin, la microglie et d'autres cellules immunitaires réagissent aussi aux lésions de la rétine en migrant vers le site de la lésion, où elles peuvent libérer des facteurs qui influent sur la prolifération des cellules de Müller.

1.11.2 Les astrocytes

Nommés d'après leur forme étoilée, les astrocytes sont presque exclusivement présentes au niveau des couches rétiniennes les plus profondes. Ces cellules nourricières sont abondantes dans le système nerveux central. Parmi les rôles bénéfiques des astrocytes, on peut citer le soutien neurotrophique, le renforcement du support mécanique des axones en dégénérescence et le maintien de la barrière hémato-rétinienne (Vecino *et al.*, 2016). La présence et la distribution des astrocytes rétiniens sont corrélées à la présence et à la distribution des vaisseaux

sanguins de la rétine (Rungger-Brandle *et al.*, 1993). Le nombre et la répartition des astrocytes dépendent de la densité des fibres nerveuses qu'ils enveloppent. En réponse à une lésion ou à une maladie, les astrocytes expriment un certain nombre de protéines qui compromettent l'intégrité de la barrière hémato-rétinienne, régulant ainsi positivement l'expression de divers gènes codant pour des cytokines, des chimiokines et favorisant la dégénérescence rétinienne (Kim *et al.*, 2006).

1.11.3 Les microglies

Les microglies forment une population de macrophages résidents dans le système nerveux central qui non seulement ont une activité immunitaire mais participent également au développement et à la maintenance des réseaux de neurones, ainsi qu'à l'homéostasie tissulaire (Fernandes *et al.*, 2014). Dans la rétine normale, ces cellules présentent un petit corps cellulaire de forme ovoïde et de multiples ramifications et sont distribuées de manière homogène principalement au niveau de la couche des cellules ganglionnaires (Fernandes *et al.*, 2014). Dans la rétine saine, les microglies sont situées dans la rétine interne et sont rares ou inexistantes dans la rétine externe et la zone rétino-choroïdienne. Cependant, dans un contexte inflammatoire, la distribution de la microglie change radicalement. Les microglies activées migrent vers les localisations sous-rétiniennes. Elles entrent même en contact étroit avec les dépôts de drusen dans le cas d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge. En réponse à une inflammation, la microglie sécrète des cytokines et chimiokines, ROS (espèces réactives à l'oxygène), oxyde nitrique (NO), phospholipase A2, IGF (facteur de croissance analogue à l'insuline), FGF-2 (facteur de croissance des fibroblastes 2) (Jha *et al.*, 2013).

1.12 Les photorécepteurs

La rétine comprend deux types de photorécepteurs : Les cônes et les bâtonnets. Ces photorécepteurs possèdent un segment interne, contenant le noyau cellulaire, et un segment externe se rapprochant de l'épithélium pigmentaire composé de disques membraneux chargés de pigments photosensibles. La transmission synaptique entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires est modulée par les cellules horizontales. Les cellules bipolaires peuvent être divisées en deux grandes classes, celles répondant aux cônes et celles répondant aux bâtonnets. Les cellules bipolaires en forme de bâtonnet contactent principalement les photorécepteurs en

bâtonnets alors que les cellules bipolaires coniques font en majorité synapses avec les photorécepteurs coniques (Hoon *et al.*, 2014). De plus, les cellules bipolaires forment deux sous-classes fonctionnelles: celles qui se dépolarisent (ON) et celles qui s'hyperpolarisent (OFF). Les cônes des cellules bipolaires entrent en contact avec les cellules ganglionnaires rétiniennes et les cellules amacrines au niveau de la couche plexiforme interne (IPL). Les cellules ganglionnaires sont les seuls neurones de la rétine projetant leur axone vers des centres visuels supérieurs (Levin *et al.*, 2011).

La lumière doit traverser la plupart des couches rétinienne afin de stimuler la couche de photorécepteurs; les bâtonnets et les cônes. Une fois que les photorécepteurs transforment les signaux lumineux en signaux électriques, ceux-ci sont amplifiés puis intégrés dans les circuits des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et ganglionnaires (Fig. 3).

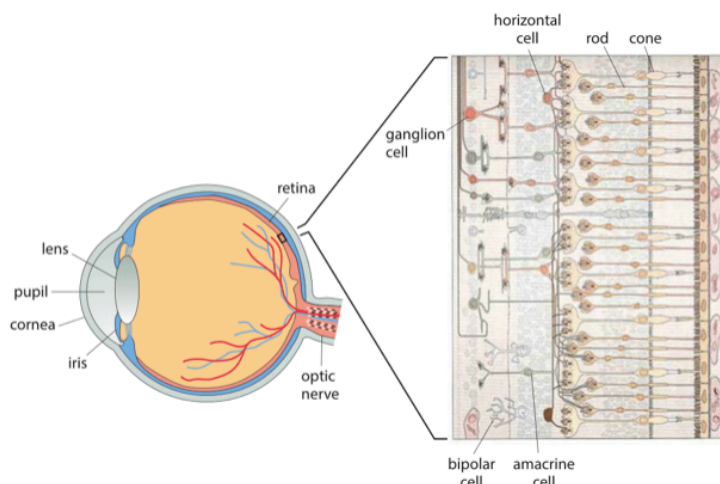


FIGURE 3 : ORGANISATION DES DIFFÉRENTS TYPES CELLULAIRES DE LA RÉTINE

Le traitement de signal se fait en quatre étapes : photoréception, transmission aux cellules bipolaires, transmission aux cellules ganglionnaires et la transmission le long du nerf optique. À chaque stade synaptique, il y a également des cellules horizontales et amacrines connectées latéralement (Milo *et al.*, 2015).

1.13 Les différentes couches rétinienne

Histologiquement, la rétine peut être divisée en 10 couches. De la partie interne à la partie externe de la rétine, ces couches rétinienne sont organisées comme suit : La première couche, la membrane limitante interne (ILM) est formée par les extrémités coniques des cellules de Müller et des astrocytes (cellules gliales de la rétine). La deuxième couche, la couche de fibres nerveuses (NFL) se compose d'axones de cellules ganglionnaires, de vaisseaux rétinien et de cellules gliales. La troisième couche, la couche des cellules ganglionnaires (GCL), contient principalement les noyaux des cellules ganglionnaires, les vaisseaux sanguins, les cellules gliales et certaines cellules amacrines. La quatrième couche est la couche plexiforme interne (IPL) où interagissent les cellules bipolaires, amacrines et ganglionnaires. La cinquième couche, la couche nucléaire interne (INL) contient les noyaux des cellules bipolaires, horizontales, amacrines et Müller. La sixième couche est la couche plexiforme externe (OPL) où les cellules photoréceptrices se connectent aux cellules bipolaires, et où les cellules horizontales interagissent étroitement avec les photorécepteurs et les cellules bipolaires. La septième couche, la couche nucléaire externe (ONL) renferme les noyaux des cellules photoréceptrices. La huitième couche, la membrane limitante externe (OLM) est créée par des complexes de jonction entre les cellules de Müller adjacentes ainsi qu'entre les cellules de Müller et les cellules photoréceptrices. La neuvième couche, la couche de photorécepteur (PL) contient des cônes et des bâtonnets étroitement empilés les uns sur les autres. La dixième couche résulte de complexes jonctionnels serrés entre les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) formant une monocouche continue. L'EPR est une monocouche cellulaire située sous la rétine neurale. Les fonctions-clés de la couche d'EPR sont de soutenir les cellules photoréceptrices sous-jacentes et de réguler le transport à travers la barrière hémato-rétinienne (Stern *et al.*, 2015). L'EPR est séparé de la choriocapillaire (réseau de capillaires qui alimentent la rétine externe) par la membrane de Bruch qui est composée de 5 couches : une membrane basale des choriocapillaires, une couche de collagène externe, une couche élastique centrale, une couche de collagène interne et la membrane basale de l'EPR (Fig.4). Des changements histologiques sont observés pendant la rétinopathie diabétique, principalement dans la couche nucléaire interne et la couche plexiforme externe et contribuent en partie à l'épaississement maculaire (Fig.5). La microscopie électronique a montré une accumulation de fluides extracellulaires, un

gonflement intracytoplasmique des cellules de Müller pouvant contribuer au mécanisme physiopathologique de l'œdème maculaire. On observe également un regroupement de fluides extracellulaires entre les segments externes et l'épithélium pigmentaire rétinien dans les yeux avec un détachement de rétine.

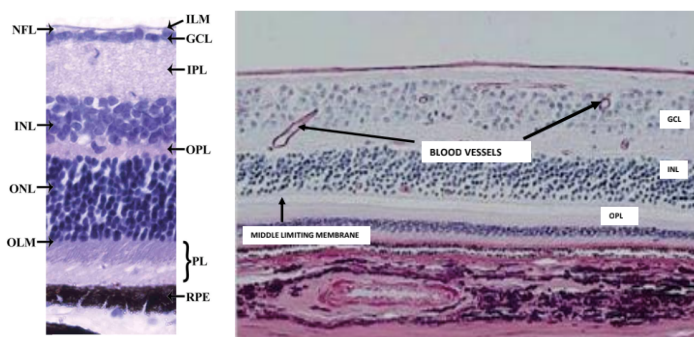


FIGURE 4: LES DIFFÉRENTES COUCHES RÉTINIENNES

Les dix couches de la rétine comprenant la membrane limitante interne (ILM); la couche de fibres nerveuses (NFL); la couche de cellules ganglionnaires (GCL); la couche plexiforme interne (IPL); la couche nucléaire interne (INL); la couche plexiforme externe (OPL); la couche nucléaire externe (ONL); la membrane limitante externe (OLM); la couche photoréceptrice (PL), la monocouche d'épithélium pigmenté rétinien (RPE) et la choroïde. Tirée de Willermain *et al.*, 2014.

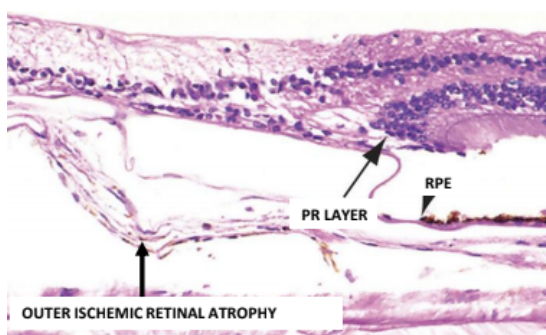


FIGURE 5: CHANGEMENT DE LA STRUCTURE DES DIFFÉRENTES COUCHES VASCULAIRES RÉTINIENNES

Lors d'une ischémie rétinienne, on assiste à une modification au niveau de la structure de ces différentes couches rétinienne. On observe notamment une perte du trois-quarts de la RPE (épithélium pigmentaire rétinien), du tiers de la couche INL (couche nucléaire interne) et une perte totale des couches ONL (couche nucléaire externe) et OPL (couche plexiforme externe) Tiré de Simo *et al.*, 2010.

Les photons traversent d'abord la rétine neuronale avant d'activer les cellules photoréceptrices. Ainsi, une réduction du courant circulant déclenche une modification de la signalisation excitatrice des cellules bipolaires et, par la suite, des cellules ganglionnaires. Les réponses des cellules bipolaires et ganglionnaires sont modulées par les réponses des cellules horizontales et amacrines, respectivement. Les axones des cellules ganglionnaires convergent pour former le nerf optique qui transmet à son tour le signal au cerveau (Levin *et al.*, 2011; Willermain *et al.*, 2014).

1.14 Le système vasculaire rétinien

Le développement vasculaire rétinien est achevé avant la naissance chez l'homme, contrairement à la souris et au rat, où il se développe après la naissance pour éventuellement former un réseau vasculaire structurellement similaire à celui des primates. (Hartnett, 2013) La rétine est alimentée par deux systèmes vasculaires: l'artère rétinienne centrale qui fournit la rétine interne, et la choriocapillaire qui fournit à son tour l'épithélium pigmentaire et la rétine externe (principalement des photorécepteurs) (Sun et Smith, 2018). Les vaisseaux rétiens fournissent du sang aux neurones rétiens internes. La couche de photorécepteur avasculaire repose sur la choriocapillaire située sous l'épithélium pigmentaire rétinien pour fournir de l'oxygène par diffusion (Sun et Smith, 2018). La choroïde compose jusqu'à 85% du volume sanguin dans l'œil. Ce plexus vasculaire sinusoïdal fortement pigmenté, provient de deux branches de l'artère ophtalmique: les courtes artères ciliaires postérieures, qui alimentent la partie postérieure de la choroïde et les longues artères ciliaires postérieures, qui alimentent la choroïde antérieure, le corps ciliaire et l'iris (Hartnett, 2013).

La croissance pathologique des vaisseaux sanguins dans l'œil menace la vision normale. L'angiogenèse dérégulée perturbe l'apport en oxygène et en nutriments, entraînant une offre

métabolique déséquilibrée, une surdemande et une perturbation de la fonction rétinienne neurale. Dans la rétinopathie diabétique, l'hyperglycémie peut conduire au développement d'une microangiopathie, notamment des microanévrismes, des hémorragies et un épaissement de la membrane basale (Nentwich et Ulbig, 2015). La vasculature, composée de vaisseaux de morphologies et de fonctions différentes, distribue le sang dans tous les tissus et maintient l'homéostasie des tissus physiologiques. Dans le diabète, le processus vasculaire est souvent affecté. Cela peut entraîner une formation excessive de nouveaux vaisseaux, instables et hyper perméables à faible débit sanguin, ce qui favorise davantage l'hypoxie et la propagation de la maladie (Fig.6).

Par ailleurs, la rupture de la membrane de Bruch est l'un des premiers stades de la néovascularisation d'origine choroïdienne pendant la dégénérescence maculaire liée à l'âge et est suivie aussi par la prolifération de tissu néovasculaire choroïdien envahissant l'espace sous-rétinien. La formation de vaisseaux sous-rétiens pathologiques peut provenir non seulement de la choroïde mais aussi parfois du système vasculaire rétinien (Sun et Smith, 2018).

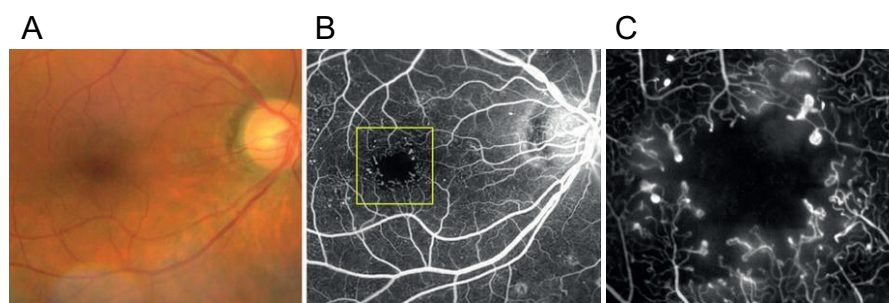


FIGURE 6: MICROVASCULATURE DANS LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE

Image d'un œil droit d'un homme atteint de rétinopathie proliférative (A). Une photographie du fond d'œil montrant de nombreux microanévrismes dispersés dans la région maculaire (B). Région agrandie du carré jaune où on est capable d'observer la prolifération pathologique et la tortuosité des nouveaux vaisseaux sanguins rétiens (C) (Pinhas et al., 2013).

1.15 La barrière hémato-rétinienne

Les barrières hémato-oculaires comprennent deux principaux systèmes de barrière: la barrière hémato-aqueuse et la barrière hémato-rétinienne qui sont fondamentales pour préserver les tissus oculaires internes des différentes variations. La barrière hémato-rétinienne (BHR) joue un rôle fondamental dans le microenvironnement de la rétine et des neurones rétiniens. Elle régule les fluides et les mouvements moléculaires entre les lits vasculaires oculaires et les tissus rétiniens et prévient également la fuite des macromolécules et d'autres agents potentiellement nocifs pour la rétine (Cunha-Vaz *et al.*, 2011). Formée par des jonctions serrées (*zonula occludentes*) entre les cellules endothéliales rétiniennes voisines, la structure principale de la BHR est constituée principalement par une couche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale couverte par des astrocytes et des cellules de Müller. Des péricytes sont également présents sur la lame basale et sont en contact étroit avec les cellules endothéliales. Les astrocytes, les cellules de Müller et les péricytes influencent l'activité des cellules endothéliales rétiniennes au niveau de la BHR en transmettant aux cellules endothéliales des signaux de régulation lorsqu'il y a un quelconque changement (Cunha-Vaz *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014) (Fig. 7).

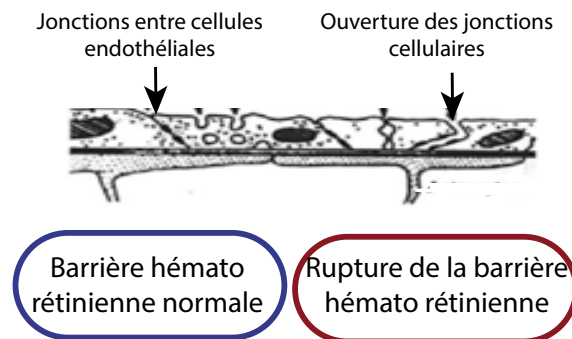


FIGURE 7: STRUCTURE DE LA BARRIÈRE HÉMATO-RÉTINIENNE

Les jonctions entre les cellules endothéliales forment la barrière hémato-rétinienne interne. Dans les conditions pathologiques, la sécrétion de cytokines et l'expression de facteurs de croissance participent à l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne. Tiré de Zhang *et al.*, 2014.

L'œdème maculaire est le résultat d'une accumulation de fluide dans les couches rétinienne et dans la plupart des cas, elle est associée à une modification de la BHR. La rupture de la BHR est produite par des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance libérés localement et pouvant modifier la perméabilité des molécules de jonctions qui assurent le maintien de l'intégrité de la BHR. La rupture de la BHR semble également être relayée par une libération de NO (Cunha-Vaz *et al.*, 2011).

1.16 L'approvisionnement vasculaire de la rétine et de la choroïde

L'arrivée des substrats métaboliques et de l'oxygène à la rétine chez les mammifères supérieurs, y compris les humains et les autres primates, est réalisée par deux systèmes vasculaires distincts: les systèmes rétinien et choroïdien.

L'artère rétinienne centrale émerge au disque optique où elle se divise en deux branches principales. Celles-ci se divisent à leur tour en artérioles s'étendant vers l'extérieur à partir du disque optique, chacune remplissant un quadrant de la rétine. Les artères et les veines rétinienne se divisent par des ramifications dichotomiques et latérales. Les plus gros vaisseaux se trouvent dans la partie la plus interne de la rétine, à proximité de la membrane limitante interne. Leurs parois sont en relation spatiale étroite avec les cellules gliales et principalement les astrocytes. Ces derniers jouent un rôle capital dans le maintien et l'intégrité des vaisseaux sanguins rétinien (Levin *et al.*, 2011; Bird et Stawicki, 2017). Les artérioles rétinienne donnent naissance à un plexus de capillaires, ces capillaires forment un réseau interconnecté à deux couches : une première couche, située dans la couche des fibres nerveuses et des cellules ganglionnaires. La seconde couche, plus profonde, se trouve dans la couche nucléaire interne. Les artérioles précapillaires et les veinules post-capillaires qui constituent les vaisseaux terminaux, sont reliés par le lit capillaire. La veine rétinienne centrale nourrit l'œil à travers le nerf optique pour drainer le sang veineux dans le sinus caverneux (Levin *et al.*, 2011). Ainsi, le système vasculaire rétinien, les branches terminales des vaisseaux, les artérioles pré-capillaires et les veinules post-capillaires, sont tous liés à travers des capillaires anastomotiques. L'unité capillaire se compose d'un endothélium continu et de péricytes qui se prolongent longitudinalement le long du capillaire. Ces deux types de cellules sont en communication directe via des complexes de jonction gap et partagent une membrane basale commune (Oku *et al.*, 2001).

Le système vasculaire de la choroïde quant à lui, dérive de l'artère ophtalmique par l'intermédiaire des branches des artères ciliaires principales nasales et temporales et des artères ciliaires antérieurs, qui alimentent l'hémisphère correspondant de la choroïde. Chez de nombreuses espèces, la circulation choroïdienne alimente la rétine interne et la rétine externe, car les vaisseaux sanguins de la rétine sont absents. La circulation de la choroïde est essentielle pour fournir de l'oxygène et des nutriments, car les capillaires de la choroïde sont fenêtrés, avec des pores particulièrement importants. Ces fenestrations ont une perméabilité élevée non seulement au glucose mais aussi à des substances de faible poids moléculaire telles que l'albumine. Dans la rétine, les capillaires sont de type continu (les parois ne sont pas fenêtrées), constituant la barrière hémato-oculaire, et sont imperméables aux molécules de faible poids moléculaire, telles que le glucose et les acides aminés (Bill *et al.*, 1980; Nickla et Wallman, 2010). La paroi de ces capillaires rétiniens est composée de trois éléments distincts: les cellules endothéliales, les péricytes et la lame basale. La couche continue des cellules endothéliales est entourée d'une lame basale à l'intérieur de laquelle se trouve une couche discontinue de péricytes, ces cellules hautement contractiles jouent un rôle important dans la régulation du flux sanguin rétinien.

1.17 La régulation du flux sanguin rétinien

En raison de la forte activité métabolique de la rétine, la capacité de réguler le flux sanguin est une caractéristique essentielle de la rétine chez les mammifères. Le débit sanguin à travers un vaisseau sanguin dépend de la pression de perfusion, la pression qui conduit le sang à travers le vaisseau, et la résistance générée par les vaisseaux. Dans la rétine, les substances libérées par les cellules endothéliales ou gliales, régulent les réponses vasomotrices, affectant le tonus artériolaire. Ces facteurs comprenant le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂), l'endothéline-1 (ET-1), l'angiotensine II, la thromboxane-A₂ (TXA₂) et la prostaglandine H₂ (PGH₂), qui peuvent avoir un effet vasodilatateur ou vasoconstricteur. Chez les mammifères, la rétine maintient un taux anormalement élevé de glycolyse. Environ 90% du glucose total utilisé est converti en lactate. Ce dernier semble induire probablement la libération de substances vasoactives endothéliales telles que le NO et la prostacycline (Levin *et al.*, 2011).

1.18 L'autorégulation du débit sanguin rétinien

Pour l'œil tout comme le cerveau, les mécanismes d'autorégulation global permettent d'assurer une pression de perfusion constante malgré les variations de la pression sanguine. Les variations de la pression de perfusion ne provoquent pas de variations proportionnelles du flux sanguin en raison de la dilatation compensatoire des artérioles. En conséquence, le débit sanguin redevient normal peu de temps après le changement de pression. La rétine a tendance à maintenir un flux sanguin constant face aux variations de la pression de perfusion, des gaz sanguins et de la pression intra-oculaire (Nickla et Wallman, 2010). Grâce à cette capacité d'autorégulation de la rétine, le taux d'oxygène (PO_2) se trouvant dans la moitié interne de la rétine reste largement non affecté par des augmentations modérées de la pression intra oculaire (Robinson *et al.*, 1986). Le débit sanguin régional est contrôlé par des mécanismes de rétroaction qui sont sensibles aux variations des concentrations ioniques et moléculaires des sous-produits. Ces sous-produits, tels que le potassium (K^+), NO, l'adénosine, le dioxyde de carbone (CO_2) et les métabolites de l'acide arachidonique, peuvent modifier directement ou indirectement le flux sanguin par dépolarisation (ou hyperpolarisation) via les cellules musculaires lisses vasculaires qui déclenchent une vasodilatation (ou vasoconstriction) (Pasley et Ralph, 2008).

Le débit sanguin local peut être contrôlé aussi par un mécanisme impliquant la signalisation neuronale par l'intermédiaire des neurotransmetteurs (Hamann *et al.*, 2002; Pasley et Ralph, 2008). Plusieurs études suggèrent que les astrocytes jouent un rôle important dans l'activité des neurotransmetteurs et la réponse vasculaire. Ces derniers constituent un élément essentiel pour le recyclage du glutamate. Une cascade d'événements chimiques dans l'astrocyte peut ensuite lier le taux de glutamate à la production d'agents vasoactifs (Cauli *et al.*, 2004).

Le contrôle actif du débit sanguin dans la circulation rétinienne se produit principalement dans les artérioles à la surface de la rétine. Ces vaisseaux sont entourés par une couche de cellules musculaires lisses (Herman et D'Amore, 1985). Il est possible que le contrôle actif du débit sanguin se produise également dans des capillaires rétiens, qui sont entourés par les péricytes contractiles (Pasley et Ralph, 2008). Ces derniers se trouvent sur presque tous les capillaires, ainsi que sur les petites artérioles et veinules. Ce sont de petites cellules situées à l'extérieur du vaisseau, entre la couche de cellules endothéliales et le parenchyme (Fig. 8).

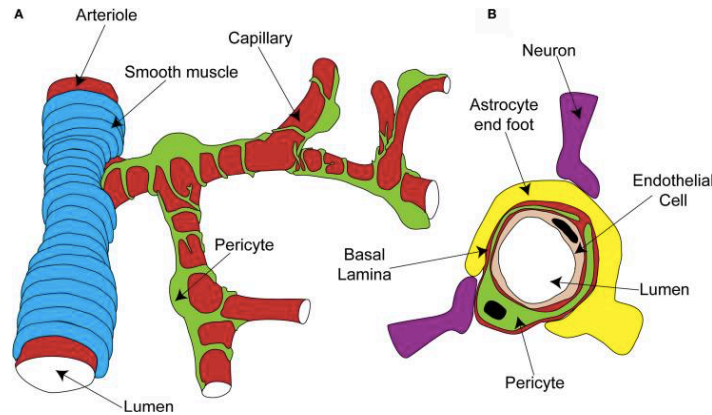


FIGURE 8: ORGANISATION DE L'UNITÉ NEUROVASCULAIRE CAPILLAIRE

A. Les péricytes entourent les capillaires et les muscles lisses entourent les artérioles. B. Les capillaires sont composés de cellules endothéliales reliées entre elles par des jonctions serrées. Les péricytes sont situés à l'extérieur des cellules endothéliales et sont séparés du parenchyme par la lame basale. Les astrocytes encerclent aussi toute la périphérie du capillaire. Des terminaisons neuronales sont associées au capillaire au niveau du parenchyme. Tirée de Hamilton *et al.*, 2010.

Les péricytes ont un rôle de soutien, mais ils ont aussi la propriété de se contracter en réponse à différentes molécules de signalisation (Peppiatt *et al.*, 2006). Comme pour les cellules musculaires lisses vasculaires, la contraction des péricytes est contrôlée par la concentration de calcium intracellulaire. Comme attendu, la dépolarisation et l'augmentation du calcium intracellulaire favorisent la contraction des péricytes, alors que l'hyperpolarisation et la diminution du calcium intracellulaire favorisent une dilatation. Une voie importante qui hyperpolarise et relaxe les cellules musculaires lisses vasculaires est l'activation des canaux potassiques (Hamilton *et al.*, 2010). Les péricytes peuvent moduler le diamètre des capillaires *in vitro*, ce qui suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans la régulation *in vivo* de la circulation sanguine.

1.19 La régulation du flux sanguin choroïdien

Contrairement à la rétine, la circulation choroïdienne est contrôlée par une innervation autonome extrinsèque. Les diminutions du flux sanguin choroïdien sont provoquées par

l'activation des nerfs efférents sympathiques qui libèrent la noradrénaline, activant les récepteurs adrénergiques alpha-1 sur les cellules musculaires lisses vasculaires (Kawarai et Koss, 1998). Les augmentations du flux sanguin choroïdien sont causées par des nerfs efférents parasympathiques qui agissent via la signalisation NO (Nilsson *et al.*, 1996). La choroïde reçoit également une innervation riche à partir des fibres sensorielles du trijumeau. Le flux sanguin choroïdien assure une protection passive contre des changements de température (Parver, 1991). Bien que controversée, une autorégulation dans le système vasculaire choroïdien ne semble pas exister, la circulation sanguine dans la choroïde pourrait être provoquée en réponse à un stimulus (Parver, 1991; Kura *et al.*, 2012). Par exemple, chez l'homme, lorsque la température de la surface oculaire augmente en réponse à une augmentation de l'intensité lumineuse, une élévation du débit sanguin choroïdien peut être observée (Parver *et al.*, 1983).

1.20 Comparaison des mécanismes de régulation rétinienne et choroïdienne

Le principal apport sanguin à la rétine est la choroïde. Pour obtenir ce transport élevé d'oxygène à partir de la choroïde, malgré les barrières de la membrane de Bruch et de l'épithélium pigmentaire rétinien, il faut un fort gradient en oxygène, maintenu par le flux sanguin élevé dans la choroïde (Nickla et Wallman, 2010). Tel que discuté précédemment, les systèmes vasculaires rétinien et choroïdien ont des propriétés hémodynamiques très différentes. La circulation rétinienne a un débit sanguin sensiblement inférieur et un niveau d'oxygène plus élevé que la circulation choroïdienne. Le flux sanguin rétinien présente une autorégulation (Kur *et al.*, 2012), alors que dans le système vasculaire choroïdien, l'autorégulation est très controversée. Par exemple, lorsque la pression artérielle est diminuée par occlusion partielle de la veine cave thoracique chez les lapins, le débit sanguin choroïdien demeure maintenu à des niveaux contrôle (Kiel et Shepherd, 1992). Certaines études ont montré une réponse du flux sanguin choroïdien à la baisse de la pression de perfusion oculaire comme preuve de l'autorégulation (Polska *et al.*, 2007; Nickla et Wallman, 2010; Ku *et al.*, 2012). Une autre fonction proposée du débit sanguin extrêmement élevé de la choroïde consisterait à protéger la rétine des dommages causés par des températures chaudes ou froides ou de la chaleur dégagée lors d'une exposition à des lumières vives (Bill *et al.*, 1983). En général, la stimulation par la lumière s'est avérée avoir peu d'effet sur la circulation choroïdienne contrairement à la rétine.

Une étude de fluxmétrie par laser chez le rat a montré que lorsque la rétine est stimulée par la lumière, le débit sanguin augmente dans la région stimulée (Srienc *et al.*, 2010).

Le débit sanguin normal de la rétine et de la choroïde peut être altéré dans un certain nombre de troubles affectant l'œil, notamment dans la rétinopathie diabétique et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Les sections suivantes décrivent les modifications du débit sanguin oculaire observées dans ces conditions.

1.21 La rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique est considérée comme une complication multifactorielle du diabète caractérisée principalement par l'atteinte progressive de la microvascularisation rétinienne. Elle représente la principale cause de perte de vision sévère dans la population adulte. Au Canada, elle entraîne environ 600 nouveaux cas de cécité légale chaque année. La rétinopathie diabétique se développe chez les patients atteints de diabète de types 1 et 2. Environ 80% des diabétiques présentent des signes cliniques de rétinopathie et 10% d'entre eux sont affectés par une perte de vision (Frank, 2004). L'organisation mondiale de la santé estime qu'à travers le monde, le nombre de personnes atteintes par cette maladie oculaire risque d'augmenter de façon inquiétante d'ici 2030 puisque la population diabétique devrait doubler pour atteindre les 360 millions de personnes. Le sexe et l'âge ne semblent pas affecter la prévalence de la rétinopathie diabétique. Dans le diabète, l'altération de la rétine touche essentiellement le système vasculaire, les neurones et les cellules gliales entraînant finalement une angiogenèse rétinienne et par conséquent une perte de la vision (Frank, 2004).

1.22 Les signes cliniques de la rétinopathie diabétique

La rétinopathie diabétique peut être subdivisée principalement en trois stades en fonction de l'évolution des altérations vasculaires (stades non-prolifératif, pré-prolifératif et prolifératif). Six grades ont été décrits basés sur les différentes caractéristiques de la maladie (Tableau I). Le grade de chaque œil est déterminé par le grade le plus bas compatible avec les caractéristiques présentes. Les changements présents au premier stade non-prolifératif de la rétinopathie diabétique sont une altération du diamètre des vaisseaux rétiniens, une augmentation de la perméabilité vasculaire et une perte des péricytes. La rupture de la barrière hémato-rétinienne

interne conduit à l'apparition de signes cliniques tels que micro-anévrysmes (Fig. 9), hémorragies rétiniennes et accumulation de fluides sous forme de dépôts exsudatifs (Liu et Feener, 2013).

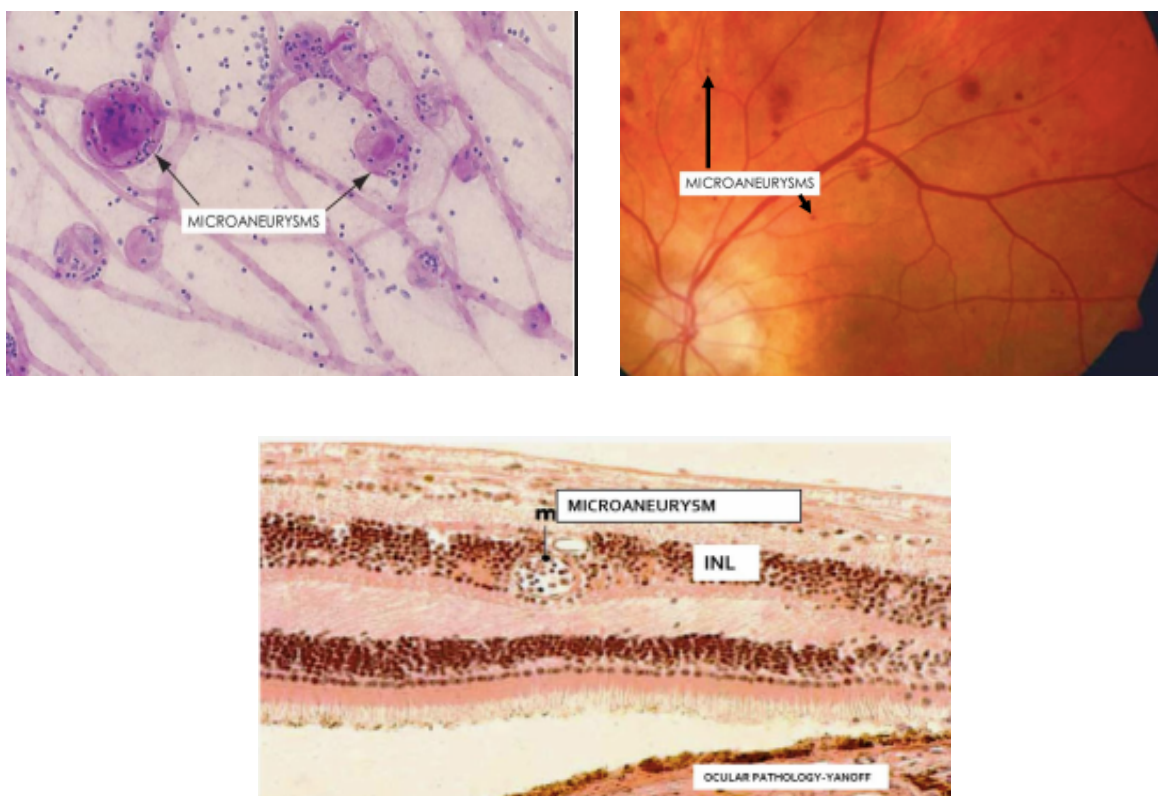


FIGURE 9: FORMATION DES MICRO-ANÉVRISMES AU STADE NON PROLIFÉRATIF

Apparition de micro-anévrysmes sous forme de dilatation des capillaires rétiniens (Gauche). Ils apparaissent comme des points rouges, généralement vus au pôle postérieur, en particulier temporal à la fovéa (Droite) au niveau de la couche nucléaire interne (Milieu). Tiré de Farmer, 2018.

Les modifications ultérieures comprennent l'aggravation de ces premiers changements et le développement d'anomalies micro-vasculaires intra-rétiniennes. Bien que ces changements seuls ne causent pas habituellement d'atteinte fonctionnelle, la progression et l'accumulation de ces modifications conduisent à une mauvaise perfusion capillaire, entraînant ainsi une ischémie et une hypoxie progressive : c'est le stade pré-prolifératif. Chez certains patients, la rétinopathie diabétique pré-proliférative peut progresser au stade prolifératif impliquant la formation de néo-vaisseaux pré-rétiniens désorganisés, fragiles et perméables dont l'incompétence peut conduire

à la formation d'hémorragies massives et de fibrose (Fig. 10). Le stade ultime, conséquence du remaniement rétinien et de la fibrose, est le décollement rétinien par traction (Antonetti *et al.*, 2012; Liu et Feener, 2013).

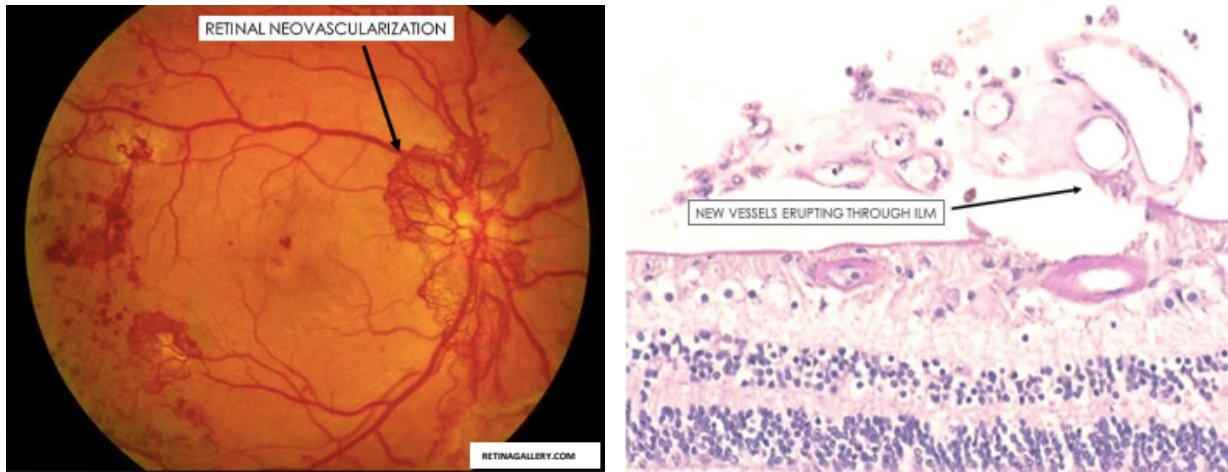


FIGURE 10: NÉOVASCULARISATION RÉTINIENNE

Schéma d'une néovascularisation rétinienne au stade prolifératif (Gauche). Coupe histologique d'une rétine avec apparition et croissance de nouveaux vaisseaux rétiens (Droite). Tiré de Framer, 2018.

1.23 Physiopathologie de la rétinopathie diabétique

Les mécanismes précis conduisant à la rétinopathie diabétique restent mal connus. Toutefois, de nombreuses études ont mis en évidence l'impact des espèces réactives oxygénées (ROS), le système rénine-angiotensine, l'activation de la protéine kinase C (PKC), les produits terminaux de glycation, diverses cytokines et chimiokines et des facteurs de croissance tel le VEGF ou encore le facteur de croissance 1 lié à l'insuline (IGF-1) (Tarr *et al.*, 2013). L'ensemble de ces anomalies entraîne une réponse inflammatoire vasculaire et une dysfonction endothéliale conduisant à l'ensemble des signes cliniques observables.

La rétine présente une teneur élevée en acides gras polyinsaturés et un métabolisme aérobie particulièrement élevé. Tous ces phénomènes font que la rétine est plus susceptible au

stress oxydatif. Le lien entre l'hyperglycémie et le stress oxydatif semble être un événement clé dans la pathogenèse de la rétinopathie diabétique (Kowluru et Chan, 2007). Le stress oxydatif est non seulement impliqué dans le développement de la rétinopathie diabétique mais aussi dans la résistance de cette maladie à se résorber même après un bon contrôle glycémique. Cette résistance est probablement due à l'accumulation des ROS (Kowluru et Chan, 2007). Les ROS sont produits en continu dans toutes les cellules à la suite des fonctions cellulaires normales.

Rétinopathie diabétique	Description
R0 (Pas de rétinopathie visible)	Aucune rétinopathie diabétique nulle part
R1 (Stade pré-prolifératif)	La présence d'au moins une des caractéristiques suivantes n'importe où <ul style="list-style-type: none"> - Hémorragies ponctuelles - Microanévrismes - Exsudats durs - Taches de coton - Hémorragies - Hémorragies superficielles
R2	Présence de quatre hémorragies ou plus dans un hémichamp seulement (hémichamps inférieurs et supérieurs délimités par une ligne passant par le centre de la fovéa et le disque optique)
R3	Présence de l'une des caractéristiques suivantes: <ul style="list-style-type: none"> - Quatre hémorragies ou plus dans les hémichamps inférieurs et supérieurs
R4 (Stade prolifératif)	Présence de l'une des caractéristiques suivantes: <ul style="list-style-type: none"> - Nouveaux vaisseaux actifs - Hémorragie vitreuse
R5	La rétine n'est pas suffisamment visible pour l'évaluation

Tableau 1 : Caractéristiques de la rétinopathie diabétique

(Adapté de Scottish Diabetic Retinopathy Grading, 2007)

Cependant, l'excès de production des ROS provenant de sources endogènes ou exogènes peut avoir des conséquences pathologiques graves sur l'intégrité tissulaire.

La rétine est le tissu le plus métaboliquement actif du corps humain et, par conséquent, elle est très sensible à la réduction des niveaux d'oxygène (Kowluru *et al.*, 2007). La surexpression de la NADPH oxydase (un complexe enzymatique membranaire appartenant à la classe des oxydo-réductases et responsable de la synthèse des ROS) se produit dans le diabète précoce et pourrait contribuer à augmenter considérablement la formation de l'anion superoxyde. Ce dernier, réagit immédiatement avec le NO pour générer le peroxynitrite (ONOO⁻), une molécule hautement toxique. La perte de l'effet vasodilatateur du NO entraîne à son tour une altération du tonus vasculaire et un dysfonctionnement endothélial (Bhat *et al.*, 2014).

1.24 Les différentes voies impliquées dans le développement de la rétinopathie diabétique

Les différentes voies impliquées dans le développement de la rétinopathie diabétique sont résumées à la Figure 11.

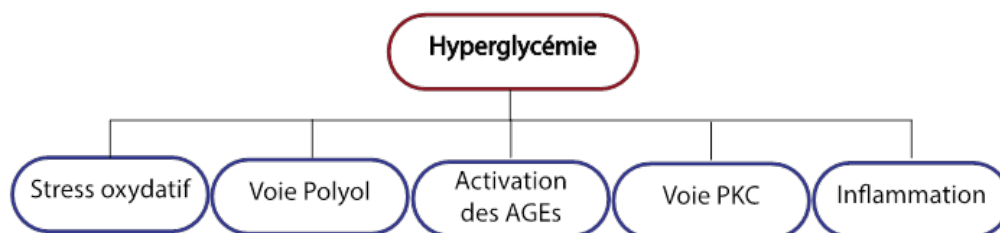


FIGURE 11: LES DIFFÉRENTES VOIES IMPLIQUÉES DANS LE DÉVELOPPEMENT DE LA RÉTINOPATHIE DIABÉTIQUE

L'hyperglycémie, le stress oxydatif, la voie polyol, l'activation des AGSs, la voie PKC entraînent une réponse inflammatoire vasculaire et une dysfonction endothéliale

1.24.1 La voie Polyol

L'accumulation de glucose favorise aussi le flux de glucose à travers la voie du polyol conduisant à la conversion du glucose en sorbitol et en fructose. L'aldose réductase réduit le glucose en sorbitol d'une manière dépendante de la NADPH. Le sorbitol est finalement

métabolisé en fructose par la sorbitol déshydrogénase qui utilise le NAD^+ comme cofacteur (Lorenzi. 2007, Eshaq *et al.*, 2017). Cela déclenche des dommages vasculaires via les ROS, qui endommagent l'ADN, les lipides et les protéines. Le sorbitol conduit à une atteinte de l'endothélium vasculaire rétinien, à la perte des péricytes et à l'épaississement de la membrane basale. De plus, une activité accrue de la voie du sorbitol est connue pour générer un stress oxydatif qui contribue aux complications du diabète en raison de l'épuisement des antioxydants importants, en particulier, le glutathion (GSH) et l'ascorbate (Obrosova, 2005).

1.24.2 Activation des produits finaux de glycation avancée (AGEs)

Les produits finaux de glycation avancée (AGEs); des protéines ou des lipides qui deviennent glyqués à la suite de l'exposition aux sucres, ont été impliqués dans la perte de vision, en particulier dans la rétinopathie diabétique. Les AGEs affectent particulièrement les fonctions cellulaires en réticulant (*cross-link*) les molécules clés dans la membrane basale, ou encore en initiant les cascades de signalisation qui altèrent les fonctions cellulaires (Singh *et al.*, 2014). Les AGEs inhibent également la synthèse de l'ADN, augmentent le niveau d'expression du VEGF et du facteur de transcription NF- κ B dans l'endothélium vasculaire et participent à la mort cellulaire des péricytes rétiniens (Maeda *et al.*, 2014).

1.24.3 La voie PKC

La PKC est constituée d'une famille d'enzymes étroitement apparentés (Les PKC classiques contiennent les isoformes α , β I, β II et γ , qui nécessitent du Ca^{2+} et le DAG pour exprimer leur activité aux sites membranaires). Les nouvelles PKC formées des isoformes δ , ϵ , η et θ , nécessitent le DAG, mais pas de Ca^{2+} pour leur activation (Steinberg, 2008). Chaque membre de cette famille d'enzymes présente des caractéristiques biochimiques bien distinctes. Dans la rétinopathie diabétique, l'activation de la PKC peut favoriser le stress oxydatif via la production accrue de NO et la voie NADPH oxydase, entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire, une perte de péricytes, des modifications du débit sanguin rétinien et une angiogenèse anormale (Williams *et al.*, 1997).

1.24.4 L'inflammation

L'inflammation joue également un rôle capital durant le diabète où la iNOS, les leucotriènes et la cyclooxygénase-2 (COX-2) sont fortement augmentés. Les niveaux

d'expression du VEGF-A et de son récepteur (VEGF-R2) sont fortement augmentés dans la rétinopathie diabétique (Pouliot *et al.*, 2012). La surexpression du VEGF se produit principalement dans les cellules ganglionnaires et les cellules de Müller entraînant une hyperperméabilité et une tortuosité au niveau des vaisseaux rétiniens (Pouliot *et al.*, 2012). L'inhibition du VEGF diminue significativement la néovascularisation permettant une amélioration fonctionnelle chez de nombreux patients (Bainbridge *et al.*, 2001).

Le stress oxydatif induit par l'hyperglycémie active le NF- κ B qui se déplace dans le noyau pour stimuler la transcription des cytokines pro-inflammatoires, des protéines de la phase aiguë, des chimiokines, la COX-2, la iNOS, IL-1 β , TNF- α , l'IL-6 et la MCP1 (Kern, 2007). La COX-2 intervient dans la production de prostaglandines vasoactives et de thromboxane A2. L'expression de COX-2 et la production de prostaglandines sont augmentées dans la rétine des rats diabétiques (Du *et al.*, 2004). Des études chez les souris knock-out iNOS ont montré que la leucostase, la dégénérescence des cellules endothéliales et des capillaires de la rétine, ainsi que la production de O₂^{•-} sont réduites lors du diabète chez ces souris (Du *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2007). L'IL-1 β contribue à la dégénérescence des cellules endothéliales et des capillaires de la rétine par l'activation de la caspase-1 (Vincent et Mohr, 2007). Des taux élevés ont été rapportés pour différentes cytokines inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et le MCP-1 dans les tissus oculaires chez des patients avec une rétinopathie diabétique non proliférative. L'accumulation de ces médiateurs inflammatoires semble contribuer fortement à la mort précoce des cellules neuronales dans la rétine. Dans les premiers stades de la rétinopathie diabétique, l'augmentation de ces cytokines pro-inflammatoires serait liée aussi à l'activation de la microglie et des cellules endothéliales et participerait activement à l'évolution du stade prolifératif (Rübsam *et al.*, 2018). Chez les patients atteints de rétinopathie proliférative, une augmentation des concentrations de cytokines dans le vitré a été notée ainsi que d'autres facteurs de croissance tels que le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1), le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF) et le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) (Rusnak *et al.*, 2015). En plus des niveaux élevés de VEGF dans l'humeur vitrée des patients avec une rétinopathie diabétique ou lors de l'œdème maculaire, on note également des taux significativement élevés d'angiopoïétine-2 (Ang-2), un important modulateur de l'angiogenèse (Funatsu *et al.*, 2009).

1.24.4.1 Rôle des cellules gliales dans l'inflammation

Les cellules de la microglie sont des cellules immunocompétentes résidentes du système nerveux central. Dans la rétine, la microglie joue un rôle de maintien des réseaux neuronaux et vasculaires et participe également à l'élimination des débris cellulaires (Langmann, 2007). L'un des premiers signes d'inflammation dans la rétinopathie diabétique est l'activation des cellules gliales et microgliales. Des études histopathologiques ont indiqué que les cellules macrogliales et microgliales montrent des changements structuraux précoces après 4 semaines de diabète chez le rat (Rungger-Brandle *et al.*, 2000). Très tôt dans la rétine diabétique, le TNF- α a été associé avec la microglie (Rusban, 2018). Dans les premiers stades de la rétinopathie diabétique, les cellules microgliales avec leurs prolongements tentaculaires très mobiles deviennent activées et migrent vers le site d'inflammation où elles vont libérer une large gamme de cytokines pro-inflammatoires, le glutamate, les ROS et le NO. A un stade avancé de la maladie, ce cocktail inflammatoire peut devenir extrêmement toxique pour les cellules neuronales (photorécepteurs, cellules horizontales, cellules bipolaires, cellules amacrines et les cellules ganglionnaires) (Ibrahim *et al.*, 2011).

1.24.4.2 Rôle des cellules de Müller dans l'inflammation

Les cellules de Müller représentent la principale glie rétinienne. Situées dans la couche nucléaire interne (INL), elles fournissent les substrats du métabolisme de la rétine et apportent un soutien direct aux neurones grâce à la régulation positive des facteurs trophiques et des antioxydants (Coorey *et al.*, 2012). Dès les premiers stades de la maladie, les cellules de Müller changent complètement de morphologie; elles augmentent de taille. De plus, une surexpression du GFAP, marqueur des cellules de Müller, devient prédominante dans le tissu rétinien dans les modèles animaux et les patients diabétiques (Rungger-Brändle *et al.*, 2000). Les cellules de Müller représentent une source importante de nombreux facteurs de croissance et de cytokines pro-inflammatoires. Plusieurs facteurs de croissance, cytokines pro-inflammatoires et chimiokines libérés par les cellules de Müller ont été identifiés dans le vitré des patients diabétiques (Eastlake *et al.*, 2016).

1.24.4.3 Rôle des astrocytes dans l'inflammation

Les astrocytes, connus également sous le nom d'astroglie, sont des cellules gliales en forme d'étoile présentes dans le cerveau et la moelle épinière, contribuant à la neuromodulation et à l'immunité du système nerveux central. Ils jouent un rôle essentiel de soutien cellulaire pendant le développement du système nerveux central (Ridet *et al.*, 1997). Les astrocytes sont principalement localisés dans les couches les plus vascularisées de la rétine, essentiellement au niveau de la couche de fibres nerveuses et de la couche de cellules ganglionnaires. Dans les conditions hypoxiques, les astrocytes deviennent activés et favorisent ainsi la libération de plusieurs facteurs et médiateurs inflammatoires tel que le facteur de croissance épidermique (EGF), les cytokines (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α), les prostaglandines, le MCP1 et le VEGF (Pekny *et al.*, 2014) (Fig. 12).

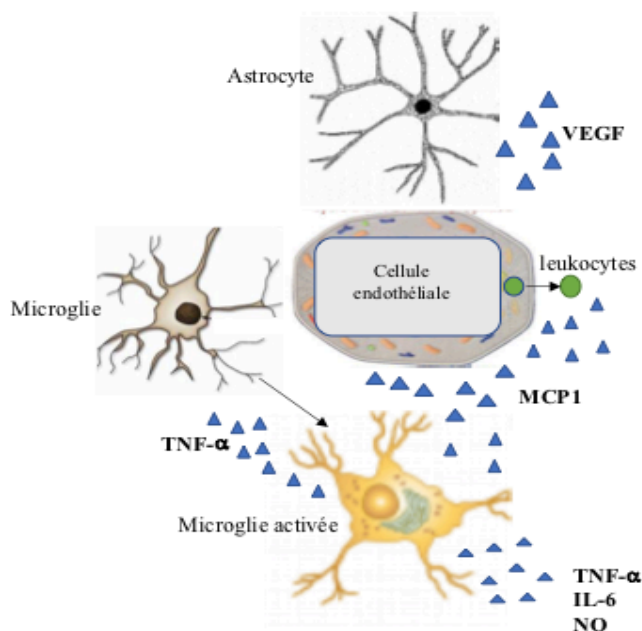


FIGURE 12: INTERACTION ENTRE CELLULES GLIALES ET ENDOTHÉLIALES ET IMPLICATION DES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION

Au cours du processus inflammatoire, certaines cellules immunitaires et endothéliales deviennent activées et favorisent la libération des médiateurs de l'inflammation. Adapté de Rübsam, 2018.

Le nombre de ces astrocytes activés augmente de façon importante chez les diabétiques, ce qui favorise l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne et par conséquent, une hyperperméabilité vasculaire dans la rétine (Rungger-Brändle *et al.*, 2000).

1.24.4.4 La leucostase

L'inflammation et l'expression accrue des molécules d'adhésion dans la rétine favorisent la leucostase, un processus par lequel les leucocytes circulants adhèrent aux cellules endothéliales des vaisseaux enflammés, roulent et transmigrent vers le tissu. Dans ce tissu enflammé, les leucocytes favorisent les réponses inflammatoires, y compris la phagocytose des particules étrangères, la production d'anticorps et la sécrétion de facteurs inflammatoires. L'adhésion des leucocytes aux parois des vaisseaux pourrait également contribuer à la mort des cellules endothéliales, à l'altération de la microcirculation et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Del Maschio *et al.*, 1996; Kern, 2007).

La stimulation des cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IL-1 β peuvent mener au recrutement des leucocytes. Plusieurs études ont montré une augmentation significative du nombre de leucocytes dans les vaisseaux rétiniens des patients diabétiques mais aussi dans des modèles animaux (Joussen et Joeres, 2007; Pouliot *et al.*, 2012). Il a été rapporté que l'inhibition du VEGF-A diminue l'infiltration leucocytaire (Myamoto *et al.*, 2000). L'utilisation systémique d'un inhibiteur compétitif du TNF- α diminue significativement l'expression des molécules d'adhésion ICAM-1 et la transmigration des leucocytes (Joussen et Joeres, 2007). En plus de diminuer l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne, l'inhibition de la COX-2 réduit aussi la leucostase dans la rétine du rat diabétique (Joussen et Joeres, 2007). Ces divers facteurs inflammatoires peuvent modifier la fonction endothéliale. Cela entraîne un dérèglement de l'apport sanguin et une augmentation de la perméabilité de l'infiltration des leucocytes dans la rétine.

1.25 Changement du flux sanguin rétinien dans la rétinopathie diabétique

L'hypothèse selon laquelle le débit sanguin rétinien altéré joue un rôle dans le développement de la rétinopathie diabétique a été suggérée il y a plus de 25 ans (Kohner *et al.*, 1975). Cette hypothèse semble maintenant plutôt controversée, car certaines observations

semblent complètement contradictoires. Ce dont on est à priori certain, c'est que le débit sanguin rétinien ne semble pas être affecté par un diabète bien régulé et contrôlé jusqu'à ce qu'à ce qu'une rétinopathie plus sévère se développe (Bursell *et al.*, 1996). De plus, une baisse du débit sanguin rétinien semble être associée à une mauvaise perfusion capillaire. Il semble aussi que l'hyperglycémie empêche une réponse autorégulatrice normale. Une réduction du débit sanguin choroïdien a été rapportée chez les patients diabétiques et, en particulier, chez ceux atteints d'œdème maculaire (Kohner *et al.*, 1975; Cunha-Vaz, 1978).

1.26 Les atteintes microvasculaires dans la rétinopathie diabétique

Dans le diabète, l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne contribue vivement à la baisse de l'acuité visuelle. La barrière hémato-rétinienne joue un rôle capital dans l'homéostasie rétinienne en contrôlant le passage des macromolécules dans les gros vaisseaux. Pendant le diabète, cette barrière subit très tôt une dégradation à cause de l'inflammation liée aux cytokines inflammatoires et aux facteurs de croissance tel que le VEGF (Kern, 2007). Durant les conditions hypoxiques, le complexe protéique HIF-1 α , régulateur central de l'hypoxie, est activé. HIF-1 α est un hétérodimère composé de deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β possédant des domaines pHLH (basic helix-loop-helix) responsables de la dimérisation et de la liaison à l'ADN (Wang *et al.*, 1995). HIF-1 α est exprimé dans tous les types cellulaires et principalement dans l'épithélium pigmentaire rétinien. Le signal hypoxique entraîne une translocation nucléaire de HIF-1 α qui va alors se dimériser avec HIF-1 β (Wang *et al.*, 1995). La sous-unité HIF-1 α est impliquée dans le développement vasculaire et elle est fortement liée avec l'expression du VEGF (Ferrara *et al.*, 2003). La surexpression du VEGF pendant la rétinopathie diabétique due à l'hypoxie chronique entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire (Ferrara *et al.*, 2003).

Les jonctions serrées (zonulae occludentes); complexes jonctionnels multiprotéiques, et les jonctions adhérentes (zonula adherens); complexes protéiques dans les tissus épithéliaux et endothéliaux, sont également affectées par le VEGF, où l'expression des protéines de jonctions serrées ZO-1 et l'occludine sont réduites (Frey *et al.*, 2011). De plus, le VEGF serait responsable de la phosphorylation des protéines de jonctions serrées, conduit inévitablement à l'augmentation de la perméabilité vasculaire (Esser *et al.*, 1998). En outre, le VEGF induit la

phosphorylation de la VE-cadhérine (Cadherin 5), composante majeure des jonctions adhérentes entre les cellules endothéliales, conduisant ainsi à la perturbation de la barrière hémato-rétinienne, et par conséquent, à une augmentation de la perméabilité vasculaire (Esser *et al.*, 1998).

Durant l'hyperglycémie, on assiste également à un dysfonctionnement endothélial majeur conduisant à une perte du glycocalyx (couche de protéoglycanes couvrant l'endothélium et essentielle à la protection de la paroi du vaisseau. Cette perturbation du glycocalyx serait liée à une production accrue de ROS dans les conditions hyperglycémiques et participerait à la vulnérabilité vasculaire (Nieuwdorp *et al.*, 2006).

D'autres composantes contribuent à l'étanchéité de la barrière hémato-rétinienne; les péricytes : cellules mésenchymateuses contractiles spécialisées d'origine mésodermique, exerçant une fonction similaire à celle des cellules musculaires lisses, participant à la régulation du tonus vasculaire et à la prolifération des cellules endothéliales (Beltramo et Porta, 2013). Durant les premiers stades de la rétinopathie diabétique, on assiste à une perte des péricytes dans la rétine. Cette perte des péricytes favorise non seulement la dégradation de la barrière hémato-rétinienne mais participe aussi à l'angiogenèse pathologique (Beltramo et Porta, 2013).

1.27 Les traitements de référence dans la rétinopathie diabétique

Avant tout traitement spécifique, le contrôle de la glycémie reste l'objectif prioritaire afin de prévenir la rétinopathie diabétique ou d'en minimiser sa progression.

La photocoagulation laser panrétinienne reste le traitement standard pour les patients ayant une rétinopathie proliférative à risque élevé dans le but de limiter la néovascularisation et de prévenir l'hémorragie. L'application du laser de façon disséminée permet de réduire les besoins métaboliques par destruction de l'épithélium pigmentaire rétinien et des photorécepteurs. Cette destruction a pour but de rétablir une adéquation entre l'apport en oxygène et les besoins. Toutefois, des effets secondaires importants sont associés à cette intervention, notamment une diminution du champ visuel périphérique et une atteinte de la vision nocturne. Quand un œdème maculaire cliniquement significatif est présent, une photocoagulation focale est alors le traitement de choix. La vitrectomie est une option pour

corriger les hémorragies massives, la fibrose ou des décollements de rétine (Joussen *et al.*, 2007). Il est à noter que les traitements laser ne permettent pas une restauration de la vision et que les dommages générés par ceux-ci entraînent un retentissement visuel. Toutefois, les pertes visuelles seraient encore plus importantes sans ces interventions.

Actuellement, les traitements ciblant le VEGF représentent une thérapie de choix que ce soit seul ou en association avec la photocoagulation panrétinienne. Ces traitements permettent une réduction de la perméabilité vasculaire, de la néovascularisation et par conséquent une amélioration de la vision (Wirostko *et al.*, 2008). Quatre anti-angiogéniques ciblant le VEGF sont couramment utilisés: Pegaptanib sodium, Ranibizumab (Lucentis, Novartis), Bevacizumab (Avastin; Genen-tech) et Aflibercept (Regeneron Pharmaceuticals/Sanofi-Aventis) (Bhat *et al.*, 2014). Malheureusement, ces injections intra-vitréennes répétées d'anticorps anti-VEGF ne ciblent que les stades les plus avancés de la maladie et n'en traitent aucunement la cause. De plus, des études ont rapporté que le nombre d'injections répétées représente un facteur de risque pour l'élévation de la pression intraoculaire et des changements dans le diamètre des vaisseaux rétiniens (Fontaine *et al.*, 2011).

Des solutions efficaces de traitement existent pour les stades les plus avancés de la maladie. Toutefois, ces traitements ont eux même un impact visuel important et certains patients restent réfractaires à ces traitements. Il existe donc un besoin important pour trouver des traitements efficaces, moins invasifs et qui permettent de prévenir les stades avancés de la rétinopathie. De plus, l'augmentation de l'incidence et l'apparition de plus en plus précoce du diabète rendent ce besoin de plus en plus pressant (Kou *et al.*, 2012).

1.28 Les modèles utilisés en rétinopathie diabétique

Plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier l'étiologie et la pathogenèse de la rétinopathie diabétique. Étant donné qu'il s'agit d'une maladie complexe avec des influences à la fois génétiques et environnementales, les modèles animaux ont été développés par induction expérimentale du diabète ou font appel à des mutations génétiques.

1.29 Modèle à la streptozotocine et à l'alloxan

La méthode la plus utilisée d'induction du diabète est par l'administration de Streptozotocine (STZ), un antibiotique extrait de *Streptomyces acromogenes*. L'induction du diabète par la STZ a été utilisée chez plusieurs espèces, incluant la souris, le lapin, le cochon, le rat, le chien, le poisson-zèbre et le singe (Olivares *et al.*, 2017). Le mécanisme d'induction du diabète sucré par la STZ entraîne une destruction des îlots pancréatiques de Langerhans, une perte des cellules β et une mort cellulaire par fragmentation de l'ADN. La STZ présente une structure similaire au glucose et à la N-acétyl glucosamine. Les cellules β captent spécifiquement la STZ parce qu'elles expriment le transporteur de glucose de faible affinité 2 (GLUT2) (Jiang *et al.*, 2015). D'autres cellules expriment également le transporteur GLUT2, y compris les hépatocytes et les cellules tubulaires rénales, ces derniers vont subir des dommages similaires avec l'administration de STZ (Jiang *et al.*, 2015). Quatre à huit jours après l'induction du diabète par la STZ chez le rat, on assiste, en plus de la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne, à l'amincissement de la couche de cellules INL et ganglionnaires (GCL) et à l'épaississement de la membrane basale capillaire dans la rétine diabétique (Jiang *et al.*, 2015).

Alloxan: Considéré comme la première molécule qui induit le diabète. C'est un dérivé de l'acide urique qui cible directement les cellules β du pancréas. L'alloxan entraîne la mort cellulaire par l'inhibition de la glucokinase, une enzyme impliquée dans la voie de régulation de l'insuline-glucose et exprimée dans le foie et le pancréas (Jiang *et al.*, 2015). Toutefois, l'alloxan est considéré moins efficace que la STZ dû à l'apparition tardive du diabète.

1.30 Modèle nutritionnel : diète riche en sucre

Plusieurs modèles de diabète ont été développés chez la souris, le rat, le chien et le lapin à la suite d'un régime riche en galactose (Kern et Engerman, 1994; 1996; Jousen *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2013). Une hyperglycémie est observée à partir de six semaines chez la souris. À partir de 15 mois de diabète, on est capable d'observer une perte des cellules endothéliales et une augmentation des capillaires (Jiang *et al.*, 2015). L'avantage de ce modèle est qu'il permet d'observer l'évolution de la maladie sur une longue période allant jusqu'à 26 mois de diabète comparé aux autres modèles animaux. L'apport en fructose alimentaire a été également associé

à l'augmentation de la résistance à l'insuline dans le cadre du syndrome métabolique. Les rats nourris au fructose développent un diabète de type 2 (Patel *et al.*, 2009). Le modèle expérimental utilisant des rats traités au glucose pendant 4 à 10 semaines (10% dans l'eau à boire) permet aussi de développer une résistance à l'insuline associée à une hypertension artérielle (Dias *et al.*, 2010; El Midaoui *et al.*, 2016; Haddad et Couture, 2017).

1.31 Modèles génétiques de diabète

Il existe six modèles génétiques de rats diabétiques, incluant les Zucker diabetic fatty (ZDF), Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF), biobreeding (BB), WBN/Kob, spontaneously diabetic Torii (SDT) et les Goto-Kakizaki (GK) (Lai *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015). Les ZDF, OLETF et BB sont des modèles monogéniques avec des mutations indépendantes. Alors que les modèles SDT, WBN/Kob et GK, sont des modèles polygéniques. Le GK est un modèle de rats non obèse de diabète de type 2, généré par de multiples croisements de consanguinité entre des rats Wistar intolérants au glucose. Ce modèle développe une hyperglycémie à partir de 4-6 semaines. C'est un excellent modèle pour étudier les changements microvasculaires dans la rétine (Jiang *et al.*, 2015).

1.32 La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

La DMLA est la principale cause de perte de vision sévère et irréversible chez les individus de plus de 50 ans dans les sociétés occidentales, elle affecte environ 14 millions de personnes dans le monde. La néovascularisation choroïdienne (CNV), caractéristique de la DMLA humide, exsudative ou néovasculaire, est responsable d'environ 90% des cas de perte de vision sévère due à la DMLA (Chappelow et Kaiser, 2008).

Avant de s'attarder sur la physiologie, un bref aperçu sur l'anatomie des composantes de la DMLA est nécessaire.

1.33 L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)

L'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) est une couche unique de cellules hexagonales continue avec l'épithélium pigmentaire du corps ciliaire jusqu'à la jonction de *l'ora serrata*. Elle fonctionne avec la membrane de Bruch et la couche choroïdienne pour assurer le maintien des

cellules réceptrices. La dégradation de ces cellules peut provoquer une accumulation de débris cellulaires (Fig. 13) (Willermain *et al.*, 2014).

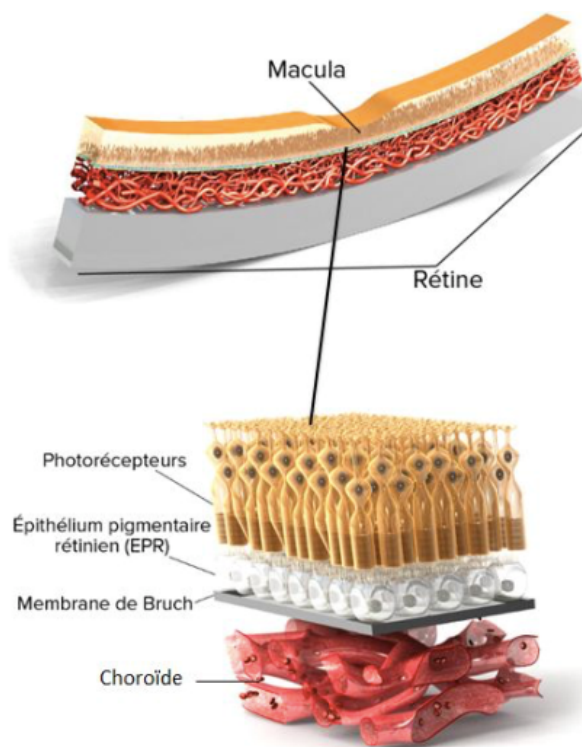


FIGURE 13: LES STRUCTURES IMPLIQUÉES DANS LA DMLA

Tiré de dmlatpe.free.fr

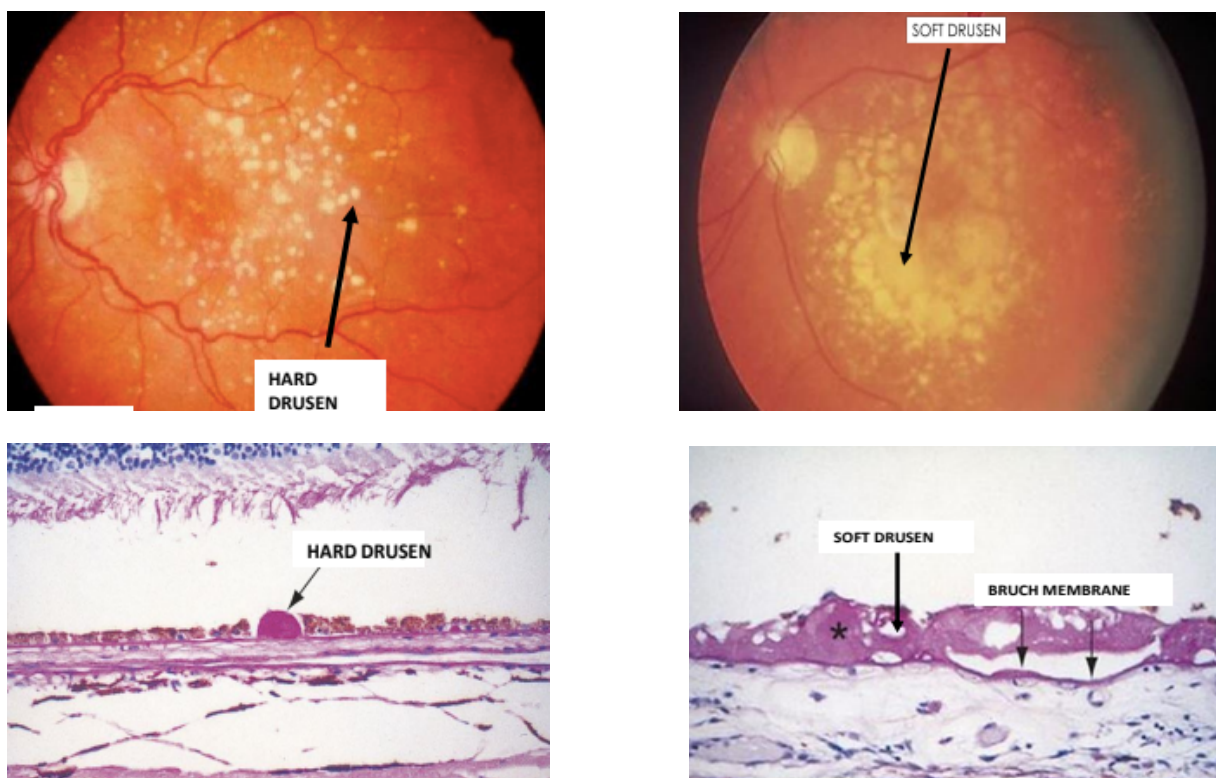
Il y a essentiellement trois structures impliquées dans la pathogenèse de la DMLA : l'Épithélium pigmentaire rétinien, la Membrane de Bruch et la choroïde.

Des deux côtés, des matrices extracellulaires spécialisées permettent une interaction étroite de l'EPR avec ses tissus adjacents. Du côté basolatéral, la membrane de Bruch combine la fonction de barrière et de matrice de transport sélectif. Du côté apical de l'EPR, la matrice interphotoréceptrice assure une interaction entre les segments externes des photorécepteurs et l'EPR. L'EPR se situe entre la choroïde et la rétine neurosensorielle pour former la barrière externe. Les fonctions de barrière spécialisées et dynamiques de l'EPR sont essentielles au maintien de la santé rétinienne. Cette fonction de barrière est d'une grande importance; en effet, l'échange complet de molécules et d'ions entre le flux sanguin et les photorécepteurs repose sur

le transport transépithélial à travers l'EPR. Le transport du sang vers le côté des photorécepteurs consiste principalement en un transport de nutriments tels que le glucose et les acides gras (Chirc *et al.*, 2017).

1.34 Formes histologiques de la DMLA

Le premier stade de la DMLA consiste en l'apparition et l'accumulation de dépôts lipidiques jaunes à l'intérieur de la membrane de Bruch appelés drusen diffus ou *basal linear drusen*. Les différents types de drusen correspondent à un début de décollement localisé de l'EPR (Fig. 14). L'évolution qui suit l'apparition des drusen correspond soit à des formes atrophiques ou exudatives.



A C
FIGURE 14: ÉVOLUTION DES DRUSEN DANS LA DMLA

Apparition de cellules pigmentées groupées en amas et hypertrophiées qui sont localisées au niveau de l'EPR (En haut). Accumulation de matériels granulaires entre l'EPR et la membrane de Bruch (En bas). Tiré de Framer, 2018.

B D

1.34.1 DMLA atrophique

La DMLA atrophique est une maladie chronique qui entraîne généralement un certain degré de déficience visuelle et qui peut parfois évoluer vers une cécité sévère. Plus fréquente mais moins sévère que la forme exudative, elle est caractérisée par la disparition de l'EPR et des photorécepteurs et associée à une atrophie de la choriocapillaire. A l'examen du fond d'œil, on observe des plages atrophiques perçues sous la forme de petites lésions de couleur blanchâtre arrondies. La baisse de l'acuité visuelle observée chez les patients atteints de DMLA atrophique est liée à la localisation de ces plages atrophiques (Ambati et Fowler, 2012).

1.34.2 DMLA exudative

La DMLA exudative est responsable de 10-15% des cas de DMLA, mais peut progresser de façon spectaculaire vers la cécité si elle n'est pas traitée. Elle est caractérisée par l'apparition de néovaisseaux d'origine choroïdienne (CNV), ces néovaisseaux sont à la fois fragiles et perméables. Ils traversent la membrane de Bruch et se développent sous l'EPR et/ou sous la rétine (Fig. 15). Dans la phase d'initiation de la CNV, les macrophages et leur production de cytokines sont des acteurs importants dans la croissance d'une CNV. La deuxième étape correspond à l'élargissement néovasculaire qui dépend de la présence des cellules inflammatoires infiltrantes (Bhutto et Lutty, 2012).

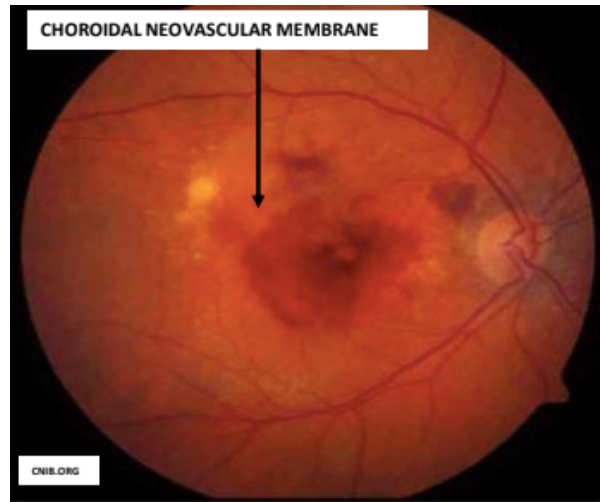


FIGURE 15: PHOTO DU FOND D’ŒIL D’UNE DMLA EXUDATIVE AVEC PRÉSENCE D’UNE NÉOVASCULARISATION D’ORIGINE CHOROÏDIENNE.

Tiré de Farmer, 2018.

1.34.2.1 Les différents types de néovascularisation

Il existe trois grands types de néovascularisation selon l'origine des nouveaux vaisseaux.

- Néovascularisation d’origine rétinienne (RNV) : implique la croissance de nouveaux vaisseaux rétiniens qui peuvent pénétrer dans la membrane limitante interne et se développer dans le vitré. La RNV est observée au cours du développement de la rétinopathie diabétique et la rétinopathie du prématuré. La surexpression du VEGF est fortement associée au développement de la RNV et la perte du système vasculaire rétinien.
- Néovascularisation d’origine choroïdienne (CNV) : dans laquelle les nouveaux vaisseaux pathologiques vont croître dans l'espace épithélial pigmentaire sous-rétinien ou au niveau de l’EPR provenant de la choriocapillaire. L’expression du VEGF est augmentée pendant la DMLA exudative.
- Néovascularisation de l’iris : généralement observée chez les glaucomateux. Des concentrations élevées du VEGF dans l’humeur aqueuse associées à une augmentation de la perméabilité vasculaire ont été révélées pendant la néovascularisation de l’iris (Tong et Yao, 2006).

1.34.2.2 Facteurs angiogéniques dans la CNV

L'angiogenèse, la croissance de nouveaux vaisseaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants, est étroitement contrôlée par un équilibre finement réglé entre les facteurs qui stimulent ou inhibent la croissance des vaisseaux. La CNV est stimulée par des facteurs angiogéniques comme le VEGF, les facteurs de croissance insuliques, les facteurs de croissance de fibroblastes, les interleukines et les angiopoïétines qui participent à l'angiogenèse (Bhutto et Luty, 2012). Le VEGF est incontestablement le facteur angiogénique le plus impliqué dans la DMLA exudative.

1.35 Rôle du VEGF dans la pathogenèse de la DMLA

La famille du VEGF inclue les VEGF-A, -B, -C et -D, et le facteur de croissance placentaire (PlGF); ces derniers jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse (Ikeda *et al.*, 2006). Le gène humain du VEGF est constitué de plusieurs exons qui peuvent être épissés alternativement pour coder plusieurs isoformes protéiques, notamment: VEGF121, VEGF145, VEGF162, VEGF165, VEGF183, VEGF189 et VEGF206. Les isoformes du VEGF présentent différentes affinités pour les récepteurs du VEGF et des protéoglycanes à sulfate d'héparane (HSPG), entraînant des effets très différents sur la croissance des vaisseaux. Les récepteurs tyrosine kinases primaires pour les isoformes du VEGF sont VEGF-R1, VEGF-R2 et VEGF-R3. Le VEGF-R2 est le principal récepteur responsable des réponses mitogéniques des cellules endothéliales au VEGF (Vempati *et al.*, 2014).

Le VEGF joue un rôle essentiel dans le développement du système vasculaire à la fois dans les conditions physiologiques et pathologiques. Dans les conditions physiologiques, les isoformes du VEGF sont séquestrées de façon différentielle par les HSPG se trouvant à la surface cellulaire et dans la matrice extracellulaire. Au cours du processus inflammatoire, le VEGF séquestré est libéré de façon accrue par des métalloprotéinases matricielles dépendantes du zinc déclenchant l'angiogenèse (Vempati *et al.*, 2014). Il est prouvé que le VEGF est fortement impliqué dans la néovascularisation oculaire. Son expression est élevée chez les patients atteints de DMLA néovasculaire et dans les modèles animaux induits par laser (Yi *et al.*, 1997). Pendant l'inflammation, le VEGF est produit de manière constitutive par les cellules de l'EPR et serait impliqué dans les mécanismes de signalisation entre l'EPR et la

choriocapillaire pour induire la fenestration endothéliale (Tong et Yao, 2006). L'expression du VEGF-A est fortement induite en réponse à l'hypoxie par le HIF-1 α (Liu, 1995). L'expression du HIF-1 α est augmentée dans le tissu hypoxique tandis que le HIF-1 β est exprimé constitutivement. L'augmentation de la concentration du HIF-1 α est corrélée avec la surexpression du VEGF. Cette augmentation est liée à l'augmentation du stress oxydatif dans la DMLA, particulièrement au niveau de la couche des photorécepteurs et de l'EPR (Campochiaro, 2013). L'élévation spatiale et temporelle du VEGF et du HIF-1 α stimule l'apparition et la croissance de nouveaux vaisseaux pathologiques à partir de l'EPR. Cibler le VEGF avec des injections intraoculaires mensuelles de ranibizumab pendant 1 an a permis de réduire la perméabilité vasculaire chez la plupart des patients atteints de DMLA néovasculaire et, par conséquent, a conduit à une amélioration de l'acuité visuelle (Andreoli et Miller, 2007).

1.36 Autres facteurs impliqués dans la pathogenèse de la DMLA

1.36.1 PEDF (Pigment epithelium-derived factor)

Le maintien de l'équilibre entre les concentrations du VEGF et du PEDF, protéine multifonctionnelle, est capital pour empêcher le développement de la CNV (Bhutto *et al.*, 2006). Le PEDF est une molécule endogène du tissu oculaire, exprimée et localisée dans les cellules de l'EPR et sécrétée par les photorécepteurs; elle a des fonctions anti-angiogéniques, anti-tumorigènes et neurotrophiques (Tong et Yao, 2006). Une étude a démontré que les taux de VEGF et de PEDF sont similaires dans la choroïde chez les personnes indemnes de toute pathologie. Tandis que chez les patients atteints d'une DMLA néovasculaire, la concentration du facteur PEDF est exprimée à des niveaux significativement plus faibles que le VEGF dans les cellules de l'EPR, la membrane de Bruch et la choroïde (Gao *et al.*, 2011), ce qui suggère que l'équilibre de ces facteurs joue un rôle clé dans le maintien de l'homéostasie de la rétine humaine et contribue également à la formation de la CNV. Le VEGF serait responsable de l'induction du gène du PEDF au niveau de la choroïde dans une CNV (Tong et Yao, 2006).

1.36.2 Thrombospondine-1 (TSP-1)

La TSP-1 est une glycoprotéine sécrétée qui, comme le PEDF, a de multiples domaines et fonctions, y compris l'inhibition de l'angiogenèse et la neuroprotection. Des souris knock-out

TSP-1 ont montré une densité vasculaire importante au cours du développement vasculaire rétinien (Carron *et al.*, 2013).

1.36.3 L'angiostatine et l'endostatine

L'angiostatine et l'endostatine possèdent des domaines qui acquièrent une activité anti-angiogénique après un clivage protéolytique. Il a été démontré que l'endostatine, inhibiteur endogène de l'angiogenèse, est réduite dans la choroïde des patients atteints de DMLA comparée aux choroïdes témoins âgés (Bhutto *et al.*, 2004).

1.36.4 La molécule d'adhésion intracellulaire 1 (ICAM-1)

L'ICAM-1 est une glycoprotéine présente à la surface des cellules immunitaires et endothéliales; elle est exprimée constitutivement sur les cellules endothéliales de la choriocapillaire, en particulier dans la macula saine. Les concentrations en ICAM-1 sont particulièrement élevées dans la DMLA et semblent contribuer au recrutement des leucocytes. ICAM-1 se lie particulièrement aux leucocytes circulants via les intégrines CD11a / CD18 ou CD11b / CD18 pour faciliter leur transmigration à travers l'endothélium (Chirko *et al.*, 2017). Deux principaux types de leucocytes jouent un rôle important dans la pathogenèse de la DMLA : les mastocytes et les macrophages. Les mastocytes sont plus abondants dans la choroïde des patients atteints de DMLA (Bhutto *et al.*, 2016). Au fur et à mesure que la maladie progresse, l'abondance des macrophages augmente dans la choriocapillaire des yeux atteints de CNV (Cherepanoff *et al.*, 2010).

1.37 Changement du flux sanguin rétinien dans la DMLA

Une diminution du débit sanguin choroïdien pourrait jouer un rôle important dans la DMLA. Des études utilisant des techniques angiographiques ont montré une réduction de la densité des capillaires et une diminution du débit sanguin choroïdien chez les patients atteints de DMLA (Ciulla *et al.*, 2002). Un flux sanguin choroïdien anormal a également été détecté chez des patients souffrant de DMLA sur la base des expériences de laser Doppler (Xu *et al.*, 2010). La débitmétrie laser Doppler donne une mesure du débit sanguin au niveau d'une seule région du disque optique ou de la rétine. L'effet Doppler a été utilisé pour mesurer la vitesse, le volume et le flux sanguin à travers les capillaires et les gros vaisseaux de la tête du nerf optique

et de la rétine superficielle (Kura *et al.*, 2012). Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré qu'il existe une corrélation entre les altérations observées lors de la DMLA et la variation du débit sanguin choroïdien; il reste à démontrer si ces altérations représentent un facteur de risque dans la pathogenèse de la DMLA et de la néovascularisation choroïdienne (Spraul *et al.*, 1998).

1.38 Traitement thérapeutique de la DMLA

Différents agents anti-angiogéniques ont été utilisés pour le traitement de la néovascularisation, principale caractéristique de la DMLA.

Ranibizumab (Lucentis) est un fragment d'anticorps humanisé contre le VEGF-A. C'est un tout petit fragment d'anticorps élaboré pour mieux pénétrer à travers la rétine, conçu spécifiquement pour l'utilisation intraoculaire. Utilisé pour la DMLA néovasculaire et pour traiter l'œdème maculaire (Andreoli et Miller, 2007; Van Lookeren Campagne et al., 2014).

Bevacizumab (Avastin) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre tous les isoformes du VEGF-A. Utilisé pour traiter la néovascularisation oculaire (Andreoli et Miller, 2007; Van Lookeren Campagne et al., 2014).

Pegaptanib (Macugen) est un ligand oligonucléotide qui se lie à l'isomère VEGF₁₆₄, le principal facteur responsable de la néovascularisation pathologique. En inhibant la liaison du VEGF à son récepteur, il entraîne une diminution de la perméabilité vasculaire et une inhibition de la néovascularisation (Andreoli et Miller, 2007; Van Lookeren Campagne et al., 2014).

VEGF-Trap (Regeneron Pharmaceuticals) est une protéine de fusion qui possède des domaines de liaison aux récepteurs du VEGF, VEGF-R1 et VEGF-R2 et donc les inhibent (Andreoli et Miller, 2007; Van Lookeren Campagne et al., 2014).

Inhibiteurs multirécepteurs de la tyrosine kinase : ce sont des inhibiteurs dirigés contre de multiples récepteurs de la tyrosine kinase, y compris le VEGF-R1, VEGF-R2, PDGFR et la tyrosine kinase 3. Ils présentent les avantages et les désavantages d'une inhibition plus large que les inhibiteurs du VEGF ciblés (Andreoli et Miller, 2007; Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

1.39 Les modèles animaux utilisés dans la DMLA

Aucun modèle animal ne récapitule parfaitement le spectre complet de la DMLA. Cependant, certaines caractéristiques des lésions vasculaires rencontrées dans la pathologie ont été élaborées.

1.39.1 Induction d'une CNV par laser chez le rat ou la souris

L'induction d'une CNV par laser entraîne la rupture de la membrane de Bruch et induit l'angiogenèse dans la choriocapillaire (Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014). Le modèle du rat est le mieux exploité, étant donné que les lésions vasculaires sont plus faciles à traiter et qu'il est techniquement plus facile de répéter les injections locales. Plus difficile que la technique par laser, la rupture chirurgicale de la membrane de Bruch par perforation de la rétine induit aussi de manière fiable la CNV dans le modèle porcin (Van Lookeren Campagne *et al.*, 2014).

1.39.2 Les modèles génétiques

Les modèles génétiques sont également utilisés pour mieux caractériser une CNV. Le modèle $Vldlr^{tm1Her}$ qui porte une mutation dans le récepteur des lipoprotéines de basse densité permet de développer une angiogenèse intrarétinienne avec la croissance de néovaisseaux (Heckenlively *et al.*, 2003). Le modèle de souris transgéniques qui exprime la sérine protéase humaine HTRA1 dans des cellules de l'EPR permet de visualiser la ramification et la croissance des nouveaux vaisseaux choroïdiens qui fuient (Jones *et al.*, 2011).

1.40 Le système kallikréine-kinines (SKK)

Le SKK est un système peptidergique endogène multifonctionnel impliqué dans la libération des kinines vasoactives. Il joue un rôle dans la contractilité du muscle lisse, la régulation du tonus vasomoteur et de la pression sanguine, dans la perméabilité vasculaire, le

développement de l'inflammation et la douleur (Couture *et al.*, 2001; Parreiras-E-Silva *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2014; Bhat *et al.*, 2014).

Les kinines appartiennent à un groupe de peptides de 9 à 11 acides aminés comprenant la bradykinine (BK), la kallidine (KD), la T-kinine (seulement chez le rat) et leurs métabolites actifs; des-Arg⁹-kinines (Couture *et al.*, 2001). Les kinines sont synthétisées à partir de leurs précurseurs, les kininogènes de haut poids moléculaire (KHPM) et les kininogènes de bas poids moléculaire (KBPM) sous l'action de sérine protéases appelées kallikréine tissulaire (KT) et kallikréine plasmatique (KP) (Bhoola *et al.*, 1992). La kallikréine plasmatique est issue d'un seul gène; elle est produite principalement dans le foie et sécrétée sous forme de proenzyme prekallikréine (PKP), l'un des zymogènes protéases les plus abondants dans le sang. La PKP subit une activation en KP par le facteur XII (FXII) après des interactions avec des surfaces chargées négativement (Schmaier et McCrae, 2007). La KP est activée par une légère augmentation du pH induite par l'anhydrase carbonique extracellulaire (Bjorkqvist *et al.*, 2013). D'autre part, la KT appartient à une famille de 15 gènes et génère la kallidine à partir du kininogène de bas poids moléculaire (KBPM) (Webb, 2011). La BK et la kallidine sont les ligands endogènes du récepteur B2 (RB2) qui peuvent être converties par les carboxypeptidases de type M (CPM) et de type N (CPN) en métabolites actifs dépourvus du résidu arginyle C-terminal (des-Arg⁹-BK et Lys-des-Arg⁹-BK), et qui agissent comme des agonistes puissants du récepteur B1 (RB1) (Regoli *et al.*, 1989) (Fig. 16). La CPM (membranaire) et la CPN (plasma) sont appelées kininases I (Fig.16). La CPM permet la régulation de l'activité des kinines dans les processus inflammatoires (Couture *et al.*, 2014). Une étude récente chez un modèle de résistance à l'insuline chez le rat a montré que la CPM et le RB1 sont régulés en même temps que la iNOS et l'IL-1 β dans l'aorte, le cortex rénal et le foie (Haddad et Couture, 2016). La CPN, synthétisée par le foie, est sécrétée dans la circulation où elle représente majoritairement l'activité destructrice de la bradykinine dans le plasma humain (Palmieri *et al.*, 1986). Les deux peptidylpeptidases considérées comme appartenant à la famille des kininases II sont la kininase II-ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine 1) et l'enképhalinase. La kininase II (ACE) catabolise les kinines et leurs métabolites actifs des-Arg⁹-BK et Lys-des-Arg⁹-BK en fragments inactifs (Bader, 2009). Une fois synthétisée, la kininase II-endopeptidase migre au niveau de la

membrane plasmique où elle devient relocalisée pour être ancrée sur la surface externe des fibroblastes (Bhoola *et al.*, 1992).

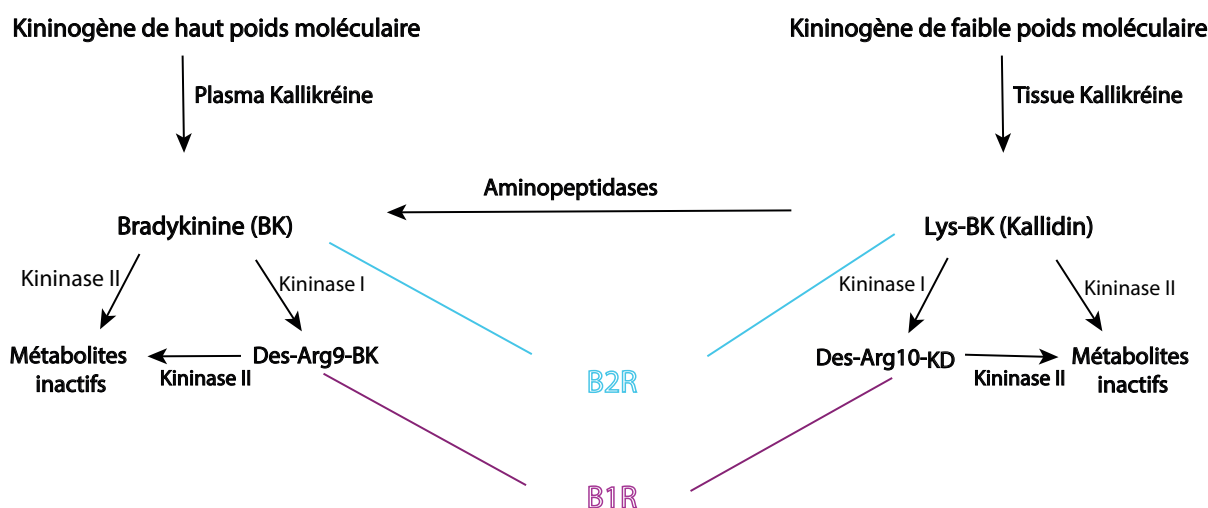


FIGURE 16: LES VOIES DE SYNTHÈSE DE DÉGRADATION DU SYSTÈME KALLIKRÉINE-KININE

1.41 Les récepteurs B1 et B2 des kinines

Le RB1 est un récepteur couplé aux protéines G (GPCR) inductible car peu exprimé dans les tissus sains, contrairement au RB2, qui est exprimé de manière constitutive dans plusieurs types cellulaires. Le RB1 est un GPCR atypique parce qu'il n'est ni désensibilisé, ni internalisé, mais induit de manière homologue par ses propres agonistes (Couture *et al.*, 2001). Le B1R suscite une signalisation intracellulaire et des réponses biologiques persistantes, lesquelles sont soumises à une dissociation très lente des ligands (Mathis *et al.*, 1996). Le RB2 est un GPCR classique qui est rapidement désensibilisé et internalisé à la suite de sa stimulation avec un agoniste (Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). Dans les situations physiologiques, les cellules répondent

uniquement à l'activation du RB2 tandis que le RB1 répond qu'à la suite de son induction par une inflammation, une lésion tissulaire, un stress oxydant ou après exposition à des agents bactériens, des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance (Marceau, 1995; Couture et Girolami, 2004; Lungu *et al.*, 2007).

1.41.1 La voie de signalisation des récepteurs des kinines

La voie de signalisation la plus commune des RB1 et RB2 implique la protéine Gαq avec l'activation subséquente de la phospholipase C et la production d'inositol-1-4-5-triphosphate et de diacylglycérol, qui conduisent respectivement à la libération de calcium intracellulaire et à l'activation de la PKC (Blaes et Girolami, 2013). Les récepteurs des kinines sont également associés aux protéines Gas et Gαi pour réguler la production d'adénylate cyclase et d'AMPc. Ils peuvent également activer les MAP kinases et les voies JAK / STAT, impliquées dans la régulation des gènes (Marceau, 1998; 2005). Le RB2 stimule la eNOS (endothelial nitric oxide synthase) et la PLA2 conduisant à une production accrue de NO (Fig. 17) et de prostacycline, deux puissants vasodilatateurs. Ces prostaglandines générées par l'activation du RB2 et de la PLA2 peuvent également contribuer à accentuer la pathogenèse de la RD (Ma *et al.*, 1996). Le RB2 peut aussi activer les kinases Src et la phosphorylation de la cadhérine vasculaire endothéliale, ce qui conduit à l'ouverture des jonctions cellulaires endothéliales (Orsenigo *et al.*, 2012).

La stimulation du RB1 entraîne l'augmentation de la production de l'anion superoxyde via la voie NADPH oxydase (Dias *et al.*, 2010; Haddad et Couture, 2017) ainsi qu'une grande production de NO via la iNOS (inducible nitric oxide synthase). La liaison de ces deux molécules conduit à la formation de peroxynitrite, une molécule hautement toxique contribuant ainsi au stress oxydatif et à la leucostase dans la rétine diabétique inflammatoire (Shigematsu *et al.*, 2002). Le stress oxydatif causé par l'hyperglycémie est responsable de l'induction du RB1 et la surexpression des médiateurs pro-inflammatoires via la voie NF-κB (Dias *et al.*, 2010). Une fois activé, le RB1 peut amplifier et perpétuer le stress oxydatif et la réponse inflammatoire grâce à un mécanisme de boucle de rétroaction positive (Bhat *et al.*, 2014).

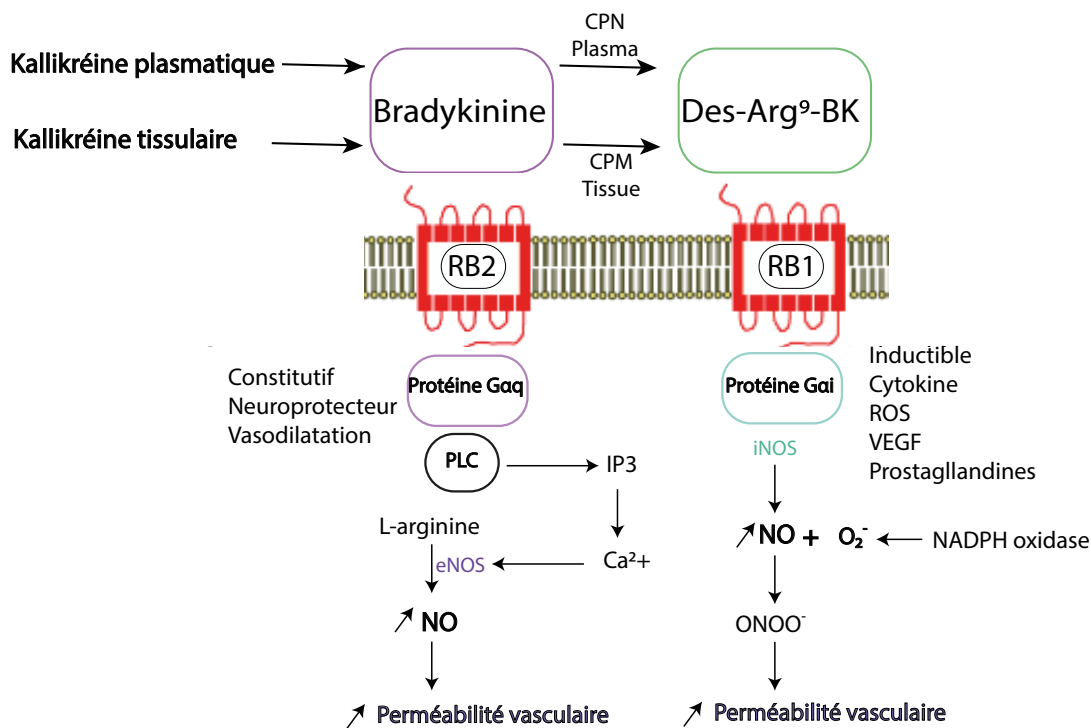


FIGURE 17: LA VOIE DE SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS DES KININES

Les récepteurs des kinines interagissent directement avec les protéines G α i et G α q. Le RB2 stimule la eNOS conduisant à une production de NO via la protéine G α q. L'activation concomitante de la iNOS par le RB1 peut provoquer la formation de NO via la protéine G α i.

1.41.2 Régulation des récepteurs des kinines

Des études basées sur un modèle de fibroblastes pulmonaires humains suggèrent une régulation positive du RB1 par son propre agoniste, impliquant l'activation de la protéine kinase C et du facteur NF- κ B. Dans les conditions inflammatoires, le RB1 est activé par les métabolites endogènes de la kininase I (des-Arg⁹-BK et des-Arg¹⁰-KD) qui sont augmentés aux sites inflammatoires (Raymond *et al.*, 1995; Schanstra *et al.*, 1998). L'activation du RB2 est connue pour activer NF- κ B, ce qui peut à son tour induire l'expression du RB1. Ce dernier peut également être régulé positivement par l'activation du RB2 via la production autocrine de cytokines et/ou la désensibilisation du RB2 (Campos *et al.*, 1995). Une étude chez la souris a montré que la déficience en C1-INH, inhibiteur majeur de FXII, entraîne une augmentation des activités de la KP et du FXIIa et, par conséquent, une augmentation de la production de BK et

de RB2 (Han *et al.*, 2002). Les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine-1 (ACE ou kininase II) peuvent aussi augmenter la réponse à la BK, indépendamment du blocage de sa dégradation enzymatique, par l'intermédiaire du RB2 (Sabatini *et al.*, 2008). Par exemple, les inhibiteurs de l'ACE amplifient la réponse induite par un agoniste du RB2 résistant à l'ACE (Minshall *et al.*, 1997). De plus, on pense que les inhibiteurs de l'ACE stabilisent le RB2 empêchant ainsi son internalisation par la BK (Haasemann *et al.*, 1998). En outre, il a été proposé que cette activation indirecte puisse dépendre de la relation de l'enzyme avec le récepteur, car l'ACE doit être à proximité immédiate du récepteur pour que l'activation puisse avoir lieu (Marcic *et al.*, 2000).

1.42 Le SKK dans la rétine diabétique

Une étude récente a confirmé la présence des composantes du SKK dans le corps vitré et la rétine des personnes atteintes de RD (Liu et Feener, 2013). La présence d'ARNm de KT et de KBPM a été détectée dans différents types cellulaires de la rétine humaine (Ma *et al.*, 1996). La présence de KP et de KHPM a été démontrée dans la rétine du rat (Takeda *et al.*, 1999; Phipps *et al.*, 2008). Il a été proposé que les protéines KP, FXII et KHPM atteignent l'interstitium rétinien en traversant la barrière hémato-rétinienne entraînant une augmentation de la perméabilité vasculaire et des hémorragies rétinienne (Phipps *et al.*, 2008). Les taux de kallikréine semblent aussi élevés dans les tissus rétiens des rats diabétiques par rapport au contrôle (Catanzaro *et al.*, 2010). Des études récentes ont montré que le RB1 est surexprimé très tôt dans la rétine diabétique par le stress oxydatif (Abdoh *et al.*, 2008; Pouliot *et al.*, 2011) et son activation participerait à la vasodilatation des microvaisseaux rétiens (Abdoh *et al.*, 2003). Une expression accrue de l'ARNm des récepteurs B1 et B2 des kinines a été observée dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins rétiens humains (Ma *et al.*, 1996). Des données de notre laboratoire ont montré une surexpression des taux d'ARNm du RB1 dans la rétine des donneurs diabétiques de type 1 et de type 2 et aucune valeur détectable dans la rétine des donneurs témoins (Bhat *et al.*, 2014). Différentes composantes du SKK pourraient donc être ciblées pour prévenir les complications rétiennes du diabète. Ces facteurs primaires libérés dans les tissus endommagés exercent des actions vasoactives, angio-géniques et pro-inflammatoires (Marceau *et al.*, 1998; Couture *et al.*, 2001). Notre laboratoire a mis en évidence

chez le rat que l'administration topique d'un antagoniste ciblant le SKK était efficace pour inverser la dérégulation des voies principales directement associées au développement de la RD (Pouliot *et al.*, 2012).

1.43 Implication du SKK dans les changements de perméabilité vasculaire

Dans la rétine physiologique, l'endothélium vasculaire fonctionne comme une barrière essentielle qui est soutenue par les cellules neurogliales. Dans la rétine diabétique, l'augmentation du flux paracellulaire, le transport transcellulaire et la mort cellulaire dans les cellules endothéliales vasculaires favorisent l'hyperperméabilité vasculaire (Antonetti *et al.*, 2012). En plus des facteurs de croissance, des cytokines pro-inflammatoires, du système VEGF et du facteur de nécrose tumorale, le SKK exerce des effets puissants sur l'hyperperméabilité vasculaire. En effet, plusieurs études ont montré que l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne et la dégradation de la barrière hémato-rétinienne peuvent être bloquées par des antagonistes sélectifs des récepteurs B1 et B2 chez les rats diabétiques STZ (Simard *et al.*, 2002; Abdouh *et al.*, 2008; Catanzaro *et al.*, 2012; Pouliot *et al.*, 2012). L'effet vasomoteur de la BK est relayé par le RB2 qui augmente la pression hydrostatique à l'intérieur des capillaires facilitant l'exudation des protéines et des liquides. De plus, le RB2 situé sur la membrane luminale des cellules endothéliales cause une ouverture des jonctions serrées (Wahl *et al.*, 1999). On ignore le mécanisme exact de l'augmentation de la perméabilité vasculaire via le RB1. Catanzaro *et al.*, 2012 ont montré que l'association de niveaux accrus de NO et du RB1 serait liée à l'hyperperméabilité vasculaire dans la rétine de rats diabétiques. Des études utilisant des souris knock-out du RB1 ou du RB2 ont révélé des fonctions importantes qui peuvent être liées au rôle de ces récepteurs dans la régulation de l'activité de la NOS et des changements résultants dans le tonus vasculaire ou la perméabilité vasculaire (Kuhr *et al.*, 2010). De leur côté, Phipps et Feener, 2008 ont suggéré que la voie KP-BK-B2R-eNOS contribuerait à la perméabilité vasculaire et à l'œdème maculaire. Il a été rapporté aussi que la kallikréine plasmatique stimule la perméabilité vasculaire rétinienne en régulant le récepteur de l'angiotensine II de type 1 (Phipps *et al.*, 2009).

1.44 Implication du SKK dans dans la néovascularisation

Très peu d'études se sont penchées sur l'implication, le rôle précis et la fonction exacte du SKK dans le développement de la CNV dans une DMLA. Toutefois, quelques études suggèrent que la kallikréine plasmatique et la prokallikréine peuvent causer une aggravation partielle de la DMLA. Le SKK stimule l'angiogenèse et favorise la signalisation des médiateurs de la prolifération des cellules endothéliales dont le NO et le VEGF. La kallikréine plasmatique est en corrélation avec la présence d'hémorragie intraoculaire et l'augmentation de l'épaisseur rétinienne dans la DMLA (Clermont *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Paradoxalement, l'administration sous-cutanée de la kallikréine tissulaire peut atténuer la CNV, caractéristique de la DMLA humide (Fukuhara *et al.*, 2013). L'injection intravitréenne d'un inhibiteur de la KT, la kallistatine, a permis aussi de réduire la néovascularisation rétinienne chez les rats diabétiques STZ, effet induit par le système VEGF (Gao *et al.*, 2003). La néovascularisation via le RB1 peut être induite par le VEGF et le VEGF-R2 dans un modèle d'angiogenèse induite par ischémie chez la souris (Ikeda *et al.*, 2004; Li *et al.* 2008). De plus, une étude sur la cornée du lapin a montré que l'administration locale d'agoniste sélectif du RB1 induit une néovascularisation (Parenti *et al.*, 2001). Le RB2 semble aussi augmenter l'expression du VEGF et du VEGF-R2 via la voie de signalisation PI3 kinase/Akt/GSK3beta (Yao *et al.*, 2008). Il a été montré que la BK via le RB2 favorise la formation de nouveaux vaisseaux pathologiques dans un modèle de souris STZ (Zuccollo *et al.*, 1996).

1.45 Relation entre VEGF et les récepteurs des kinines

Des études antérieures ont suggéré une relation possible entre le SKK et la signalisation du VEGF dans différents modèles de perméabilité vasculaire et d'angiogenèse. Les kallikréines tissulaires clivent et inactivent le VEGF, tandis que la stimulation des récepteurs des kinines (RB1 et RB2) augmente l'expression du VEGF et du VEGFR et transactive VEGF-R2 (Kita *et al.*, 2015). Les deux récepteurs de la BK et le VEGFR partagent l'activation Src, la signalisation Akt, iNOS et eNOS, et c'est via ces deux voies qu'ils semblent favoriser l'augmentation de la perméabilité vasculaire rétinienne. Kita *et al.*, 2015, ont démontré que la voie KP-kinine-NOS favorise l'hyperperméabilité vasculaire dans l'œdème maculaire indépendamment des effets biologiques du VEGF. Des analyses biochimiques à partir d'échantillons cliniques provenant de

patients atteints d'œdème maculaire ont révélé que les taux de KP et de VEGF étaient tous deux augmentés dans les fluides intraoculaires, bien qu'ils ne soient pas liés les uns aux autres (Kita *et al.*, 2015). De plus, une étude sur des échantillons de vitré chez des patients atteints d'œdème maculaire a révélé des taux élevés de kinines associés à une perméabilité vasculaire à plus long terme impliquant les récepteurs B1 ou B2 mais pas la signalisation VEGF (Kita *et al.*, 2015). Ces travaux suggèrent que le système des kinines emprunte une voie complètement indépendante du système VEGF dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire dans l'œdème maculaire. Murakami *et al.*, 2015, propose l'hypothèse que le VEGF initie la rupture de la BHR, mais que ce sont les kinines qui favorisent et maintiennent l'hyperperméabilité vasculaire. Ces deux systèmes majeurs contribuent donc parallèlement à une hyperperméabilité vasculaire soutenue dans la pathogenèse chronique du diabète.

1.46 Interaction entre le SKK et le système rénine-angiotensine

Le SKK et le système rénine-angiotensine (SRA) constituent deux systèmes de régulation interactifs impliqués dans une multitude d'actions physiologiques et physiopathologiques (Regoli et Gobeil, 2017). En règle générale, le SRA joue un rôle important dans la régulation de la pression artérielle. Dans cette voie, l'angiotensinogène est converti en angiotensine I par la rénine puis clivée en angiotensine II (un puissant vasoconstricteur) par l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) dans la circulation pulmonaire (Hong *et al.*, 2008). ACE, une dipeptidyl carboxypeptidase aussi nommée kininase II, catabolise également la BK, qui agit comme un vasodilatateur (Jung *et al.*, 2006; Wijesekara et Kim, 2010; Regoli et Gobeil, 2017). Une autre stratégie pour prévenir ou traiter la rétinopathie diabétique serait donc de cibler l'interaction entre le SRA et le SKK. Les composantes du SRA sont présentes dans les tissus oculaires et l'hypertension associée au SRA est un facteur aggravant de la rétinopathie diabétique (Ayalasomayajula *et al.*, 2004). Les concentrations d'angiotensine II et d'angiotensinogène sont élevées dans le vitré des patients atteints de PDR par rapport à la phase NPDR (Gao *et al.*, 2007). Des concentrations sériques élevées de rénine et d'ACE ont été détectées chez les patients atteints de rétinopathie diabétique (Clermont *et al.*, 2006). L'activation du récepteur AT1 peut stimuler plusieurs voies impliquées dans la pathogenèse de la RD telles que l'inflammation, le stress oxydatif, la prolifération cellulaire, la migration des péricytes et le remodelage de la

matrice extracellulaire (Wilkinson-Berka, 2006). L'inhibition du SRA semble atténuer la plupart des voies pathologiques rencontrées pendant la rétinopathie diabétique et s'accompagne d'une régulation négative du VEGF et du VEGF-R2 (Wilkinson-Berka, 2006). La voie du SRA pro-oxydative favorise l'expression du RB1 en convergeant vers l'activation de la NAPDH oxydase et du NF- κ B. Fait intéressant, les inhibiteurs de l'ACE empêchent l'induction et l'expression du RB1 vasculaire dans un modèle diabétique, ce qui suggère que les effets bénéfiques des bloqueurs du SRA et de l'ACE pourraient être associés en partie à la suppression du RB1 (Ismael *et al.*, 2008). Plusieurs auteurs ont démontré que les effets protecteurs des inhibiteurs de l'ACE sur le cœur et les vaisseaux sanguins étaient au moins en partie dus à l'activation du RB2 via une accumulation de kinines (Linz *et al.*, 1995; Erdös *et al.*, 2001; Tschöpe *et al.*, 2001). Il a été démontré aussi que les inhibiteurs de l'ACE diminuent la phosphorylation du RB2 stimulé par la BK, mais pas en l'absence de BK, ce qui concorde de manière appropriée avec la potentialisation des actions de la BK par les inhibiteurs de l'ACE (Marcic *et al.*, 2000). Les inhibiteurs de l'ACE sont couramment prescrits pour le contrôle de la pression artérielle et la protection rénale. Les inhibiteurs de l'ACE et les bloqueurs des récepteurs de l'angiotensine ont significativement réduit le risque relatif de mortalité cardiovasculaire, de l'infarctus du myocarde, des accidents vasculaires cérébraux et de l'insuffisance cardiaque de 7% dans les populations à forte prévalence d'hypertension ($\geq 66\%$) (Ferrari et Boersma, 2013). Toutefois, il a été démontré qu'un taux élevé de BK dû à l'inhibition de l'ACE peut être une cause d'angioedème, de toux sèche, d'hypotension ou encore de douleur liée à l'inflammation (Beavers *et al.*, 2011; Bezalel *et al.*, 2015). À l'heure actuelle, il y a un essai clinique de Phase III en cours qui étudie l'effet de l'icatibant (antagoniste du RB2) dans l'angioedème induit par les inhibiteurs de l'ACE (Whalley *et al.*, 2012). Les inhibiteurs de l'ACE les plus fréquemment prescrits sont le bénazépril, le zofénopril, le périndopril, le trandolapril, le captopril, l'énalapril, le lisinopril et le ramipril (RxList ACE Inhibitor. com).

CHAPITRE 2

Premier article

2 Article 1

Hachana S, Bhat M, Sénécal J, Huppé-Gourgues F, Couture R, and Vaucher E. (2017) Expression, distribution and function of Kinin B1receptor in the rat diabetic retina. British Journal of Pharmacology 175 :968-983.

2.1 Problématique

Notre laboratoire a publié antérieurement que le récepteur B1 des kinines (RB1) est fortement induit dans la rétine du rat diabétique où il est responsable de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, du stress oxydatif et de l'expression de plusieurs médiateurs de l'inflammation (VEGF, VEGF-R2, iNOS, Cox-2) (Pouliot *et al.*, 2012). Cet article vise à mieux comprendre la fonction et le mécanisme d'action du RB1 dans ce processus inflammatoire en explorant son implication dans la réactivité gliale, les altérations vasculaires et dans son interaction avec le VEGF dans la rétine diabétique à différents stades de la maladie. À travers cet article, nous avons aussi répondu à une question fondamentale qui est en rapport avec la localisation cellulaire du RB1 dans la rétine. On ignore jusqu'à présent sur quel type cellulaire se situe le RB1 dans la rétine témoin ou diabétique. Cette information s'avère indispensable pour mieux caractériser le rôle du RB1 dans la rétinopathie diabétique.

2.2 Hypothèse

Il est émis comme hypothèse que le récepteur B1 est impliqué dans les événements précoces liés aux changements vasculaires dans la rétine diabétique et que son inhibition peut empêcher l'évolution de la maladie à des stades précoces ou inverser la progression de la maladie en cas de rétinopathie diabétique établie. Il est suggéré que le RB1 joue un rôle indépendant sur les principales caractéristiques pathologiques de la rétinopathie diabétique, mais pourrait également les influencer par l'induction de la voie VEGF.

2.2 Objectif principal et objectifs spécifiques

L'objectif à long terme de cette étude est d'élucider la cascade d'événements impliqués dans la rétinopathie diabétique et de déterminer si l'inhibition du RB1 peut prévenir et inverser

la progression de la maladie aux stades précoce et tardif. L'utilisation d'un agent pharmacologique topique pour traiter les premiers stades de la rétinopathie diabétique serait un exploit.

Ces études ont été effectuées dans la rétine de rats diabétiques STZ de 2 sem, 6 sem et 6 mois. Ces trois points représentent le stade précoce du diabète (2 sem), l'apparition d'altérations morphologiques dans les astrocytes (6 sem) et l'apparition de microanévrismes (6 mois).

- *Objectif 1* : déterminer quelles caractéristiques pathologiques, y compris la gliose réactive et l'expression génique inflammatoire, sont induites par la stimulation du RB1 chez des rats STZ de 2 et 6 semaines. Les rats STZ ont été traités par des injections intravitréennes de R-838 (agoniste RB1) ou de sérum physiologique. En plus des paramètres ci-dessus, la localisation immunohistochimique du RB1 sur les cellules endothéliales et gliales de la rétine a été étudiée. La co-localisation possible du RB1 avec le VEGF-R2 a été également examinée.
- *Objectif 2*: évaluer si l'inhibition du RB1 peut empêcher la réactivité de la microglie dans la rétinopathie diabétique précoce. Le marquage immunochimique est effectué chez des rats STZ de 2 sem traités par des gouttes oculaires avec l'antagoniste R-954 ou le véhicule.
- *Objectif 3* : évaluer chez les rats STZ de 6 mois si le RB1 est encore exprimé à un stade évolué de la rétinopathie diabétique.

2.3 Contribution



SH a réalisé les expériences, participé au design expérimental, analysé les données et écrit la première version du manuscrit. MB a participé à la réalisation des expériences de PCR. JS a aidé à la réalisation des expériences de perméabilité vasculaire. FHG a aidé à l'analyse des données statistiques. RC et EV ont réalisé le design expérimental, contribué à l'interprétation des résultats et à l'écriture de la version finale du manuscrit. RC et EV ont fait la correspondance de l'éditeur.

RESEARCH PAPER

Expression, distribution and function of kinin B₁ receptor in the rat diabetic retina

Correspondence Elvire Vaucher, École d'optométrie, Université de Montréal, C.P.6128, Succursale Centre Ville, Montréal, QC H3C 3J7, Canada. E-mail: elvire.vaucher@umontreal.ca

Received 28 June 2017; **Revised** 22 November 2017; **Accepted** 15 December 2017

Soumaya Hachana^{1,2}, Menakshi Bhat^{1,2}, Jacques Sénécal², Frédéric Huppé-Gourgues¹ , Réjean Couture^{2,*} and Elvire Vaucher^{1,*} 

¹École d'optométrie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada, and ²Département de Pharmacologie et Physiologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

*The two senior authors contributed equally to the work.

BACKGROUND AND PURPOSE

The kinin B₁ receptor contributes to vascular inflammation and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy (DR). We investigated the changes in expression, cellular localization and vascular inflammatory effect of B₁ receptors in retina of streptozotocin diabetic rats.

EXPERIMENTAL APPROACH

The distribution of B₁ receptors on retinal cell types was investigated by immunocytochemistry. Effects of B₁ receptor agonist, R-838, and antagonist, R-954, on retinal leukocyte adhesion, gene expression of kinin and VEGF systems, B₁ receptor immunoreactivity, microgliosis and capillary leakage were measured. Effect of B₁ receptor siRNA on gene expression was also assessed.

KEY RESULTS

mRNA levels of the kinin and VEGF systems were significantly enhanced at 2 weeks in streptozotocin (STZ)-retina compared to control-retina and were further increased at 6 weeks. B₁ receptor mRNA levels remained increased at 6 months. B₁ receptor immunolabelling was detected in vascular layers of the retina, on glial and ganglion cells. Intravitreal R-838 amplified B₁ and B₂ receptor gene expression, B₁ receptor levels (immunodetection), leukostasis and vascular permeability at 2 weeks in STZ-retina. Topical application (eye drops) of R-954 reversed these increases in B₁ receptors, leukostasis and vascular permeability. Intravitreal B₁ receptor siRNA inhibited gene expression of kinin and VEGF systems in STZ-retina. Microgliosis was unaffected by R-838 or R-954 in STZ-retina.

CONCLUSION AND IMPLICATIONS

Our results support the detrimental role of B₁ receptors on endothelial and glial cells in acute and advanced phases of DR. Topical application of the B₁ receptor antagonist R-954 seems a feasible therapeutic approach for the treatment of DR.

Abbreviations

BK, bradykinin; DR, diabetic retinopathy; GCL, ganglion cell layer; GFAP, glial fibrillary acid protein; Iba-1, ionized calcium-binding adapter molecule 1; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; qRT-PCR, real-time quantitative RT-PCR; R-838, Sar-[D-Phe⁸]-desArg⁹-BK; R-954, AcOrn [Oic², (αMe) Phe⁵, DβNal⁷, Ile⁸] desArg⁹-BK; RECA-1, rat endothelial cell antigen-1; STZ, streptozotocin

Introduction

Diabetic retinopathy (DR) is one of the most frequent complications of diabetes. Approximately 75% of patients living with diabetes for 20 years show clinical signs of retinopathy and over 10% of them are affected by a vision loss (Frank, 2004; Hernandez *et al.*, 2017). Vision loss is the result of slow and gradual alterations in the microvasculature of the retina due to hyperglycaemia and an inflammatory response, which lead to the overexpression of **VEGF**, breakdown of the blood-retinal barrier, pathological proliferation of blood vessels and the formation of fibrous tissue in the vitreous cavity leading to retinal detachment (Wilkinson-Berka, 2006). In addition to changes in the vascular bed, pathological mechanisms in DR are associated with activation of glial cells and dysfunction of neurons. Principally, reactive microglia, astrocytes and Müller glial cells in the retina produce VEGF (Wang *et al.*, 2010; 2015) and inflammatory mediators that amplify the inflammatory response (Chang *et al.*, 2007; Sorrentino *et al.*, 2016) and could play an important role in the breakdown of the haemoretinal barrier (Antonetti *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2010). Recent findings suggest a role for the kallikrein-kinin system in the development of inflammation in DR (Wilkinson-Berka and Fletcher, 2004; Phipps and Feener, 2008; Feener, 2010; Bhat *et al.*, 2014). All the components of the kallikrein-kinin system are present in the retina and several studies suggest that metabolic changes associated with diabetes can cause the production of kinins in the retina (Ma *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 1999; Phipps *et al.*, 2009). Although retinal vascular permeability was decreased following systemic and intravitreal injection of a selective plasma kallikrein inhibitor in diabetic rats (Clermont *et al.*, 2011), the relative contribution of tissue kallikrein in DR remains elusive.

Kinins are vasoactive autacoid peptides involved in a variety of biological effects including vasodilatation, inflammation and pain. Kinins are among the first mediators to be released into the injured tissue (Couture *et al.*, 2001). Kinins undergo rapid metabolic degradation by amino-, endo- and carboxypeptidases found in blood, tissues and biological fluids. The aminopeptidases, carboxypeptidases, neutral endopeptidase and angiotensin converting enzyme (also known as kininase II) are the main enzymes responsible for the metabolism of **bradykinin** (BK) and **kallidin** (Lys-BK) into active and inactive peptide fragments. These enzymes ensure that the half-life of kinins is only a few seconds (Décarie *et al.*, 1996; Gabra *et al.*, 2003). Kinins exert their biological effects by activating two GPCRs: the bradykinin **B₁ receptor** and B₂ receptor (Regoli *et al.*, 2001; Leeb-Lundberg *et al.*, 2005). The constitutive B₂ receptor mediates most of the effects of BK and kallidin while the B₁ receptor is activated by the C-terminal metabolites **des-Arg⁹-BK** and Lys-des-Arg⁹-BK generated by kininase I (carboxypeptidase M/N). The B₁ receptor is weakly expressed under physiological conditions, yet it is strongly induced and up-regulated during tissue injury or after exposure to oxidative stress, bacterial endotoxins, growth factors and pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β (Zhou *et al.*, 1998; Couture *et al.*, 2014). The induction of B₁ receptors by cytokines is regulated by MAPK and the nuclear transcription factor NF- κ B (Larrivee *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 1999). The B₁ receptor is overexpressed in the retina of type 1 and type 2 diabetic

patients (Bhat *et al.*, 2014). In the retina of streptozotocin (STZ)-diabetic rats, the B₁ receptor is readily up-regulated by a mechanism involving oxidative stress, and contributes to the vasodilatation of microvessels and increased vascular permeability (Abdoun *et al.*, 2003; Abdoun *et al.*, 2008). The non-peptide B₁ receptor antagonist LF22-0542 reverses numerous of the pathological processes, occurring after two weeks in retina from STZ-diabetic rats, such as vascular hyperpermeability, leukocyte infiltration and the up-regulation of inflammatory mediators notably VEGF (Pouliot *et al.*, 2012).

To better define the physiopathological role of the B₁ receptor in DR, we investigated its cellular distribution and its expression during the course of diabetes. For this study, we focused on the nonproliferative stage of DR, and selected 2 weeks of diabetes in most experiments to enable comparison with our previous studies using LF22-0542 (Pouliot *et al.*, 2012). The impact of B₁ receptor gain-of-function secondary to intraocular treatments with a highly selective and peptidase resistant B₁ receptor agonist (**R-838, Sar-[D-Phe⁸]-des-Arg⁹-BK**) was examined on the main inflammatory events in DR, that is, leukostasis and microgliosis and on the endothelial dysfunction, that is, vascular permeability. The phenotype of B₁ receptor activation with R-838 was compared with that of B₁ receptor deletion with siRNA on gene expression of kinin receptors and the VEGF system. Lastly, the peptidase resistant B₁ receptor antagonist R-954, (AcOrn [Oic², (αMe) Phe⁵, DβNal⁷, Ile⁸] desArg⁹-BK) was administered topically by eye drops to determine its therapeutic value in this model of DR.

Methods

Animal model and procedures

All experimental methods and animal care procedures were approved by the animal care committee of the Université de Montréal (Protocol 15-063) in accordance with the Canadian Council on Animal Care. Animal studies are reported in compliance with the ARRIVE guidelines (Kilkenny *et al.*, 2010; McGrath and Lilley, 2015). Male Wistar rats (200–250 g, 6–8 weeks old) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage using heated wood chip litter as bedding material in a pathogen-free environment and under standard conditions of temperature (22°C) and humidity (43%) on a 12 h light/dark cycle and allowed free access to normal chow diet and tap water. The rats were made diabetic by a single i.p. injection of STZ (Zanosar 65 mg·kg⁻¹; Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada). The concentration of glucose was measured in blood samples from the tail vein with a glucometer (Accusoft; Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada). Only STZ-treated rats with glycaemia above 20 mmol·L⁻¹ were considered diabetic and included in the study. Blood glucose and body weight were recorded three times per week and on the day of the experiment. STZ-diabetic rats were humanely killed with isoflurane when they reached the following ethical endpoints: glycaemia ≥ 30 mmol·L⁻¹, loss of body weight $\geq 20\%$, severe diarrhoea, loss of locomotor activity and rearing. STZ-diabetic rats were randomly divided for each pharmacological

treatment, and the experimenter was blinded to assess immunohistological parameters (B_1 receptor distribution, microgliosis and leukostasis) and to perform data analysis. One rat was killed in the STZ treated group with R-838 because the glycaemia was higher than the endpoint.

Pharmacological treatments

The highly selective and metabolically protected peptide B_1 receptor agonist R-838 (Audet *et al.*, 1997) synthesized at the Research Institute of Biotechnology, National Research Council of Canada (Montréal, QC, Canada) was injected intravitreally ($100 \text{ ng} \cdot 5 \mu\text{L}^{-1}$) twice, to rats anaesthetized with 3% isoflurane, the second injection being given 48 h prior to the experiments. The vehicle (sterile saline solution, 0.9%) was administered to the contralateral eye. Rats with any kind of postoperative complication (cataract or infection) were excluded from analysis. A selective and metabolically protected peptide B_1 receptor antagonist R-954 (Gobeil *et al.*, 2014), kindly provided by Dr Fernand Gobeil Jr (Pharmacology, Université de Sherbrooke, QC, Canada), was applied to unanaesthetized rats twice a day with one eye drop application ($\approx 100 \mu\text{g} \cdot 10 \mu\text{L}^{-1}$) in both eyes during the last week prior to the experiments. R-954 was prepared in sterile saline solution and filtered ($0.20 \mu\text{m}$ mesh). In addition, Ambion *in vivo* B_1 receptor siRNA (Invitrogen Life Technologies, Canada) was used to determine the efficacy of the B_1 receptor-siRNA strategy in reducing the mRNA levels of B_1 receptors, B_2 receptors, **VEGF-A** and **VEGFR-2**, in the retinas of STZ-diabetic rats by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and to confirm the specificity of the polyclonal rabbit antiserum to rat B_1 receptors by immunocytochemistry (Supporting Information Figure S1). After anaesthesia with 3% isoflurane, a single intravitreal injection of siRNA (0.5, 1.0 or 10 nmol) on the day of STZ treatment for qRT-PCR and 2 days after STZ treatment for immunohistochemistry was performed. Rats were killed 1 week later, for the qRT-PCR or immunofluorescence analysis (see below).

No ocular irritation such as redness, porphyrin secretion or corneal opacity was seen 1 week after treatment with R-838, R-954 or B_1 receptor siRNA. In a previous study, s.c. administration of R-954 corrected the enhanced NO, kallikrein and vascular permeability in the retina of STZ-diabetic rats at 4 and 12 weeks (Catanzaro *et al.*, 2012).

Moreover, a mixture of $10 \mu\text{L}$ of the radiolabelled [^3H]-R-954 (Vitrax, $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, specific activity: $225 \text{ mCi} \cdot \text{mmol}^{-1}$, molar mass: $1194.42 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) with $1 \mu\text{L}$ of cold R-954 ($100 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) was applied on the surface of both eyes 1, 3 and 12 h (one rat for each time point) before the rat was killed to assess its ability to diffuse into the different structures. The cornea, vitreous, lens, retina and choroid from each eye of the STZ-treated rats were removed and digested in $300 \mu\text{L}$ of solvane (PerkinElmer, Boston, MA, USA) for 2 h at 37°C . A total of 5 mL of scintillation fluid (Ultimagold, Perkin Elmer, Boston, MA, USA) was added, and the radioactivity was counted in a scintillation counter (LS6500, Beckman Coulter, Mississauga, ON, Canada). Data are expressed as $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ of wet tissue, calculated from the DPM counts, specific activity and molar mass of [^3H]-R954. The percentage of [^3H]-R-954 represents the levels of radioactivity distributed within the various tissues.

Measurement of retinal inflammatory markers by quantitative RT-PCR

Control, 2 weeks, 6 weeks and 6 months STZ-treated rats were anaesthetized with urethane ($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and the eyes were dissected out. The retinæ were isolated and immersed in RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). First-strand cDNA synthesized from 400 ng total RNA with random hexamer primers was used as the template for each reaction with the QuantiTect Rev Transcription Kit (QIAGEN). SYBR Green-based real-time quantitative PCR using Mx3000p device for signal detection (Stratagene, La Jolla, CA, USA) was performed as previously described (Pouliot *et al.*, 2012). A PCR was performed in SYBR Green Master mix (QIAGEN) with 300 nM of each primer. For standardization and quantification, rat 18S mRNA was amplified simultaneously. The primer pairs were designed by Vector NTI software (Table 1). PCR conditions were as follows: 95°C for 15 min, followed by 46 cycles at 94°C for 15 s, 60°C for 30 s and 72°C for 30 s. The relative differences in gene expression between treatment groups and control were determined using the $\Delta\Delta\text{Ct}$ method. Each sample was run in duplicate to ensure the reliability of single values.

Immunofluorescent and immunocytochemistry staining

The specificity of the polyclonal rabbit antiserum for B_1 receptors was shown previously in B_1 receptor knockout (KO) mice tissues (Lin *et al.*, 2010; Lacoste *et al.*, 2013) and further determined in the present study using retina from wild-type (WT) and B_1/B_2 receptor KO mice (provided by Dr Jean-Pierre Girolami, Université Paul Sabatier, Toulouse, France). In contrast to WT mice retina, B_1 receptor immunostaining was totally absent in the retina of B_1/B_2 receptor KO mice (Supporting Information Figure S1). Furthermore, the specificity of the B_1 receptor antiserum was confirmed in STZ rat retina treated with B_1 receptor siRNA (10 nmol) showing a complete absence of B_1 receptor labelling. Also no staining was found in STZ rat retina incubated with the pre-immune serum as a negative control (Supporting Information Figure S1).

For immunofluorescent staining, rats were perfused with a paraformaldehyde solution (2% PFA), and the eyes were dissected out, post-fixed in 2% PFA for 2 h and then frozen in isopentane (-55°C). Eyes were cut into $20\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections with a cryostat and placed onto glass slides. Alternatively, they were embedded in paraffin after post-fixation, cut into $5\text{-}\mu\text{m}$ -thick sections and placed onto glass slides. The samples were treated to remove paraffin prior to the immunocytochemistry experiment. Tissue sections were incubated within a 20 mL staining dish containing sodium citrate buffer at 95°C . The citrate-based solution breaks the PFA-induced protein cross-links, therefore, unmasks the antigens and epitopes and enhances the intensity of staining of the antibodies. Sections were placed at room temperature (RT) and allowed to cool down for 20 min. Then, sections were washed for 10 min in 0.1 M PBS buffer (pH 7.4) and incubated for 1 h (RT) in blocking buffers (PBS containing 10% donkey serum and 0.25% triton X-100) to prevent non-specific labelling. Sections were incubated overnight at RT with the blocking buffer containing one of the following primary antibodies:

Table 1

List of primer pairs designed by vector NTI software and used in qRT-PCR analysis

Gene		Sequence	Position	GenBank accession no
B ₁ R	Forward	5' GCAGCGCTTAACCATAGCGGAAAT	3' 67–390	NM_030851
	Reverse	5' CCAGTTGAAACGGTCCCGATGTT	3' 454–431	
B ₂ R	Forward	5' AGGTGCTGAGGAACAACGAGATGA	3' 882–905	NM_173100
	Reverse	5' TCCAGGAAGGTGCTGATCTGGAAA	3' 990–967	
VEGF-A	Forward	5' TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA	3' 1219–1242	BC168708
	Reverse	5' TTACACGTCTGCGGATCTGGACA	3' 371–1348	
VEGFR-2	Forward	5' AGTGGCTAAGGGCATGGAGTTCTT	3' 3269–3292	U93306
	Reverse	5' GGGCCAAGCCAAGTCACAGATTT	3' 3387–3292	
18S	Forward	5' TCAACTTTCGATGGTAGTCGCCGT	3' 363–385	X01117
	Reverse	5' TCCTGGATGTGGTAGCCGTTTCT	3' 470–447	

polyclonal rabbit antiserum to rat B₁ receptor 1:150, mouse monoclonal anti-endothelial cells [rat endothelial cell antigen-1 (RECA-1), ab 9774; ABCAM] 1:500, mouse monoclonal anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) (IF03L, Millipore Sigma) 1:500 to label astrocytes, mouse polyclonal anti-ionized calcium binding adapter molecule 1 (Iba-1; Wako, Richmond, VA, USA) 1:500 (2 µg·mL⁻¹) to label microglia and chicken monoclonal anti-VEGFR-2 (GW21181, Sigma-Aldrich) 1:250. Afterwards, the slides were incubated for 2 h at RT with Alexa Fluor 488 donkey secondary anti-rabbit IgG (A21206, Invitrogen) to visualize B₁ receptors, with Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (A31570, Invitrogen) to visualize endothelial cells, astrocytes and microglia and with Alexa Fluor 647 goat anti-chicken IgG (ab150175, Abcam) to visualize VEGFR-2. The slides were finally washed and mounted using ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen). Images were obtained with a confocal microscope Zeiss-LSM800 equipped with an argon laser.

For the immunocytochemical study, tissue sections were prepared similarly. After incubation with the polyclonal rabbit antiserum to rat B₁ receptors 1:150, the sections were washed, and incubated with the appropriate biotinylated secondary antibody (1:200; Vectastain kit) for 2 h at RT. The slides were washed [PBS-T (0.25%)] and exposed to ABC solution (1%) (Vectastain, Vector Elite) for 1 h at RT. After being rinsed, the slides were exposed to diaminobenzidine (DAB/Vector peroxidase substrate Kit) chromogen for up to 10 min. The sections were rinsed for 5 min with PBS to stop the reaction. The slides were dehydrated with ethanol and cleared with xylene and then mounted using DPX mounting medium.

Quantification of B₁ receptors and Iba-1 immunolabelling

Microphotographs were obtained with a Leica microscope (Leica microsystems Co., Germany). Tissues from each experimental group were processed and imaged in parallel. The camera setting was identical for acquisition of images from all sections. Leica LCS Lite software was used to quantify the mean grey values in the retinal ganglion cell layer (GCL), the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer

(ONL). Data are expressed as the mean pixel energy ratio from an average of 10 perikarya in the GCL or 20 perikarya in the INL and ONL for each retinal image quantified in four rats.

Measurement of retinal leukostasis

The rats were anaesthetized with urethane (1.5 g·kg⁻¹), and a 16G cannula was inserted into the left heart ventricle. Rats were perfused with PBS over 1 min (35 mL·min⁻¹). FITC-coupled concanavalin A lectin was infused (20 µg·mL⁻¹ in PBS, 5 mg·kg⁻¹, 30 mL·min⁻¹). Then 4% PFA was perfused for 1 min followed by albumin 1% in PBS for 1 min and by PBS for 2 min (35 mL·min⁻¹). Eyes were removed, then the retinae were dissected out and flat mounted on a glass slide and imaged using a fluorescence microscope (Leica microsystems Co., Germany).

Measurement of retinal vascular permeability

Retinal vascular permeability was measured using the Evans blue dye technique as described previously (Pouliot *et al.*, 2012). The rats were anaesthetized with urethane (1.5 g·kg⁻¹), and a catheter (Micro-Renathane, I.D. 0.040", O.D. 0.020", Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) was inserted into the right femoral vein. Evans blue dye (45 mg·mL⁻¹ in saline) (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) was injected i.v. for 10 s, and 1.5 h later, saline (25 mL) was infused through the left heart ventricle to wash out intravascular dye. Eyes were removed, then the retina was dissected out and immediately weighed. Evans blue dye was then extracted by incubating each retina in 500 µL of formamide (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada) for 18 h at 70–75°C. The fluorescence of Evans blue was measured using a spectrofluorometer (Spex 1681 0.22 m, Horiba Jobin Yvon Inc, Edison, NJ, USA) using the wavelength of 620 nm (excitation) and 680 nm (emission).

Statistical analysis

The data and statistical analysis comply with the recommendations on experimental design and analysis in pharmacology (Curtis *et al.*, 2015). Data are expressed as mean ± SEM of values and 'n' refers to the number of rats for each set of experiments. Multiple comparisons between groups were performed using the non-parametric ANOVA Kruskal-Wallis test and *post hoc* Dunn's test for leukostasis and cellular

distribution of B₁ receptors and microglia quantification. One-way ANOVA followed by the Bonferroni test was used for vascular permeability, Table 2 and gene expression when F achieved $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using Prism™ version 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Nomenclature of targets and ligands

Key protein targets and ligands in this article are hyperlinked to corresponding entries in <http://www.guidetopharmacology.org>, the common portal for data from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY (Harding *et al.*, 2018), and are permanently archived in the Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18 (Alexander *et al.*, 2017a,b).

Results

Blood glucose levels and body weight

Blood glucose concentrations were significantly increased while body weights were significantly decreased in STZ-diabetic rats at 2 weeks, 6 weeks and 6 months when compared to age-matched control rats (Table 2). One week of treatment with R-838 or R-954 had no significant effect on glycaemia and body weight in STZ-diabetic rats and control rats.

Distribution of topically applied [³H]-R-954

To make sure that the topically applied B₁ receptor antagonist on the ocular surface was able to reach the retina, we performed a preliminary experiment to evaluate the distribution of [³H]-R-954 within the ocular compartments of STZ-diabetic rat, at 1, 3 and 12 h post-administration. The results presented in Table 3 reveal that [³H]-R-954 was present in the retina 1 h after topical application and declined gradually thereafter. The major route of elimination of [³H]-R-954 is

likely the choroid with its highest blood flow, suggesting that [³H]-R-954 crosses readily through the different tissues before reaching the choroid at 1 h and accumulating gradually in the choroid at 3 and 12 h after application. Because [³H]-R-954 is not metabolized in rat tissue homogenates kept at room temperature (Gobeil Jr. *et al.*, 2014), only its intact form can be found in each tissue compartment.

Effect of B₁ receptor stimulation on mRNA levels of kinin receptors and the VEGF system in the STZ-retina

Results depicted in Figure 1 showed significant and similar diabetes-induced increases (≈6-fold) of mRNA levels for B₁ receptors, B₂ receptors, VEGF-A and VEGFR-2 in the retina of 2 weeks STZ-diabetic rats compared to control retina. Retinal mRNA levels of all these markers were significantly higher at 6 weeks than at 2 weeks in vehicle-injected STZ-diabetic rats. Intravitreal injection of R-838 significantly further increased retinal mRNA levels of B₁ and B₂ receptors both at 2 and 6 weeks but not the mRNA of VEGF-A and VEGFR-2 when compared to vehicle-injected STZ-diabetic rats. The mRNA levels of the four markers in the retina of control rats were not changed by two intravitreal injections of R-838 at 48 h apart when compared to control vehicle at 2 weeks. However, R-838 caused a small but significant increase in B₁ and B₂ receptor mRNA levels in the 6 weeks control. B₁ receptors remained overexpressed (mRNA increased by ≈6-fold) at 6 months of diabetes, but the level of expression was not significantly enhanced by R-838 (Figure 1A).

In a separate series of experiments performed in 2 weeks STZ-diabetic rats, retinal mRNA levels of B₁ receptors, B₂ receptors, VEGF-A and VEGFR-2 were significantly increased (fourfold to sixfold) compared to control rats. These increases in STZ-retinas were dose-dependently prevented by B₁ receptor siRNA. Doses of 1.0 or 10 nmol of B₁ receptor siRNA totally prevented any increases in B₁ receptor, B₂ receptor, VEGF-A and VEGFR-2 mRNA expression (Figure 1E).

Table 2

Effects of diabetes and B₁ receptor agonist (R-838) and antagonist (R-954) treatments on body weight and glycaemia

Parameters	Ctl-vehicle (n = 6)	Ctl-R-838 (n = 6)	STZ-vehicle (n = 6)	STZ-R-838 (n = 5)	STZ-R-954 (n = 6)
2 weeks					
Body weight (g)	351 ± 8	353 ± 4	264 ± 12*	260 ± 13*	260 ± 8*
6 weeks					
Body weight (g)	358 ± 7	364 ± 4	279 ± 12*	268 ± 13*	–
6 months					
Body weight (g)	430 ± 11	–	249 ± 5*	252 ± 5*	–
2 weeks					
Glycaemia (mmol·L ⁻¹)	5.2 ± 0.1	5.2 ± 0.1	26.6 ± 1.9*	27.4 ± 1.0*	25.7 ± 1.8*
6 weeks					
Glycaemia (mmol·L ⁻¹)	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.1	27.7 ± 1.7*	28.0 ± 1.3*	–
6 months					
Glycaemia (mmol·L ⁻¹)	5.1 ± 0.4	–	28.8 ± 2.0*	29.5 ± 1.4*	–

Values are mean ± SEM of five to six rats per group. Statistical significance was determined with one-way ANOVA followed by the Bonferroni test.

* $P < 0.05$ significantly different from control (Ctl)-vehicle.

Table 3

Eye tissue distribution of [³H]-R-954 at 1, 3 and 12 h post-treatment

Tissues		1 h post-treatment	3 h post-treatment	12 h post-treatment
Cornea	ng (μCi)·g ⁻¹ wet tissue	300.5 (56.6)	35.0 (6.6)	8.9 (1.67)
	%	14	26	14
Lens	ng (μCi)·g ⁻¹ wet tissue	71.8 (13.5)	29.0 (5.4)	14.2 (2.7)
	%	34	22	22
Vitreous	ng (μCi)·g ⁻¹ wet tissue	17.6 (3.3)	5.4 (1.0)	8.0 (1.5)
	%	8	9	12
Retina	ng (μCi)·g ⁻¹ wet tissue	59.5 (11.2)	13.1 (2.5)	9.8 (1.8)
	%	28	10	15
Choroid	ng (μCi)·g ⁻¹ wet tissue	32.6 (6.1)	42.3 (8.0)	23 (4.3)
	%	15	23	36

Values are in ng of [³H]-R-954·g⁻¹ wet tissue (μCi·g⁻¹ wet tissue) calculated at 1, 3 and 12 h after eye drops application in STZ-diabetic rats (two eyes from one rat for each time point). The radioactivity was counted in each tissue, and the amount was expressed as a percentage of the total (%).

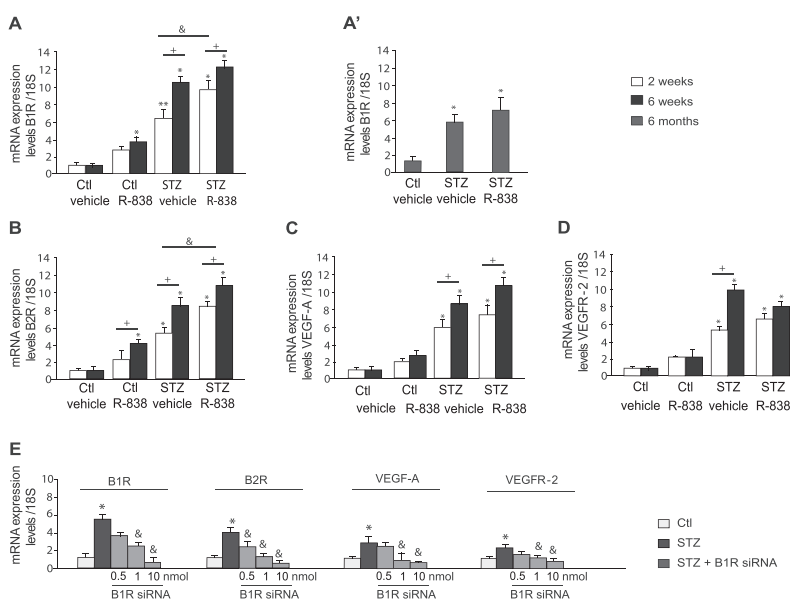


Figure 1

Relative mRNA expression of kinin receptors and the VEGF system in the retina at different time points of diabetes. mRNA levels of B₁ receptors (B₁R; A, A'), B₂ receptors (B₂R; B), VEGF-A (C) and VEGFR-2 (D) in control (Ctl; fold = 1) and STZ-retina at 2 weeks (open graphs), 6 weeks (black graphs) and 6 months (A', grey graphs, B₁ receptor only) with or without intravitreal administration of the B₁ receptor agonist R-838. (E) The impact of one intravitreal administration of B₁ receptor siRNA (0.5, 1.0 or 10 nmol) on mRNA levels of B₁ receptors, B₂ receptors, VEGF-A and VEGFR-2 in STZ-retina at 2 weeks in comparison to control (Ctl, fold = 1.0). Data are mean ± SEM of values from five to six rats in each group. Statistical comparison to Ctl-vehicle (*) and between 2 and 6 weeks (+) or between STZ-vehicle and STZ-R-838 (³) is indicated by *+,³P < 0.05. Comparison to Ctl (*) or to STZ without siRNA (³) is indicated by *,³P < 0.05.

Effect of B₁ receptor agonist and antagonist on B₁ receptor immunoreactivity in the retina at 2 weeks of diabetes

The distribution of B₁ receptors in the retina and the intensity of staining in the different experimental conditions were studied by immunocytochemistry. The immunodetection of B₁ receptors was located mainly in vascularized layers of the retina, particularly in the retinal GCL, the INL and the ONL (Figure 2, upper panel). While basal B₁ receptor immunostaining was virtually absent in the retina of control rats (Figure 2A), it was intense in the retina of 2 weeks STZ-diabetic rats (Figure 2B). Intravitreal treatment with R-838 further enhanced B₁ receptor staining intensity in the retina of STZ-diabetic rats (Figure 2C), while eye drops application of R-954 reduced it markedly in STZ-retina (Figure 2D). Semi-quantitative analysis showed significant increases in B₁ receptor immunolabeling in the three layers of the STZ-retina in comparison to control retina (Figure 2E). Treatment with R-838 did not significantly increase the B₁ receptor labelling in STZ-retina compared to the STZ group receiving vehicle despite a tendency in GCL and INL. In contrast, treatment with R-954 abolished the increases in B₁ receptor staining in GCL, INL and ONL in STZ-retina (Figure 2E).

Effect of B₁ receptor agonist and antagonist on retinal leukostasis at 2 weeks of diabetes

The pharmacological effect of R-838 and R-954 on leukocyte infiltration, which is an inflammatory event strongly involved in the pathogenesis of DR, was evaluated (Figure 2, middle panel). The leukocytes were labelled with FITC-concanavalin A lectin (Figure 2A'–D'). The number of adherent leukocytes to the retinal vascular endothelium was significantly higher (Figure 2E') in STZ-diabetic retina compared to control. Although treatment with R-838 did not enhance further the leukostasis in the STZ-retina compared with vehicle-injected STZ-retina, R-954 significantly decreased leukocyte adherence and infiltration in STZ-diabetic retina. Some leukocytes were occasionally seen within the retinal tissue in STZ treated with R-838 (Figure 2C', arrowhead). This invasion of the retina by leukocytes indicates a strong inflammatory process controlled by B₁ receptors.

Effect of B₁ receptor agonist and antagonist on spatial distribution of microglia reactivity at 2 weeks of diabetes

Microglia cells were found chiefly within the layer of neuronal fibres (Figure 2A''–D'', lower panel). In pathological conditions, these phagocytic cells can be present throughout the retina, where they produce not only pro-inflammatory cytokines but also factors that ensure the survival of vascular cells and neurons (Chen *et al.*, 2002). Here, we determined whether the B₁ receptor has an effect on microglia reactivity, an event that occurs early in the development of DR. In the retina of control rats, microglia morphology was characterized by a small soma with dense ramifications (Figure 2A''). The microglia was distributed mainly in GCL (Figure 2A'–D'', E''). In the retina of 2 week STZ-diabetic rats, microglia cells were mostly ramified with some hypertrophic cell bodies and fewer processes (Figure 2B''–D''). The mean diameter of microglia was significantly enhanced (Figure 2F''), and the majority of

microglia was distributed in the INL, GCL and the ONL in the STZ-retina (Figure 2E''). Treatment with R-838 or R-954 had no effect on microglia reactivity as shown by the intensity of Iba-1 labelling (Figure 2C'', D''), the mean diameter (Figure 2F'') and the density (Figure 2E'') of microglia cells, which were not significantly affected by B₁ receptor agonism and antagonism in 2 week STZ-retina.

Effect of B₁ receptor agonist and antagonist on retinal vascular permeability at 2 weeks of diabetes

Increased vascular permeability is an important dysfunction in the development of macular oedema in DR that contributes significantly to the reduction in vision. In this series of experiments, the pharmacological effect of a B₁ receptor agonist and antagonist on retinal vascular permeability was determined. In 2 week STZ-diabetic rats, retinal Evans Blue dye extravasation measured by spectrofluorometry was significantly increased compared to control rats (Figure 3). R-838 induced a significantly greater increase of retinal vascular permeability compared to vehicle-injected STZ-diabetic rats (Figure 3A). In contrast, eye drops treatment with R-954 significantly reduced, to near control values, the vascular hyperpermeability in the retina of STZ-diabetic rats (Figure 3B). Thus, topical application of R-954 appears a highly promising approach for the non-invasive treatment at the early stage of DR.

Co-localization of B₁ receptors on vascular endothelial and glial cells in the STZ-retina at 2 weeks of diabetes

As shown by confocal microscopy, there was a very faint B₁ receptor staining in the control retina (Figures 4A, 5A, 6A, 7A). The B₁ receptor immunostaining was, however, strongly pronounced in the retina of the STZ rat in the nerve fibre, GCL and INL (Figures 4D; 5D, D', D''; 6D, D'; 7D, G, J, M). In 2 week STZ-retina, there was a co-localization of immunofluorescence of B₁ receptors (Figure 4F) with endothelial cells labelled with the antibody RECA-1 (Figure 4E). This co-localization supports the hyperglycaemia-induced expression of B₁ receptors by endothelial cells in the STZ-retina. There was also a strong co-labelling of B₁ receptors (Figure 5F, F', F'') and the GFAP marker (Figure 5E, E', E''), representative of astrocytes and activated Müller cells (Wang *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2014), mainly in the internal border of the retina and GCL of diabetic retina. The GFAP labelling in the Müller cells in the control retina was less intense and limited to low ramified glial extensions (Figure 5B) compared to the STZ retina where highly ramified and hypertrophic glial extensions were seen (Figure 5E, E', E'').

VEGFR-2 exhibited weak immunostaining in control retina (Figure 6B), yet the intensity of labelling was increased in the diabetic retina (Figure 6E). Importantly, B₁ receptor staining did not show co-localization with VEGFR-2 on Müller cells and other retinal cells in both control and STZ-retina (Figure 6C, F). Intriguingly, B₁ receptors and VEGFR-2 seem to be co-expressed in blood vessels in STZ-retina (Figure 6F', arrow). This might suggest their joint effects in activating the vascular endothelium in diabetic retina.

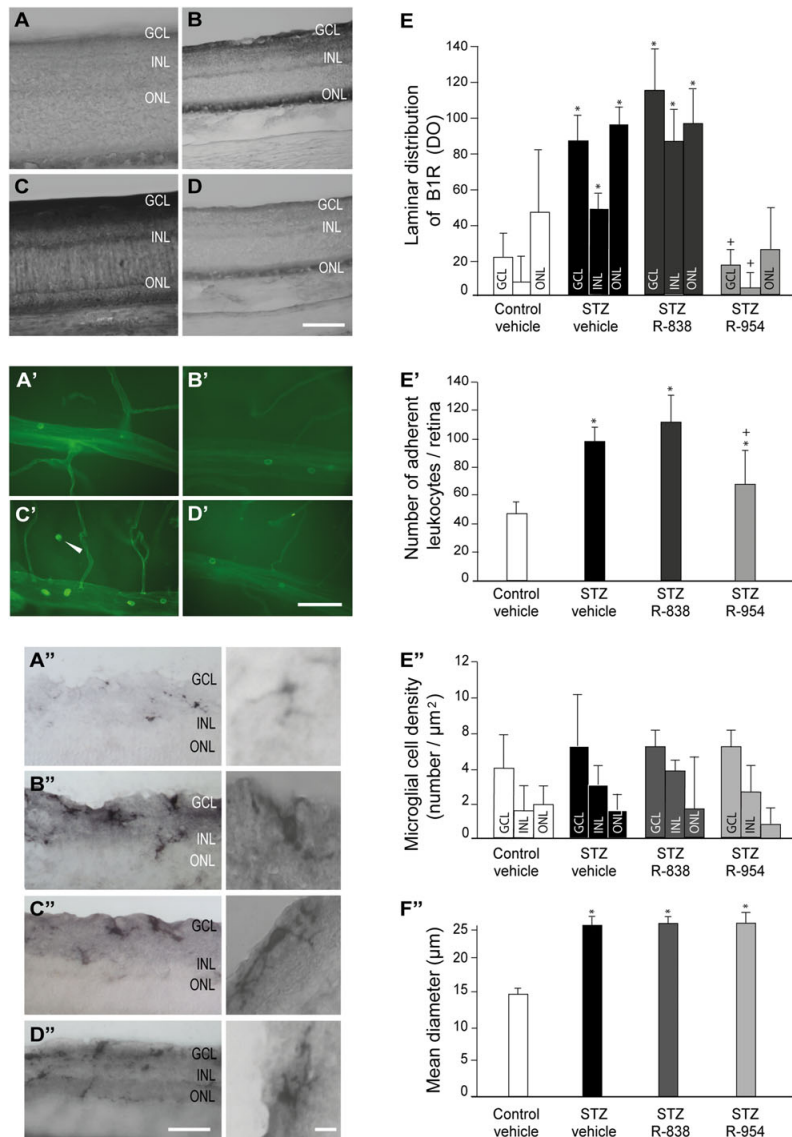


Figure 2

Effects of B₁ receptor (B₁R) stimulation and blockade on the cellular distribution of B₁ receptors, leukostasis and microgliosis in the retina at 2 weeks of diabetes. In all panels, microphotographs are representative of average observation in control-vehicle (A, A', A''), STZ-vehicle (B, B', B''), STZ-treated with the B₁ receptor agonist R-838 (C, C', C'') and STZ-treated with the B₁ receptor antagonist R-954 (D, D', D''). Upper panel: distribution of B₁ receptors shown by immunocytochemistry (A–D). (E) Mean pixel density ratio in the retinal GCL, the INL and the ONL for each group (each bar value is the mean ± SEM of 40 retinal sections per rat × four rats). Middle panel: Representative microphotographs of adherent leukocytes (A'–D'). The arrow indicates leukocyte infiltration within the retinal tissue in STZ-retina treated with R-838 (C). Total number of adherent leukocytes per retina in different groups is shown in panel E' (mean ± SEM of values from six rats in each group). Bottom panel: Microgliosis shown by the immunostaining of microglia with anti-Iba-1 antibody (A''–D''). Diabetes induces microgliosis (B'') shown by hypertrophied and ramified microglia with intense immunostaining. (E'') Evaluation of microglial cell density in the retinal GCL, the INL and the ONL for each treatment. (F'') Evaluation of the mean diameter of microglia. Each bar value in E'' and F'' is the mean ± SEM of 40 retinal sections per rat × four rats. Statistical comparison with control (*) or STZ-vehicle (+) is indicated by ***P* < 0.05. Bar scale: 75 μm (A–D); 50 μm (A'–D').

Absence of co-localization of B₁ receptors on microglia in the STZ-retina

In contrast to the low immunostaining for Iba 1⁺ microglial cells (Figure 7B) in control retina, a strong immunostaining was shown for microglial cells in the STZ-diabetic retina

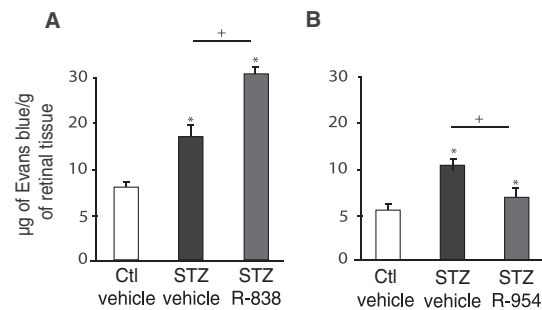


Figure 3

Vascular permeability in the retina at 2 weeks of diabetes. Retinal vascular hyperpermeability induced at 2 weeks of diabetes after intravitreal injection of the B₁ receptor agonist R-838 or its vehicle (A) and after eye drops application of the B₁ receptor antagonist R-954 (B). Tissue injury caused by intravitreal injection might account for the slightly higher vascular permeability in control and STZ-diabetic retinas in (A) in comparison to (B). Data are mean ± SEM of values from five rats in each group. Statistical comparison to Ctl-vehicle (*) or STZ-vehicle (+) is indicated by ***P* < 0.05.

(Figure 7E, H, K, N). However, B₁ receptor (left panels) and Iba1 staining did not merge together in STZ-diabetic retina (Figure 7F, I, L, O) and in control retina (Figure 7C), suggesting a distinct location of these markers. It is worth noting that the B₁ receptor was also seen on large cells within the GCL, which are most likely ganglion cells, based on their morphology (Figure 7J arrow).

Discussion

This study supports a role for kinin B₁ receptors in retinal inflammation and the development of vascular alterations through a mechanism involving the endothelial and GFAP-expressing glial cells on which the B₁ receptor is expressed and up-regulated. However, the B₁ receptor is not present on microglia and does not seem to influence its reactivity. The B₁ receptor is proposed as a therapeutic target for the treatment of diabetic retinopathy as it is expressed at the very beginning of diabetes, an effect maintained during the progression of diabetes. This study also provides evidence that 1-week eye drops application of a water-soluble and metabolically stable peptide kinin B₁ receptor antagonist is an effective non-invasive approach to alleviate diabetes-induced retinal vascular inflammation.

Expression of B₁ receptor in various stages of diabetic retinopathy

Although earlier studies have shown that the B₁ receptor is up-regulated in the STZ-diabetic retina very early from

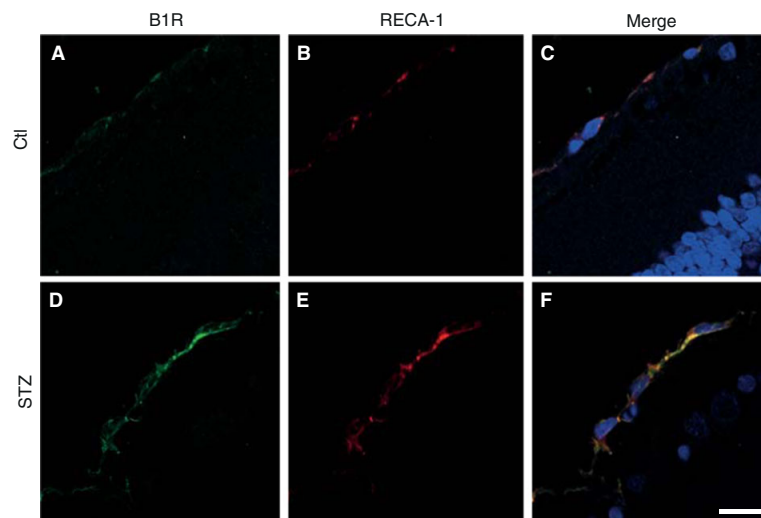


Figure 4

Microphotographs of immunolocalization of B₁ receptors on endothelial cells. Representative microphotographs of double immunolabelling for B₁ receptor (green, A, D) and RECA-1 (red, B, E) in control (upper panels) and diabetic (lower panels) retina. All sections were counter-stained for DAPI (blue) which labels the cell nucleus. Note that B₁ receptors completely co-localized (yellow, F) with RECA-1 marker, indicating expression of this receptor by endothelial cells in STZ retina. Bar scale: 75 µm.

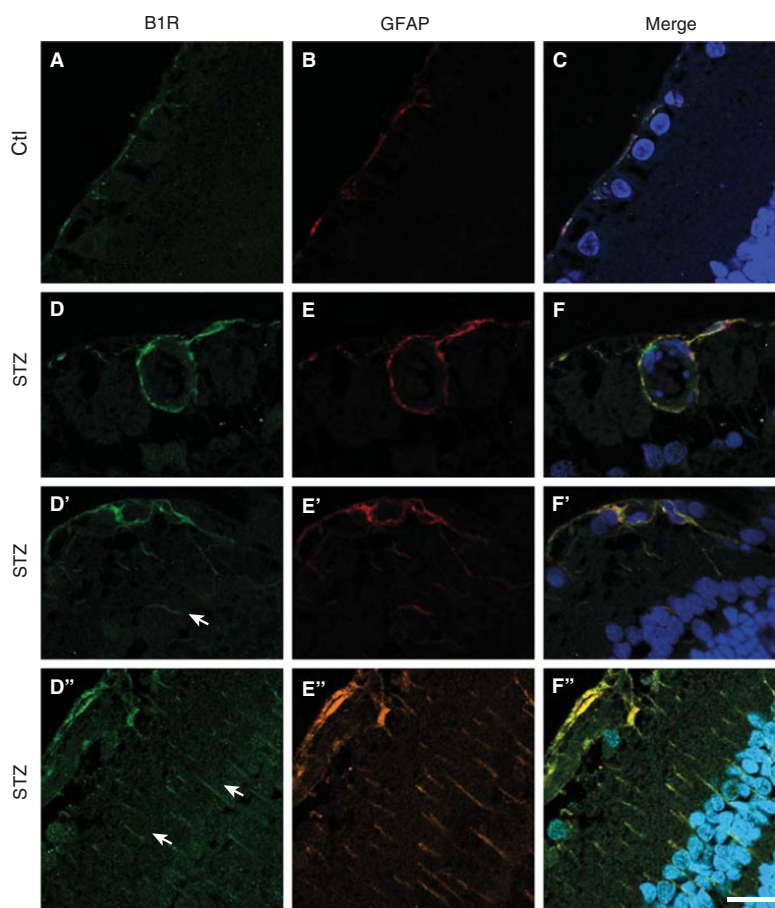


Figure 5

Microphotographs of immunolocalization of B₁ receptors (B1R) on glial cells. Representative microphotographs of double immunolabelling for B₁ receptors (green) and GFAP (red) in control (A; B) and diabetic (D, D', D''; E, E', E'') retina. The B₁ receptors completely co-localized (yellow, F, F', F'') with GFAP marker, indicating expression of this receptor by glial cells in STZ retina. The arrows indicate the presence of B₁ receptors on Müller cells visible in D' and D''. All sections were counter-stained for DAPI (blue) which labels the cell nucleus. Bar scale: 75 μ m.

1–4 days to 6 weeks (Abdouh *et al.*, 2003; 2008; Pouliot *et al.*, 2011; 2012), this is the first study showing that it remains overexpressed until a late (6 months) phase of STZ-induced diabetes. The agonist R-838 amplified retinal vascular permeability, leukostasis and B₁ receptor gene expression, suggesting that the B₁ receptor is functional and can respond to its agonist. The up-regulation of B₁ receptor gene expression by R-838 in STZ-retina is congruent with the auto-induction of B₁ receptors by its own agonists through the production of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β (Schanstra *et al.*, 1998; Phagoo *et al.*, 1999). This way, the B₁ receptor can amplify the pro-inflammatory process through a positive feedback loop mechanism (Couture *et al.*, 2014). Indeed, the antagonist R-954 reversed the increased vascular permeability, leukostasis and immunocytochemical B₁

receptor protein expression, further suggesting that this receptor plays an important role in the pathological events of diabetes. In contrast, control rat retinal vessels did not express functional B₁ receptors, which is consistent with earlier studies in control rat retina at 1, 4, 7 and 21 days (Abdouh *et al.*, 2003; 2008; Pouliot *et al.*, 2011, 2012).

B₁ receptor pathway seems independent of VEGF pathway

The activation of B₁ receptors by intravitreal injection of R-838 failed to result in overexpressed VEGF and increased VEGFR-2 gene expression although they were suppressed following blockade of B₁ receptors with siRNA treatment or with LF22-0542 in the retina of STZ-diabetic rats (Pouliot *et al.*,

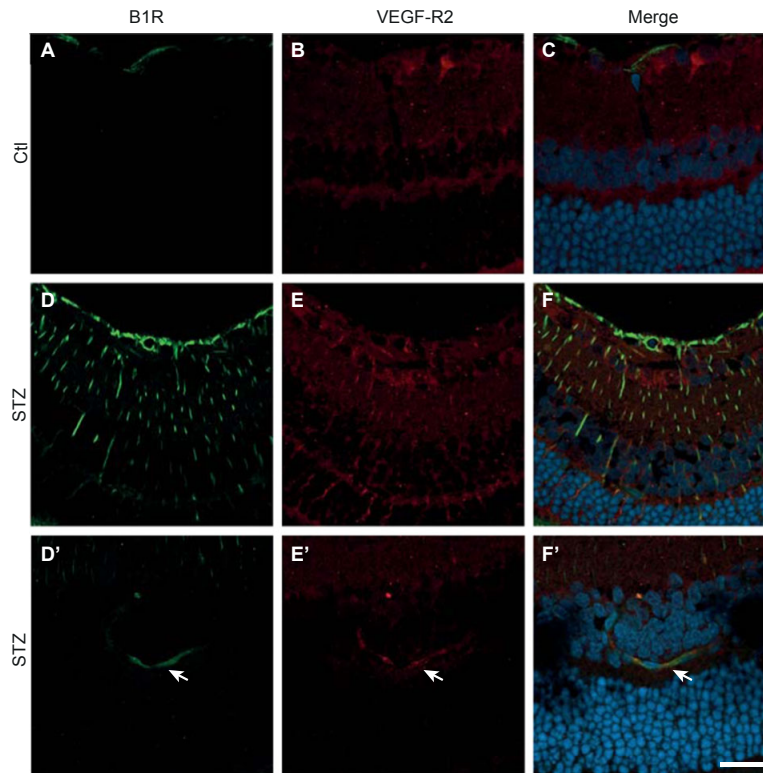


Figure 6

Immunohistochemical distribution of VEGFR-2 and B_1 receptors (B_1R). In control retina (A), B_1 receptor immunostaining was very weak and the overall B_1 receptor immunofluorescence intensity was higher in STZ-retina (D, D'), particularly in the GCL of diabetic retina. Compared to control retina (B), VEGFR-2 immunofluorescence intensity increased in diabetic retina (E) notably in Müller cells process and in blood vessels (E' arrow). There is no co-localization between VEGFR-2 and B_1 receptors in control and STZ-retina on Müller cells and in GCL layer (C, F), but both co-localized on blood vessels in STZ-retina (F'). Bar scale: 75 μ m.

2012). The lack of effect of R-838 on expression of VEGFR-2 is supported by the absence of co-localization of the two markers on retinal cells (except endothelial cells). The VEGF system is well known to stimulate microvascular permeability, vasodilatation and angiogenesis (Murakami, 2015). VEGF also increases extravasation of plasma kallikrein into the retina, and plasma kallikrein is required for the full effects of VEGF on retinal vascular permeability and retinal thickening in rodents (Clermont *et al.*, 2016). Conversely, tissue kallikrein inhibits VEGF signalling via the cleavage of VEGF165 isoform, which may reduce retinal vascular permeability (Nakamura *et al.*, 2011). Importantly, BK-induced retinal thickening in mice was not affected by the blockade of VEGFR-2, and antagonists of B_1 receptors and B_2 receptors did not influence VEGF-induced retinal vascular permeability (Kita *et al.*, 2015). The latter study concluded that the plasma kallikrein-kinin system is implicated as a VEGF-independent mediator of diabetic macular oedema. Indeed, the strong expression of B_1 receptors on endothelial cells in STZ-retina is

congruent with a direct effect of the B_1 receptor on capillary leakage that can occur independently of VEGF. The down-regulation of the VEGF expression system by B_1 receptor antagonism or B_1 receptor gene deletion could merely derive from the inhibition of the inflammatory process.

Role of B_1 receptor in retinal vascular permeability and leukostasis

The breakdown of the blood-retinal barrier is an event that occurs early in the development of DR, and it is attributed to the increased production of pro-inflammatory cytokines and growth factors (Kern, 2007). The increased vascular permeability may also be associated with changes in the expression of molecules that form the cell junctions of the blood-retinal barrier (Kern, 2007). Studies have shown a decreased expression of occludin and ZO-1 in diabetic retinal endothelial cells, proteins that constitute the tight junctions (Antonetti *et al.*, 1998; Barber *et al.*, 2000). In the present

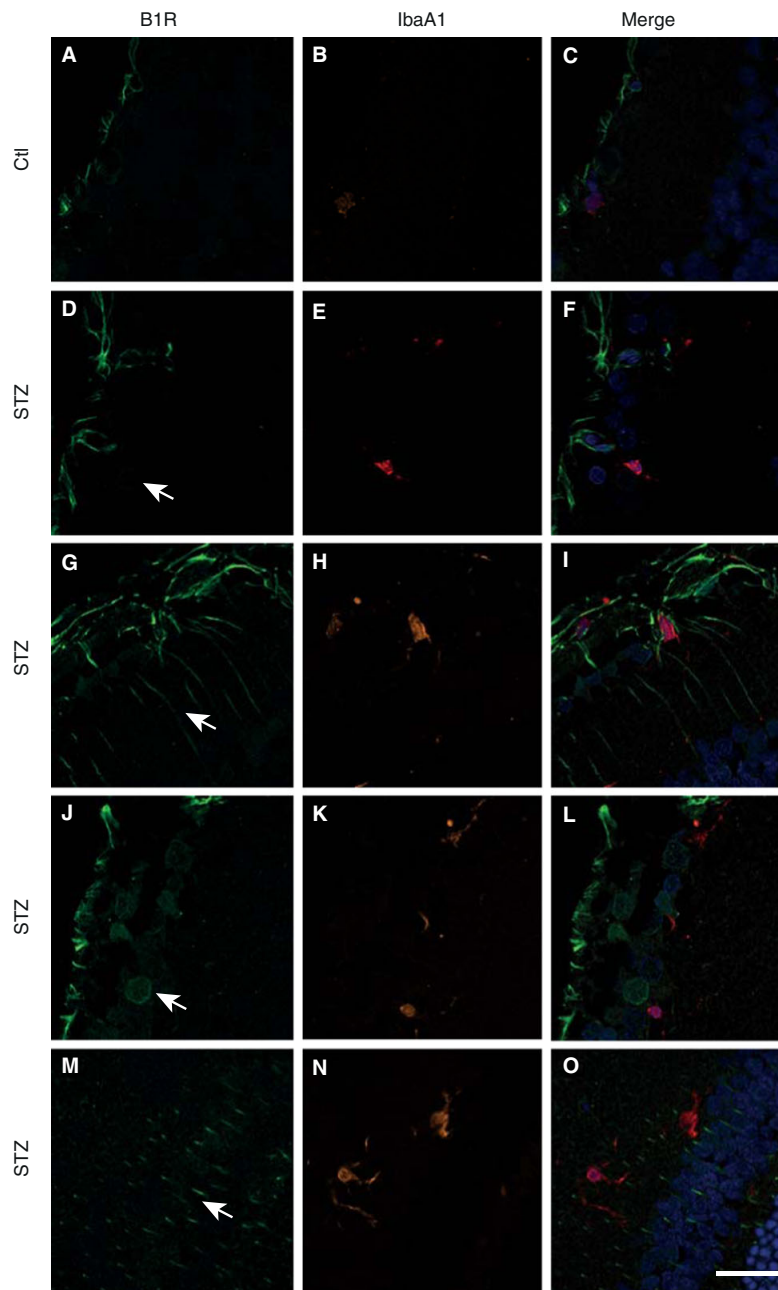


Figure 7

Absence of localization of B₁ receptors (B1R) on microglial cells in the retina of STZ-diabetic rats. Representative images of immunofluorescent detection of microglial cells. All immunofluorescence sections were counter-stained for DAPI (blue). Immunofluorescent detection of B₁ receptors (green) in control retina (A) and STZ-retina (D–M). Immunofluorescent detection of Iba1 (red) in control retina (B) and STZ-retina (E–N). Iba1 and B₁ receptors showed faint immunostaining in control retina (A, B) but higher staining in GCL layer in STZ-retina (D–M, E–N). B₁ receptor staining did not show co-localization with Iba1 in control retina (C) and in STZ-retina (no yellow colour, F, I, L, O). In the STZ group, the B₁ receptor was present in Müller cells (G, M arrow) and ganglion cells (D, J, arrows). Bar scale: 75 μ m.

study, 1 week eye drops application of R-954 reversed increased retinal vascular permeability in 2 week STZ-diabetic rats without affecting glycaemia. This is in agreement with previous data using the high-affinity non-peptide B₁ receptor antagonist LF22-0542 (Pouliot *et al.*, 2012). Retinal vascular permeability was also decreased following systemic and intravitreal injection of a selective plasma kallikrein inhibitor in STZ-diabetic rats (Clermont *et al.*, 2011). The i.v. injection of R-954 was found to inhibit the enhanced vascular permeability in the retina of mice and rats treated with STZ 1 and 4 weeks earlier (Simard *et al.*, 2002; Lawson *et al.*, 2005). Five consecutive s.c. injections of R-954 also reduced the enhanced levels of NO, kallikrein and vascular permeability and improved the reduced Na/K ATPase activity in diabetic rat retinae 4 and 12 weeks after STZ treatment (Catanzaro *et al.*, 2012). For the first time, our study shows that eye drops application of R-954 is a feasible approach that has the advantage of being less invasive, avoiding the risks associated with intravitreal injections (viral and bacterial infection and cataracts) and the systemic effects of i.v. treatments, particularly if the goal is to develop a therapeutic treatment.

The adhesion of leukocytes to the wall of blood vessels was suggested as one of the factors involved in endothelial cell death and may also contribute to alterations in retinal perfusion (Joussen *et al.*, 2002; Kern, 2007) and increased vascular permeability (Del Maschio *et al.*, 1996). Evidence suggests that diabetic retinopathy is associated with increased levels of leukocytes in the retina and persistent leukostasis. Indeed, the number of neutrophils is significantly increased in the retinal blood vessels of diabetic patients and animals (McLeod *et al.*, 1995; Miyamoto *et al.*, 1998, 1999). Local production of kinins and up-regulation of B₁ receptor expression in blood vessels contribute to the diapedesis of leukocytes and their migration into damaged tissues in response to the chemotactic attraction of cytokines (McLean *et al.*, 2000). The present study shows that treatment with R-954 reversed retinal leukostasis in STZ-diabetic retina. This finding highlights a primary role for B₁ receptors in the cellular inflammation associated with DR.

Co-localization of B₁ receptors on endothelial cells in the retina of STZ-diabetic rats

B₁ receptor protein was mainly located in the retinal GCL, the INL, the ONL and the inner plexiform layer (IPL), representing the most vascularized retinal layers (except ONL) (Cuthbertson and Mandel, 1986). R-954 down-regulated the protein expression of B₁ receptors in the vascularized retinal layers. This may occur by preventing the auto-induction of B₁ receptors by its own agonist (Couture *et al.*, 2014). Furthermore, the B₁ receptor was shown on endothelial cells and astrocytic end feet of retinal blood vessels, supporting its action on endothelial function and retinal vascular permeability. The overexpression of B₁ receptors in endothelial cells may also account for the alteration of retinal blood flow in the early phase of diabetes (Pouliot *et al.*, 2011). The vasodilatation of isolated retinal microvessels was mediated by the release of NO and prostaglandins derived from the COX-2 pathway in STZ-diabetic rats (Abdoun *et al.*, 2003; Abdoun *et al.*, 2008).

Co-localization of B₁ receptors on glial cells but not on microglia in the retina of STZ-diabetic rats

Activated microglia are heavily involved in diabetes and retinal degeneration (Natoli *et al.*, 2017). In our study, microglia were identified by Iba-1 immunolabelling and showed the characteristics of activated microglia with hypertrophied cell body in STZ-diabetic retina unlike microglia in control rats displaying small size cytoplasm, in agreement with previous studies (Zeng *et al.*, 2000; Krady *et al.*, 2005). At 2 weeks of diabetes, the majority of microglia were distributed in the inner retina, including GCL and the IPL, in both normal control and diabetic rats. At 12 weeks of diabetes, it was reported that the retinal microglia were more in the nerve fibre layer and GCL and less in the IPL; this is probably due to a redistribution associated with the reduction of the retinal thickness in the IPL (Chen *et al.*, 2015). Importantly, our findings showed that treatment with R-838 and R-954 did not alter retinal microglia reactivity as evidenced by the intensity of Iba-1 labelling, mean diameter and density of microglia in the three main vascular layers at 2 weeks of diabetes. Microglial cells are activated from the beginning of neuroinflammation (Graeber *et al.*, 2011; Natoli *et al.*, 2017); subsequently, astrocytes and Müller cells are activated to further accentuate the inflammatory process (Sorrentino *et al.*, 2016). The astrocytes are found mainly in the ganglion cell layer and the inner plexiform layer. These glial cells are in contact with the ganglion cells and surround the capillaries and contribute to the maintenance of the blood-retina barrier (Gardner *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2010). Recent studies suggest that astrocytes are strongly activated during the inflammatory process via the NF- κ B signalling pathway and contribute to the up-regulation of inflammatory enzymes and mediators such as inducible NOS, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-8 (Martorana *et al.*, 2015; Zhong *et al.*, 2016). The activation of NF- κ B and the subsequent release of pro-inflammatory cytokines are involved in the induction of the B₁ receptor (Couture *et al.*, 2014) that makes a link with astrogliosis. Müller cells expressing B₁ receptors also appeared to be activated since numerous GFAP hypertrophied cytoplasmic extension are seen throughout the tissue. The Müller cells also take part in the secretion of inflammatory mediators, which contribute to enhanced inflammation. They can be activated by microglia (Natoli *et al.*, 2017).

Hence, data show that the distribution and co-localization of B₁ receptor with retinal glial and Müller cells are strikingly correlated with the presence and distribution of retinal blood vessels. This provides a strategic role and mechanism for B₁ receptors in microvascular inflammation and endothelial dysfunction in the diabetic retina. Further investigations are needed to determine the occurrence and plasticity of B₁ receptor expression in other retinal cells (pericytes, photoreceptors and neurons) that can affect vision during diabetes.

Conclusion

This study shows that the B₁ receptor is up-regulated in retinal blood vessels including glial, Müller cells and particularly on endothelial cells, supporting a direct action of this

receptor on blood vessels to enhance vascular permeability and leukostasis in STZ-diabetic retina. The B₁ receptor is also involved in the inflammatory cascade leading to its auto-induction and enhanced expression of B₂ receptors. In contrast, the B₁ receptor is not expressed on microglia in STZ-retina and its activation or inhibition failed to affect microgliosis. The functional overexpression of B₁ receptors in a late stage (6 months) of diabetes also suggests its involvement in the chronic phase of DR. Ocular application of the B₁ receptor antagonist R-954 by eye drops exerted anti-inflammatory effects in STZ-diabetic retinopathy, providing a promising and non-invasive therapeutic approach for the treatment of diabetic retinopathy.

Acknowledgements

This work was supported by a Grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-125962) and the FRQS Vision Health Research Network to E.V. and R.C. S.H. was recipient of a Scholarship from the Groupe de Recherche Universitaire sur le Médicament (GRUM) of the Université de Montréal.

Author contributions

S.H., E.V. and R.C. designed the experiments and interpreted the results. S.H. and M.B. performed the experiments. S.H., F.H.G. and J.S. analysed the data. S.H. and F.H.G. drafted the paper. E.V. and R.C. co-supervised the work and wrote the final version of the paper. All authors approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Declaration of transparency and scientific rigour

This Declaration acknowledges that this paper adheres to the principles for transparent reporting and scientific rigour of preclinical research recommended by funding agencies, publishers and other organisations engaged with supporting research.

References

Abdoun M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hassessian HM (2003). Early up regulation of kinin B₁ receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol* 140: 33–40.

Abdoun M, Talbot S, Couture R, Hassessian HM (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B (1) and B (2) receptors. *Br J Pharmacol* 154: 136–143.

Alexander SPH, Christopoulos A, Davenport AP, Kelly E, Marrion NV, Peters JA *et al.* (2017a). The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 174: S17–S129.

Alexander SPH, Fabbro D, Kelly E, Marrion NV, Peters JA, Faccenda E *et al.* (2017b). The Concise Guide To PHARMACOLOGY 2017/18: Catalytic receptors. *Br J Pharmacol* 174: S225–S271.

Antonetti DA, Barber AJ, Khin S, Lieth E, Tarbell JM, Gardner TW (1998). Vascular permeability in experimental diabetes is associated with reduced endothelial occludin content: vascular endothelial growth factor decreases occludin in retinal endothelial cells. *Penn State Retina Research Group. Diabetes* 47: 1953–1959.

Audet R, Rioux F, Drapeau G, Marceau F (1997). Cardiovascular effects of Sar-[D-Phe⁸] des-Arg⁹-bradykinin, a metabolically protected agonist of B₁ receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther* 280: 6–15.

Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW (2000). Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. *The Penn State Retina Research Group. Invest Ophthalmol Vis Sci* 41: 3561–3568.

Bhat M, Pouliot M, Couture R, Vaucher E (2014). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Prog Drug Res Fortschritte der Arzneimittelforschung Progres des recherches pharmaceutiques* 69: 111–143.

Campos MM, Souza GE, Calixto JB (1999). *In vivo* B₁ kinin-receptor up regulation. Evidence for involvement of protein kinases and nuclear factor kappaB pathways. *Br J Pharmacol* 127: 1851–1859.

Catanzaro OLE, Andornino A, Capponi JA, Di Martino I, Sirois P (2012). Blockade of early and late retinal biochemical alterations associated with diabetes development by the selective bradykinin B₁ receptor antagonist R-954. *Peptides* 34: 349–352.

Chang ML, Wu CH, Jiang-Shieh YF, Shieh JY, Wen CY (2007). Reactive changes of retinal astrocytes and Muller glial cells in kainate-induced neuroexcitotoxicity. *J Anat* 210: 54–65.

Chen L, Yang P, Kijlstra A (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocul Immunol Inflamm* 10: 27–39.

Chen X, Zhou H, Gong Y, Wei S, Zhang M (2015). Early spatiotemporal characterization of microglia activation in the retinas of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 253: 519–525.

Clermont A, Chilcote TJ, Kita T, Liu J, Riva P, Sinha S *et al.* (2011). Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes* 60: 1590–1598.

Clermont A, Murugesan N, Zhou Q, Kita T, Robson PA, Rushbrooke LJ *et al.* (2016). Plasma kallikrein mediates vascular endothelial growth factor-induced retinal dysfunction and thickening. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57: 2390–2399.

Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol* 429: 161–176.

Couture R, Blaes N, Girolami JP (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol* 12: 223–248.

Curtis MJ, Bond RA, Spina D, Ahluwalia A, Alexander SP, Giembycz MA *et al.* (2015). Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3461–3471.

Cuthbertson RA, Mandel TE (1986). Anatomy of the mouse retina. Endothelial cell-pericyte ratio and capillary distribution. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27: 1659–1664.



- Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R *et al.* (1996). Serum interspecies difference in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg⁹] BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol* 271: H1340–H1347.
- Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG *et al.* (1996). Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol* 135: 497–510.
- Feener EP (2010). Plasma kallikrein and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep* 10: 270–275.
- Frank RN (2004). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 350: 48–58.
- Gabra BH, Couture R, Sirois P (2003). Dualité fonctionnelle des récepteurs des kinines en physiopathologie. *Med Sci* 19: 1101–1010.
- Gardner TW, Lieth E, Khin SA, Barber AJ, Bonsall DJ, Leshner T *et al.* (1997). Astrocytes increase barrier properties and ZO-1 expression in retinal vascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38: 2423–2427.
- Gobeil F Jr, Sirois P, Regoli D (2014). Preclinical pharmacology, metabolic stability, pharmacokinetics and toxicology of the peptidic kinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides* 52: 82–89.
- Graeber MB, Li W, Rodriguez ML (2011). Role of microglia in CNS inflammation. *FEBS Lett* 585: 3798–3805.
- Harding SD, Sharman JL, Faccenda E, Southan C, Pawson AJ, Ireland S *et al.* (2018). The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res* 46: D1091–D1106.
- Hernandez C, Simo-Servat A, Bogdanov P, Simo R (2017). Diabetic retinopathy: new therapeutic perspectives based on pathogenic mechanisms. *J Endocrinol Invest* 40: 925–935.
- Jousen AM, Poulaki V, Qin W, Kirchhof B, Mitsiades N, Wiegand SJ *et al.* (2002). Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion *in vivo*. *Am J Pathol* 160: 501–509.
- Kern TS (2007). Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007: 95103.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG (2010). Animal research: reporting *in vivo* experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 160: 1577–1579.
- Kita T, Clermont AC, Murugesan N, Zhou Q, Fujisawa K, Ishibashi T *et al.* (2015). Plasma kallikrein-kinin system as a VEGF-independent mediator of diabetic macular edema. *Diabetes* 64: 3588–3599.
- Krady JK, Basu A, Allen CM, Xu Y, LaNoue KF, Gardner TW *et al.* (2005). Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglia activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy. *Diabetes* 54: 1559–1565.
- Lacoste B, Lahjouji K, Couture R, Hamel E (2013). Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation* 10: 57.
- Larrivee JF, Bachvarov DR, Houle F, Landry J, Huot J, Marceau F (1998). Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J Immunol* (Baltimore, Md: 1950) 160: 1419–1426.
- Lawson SR, Gabra BH, Nantel F, Battistini B, Sirois P (2005). Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. *Eur J Pharmacol* 514: 69–78.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Muller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL (2005). International union of pharmacology. XLV Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev* 57: 27–77.
- Lin JC, Talbot S, Lahjouji K, Roy JP, Senecal J, Couture R *et al.* (2010). Mechanism of cigarette smoke-induced kinin B (1) receptor expression in rat airways. *Peptides* 31: 1940–1945.
- Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J (1996). Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp Eye Res* 63: 19–26.
- Martorana F, Guidotti G, Brambilla L, Rossi D (2015). Withaferin A inhibits nuclear factor-kappaB-dependent pro-inflammatory and stress response pathways in the astrocytes. *Neural Plast* 2015: 381964.
- McGrath JC, Lilley E (2015). Implementing guidelines on reporting research using animals (ARRIVE etc.): new requirements for publication in BJP. *Br J Pharmacol* 172: 3189–3193.
- McLean PG, Ahluwalia A, Perretti M (2000). Association between kinin B (1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med* 192: 367–380.
- McLeod DS, Lefer DJ, Merges C, Luty GA (1995). Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid. *Am J Pathol* 147: 642–653.
- Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y (1998). *In vivo* demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 2190–2194.
- Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Rohan R, Murata T, Clermont AC *et al.* (1999). Prevention of leukostasis and vascular leakage in streptozotocin-induced diabetic retinopathy via intercellular adhesion molecule-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10836–10841.
- Murakami T (2015). Kallikrein-kinin system: an emerging competitor or collaborator for VEGF in diabetic macular edema? *Diabetes* 64: 3350–3352.
- Nakamura S, Morimoto N, Tsuruma K, Izuta H, Yasuda Y, Kato N *et al.* (2011). Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31: 1041–1048.
- Natoli R, Fernando N, Madigan M, Chu-Tan JA, Valter K, Provis J *et al.* (2017). Microglia-derived IL-1beta promotes chemokine expression by Muller cells and RPE in focal retinal degeneration. *Mol Neurodegener* 12: 31.
- Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM (1999). Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol* 56: 325–333.
- Phipps JA, Feener EP (2008). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int* 73: 1114–1119.
- Phipps JA, Clermont AC, Sinha S, Chilcote TJ, Bursell SE, Feener EP (2009). Plasma kallikrein mediates angiotensin II type 1 receptor-stimulated retinal vascular permeability. *Hypertension* (Dallas, Tex: 1979) 53: 175–181.
- Pouliot M, Hetu S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B (1) receptor in streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res* 92: 482–489.

- Pouliot M, Talbot S, Senecal J, Dotigny F, Vaucher E, Couture R (2012). Ocular application of the kinin B₁ receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* 7: e33864.
- Regoli D, Rizzi A, Perron SI, Gobeil F Jr (2001). Classification of kinin receptors. *Biol Chem* 382: 31–35.
- Schanstra JP, Bataille E, Marin Castano ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB *et al.* (1998). The B₁-agonist [des-Arg¹⁰]-kallidin activates transcription factor NF- κ B and induces homologous up regulation of the bradykinin B₁-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest* 101: 2080–2091.
- Simard B, Gabra BH, Sirois P (2002). Inhibitory effect of a novel bradykinin B₁ receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol* 80: 1203–1207.
- Sorrentino FS, Allkabet M, Salsini G, Bonifazzi C, Perri P (2016). The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci* 162: 54–59.
- Suzuki K, Ono M, Tonaka K (2014). Inhibitory effects of glutamate-stimulated astrocytes on action potentials evoked by bradykinin in cultured dorsal root ganglion neurons. *Tokai J Exp Clin Med* 39: 14–24.
- Takeda H, Kimura Y, Higashida H, Yokoyama S (1999). Localization of B₂ bradykinin receptor mRNA in the rat retina and sclerocornea. *Immunopharmacology* 45: 51–55.
- Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ (2010). Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes* 59: 2297–2305.
- Wang JJ, Zhu M, Le YZ (2015). Functions of Muller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World J Diabetes* 6: 726–733.
- Wilkinson-Berka JL (2006). Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 752–765.
- Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL (2004). Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des* 10: 3313–3330.
- Zeng XX, Ng YK, Ling EA (2000). Neuronal and microglia response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vis Neurosci* 17: 463–471.
- Zhong H, Cui L, Xu F, Chen L, Jiang L, Huang H *et al.* (2016). Up-regulation of Wip1 involves in neuroinflammation of retinal astrocytes after optic nerve crush via NF- κ B signalling pathway. *Inflamm Res: official journal of the European Histamine Research Society [et al]* 65: 709–715.
- Zhou X, Polgar P, Taylor L (1998). Roles for interleukin-1beta, phorbol ester and a post-transcriptional regulator in the control of bradykinin B₁ receptor gene expression. *Biochem J* 330 (Pt 1): 361–366.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

<https://doi.org/10.1111/bph.14138>

Figure S1 Tests of specificity on the polyclonal rabbit antiserum to rat B₁ receptor. **Upper panel:** Representative images of immunofluorescent detection of B₁ receptor in control rat retina (A, D), STZ-retina (B, E) and STZ-retina treated with siRNA 10 nmol (C, F), sections were counter-stained for DAPI (blue). In contrast to the abundant B₁ receptor immunolabeling in STZ-retina, B₁ receptor immunostaining was absent in STZ-retina treated with siRNA. In control retina, B₁ receptor showed weak immunostaining. **Middle panel:** Immunohistochemical labelling (revealed with DAB) in control rat retina (A'), STZ-retina (B') and STZ retina treated with pre-immune rabbit serum (C'). The intensity of B₁ receptor immunostaining was greatly increased in STZ-retina compared to control retina. Conversely, no B₁ receptor labelling was detected in STZ-retina with the pre-immune rabbit serum. Bar scale: 75 μ m. **Bottom panel:** Immunohistochemical labelling in wild-type mice retina (Wt; A'') and B₁ receptor/B2R-KO mice retina (B''). B₁ receptor staining in the GCL layer of Wt retina (arrows) was absent in B₁ receptor/B2R-KO mice retina (B''). This is consistent with the higher expression of B₁ receptor in mice than in rats (Couture *et al.*, 2014). Bar scale: 75 μ m.

CHAPITRE 3

Deuxième article

3 Article 2

Hachana S, Fontaine O, Sapiuha P, Lesk M, Couture R, Vaucher E (2018) Anti-VEGF and Kinin B1 Receptor blockade on Retinal Inflammation in Laser Induced Choroidal Neovascularization.

3.1 Problématique

La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est actuellement traitée par injection intravitréenne avec des anti-VEGF afin d'arrêter la néovascularisation. Ces molécules pharmacologiques ne traitent malheureusement pas la cause et sont d'un inconfort pour les patients. Dans le but de chercher des traitements plus efficaces afin de prévenir les dommages rétinien, il a été proposé que le système kallikréine-kinines (SKK), un acteur clé de l'inflammation, est impliqué dans l'étiologie de la DMLA. Nous avons démontré dans l'article 1 que le RB1 est fortement impliqué dans les altérations vasculaires de la rétine diabétique et qu'un traitement sous forme topique ciblant ce récepteur améliore certains paramètres cliniques fortement impliqués dans la pathogenèse de la maladie. Cependant, le rôle des récepteurs des kinines et leur interaction avec le VEGF dans la DMLA sont très mal compris. Très peu d'études se sont intéressées à l'implication des kinines dans un modèle de néovascularisation et encore moins dans une CNV rétinienne.

À travers cet article, nous avons examiné si le récepteur B1 des kinines peut induire des caractéristiques pathologiques de l'inflammation et de la néovascularisation dans un modèle de dégénérescence maculaire liée à l'âge et avons déterminé si l'inhibition du RB1 peut empêcher ces changements. Les mécanismes de l'angiogenèse associés au RB1 et son interaction avec le VEGF ont été étudiés.

La finalité de ce projet sera de développer l'utilisation possible d'un agent pharmacologique topique pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge, ce qui serait un atout important pour le confort des patients.

3.2 Hypothèse

De nombreuses études ont mis en évidence la relation possible entre le système des kinines et la voie du VEGF dans la perméabilité vasculaire et l'angiogenèse. Des travaux récents suggèrent que le VEGF et le système des kinines agissent conjointement dans l'œdème maculaire diabétique. Le VEGF initierait la disruption de la barrière hémato-rétinienne interne tandis que le système des kinines serait responsable de la perpétuation de l'hyperperméabilité vasculaire. Le travail en synergie de ces deux systèmes laisse entrevoir la possibilité d'un effet synergique des molécules anti-VEGF et des antagonistes du RB1. Cette hypothèse a été étudiée dans le modèle de CNV induit par laser.

3.3 Objectifs

L'objectif général de cet article consiste dans un premier temps à déterminer si les récepteurs des kinines (RB1 et RB2) sont exprimés dans une néovascularisation.

Les objectifs spécifiques consistent à évaluer : (1) l'impact d'un antagoniste sous forme topique (non invasif) et d'une délétion génétique du RB1 par siRNA sur l'inflammation accompagnant la néovascularisation rétinienne; (2) la localisation cellulaire du RB1 dans une rétine ayant subi une néovascularisation par laser, et (3) l'effet des anti-VEGF sur le processus inflammatoire induit lors d'une CNV.

3.4 Contribution

SH et OF ont réalisé les expériences, analysé les données, interprété les résultats et écrit la première version du manuscrit. OF et EV ont réalisé le design expérimental. SP et LM ont participé à l'élaboration du design expérimental. RC et EV ont aidé à l'interprétation des résultats et à l'écriture de la version finale du manuscrit. RC et EV ont fait la correspondance avec l'Éditeur.

Anti-VEGF and Kinin B1 Receptor blockade on Retinal Inflammation in Laser-Induced Choroidal Neovascularization

Soumaya Hachana^{1,3#}, Olivier Fontaine^{1,2#}, Przemyslaw Sapieha², Mark Lesk²,

Réjean Couture^{3#}, Elvire Vaucher^{1#*}

¹ School of Optometry, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

² Maisonneuve-Rosemont Hospital Research Centre, Montréal, QC, Canada

³ Department of Pharmacology and Physiology, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

#The two first and senior authors contributed equally to this work

Running title: Kinin B1 receptor in choroidal neovascularization

Words count: 4711

Figures and Tables: 10

* Correspondence:

Elvire Vaucher, PhD. School of Optometry. Université de Montréal. C.P. 6128, Succursale Centre-Ville. Montréal, QC, Canada H3C 3J7. Tel: 514-343-7537.

Email: elvire.vaucher@umontreal.ca

Abstract

Age-related macular degeneration (AMD) is a complex multifactorial neurodegenerative disease of retinal pigment epithelium-Bruch's membrane-choroid, which is the main cause of irreversible vision loss in people over 60 years old. Inflammation has potentially a pathological role in retinal degeneration. The wet form, characterized by invasive neovascularization, is commonly treated by anti-VEGF intravitreal injections, yet this approach is invasive and not effective in some patients. The pro-inflammatory kallikrein-kinin system can be a relevant alternative target. Recently, we highlighted a primary role for the kinin B1 receptor (B1R) in diabetic retinal inflammation. The objectives of the present study were to determine whether such a detrimental role for the B1R occurs in retinal structural damage and inflammation in a model of choroid neovascularization and whether B1R interacts with the VEGF pathway in this paradigm.

Laser-induced choroidal neovascularization (CNV) was made in one eye of Long-Evans rats, which was immediately treated either by eye-drop corneal application of a B1R antagonist (R-954) or by intravitreal injection of B1R siRNA or anti-VEGF. The impact of treatments was measured ten days later in the retina on gene expression of inflammatory mediators, CNV lesion regression, leukocyte adhesion and the integrity of the blood-retinal barrier. B1R and VEGF-receptor 2 cellular localization was also examined.

Data showed that the three treatments had a significant inhibitory effect on the alterations of the retina due to CNV, notably on the size of neovascular lesions. Anti-VEGF and R-954 significantly alleviated CNV-induced upregulation (mRNA levels by qRT-PCR) of B1R, B2R, TNF- α and ICAM-1. Anti-VEGF additionally reversed the upregulation of VEGF-A, VEGF-R2, HIF-1 α , MCP-1 and VCAM-1, whereas R-954 additionally inhibited gene expression of IL-1 β and COX-2. B1R immunostaining was particularly intense on endothelial and glial cells and found co-localized with VEGF-R2 on blood vessels in CNV retinas. The increased number of adherent leukocytes in the CNV was significantly prevented by anti-VEGF and B1R siRNA. The enhanced retinal vascular permeability was abolished by anti-VEGF, and significantly reduced by R-954 and B1R siRNA treatments. It is concluded that the upregulated kinin B1R interacts with the VEGF pathway involved in retinal inflammation and damage in laser-induced CNV.

Keywords: Age-related macular degeneration, bradykinin, kinin B1 receptor, choroidal neovascularization, retina, R-954, VEGF

Introduction

Ocular pathologies involving angiogenesis are particularly devastating in terms of visual acuity. Among these, age-related macular degeneration (AMD) is one of the leading causes of severe vision loss in elderly of industrialized countries (Bashshur et al., 2006; Nguyen et al., 2006). The predominant pathological feature of AMD is choroidal neovascularization (CNV) that corresponds to the formation of new branches from pre-existing choroidal vessels, which penetrate the Bruch's membrane and develop under the retinal pigment epithelium (RPE) and/or in the subretinal space (Lu and Adamis, 2006). The greatest change associated with neovascularization of the choroid results in discrete loss of RPE areas and retinal thickness in the RPE/Bruch's membrane complex (Rutar and Provis, 2016). Moreover, inflammation causes structural and functional changes in the retina provoking decreased oxygenation and cell death. However, very few studies have focused on the mechanism involved.

The development of chronic inflammation in the retina and choroid is a threatening feature of AMD. Neovascularization is associated with an inflammatory process including breakdown of the blood-retinal barrier, leukocyte adhesion on the blood vessels wall, macrophage and microglia activation, and cytokines production (Dorrell et al., 2007). The chemokine expression is also prodigious in all forms of AMD. These chemokines participate in recruitment of macrophages and spread the degeneration to the retina (Rutar and Provis, 2016). The presence of macrophages and overexpression of tumor necrosis factor (TNF- α), vascular endothelial growth factor (VEGF) (Grossniklaus et al., 2002), and interleukin IL-1 β (Grossniklaus et al., 2002; Zou et al., 2006; Sheridan et al., 2009; Xie et al., 2012) have been shown in excised choroidal neovascular membranes of AMD patients and in laser-induced CNV. These molecules may promote angiogenesis (Lavalette et al., 2011; Yang et al., 2011) and vascular permeability (Clermont et al., 2016). In AMD, microglia cells translocate into the retina and accumulate in the subretinal space by adopting characteristics of morphological activation (Ng and Streilein, 2001; Xu et al., 2009). Studies have shown the deleterious effect of leukocyte adhesion in neovascular AMD (Penfold et al., 1987; Takeda et al., 2009) and in VEGF-induced ocular angiogenesis (Nakao et al., 2005). Leukocyte adhesion and breakdown of the blood-retinal barrier are mediated by chemokines such as Vascular Cell Adhesion Molecule-1

(VCAM-1) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), which are overexpressed in the presence of VEGF in endothelial cells (Kim et al., 2001). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1) and ICAM-1 are both heavily involved in the recruitment and extravasation of leukocytes, and are induced in cultured vascular endothelial cells by VEGF through NF- κ B activation (Marumo et al., 1999; Kim et al., 2001). Both VEGF and MCP-1 are overexpressed in laser-induced CNV animal models (Xie et al., 2011) and in neovascular AMD patients (Jonas et al., 2010). The presence of inflammatory cells and cytokines can thus be considered an integral part of an active inflammatory phase that keeps CNV active. However, it is unknown so far if VEGF expression is responsible for inflammation in the retina and the choroid and if inflammation is a prerequisite for the development of neovascularization.

VEGF is then overexpressed in AMD and is considered to be the major mediator of either choroidal (Lu and Adamis, 2006) or retinal neovascularization (Aiello et al., 1995; Campochiaro, 2013). VEGF triggers cellular proliferation, migration, and formation of neovessels. It has thus become the target of choice for the treatment of pathological ocular angiogenesis using anti-VEGF antibodies (Fontaine et al., 2011; Mitchell, 2011; Sarwar et al., 2016). The most common therapy approved by the U.S. Food and Drug Administration for the treatment of patients with AMD is Aflibercept by intravitreal monthly injections (Hernandez et al., 2018). Despite the efficacy of these molecules in the improvement of visual acuity, repeated intravitreal injections of anti-VEGF may cause long-term ocular complications due to the numerous physiological roles associated to this growth factor (Saint-Geniez et al., 2008; Fontaine et al., 2011; Park et al., 2014). Furthermore, many patients suffering from neovascular AMD may develop mechanisms of resistance to anti-VEGF therapy (Yang et al., 2016).

The kallikrein-kinin system (KKS) is highly activated during inflammation. Bradykinin (BK), Lys-BK and their C-terminal metabolites (des-Arg⁹-BK and Lys-des-Arg⁹-BK) are involved in vascular permeability, vasodilation, and expression of pro-inflammatory cytokines (Kojima et al., 2009; Pouliot et al., 2012). These effects are mediated by two G-protein-coupled receptors, B1R and B2R. The B2R is constitutive while the B1R is normally absent in healthy tissue; it is induced by tissue damage and pro-inflammatory cytokines via activation of NF- κ B (Ni et al., 1998; Couture and Girolami, 2004). The KKS with its kinin receptors are expressed

in the retina and ocular tissues of several species, including humans (Ma et al., 1996; Bhat et al., 2014). A role for the KKS was described in diabetic retinopathy (Feener, 2010; Pouliot et al., 2012). For example, B1R activation enhances vascular permeability, leukocyte adhesion and the expression of pro-inflammatory molecules such as VEGF-A, VEGF-R2, ICAM-1, VCAM-1, COX-2 and IL-1 β in diabetic retina (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). In addition to its effect on inflammation, BK promotes angiogenesis by upregulating basic fibroblast growth factor (bFGF) through B1R, and by stimulating VEGF formation via B2R in a non-ocular model of neovascularization (Colman, 2006). B1R promotes reparative angiogenesis in murine models of occlusive vascular disease. B1R activation induces endothelial cells proliferation and survival, while B1R antagonists induce apoptosis (Emanueli et al., 2001; Emanueli et al., 2002; Hillmeister et al., 2011). Thus far, only three studies have explored the KKS in AMD etiology (Nagai et al., 2007; Nakamura et al., 2011; Fukuhara et al., 2013). However, the specific role of kinin receptors and their interplay with VEGF in retinal neovascular AMD are still poorly understood.

The present study examined the interplay between kinin B1R and VEGF in retinal inflammation in a rat model of laser-induced CNV. Molecular (qRT-PCR) and cellular expression (immunocytochemistry) of these two mediators was studied in the retina after the CNV. The impact of anti-VEGF therapy was compared with that of a selective B1R antagonist (R-954) or B1R siRNA on the expression of inflammatory mediators, the size of CNV lesions, leukocyte adhesion and vascular permeability. Our results indicate that B1R has a substantial impact on CNV-induced inflammation within the retina.

Material and Methods

All experimental methods and animal care procedures were approved by the animal care committee of Université de Montréal (Protocol 15-063), in compliance with the guiding principles for animal experimentation as enunciated by the Canadian Council on Animal Care and [ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research](#). Male Long-Evans rats (200-250 g) were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage in a room under standard conditions of temperature (23 °C) and lighting (12-hour light/dark cycle), with food and water provided *ad libitum*. For each rat,

CNV was induced in the left eye. The right eye (without CNV) was used as the control. Every day, the rats were visually inspected for any redness, porphyrin secretion, or corneal opacity. In separate groups of rats, retinæ were gently separated from the RPE to measure retinal vascular permeability, leukocyte recruitment, expression of inflammatory mediators, and estimation of neovascular lesions.

Laser-induced CNV in rats

Rats were anesthetized with an intramuscular injection of a mixture of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg). The pupils were dilated with tropicamide 1% and the cornea was kept moisturized with an ointment. Five regions of 100 µm were targeted using an argon laser, with 0.1 s duration and energy of 110 mW (Coherent Novus 2000; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany). The CNV was successful if a typical bubble at the choroid/RPE interface was seen, corresponding to the breakdown of the Bruch's membrane. The development of laser-induced CNV is manifested by an early phase occurring during the first week and mature membranes develop between 10 and 14 days post-CNV in most studies (Tobe et al., 1998; Edelman and Castro, 2000; Pennesi et al., 2012). Based on these studies, the experimental protocols were designed at 10 days post-CNV.

Pharmacological treatments

Pharmacological treatments were started immediately after laser-induced CNV in anesthetized rats. A dose of 125 µg polyclonal goat IgG anti-VEGF (AF564, R&D systems, Oakville, Canada) was injected as a single intravitreal (ITV) injection (5 µL) to neutralize vitreal and retinal VEGF. The same dosage of a normal goat IgG (AB-108C, R&D systems) was injected as control. B1R induction and upregulation was blocked with 10 nmol of an ITV injection of B1R siRNA (Ambion Invitrogen Life Technologies, Canada) (Hachana et al., 2018). The same dosage of scramble siRNA (Invitrogen Life Technologies) - same nucleotides as siRNA but in a random sequence- was injected ITV as control. This treatment with intravitreal B1R siRNA (10 nmol) showed the absence of B1R protein by immunohistochemistry in the streptozotocin (STZ)-diabetic rat retina and confirmed the specificity of the polyclonal rabbit antiserum for rat B1R (Hachana et al., 2018). We have also shown the efficacy of the B1R

siRNA in reducing the mRNA levels of kinin receptors (B1R and B2R), VEGF-A and VEGFR-2, in the retinas of STZ-diabetic rats by quantitative RT-PCR.

The pharmacological blockade of the B1R was achieved with R-954 (AcOrn[Oic²,(α Me)Phe⁵,D β NaI⁷,Ile⁸]desArg⁹-BK), a highly selective and metabolically stable peptide antagonist obtained from Dr Fernand Gobeil Jr (Pharmacology, Université de Sherbrooke, Canada) (Gobeil et al., 2014). It was topically administered (\approx 100 μ g/10 μ L) twice a day to the surface of the eye in non-anesthetized rats for 10 days, starting immediately after the CNV. Using radiolabeled [³H]-R-954, R-954 was found to diffuse to the retina within 1 h and to remain in the tissue for up to 12 h after its administration to the ocular surface (Hachana et al., 2018). Since R-954 is not metabolized in rat tissue homogenates at room temperature (Gobeil et al., 2014), only its intact form can be found in retina. Eye drop application of sterile saline solution (vehicle) served as control.

Observation of laser-induced CNV with Heidelberg retinal angiograph

Rats were anaesthetized with an intramuscular injection of ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Fundus fluorescein angiography was performed using a commercial camera and imaging system (KOWA GENESIS-D system; KOWA Company, Tokyo, Japan) at 10 days after laser photocoagulation. The photographs were captured with a 20-D lens in contact with the fundus camera lens, after an intraperitoneal injection of 0.1mL of 1% fluorescein sodium (Akorn, Decatur, IL). CNV was monitored in untreated and anti-VEGF treated rat eyes with a laser ophthalmoscope (Heidelberg, Dossenheim, Germany).

Method of retinal dissection

Enucleated eyes were bisected equatorially and after removal of the cornea and peeling the sclera and choroid under the dissecting microscope, the entire retina was carefully removed. The RPE cells were gently scratched with a brush for qRT-PCR. Dissected retinal tissue was visually inspected to exclude cross-contamination with the vitreous, and choroid and was immediately submerged in the RNA stabilizing reagent (RNA*later*).

Measurement of retinal inflammatory mediators by quantitative RT-PCR

After anesthesia with sodium pentobarbital (60 mg/kg, i.p), eyes were enucleated and retinas excluding RPE were isolated and put in RNAlater stabilization reagent (QIAGEN, Valencia, CA, USA). SYBR green-based real-time quantitative PCR using the Mx3000p device for signal detection was performed as described previously (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). The primer pairs designed by Vector NTI software are shown in Table 1. For standardization and quantification, rat 18S was amplified simultaneously. The relative quantification of gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method.

Measurement of retinal adherent leukocytes and vascular permeability

Retinal adherent leukocytes were determined in sodium pentobarbital anesthetized rats (60 mg/kg, i.p.), as described in previous studies (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). Briefly, rats were perfused with phosphate buffer saline (PBS) (35 ml/min) to eliminate non-adherent leukocytes. FITC-conjugated Concanavalin A (FITC-ConA 20 μ g/ml in PBS, 5 mg/kg; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) was used to label the adherent leukocytes and vascular endothelium. Subsequently, rats were perfused with 4% paraformaldehyde (PFA) followed by 1% Albumin in PBS (35 ml/min). Then, FITC-Concanavalin A-stained leukocytes were counted in each flat-mounted retina with a fluorescence microscope at 40x and 60x magnification (Leica microsystems, Concord, ON, Canada). The total number of leukocytes in each retina was determined.

Retinal vascular permeability was assessed using the Evans blue dye extravasation technique (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). After enucleation, retinas were collected, weighed, and incubated in 1 mL formamide for 18 h at 70-75°C. The fluorescence of extracted Evans blue was measured with a spectrofluorometer (Spex 1681, Horiba JobinYvon Inc, Edison, NJ, USA) (620 nm for excitation and 680 nm for emission).

Evaluation of the retinal vascular leakage to assess neovascular area

Rats were anesthetized with an overdose of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (40 mg/kg, i.m.). A solution of FITC-dextran (2×10^6 MW; Sigma Aldrich-Canada) was prepared

at a concentration of 10 mg/mL in PBS. After an injection of 0.5 mL of FITC-dextran solution into the left heart ventricle, the eyes were removed and fixed for 1 h in PFA (4%). The retina was then dissected out, and visually inspected to exclude cross-contamination with the vitreous, limbus and choroid and then flat mounted on a gelatinized microscope slide with cover slip. Neovascularization lesions were visualized using a fluorescence microscope (Leica microsystems Co., Concord, ON, Canada). A digital camera was used to take micrographs (40x) for each of the five laser burn sites seen on the retina. The retinal neovascular area was outlined in red and measured using Java-based image processing software (ImageJ; National Institutes of Health, Bethesda, USA).

Immunofluorescence staining

Rats were perfused with PFA 2% and the eyes were embedded in paraffin and cut into 5 µm-thick sections as described previously (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). The sections were pre-treated with citrate buffer solution (10 mM citric acid, 0.05% Tween 20, pH 6.0) at 80°C for 20 min to break down the protein cross-links, unmasking the antigens and epitopes. Sections from all groups were incubated with either the selective rabbit polyclonal antiserum anti-B1R 1:500 (Hachana et al., 2018), the mouse monoclonal anti-endothelial cells antibody 1:500 (RECA-1, ab 9774, Abcam, Cambridge, USA), the mouse monoclonal anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) antibody 1:500 (IF03L-Millipore Sigma), the mouse polyclonal anti-ionized calcium binding adapter molecule-1 antibody 1:500 (Iba-1; Wako, Richmond, VA, USA) or the chicken monoclonal anti-VEGF-R2 antibody 1:250 (GW21181, Sigma-Aldrich). The slides were incubated with Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (A21206, Invitrogen) to visualize B1R, with Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse IgG (A31570, Invitrogen) to visualize endothelial and glial cells and microglia or with Alexa Fluor 647 goat anti-chicken IgY (ab150175, Abcam) to visualize VEGF-R2. Slides were then washed and mounted using ProLong® Gold Antifade Reagent (Invitrogen) or Fluoroshield with DAPI (Sigma). Images were obtained with a confocal microscope Zeiss-LSM800 equipped with an argon laser.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm s.e.m. and *n* represents the number of rats used in each experiment. One-way ANOVA and the Bonferroni *post-hoc* test were used for comparison between groups for each parameter. Only probability values (P) less than 0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Effect of anti-VEGF on the expression of retinal inflammatory mediators, retinal vascular permeability and retinal leukocyte adhesion

To assess the inflammatory component of laser-induced CNV, we first measured mRNA expression of selected mediators related to the kinin and VEGF systems (B1R, B2R, VEGF-A, VEGF-R2, HIF-1 α), the inflammation pathway (IL-8, IL-1 β , COX-2, MCP-1, TNF- α), and adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1) (Figure 1 A-L, Table 2). All these inflammatory mediators (B1R, B2R, VEGF-A, VEGF-R2, HIF-1 α , IL-8, IL-1 β , TNF- α , COX-2, ICAM-1, MCP-1, VCAM-1) were significantly increased in the CNV retina (4 to 10-folds) compared to the control retina (for statistical results see Table 2). The upregulation of kinin receptors (B1R and B2R) in the CNV retina was significantly prevented by ITV anti-VEGF therapy (Figure 1 A, B). Similarly, the CNV-induced overexpression of VEGF-A and VEGF-R2 was blocked by the anti-VEGF therapy (Figure 1 C, D). The upregulation of the hypoxia-induced factor HIF-1 α involved in the expression of VEGF in CNV was also blocked by the anti-VEGF therapy (Figure 1 E). The pro-inflammatory cytokine TNF- α was downregulated by the anti-VEGF therapy (Figure 1 H), which had, however, no impact on IL-8, IL-1 β and Cox-2 expression (Figure 1 F, G, I). The upregulation of leukocyte recruitment markers ICAM-1, MCP-1 and VCAM-1 was blocked by anti-VEGF (Figure 1 J-L).

CNV significantly increased retinal extravasation of Evans blue dye compared to the control retina (CNV+IgG compared to Ctl+IgG) (Figure 1 M). These changes as well as effects of treatments were significant (anti-VEGF experiments, $F(3, 48) = 10.6$, $p = 0.001$). ITV injection of anti-VEGF in control eyes did not significantly change the baseline values of retinal

vascular permeability. In contrast, ITV injection of anti-VEGF in the CNV group significantly decreased vascular permeability to baseline values compared to the CNV group receiving IgG ITV injection, $p = 0.003$.

Leukocyte adhesion to the retinal vasculature among the four groups of animals was counted under fluorescence microscopy (Figure 1 N, O). There was a significant difference between groups as determined by one-way ANOVA ($F(3,14) = 145.22, p = 0.001$) (Figure 1 O). The total number of labelled adherent leukocytes was significantly increased in laser-induced CNV compared to the control retina injected with IgG ($p = 0.001$). One single ITV injection of anti-VEGF concomitant to the CNV induction significantly reduced the number of retinal adherent leukocytes compared to the CNV+ IgG group ($p = 0.001$), and to the control retina ($p = 0.001$). Anti-VEGF also significantly reduced labelled adherent leukocytes induced by IgG in the control retina (Figure 1 O).

Effect of R-954 or B1RsiRNA on the expression of retinal inflammatory mediators, retinal vascular permeability and retinal leukocyte adhesion

Laser-induced CNV enhanced again inflammatory mediators (B1R, B2R, VEGF-A, VEGF-R2, HIF-1 α , IL-8, IL-1 β , TNF- α , COX-2, ICAM-1, MCP-1, VCAM-1) in the retina (4 to 10-folds) compared to the control retina (Figure 2 A-L, Table 2). The upregulation of kinin receptors (B1R and B2R) in the CNV retina was significantly prevented by the topical B1R antagonist R-954 (Figure 2 A, B). In contrast, the CNV-induced overexpression of VEGF-A and VEGF-R2 and HIF-1 α remained unaffected by the B1R antagonist (Figure 2 C, D, E). Pro-inflammatory cytokine markers (IL-1 β and TNF- α) were significantly reduced by the R-954 antagonist, but not IL-8 (Figure 2 F-H). Also, COX-2 mRNA levels were blocked by R-954 (Figure 2 I). The leukocyte recruitment markers MCP-1 and VCAM-1 were not affected by R-954 (Figure 2 K, L), whereas ICAM-1 was downregulated by R-954 (Figure 2 J).

CNV significantly increased by two to three folds the extravasation of Evans blue dye compared to the control retina (Figure 2 M). These changes as well as effects of treatments were significant (siRNA experiments, $F(3,35) = 35.7, p = 0.001$). A 10-day topical treatment with R-954 significantly decreased vascular permeability in CNV retina ($p = 0.001$) compared to the

CNV group treated with the vehicle. The permeability remained, however, higher than control retinal values. ITV injection of B1R siRNA in control eyes did not significantly change the baseline values of retinal vascular permeability. However, B1R siRNA ITV treatment significantly decreased although not totally vascular permeability in CNV retina compared to Scramble B1R siRNA treatment ($p = 0.001$).

Leukocyte adhesion to the retinal vasculature was counted in four groups of animals (Figure 2 N, O). The total number of labelled adherent leukocytes was significantly increased in laser-induced CNV compared to the control retina ($p = 0.001$). One single ITV injection with B1R siRNA significantly abolished leukocyte adherence in laser-induced CNV compared to CNV treated with scrambled siRNA ($p = 0.001$).

Cellular distribution of B1R on glial and vascular endothelial cells, microglia and VEGF-R2 in the retina

In contrast to the weak immunostaining for B1R in control retina, (Figure 3A), there was a heavy staining of B1R in the neovascularization area observed ten days after laser-induced CNV, particularly in the ganglion cell layer (Figure 3A', white arrows). The GFAP labeling in the CNV retina was highly ramified, and hypertrophic glial extensions were seen (Figure 3B'), which was not the case in the control retina (Figure 3 B). In CNV and control retinas, B1R was co-localized with astrocytes labelled with the GFAP antibody (Figure 3 C, C').

Confocal microscopy revealed newly retinal vessels in CNV retina (Figure 3E' indicated by an arrow). B1R immunostaining was dramatically increased in retinal vessels (Figure 3 D', arrows) and found co-localized with the endothelial marker (RECA-1) in control and CNV retinas (Figure 3 F, F').

In order to investigate the effects of activated microglia in retina, we used the specific Iba-1 marker. Activated microglia, as defined by hypertrophic cell body and fewer processes, were more abundant in CNV retina (Figure 3 H') compared to control retina (Figure 3 H). After CNV, microglia accumulated in the subretinal space and in all the retinal layers (particularly in GCL, INL indicated by arrows). In addition, B1R labeling after CNV was more intense in GCL retinal

layers (Figure 3 G') in comparison to control retina (Figure 3 G). It is worth noting that most microglia cells were not labelled for B1R in the retina (Figure 3 I').

In comparison with the low immunostaining for VEGF-R2 in the control retina (Figure 3 K), VEGF-R2 immunostaining was more striking in blood vessels of the CNV retina (Figure 3 K'). It is worth noting that the immunostaining of B1R - and VEGF-R2 - merged together, especially in GCL layer in CNV retina (Figure 3 L'). Such co-localization between B1R and VEGF-R2 was not seen in Müller cells.

Effect of anti-VEGF, R-954 and B1R siRNA on the retinal vascular leakage

CNV was first monitored with a fundus camera and angiography. Laser-induced spots of CNV were evidenced by visible hyperfluorescence in the late phase of angiography (Figure 4 A). Hyperfluorescence was more visible in the untreated eye (left picture) than in the treated eye with ITV injection of anti-VEGF (right picture). To evaluate the retinal vascular leakage, we performed fluorescein FITC-Dextran perfusion. Leakage of the dye was observed ex-vivo in CNV retina (Figure 4 B), suggesting abnormal vessels. We determined also whether the pharmacological treatments could attenuate the retinal leakage. All laser spots demonstrated evident fluorescein leakage 10 days post-CNV compared to the control eye ($F(3,21) = 87.4, p = 0.001$). The anti-VEGF significantly decreased the retinal vascular leakage by 72% ($2.6 \pm 1.1 \text{mm}^2$), while R-954 and B1R siRNA treatments significantly reduced it by 45% ($5.2 \pm 0.8 \text{mm}^2$) and 78% ($2.0 \pm 0.6 \text{mm}^2$), respectively, compared to vehicle-treated RNV lesions ($9.6 \pm 1.1 \text{mm}^2, p=0.001$ for each comparison, Figure 4 C).

Immunostaining of RECA-1 (red) supports laser-induced neovascularization. RECA-1 and B1R (green) staining merged together (yellow) showing their colocalization in CNV choroid and retina (Figure 4 D). The immunodetection of B1R by fluorescence revealed an increased protein expression of B1R both in the CNV choroid and retina (Figure 4 D). Topical application of R-954, ITV B1R siRNA treatment, and anti-VEGF treatment significantly decreased the severity of laser-induced CNV (Figure 4 B, C).

Discussion

This study provides the first demonstration that in addition to VEGF and its receptor VEGF-R2, the KKS contributes to the inflammatory process following laser-induced CNV leading to retinal damage. B1R blockade with ITV B1R siRNA or topical application of the B1R antagonist R-954 is able to significantly decrease CNV-related neovascularization in the retina and inflammatory responses such as leukocyte adhesion and the enhanced retinal vascular permeability. Moreover, the topical administration of the B1R antagonist R-954 is able to strongly reduce the expression of inflammation mediators (IL-1 β , TNF- α and COX-2). On the other hand, the treatment with anti-VEGF is able to dramatically reduce CNV-induced B1R and B2R upregulation as well as VEGF-A and VEGF-R2, and vascular adhesion molecules resulting in leukocyte adhesion. These findings suggest that VEGF and B1R pathways are involved in complementary mechanisms in the development of CNV-induced retinal alterations.

Contribution of B1R along with VEGF in retinal damage induced by CNV

Our study clearly shows B1R and B2R upregulation in retina after laser-induced CNV and the preventing effect of B1R blockade and anti-VEGF treatment on the upregulation of both kinin receptors and the size of a neovascularization. These results suggest a possible contribution of the B1R in the retinal damage or the sustaining of CNV. As shown by immunostaining, B1R protein is mainly located in the ganglion cell layer which is one of the most vascularized layers of the retina. B1R is co-localized with endothelial cells in RPE, but much less frequently with the microglia. The overexpression of B1R in endothelial cells is in accordance with the enhanced vascular permeability observed in this study. Additionally, B1R is detected on astrocytes in the GCL and the inner plexiform layer. These glial cells are in close relations with ganglion cells and capillaries contributing to the blood-retinal barrier (Wang et al., 2010; Hachana et al., 2018). Moreover, astrocytes are strongly implicated in retinal angiogenesis, providing the necessary template for vessel proliferation (O'Sullivan et al., 2017).

The cellular distribution of B1R overlapped VEGF-R2 in the retina, RPE or choroid in the CNV model. Whereas B1R and VEGF may interact in the retina (Kita et al., 2015; Clermont et al., 2016), only three studies have explored the role of the KKS in AMD etiology. The first

shows that the KKS is a positive regulator of CNV through additive effects of B2R antagonist and ACE inhibition on CNV lessening (Nagai et al., 2007). The second shows that tissue kallikrein attenuates CNV formation via the cleavage of VEGF and VEGF164 isoform in RPE-choroid complexes (Fukuhara et al., 2013). In the third one, tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization in laser-induced CNV via the cleavage of VEGF165 (Nakamura et al., 2011). However, this effect is modest and does not concern the plasmatic form of kallikrein, which is strongly induced in retinal vascular disease (Pouliot et al., 2012; Bhat et al., 2014).

A single anti-VEGF ITV injection reduced the formation of neovascularization in retina and reversed completely the increase in retinal vascular permeability in laser-induced CNV. This anti-VEGF effect could be related to the concomitant downregulation of B1R and B2R, or to the maintaining of VEGF and VEGF-R2 baseline levels. VEGF, as B1R, causes breakdown of the blood-retinal barrier in numerous ocular diseases, including neovascular AMD (Qaum et al., 2001; Saishin et al., 2003; Gragoudas et al., 2004; Clermont et al., 2016). The possibility that VEGF acts through the KKS system in this function would be in accordance with a recent study showing that the full effect of VEGF on retinal vascular permeability is dependent on plasma kallikrein (Clermont et al., 2016). The co-localisation of VEGF and B1R on retinal blood vessels is congruent with this mechanism. Conversely, a 10 days treatment by eye-drop application of R-954 decreased vascular permeability and B1R and B2R upregulation without affecting VEGF and VEGF-R2 upregulation. One can infer that B1R can activate the inflammatory process in the retina independently of the VEGF pathway. Accordingly, a previous study showed that the plasma kallikrein is implicated as a VEGF-independent mediator in macular edema (Kita et al., 2015). This is congruent with the role of the KKS in vasodilation, inflammation, and retinal vascular hyperpermeability in retinal diseases (Clermont et al., 2011; Pouliot et al., 2012; Abdulaal et al., 2016).

Contribution of inflammatory mediators in retinal damage induced by CNV

The profile of inflammatory mediators remains less investigated in AMD. An association was shown between aqueous humor cytokines levels and the pathogenesis of AMD patients (Liu et al., 2016). Although BK can upregulate IL-8 expression in human fibroblasts (Bastian et al., 1998; Brunius et al., 2005), the expression of this cytokine is not altered by R-954 or anti-VEGF

in the CNV retina. Therefore, our data do not support a primary role for IL-8, a potent chemoattractant involved in CNV (Qu et al., 2009), in the therapeutic effects of anti-VEGF and B1R antagonism in laser-induced CNV. The local production of IL-1 β and TNF- α is one of the most prominent processes at the beginning of inflammation. Both are involved in the induction and upregulation of B1R (Lundberg et al., 2015). *In vivo* and *in vitro* studies have shown that angiogenesis is induced by IL-1 β via the Cox-2 pathway. Positive cells-Cox-2 was around IL-1 β in the presence of neovascularization (Kuwano et al., 2004). TNF- α is known as a potent mediator of increased vascular permeability (Aveleira et al., 2010) that is partly mediated by the KKS system (Clermont et al., 2016). Macrophages recruited during a CNV express TNF- α (Oh et al., 1999) and TNF- α produced by macrophages stimulates RPE and overexpression of VEGF (Beatty et al., 2000). Interestingly, anti-VEGF injection and R-954 topical application were both able to reduce TNF- α expression in CNV retina. In contrast, Cox-2 and IL-1 β upregulation in CNV retina was normalized with R-954 but not with anti-VEGF treatment. Hence, B1R and VEGF appear to promote retinal inflammation through complementary but distinctive mechanisms that may work in concert as a loop of auto-amplification (Figure 5).

Regulation and interaction between VEGF and B1R in CNV retina

Ocular fluid levels of VEGF increase markedly in AMD patients (Sato et al., 2018). VEGF-A via VEGFR-1 is involved in the recruitment of monocytes/macrophages leading to inflammatory neovascularization (Cursiefen et al., 2004). In the present study, HIF-1 α mRNA is increased in CNV retina and normalized with anti-VEGF treatment. The expression of VEGF-A is mainly regulated by hypoxia via HIF-1 α (Ikeda et al., 2006), but can also accumulate in the retina due to the oxidative stress (Kuroki et al., 1996). In turn, VEGF stimulates neovascularization (Stefansson et al., 2011). During acute hypoxia, HIF-1 α appears to be regulated by a transcriptional-dependent mechanism resulting in a decrease of HIF-1 α mRNA in RPE (Stiehl et al., 2006). Under chronic hypoxia, this mechanism is replaced by a negative feedback loop involving proline hydroxylase enzymes (Forooghian et al., 2007).

Our results show that blockade of B1R with R-954 does not reduce the upregulation of HIF-1 α , VEGF and VEGF-R2. This supports the assumption that the regulation of the KKS by VEGF is not reciprocal. In the hypothetical scenario illustrated in Figure 5, VEGF operates

through the upregulation of the B1R by releasing TNF- α . Studies have shown that B1R can be upregulated by its own agonists and downregulated by B1R antagonists in several paradigms (reviewed by Couture et al., 2014). Such a regulatory mechanism is also proposed herein to explain the suppressive effect of R-954 on B1R expression in the CNV retina. Because anti-VEGF treatment results in inhibition of cytokines production, particularly TNF- α , it is conceivable that a mechanism similar to B1R is also effective for VEGF. Hence a decrease of inflammatory mediators by anti-VEGF is likely to halt the positive feedback loop of autoregulation on VEGF-A, VEGF-R2 and B1R.

Contribution of leukocytes in retinal damage induced by CNV

The inflammatory process in CNV and its spread to retina include leukocyte infiltration. Leukocytes have been described in excised neovascular membranes (Lopez et al., 1991; Gehrs et al., 1992; Seregard et al., 1994). Under physiological conditions, the quiescent vascular endothelium prevents the adhesion of leukocytes and platelets to its apical surface. Under inflammatory conditions, leukocyte adhesion is promoted by numerous pro-adhesive molecules such as ICAM-1, VCAM-1, and MCP-1. CNV tissues express molecules responsible for infiltration of macrophages such as ICAM-1 and MCP-1 (Yeh et al., 2004). As expected, we observed that the increased number of adherent leukocytes in the CNV retina is accompanied by an increase in mRNA levels of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1. Targeted disruption of ICAM-1 and MCP-1 in mice leads to a significant decrease in CNV development (Sakurai et al., 2003; Schmack et al., 2009), suggesting that adherent leukocytes have a prominent role in the angiogenic process. In the present study, anti-VEGF reduced the expression of these adhesion molecules and leukocyte adhesion, which is consequent with the reduction of the retinal CNV. B1R blockade also reduced leukocyte adhesion and the size of the CNV by reducing the overexpression of ICAM-1. This occurs without impact on the overexpression of MCP-1 and VCAM-1 in the CNV retina, supporting again that B1R and VEGF operate through distinct and complementary mechanism on leukocyte adhesion and CNV development.

Contribution of microglia in retinal damage induced by CNV

The accumulation of reactive microglia in the affected areas represents a key cellular event in inflammation. Activated microglia has been found in the subretinal space of patients with AMD or mouse model (Ma et al., 1996; Gupta et al., 2003; Checchin et al., 2006; Ma et al., 2009). Microglia are resident immune cells of the retina that can release multiple cytokines, chemokines and neurotransmitters (Hanisch and Kettenmann, 2007) such as IL-1 α , IL-1 β , IL-6 and TNF- α (McGeer and McGeer, 2004; McGeer et al., 2005). Under normal conditions, retinal microglia are totally absent from the subretinal space, largely excluded from the external retina and present in small amounts in the inner retina (Lee et al., 2008). Herein, we illustrate that microglia cells accumulated in the GCL, INL and the subretinal space close to the RPE layer. The accumulation and morphological changes of activated microglia can probably increase inflammation leading to the formation of neovascular changes. A study revealed that eyes with subretinally-transplanted microglia develop large and prominent CNV in the subretinal space (Ma et al., 2009). Local retinal microglia can interact with signals from retinal vessels in response to local tissue hypoxia and thereby participate in the vascularization of the retina (Checchin et al., 2006). In our study, microglia were identified by Iba-1 immunolabelling and did not reveal colocalization with B1R. Importantly, our previous findings in diabetic retina showed that B1R was not expressed on microglia and a similar ocular treatment with R-954 did not alter retinal microglia reactivity (Hachana et al., 2018). As corollary, microglial cell changes identified in this study may promote apoptosis of retinal cells through a mechanism unlikely related to B1R.

Conclusion

This study underscores the beneficial effect of topical ocular application of a B1R antagonist to halt vascular neovascularisation and inflammation in the retina subsequent to a lesion of the choroid. From a clinical point of view, the non-invasive and self-administration of B1R antagonists on the surface of the cornea by eye-drops might be an important alternate asset for the treatment of AMD or a complementary approach to patients currently resistant to anti-VEGF therapy.

Author contributions

SH and OF performed the experiments, SH, OF, RC, and EV designed the experiments, analyzed the data, interpreted the results, and wrote the paper. All authors approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-125962) to EV and RC, and from the FRQS Vision Health Research Network (AMD program) to EV, RC and MS. SH was recipient of a scholarship from the GRUM- Université de Montréal. OF was a recipient of a scholarship from the FROUM.

Conflict of interest Statement

S. Hachana, None; O. Fontaine, None; P. Sapieha, None; M. Lesk, None; R. Couture, None; E. Vaucher, None

Acknowledgment

The authors greatly appreciate the technical assistance of Jacques Sénécal for the immunohistochemistry experiments.

Abbreviations:

AMD, age-related macular degeneration; BK, bradykinin; B1R, bradykinin type 1 receptor; B2R, bradykinin type 2 receptor; CNV, choroidal neovascularization; Cox-2, cyclooxygenase-2; FITC, fluorescein isothiocyanate; GCL, glial cell layer; GFAP, glial fibrillary acid protein; HIF-1 α , hypoxia-induced factor-1 α ; Iba1, ionized calcium binding adapter molecule-1; ICAM-1, intercellular adhesion molecule-1; IL-1 β , interleukin-1 β ; IL-8, interleukin-8; INL, inner nuclear layer; ITV, intravitreal injection; KKS, kallikrein-kinin system; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; PFA, paraformaldehyde, qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; RNV, retinal neovascularization; RPE, retinal pigment epithelium; STZ,

streptozotocin; TNF- α , tumor necrosis factor- α ; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGF-R2, vascular endothelial growth factor type 2 receptor; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1.

References

Abdulaal, M., Haddad, N.M., Sun, J.K., and Silva, P.S. (2016). The Role of Plasma Kallikrein-Kinin Pathway in the Development of Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Therapeutic Approaches. *Semin Ophthalmol* 31(1-2), 19-24. doi: 10.3109/08820538.2015.1114829.

Aiello, L.P., Pierce, E.A., Foley, E.D., Takagi, H., Chen, H., Riddle, L., et al. (1995). Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(23), 10457-10461.

Aveleira, C.A., Lin, C.M., Abcouwer, S.F., Ambrosio, A.F., and Antonetti, D.A. (2010). TNF-alpha signals through PKCzeta/NF-kappaB to alter the tight junction complex and increase retinal endothelial cell permeability. *Diabetes* 59(11), 2872-2882. doi: 10.2337/db09-1606.

Bashshur, Z.F., Bazarbachi, A., Schakal, A., Haddad, Z.A., El Haibi, C.P., and Nouredin, B.N. (2006). Intravitreal bevacizumab for the management of choroidal neovascularization in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 142(1), 1-9. doi: 10.1016/j.ajo.2006.02.037.

Bastian, S., Paquet, J.L., Robert, C., Cremers, B., Loillier, B., Larrivee, J.F., et al. (1998). Interleukin 8 (IL-8) induces the expression of kinin B1 receptor in human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 253(3), 750-755. doi: 10.1006/bbrc.1998.9848.

Beatty, S., Koh, H., Phil, M., Henson, D., and Boulton, M. (2000). The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 45(2), 115-134.

Bhat, M., Pouliot, M., Couture, R., and Vaucher, E. (2014). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Prog Drug Res* 69, 111-143.

Brunius, G., Domeij, H., Gustavsson, A., and Yucel-Lindberg, T. (2005). Bradykinin upregulates IL-8 production in human gingival fibroblasts stimulated by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *Regul Pept* 126(3), 183-188. doi: 10.1016/j.regpep.2004.09.005.

Campochiaro, P.A. (2013). Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl)* 91(3), 311-321. doi: 10.1007/s00109-013-0993-5.

Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., and Chemtob, S. (2006). Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47(8), 3595-3602. doi: 10.1167/iovs.05-1522.

Clermont, A., Chilcote, T.J., Kita, T., Liu, J., Riva, P., Sinha, S., et al. (2011). Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes* 60(5), 1590-1598. doi: 10.2337/db10-1260.

Clermont, A., Murugesan, N., Zhou, Q., Kita, T., Robson, P.A., Rushbrooke, L.J., et al. (2016). Plasma Kallikrein Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Retinal Dysfunction and Thickening. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(6), 2390-2399. doi: 10.1167/iovs.15-18272.

Colman, R.W. (2006). Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. *Curr Pharm Des* 12(21), 2599-2607.

Couture, R., and Girolami, J.P. (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. doi: 10.1016/j.ejphar.2004.07.045.

Couture R, Blaes N, Girolami JP. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol*, 12(2):223-48.

Cursiefen, C., Chen, L., Borges, L.P., Jackson, D., Cao, J., Radziejewski, C., et al. (2004). VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. *J Clin Invest* 113(7), 1040-1050. doi: 10.1172/JCI20465.

Dorrell, M., Uusitalo-Jarvinen, H., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2007). Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol* 52 Suppl 1, S3-19. doi: 10.1016/j.survophthal.2006.10.017.

Edelman, J.L., and Castro, M.R. (2000). Quantitative image analysis of laser-induced choroidal neovascularization in rat. *Exp Eye Res* 71(5), 523-533. doi: 10.1006/exer.2000.0907.

Emanuelli, C., Bonaria Salis, M., Stacca, T., Pintus, G., Kirchmair, R., Isner, J.M., et al. (2002). Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation* 105(3), 360-366.

Emanuelli, C., Minasi, A., Zacheo, A., Chao, J., Chao, L., Salis, M.B., et al. (2001). Local delivery of human tissue kallikrein gene accelerates spontaneous angiogenesis in mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 103(1), 125-132.

Feener, E.P. (2010). Plasma kallikrein and diabetic macular edema. *Curr Diab Rep* 10(4), 270-275. doi: 10.1007/s11892-010-0127-1.

Fontaine, O., Olivier, S., Descovich, D., Cordahi, G., Vaucher, E., and Lesk, M.R. (2011). The effect of intravitreal injection of bevacizumab on retinal circulation in patients with neovascular macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52(10), 7400-7405. doi: 10.1167/iovs.10-6646.

Forooghian, F., Razavi, R., and Timms, L. (2007). Hypoxia-inducible factor expression in human RPE cells. *Br J Ophthalmol* 91(10), 1406-1410. doi: 10.1136/bjo.2007.123125.

Fukuhara, J., Noda, K., Murata, M., Namba, S., Kinoshita, S., Dong, Z., et al. (2013). Tissue kallikrein attenuates choroidal neovascularization via cleavage of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54(1), 274-279. doi: 10.1167/iovs.12-10512.

Gehrs, K.M., Heriot, W.J., and de Juan, E., Jr. (1992). Transmission electron microscopic study of a subretinal choroidal neovascular membrane due to age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 110(6), 833-837.

Gobeil, F., Jr., Sirois, P., and Regoli, D. (2014). Preclinical pharmacology, metabolic stability, pharmacokinetics and toxicology of the peptidic kinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides* 52, 82-89. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.009.

Gragoudas, E.S., Adamis, A.P., Cunningham, E.T., Jr., Feinsod, M., Guyer, D.R., and Group, V.I.S.i.O.N.C.T. (2004). Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 351(27), 2805-2816. doi: 10.1056/NEJMoa042760.

Grossniklaus, H.E., Ling, J.X., Wallace, T.M., Dithmar, S., Lawson, D.H., Cohen, C., et al. (2002). Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization. *Mol Vis* 8, 119-126.

Gupta, N., Brown, K.E., and Milam, A.H. (2003). Activated microglia in human retinitis pigmentosa, late-onset retinal degeneration, and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 76(4), 463-471.

Hachana, S., Bhat, M., Senecal, J., Huppe-Gourgues, F., Couture, R., and Vaucher, E. (2018). Expression, distribution and function of kinin B1 receptor in the rat diabetic retina. *Br J Pharmacol* 175(6), 968-983. doi: 10.1111/bph.14138.

Hanisch, U.K., and Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11), 1387-1394. doi: 10.1038/nn1997.

Hernandez, L., Lanitis, T., Cele, C., Toro-Diaz, H., Gibson, A., and Kuznik, A. (2018). Intravitreal Aflibercept Versus Ranibizumab for Wet Age-Related Macular Degeneration: A Cost-Effectiveness Analysis. *J Manag Care Spec Pharm* 24(7), 608-616. doi: 10.18553/jmcp.2018.24.7.608.

Hillmeister, P., Gatzke, N., Dulsner, A., Bader, M., Schadock, I., Hofer, I., et al. (2011). Arteriogenesis is modulated by bradykinin receptor signaling. *Circ Res* 109(5), 524-533. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.240986.

Ikeda, Y., Yonemitsu, Y., Onimaru, M., Nakano, T., Miyazaki, M., Kohno, R., et al. (2006). The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and -D) expression in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 83(5), 1031-1040. doi: 10.1016/j.exer.2006.05.007.

Jonas, J.B., Tao, Y., Neumaier, M., and Findeisen, P. (2010). Monocyte chemoattractant protein 1, intercellular adhesion molecule 1, and vascular cell adhesion molecule 1 in exudative age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 128(10), 1281-1286. doi: 10.1001/archophthalmol.2010.227.

Kim, I., Moon, S.O., Kim, S.H., Kim, H.J., Koh, Y.S., and Koh, G.Y. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem* 276(10), 7614-7620. doi: 10.1074/jbc.M009705200.

Kita, T., Clermont, A.C., Murugesan, N., Zhou, Q., Fujisawa, K., Ishibashi, T., et al. (2015). Plasma Kallikrein-Kinin System as a VEGF-Independent Mediator of Diabetic Macular Edema. *Diabetes* 64(10), 3588-3599. doi: 10.2337/db15-0317.

Kojima, N., Saito, M., Mori, A., Sakamoto, K., Nakahara, T., and Ishii, K. (2009). Role of cyclooxygenase in vasodilation of retinal blood vessels induced by bradykinin in Brown Norway rats. *Vascul Pharmacol* 51(2-3), 119-124. doi: 10.1016/j.vph.2009.05.006.

Kuroki, M., Voest, E.E., Amano, S., Beerepoot, L.V., Takashima, S., Tolentino, M., et al. (1996). Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 98(7), 1667-1675. doi: 10.1172/JCI118962.

Kuwano, T., Nakao, S., Yamamoto, H., Tsuneyoshi, M., Yamamoto, T., Kuwano, M., et al. (2004). Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J* 18(2), 300-310. doi: 10.1096/fj.03-0473com.

Lavalette, S., Raoul, W., Houssier, M., Camelo, S., Levy, O., Calippe, B., et al. (2011). Interleukin-1beta inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am J Pathol* 178(5), 2416-2423. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.013.

Lee, J.E., Liang, K.J., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2008). Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(9), 4169-4176. doi: 10.1167/iovs.08-2076.

Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 57(1):27-77

Liu, F., Ding, X., Yang, Y., Li, J., Tang, M., Yuan, M., et al. (2016). Aqueous humor cytokine profiling in patients with wet AMD. *Mol Vis* 22, 352-361.

Lopez, P.F., Grossniklaus, H.E., Lambert, H.M., Aaberg, T.M., Capone, A., Jr., Sternberg, P., Jr., et al. (1991). Pathologic features of surgically excised subretinal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 112(6), 647-656.

Lu, M., and Adamis, A.P. (2006). Molecular biology of choroidal neovascularization. *Ophthalmol Clin North Am* 19(3), 323-334. doi: 10.1016/j.ohc.2006.05.001.

Ma, J.X., Song, Q., Hatcher, H.C., Crouch, R.K., Chao, L., and Chao, J. (1996). Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp Eye Res* 63(1), 19-26. doi: 10.1006/exer.1996.0087.

Ma, W., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., and Wong, W.T. (2009). Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One* 4(11), e7945. doi: 10.1371/journal.pone.0007945.

Marumo, T., Schini-Kerth, V.B., and Busse, R. (1999). Vascular endothelial growth factor activates nuclear factor-kappaB and induces monocyte chemoattractant protein-1 in bovine retinal endothelial cells. *Diabetes* 48(5), 1131-1137.

McGeer, E.G., Klegeris, A., and McGeer, P.L. (2005). Inflammation, the complement system and the diseases of aging. *Neurobiol Aging* 26 Suppl 1, 94-97. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2005.08.008.

McGeer, P.L., and McGeer, E.G. (2004). Inflammation and the degenerative diseases of aging. *Ann N Y Acad Sci* 1035, 104-116. doi: 10.1196/annals.1332.007.

Mitchell, P. (2011). A systematic review of the efficacy and safety outcomes of anti-VEGF agents used for treating neovascular age-related macular degeneration: comparison of ranibizumab and bevacizumab. *Curr Med Res Opin* 27(7), 1465-1475. doi: 10.1185/03007995.2011.585394.

Nagai, N., Oike, Y., Izumi-Nagai, K., Koto, T., Satofuka, S., Shinoda, H., et al. (2007). Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: minimal role of bradykinin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(5), 2321-2326. doi: 10.1167/iovs.06-1296.

Nakamura, S., Morimoto, N., Tsuruma, K., Izuta, H., Yasuda, Y., Kato, N., et al. (2011). Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31(5), 1041-1048. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.223594.

Nakao, S., Kuwano, T., Tsutsumi-Miyahara, C., Ueda, S., Kimura, Y.N., Hamano, S., et al. (2005). Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest* 115(11), 2979-2991. doi: 10.1172/JCI23298.

Ng, T.F., and Streilein, J.W. (2001). Light-induced migration of retinal microglia into the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(13), 3301-3310.

Nguyen, Q.D., Shah, S.M., Hafiz, G., Quinlan, E., Sung, J., Chu, K., et al. (2006). A phase I trial of an IV-administered vascular endothelial growth factor trap for treatment in patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 113(9), 1522 e1521-1522 e1514. doi: 10.1016/j.opthta.2006.05.055.

Ni, A., Chao, L., and Chao, J. (1998). Transcription factor nuclear factor kappaB regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J Biol Chem* 273(5), 2784-2791.

O'Sullivan, M.L., Punal, V.M., Kerstein, P.C., Brzezinski, J.A.t., Glaser, T., Wright, K.M., et al. (2017). Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. *Glia* 65(10), 1697-1716. doi: 10.1002/glia.23189.

Oh, H., Takagi, H., Takagi, C., Suzuma, K., Otani, A., Ishida, K., et al. (1999). The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40(9), 1891-1898.

Park, H.Y., Kim, J.H., and Park, C.K. (2014). Neuronal cell death in the inner retina and the influence of vascular endothelial growth factor inhibition in a diabetic rat model. *Am J Pathol* 184(6), 1752-1762. doi: 10.1016/j.ajpath.2014.02.016.

Penfold, P.L., Provis, J.M., and Billson, F.A. (1987). Age-related macular degeneration: ultrastructural studies of the relationship of leucocytes to angiogenesis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 225(1), 70-76.

Pennesi, M.E., Neuringer, M., and Courtney, R.J. (2012). Animal models of age related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 33(4), 487-509. doi: 10.1016/j.mam.2012.06.003.

Pouliot, M., Talbot, S., Senecal, J., Dotigny, F., Vaucher, E., and Couture, R. (2012). Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One* 7(3), e33864. doi: 10.1371/journal.pone.0033864.

Qaum, T., Xu, Q., Jousseaume, A.M., Clemens, M.W., Qin, W., Miyamoto, K., et al. (2001). VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(10), 2408-2413.

Qu, Y., Zhou, F., and Xu, X.Y. (2009). [Selective non-peptide CXCR2 antagonist SB225002 inhibits choroidal neovascularization in rat model]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 45(8), 742-745.

Rutar, M., and Provis, J.M. (2016). Role of Chemokines in Shaping Macrophage Activity in AMD. *Adv Exp Med Biol* 854, 11-16. doi: 10.1007/978-3-319-17121-0_2.

Saint-Geniez, M., Maharaj, A.S., Walshe, T.E., Tucker, B.A., Sekiyama, E., Kurihara, T., et al. (2008). Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PLoS One* 3(11), e3554. doi: 10.1371/journal.pone.0003554.

Saishin, Y., Saishin, Y., Takahashi, K., Lima e Silva, R., Hylton, D., Rudge, J.S., et al. (2003). VEGF-TRAP(R1R2) suppresses choroidal neovascularization and VEGF-induced breakdown of the blood-retinal barrier. *J Cell Physiol* 195(2), 241-248. doi: 10.1002/jcp.10246.

Sakurai, E., Taguchi, H., Anand, A., Ambati, B.K., Gragoudas, E.S., Miller, J.W., et al. (2003). Targeted disruption of the CD18 or ICAM-1 gene inhibits choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(6), 2743-2749.

Sarwar, S., Clearfield, E., Soliman, M.K., Sadiq, M.A., Baldwin, A.J., Hanout, M., et al. (2016). Aflibercept for neovascular age-related macular degeneration. *Cochrane Database Syst Rev* 2, CD011346. doi: 10.1002/14651858.CD011346.pub2.

Sato, T., Takeuchi, M., Karasawa, Y., Enoki, T., and Ito, M. (2018). Intraocular inflammatory cytokines in patients with neovascular age-related macular degeneration before and after initiation of intravitreal injection of anti-VEGF inhibitor. *Sci Rep* 8(1), 1098. doi: 10.1038/s41598-018-19594-6.

Schmack, I., Berglin, L., Nie, X., Wen, J., Kang, S.J., Marcus, A.I., et al. (2009). Modulation of choroidal neovascularization by subretinal injection of retinal pigment epithelium and polystyrene microbeads. *Mol Vis* 15, 146-161.

Seregard, S., Algvare, P.V., and Berglin, L. (1994). Immunohistochemical characterization of surgically removed subfoveal fibrovascular membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 32(6), 325-329.

Sheridan, C.M., Pate, S., Hiscott, P., Wong, D., Pattwell, D.M., and Kent, D. (2009). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in human choroidal neovascular membranes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 47(10), 1361-1367. doi: 10.1007/s00417-009-1133-3.

Stefansson, E., Geirsdottir, A., and Sigurdsson, H. (2011). Metabolic physiology in age related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 30(1), 72-80. doi: 10.1016/j.preteyeres.2010.09.003.

Stiehl, D.P., Wirthner, R., Koditz, J., Spielmann, P., Camenisch, G., and Wenger, R.H. (2006). Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels. Evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. *J Biol Chem* 281(33), 23482-23491. doi: 10.1074/jbc.M601719200.

Takeda, A., Baffi, J.Z., Kleinman, M.E., Cho, W.G., Nozaki, M., Yamada, K., et al. (2009). CCR3 is a target for age-related macular degeneration diagnosis and therapy. *Nature* 460(7252), 225-230. doi: 10.1038/nature08151.

Tobe, T., Ortega, S., Luna, J.D., Ozaki, H., Okamoto, N., Derevjani, N.L., et al. (1998). Targeted disruption of the FGF2 gene does not prevent choroidal neovascularization in a murine model. *Am J Pathol* 153(5), 1641-1646. doi: 10.1016/S0002-9440(10)65753-7.

Wang, J., Xu, X., Elliott, M.H., Zhu, M., and Le, Y.Z. (2010). Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes* 59(9), 2297-2305. doi: 10.2337/db09-1420.

Xie, P., Kamei, M., Suzuki, M., Matsumura, N., Nishida, K., Sakimoto, S., et al. (2011). Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344. *PLoS One* 6(12), e28933. doi: 10.1371/journal.pone.0028933.

Xie, P., Zhang, W., Yuan, S., Chen, Z., Yang, Q., Yuan, D., et al. (2012). Suppression of experimental choroidal neovascularization by curcumin in mice. *PLoS One* 7(12), e53329. doi: 10.1371/journal.pone.0053329.

Xu, H., Chen, M., and Forrester, J.V. (2009). Para-inflammation in the aging retina. *Prog Retin Eye Res* 28(5), 348-368. doi: 10.1016/j.preteyeres.2009.06.001.

Yang, H., Wang, Y., Qian, H., Zhang, P., and Huang, C. (2011). Pim protein kinase-3 is regulated by TNF-alpha and promotes endothelial cell sprouting. *Mol Cells* 32(3), 235-241. doi: 10.1007/s10059-011-1026-z.

Yang, S., Zhao, J., and Sun, X. (2016). Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug Des Devel Ther* 10, 1857-1867. doi: 10.2147/DDDT.S97653.

Yeh, D.C., Bula, D.V., Miller, J.W., Gragoudas, E.S., and Arroyo, J.G. (2004). Expression of leukocyte adhesion molecules in human subfoveal choroidal neovascular membranes treated with and without photodynamic therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(7), 2368-2373.

Zou, Y., Xu, X., and Chiou, G.C. (2006). Effect of interleukin-1 blockers, CK112, and CK116 on rat experimental choroidal neovascularization in vivo and endothelial cell cultures in vitro. *J Ocul Pharmacol Ther* 22(1), 19-25. doi: 10.1089/jop.2006.22.19.

Table 1 Primers list

		Sequence	Position	GenBanq
B1R	Forward	5'GCAGCGCTTAACCATAGCGGAAAT3'	367 - 390	NM_030851
	Reverse	5'CCAGTTGAAACGGTCCCGATGTT3'	454 - 431	
B2R	Forward	5'AGTGTCTGAGGAACAACGAGATGA3'	882 - 905	NM_173100
	Reverse	5'TCCAGGAAGGTGCTGATCTGGAAA3'	990 - 967	
VEGF-A	Forward	5'TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA3'	1219 - 1242	BC168708
	Reverse	5'TTACACGTCTGCGGATCTTGACA3'	1371 - 1348	
VEGF-R2	Forward	5'AGTGGCTAA GGCATGGAGTTCTT3'	3269 - 3292	U93306
	Reverse	5'GGGCCAAGCCAAAGTCACAGATT3'	3387 - 3364	
HIF-1α	Forward	5'TAGACTTGAAATGCTGGCTCCCT3'	1693 - 1716	NM_024359
	Reverse	5'TGGCAGTGACAGTGATGGTAGGTT3'	1863 - 1840	
IL-8	Forward	5'ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT3'	243 - 342	NM_018462
	Reverse	5'TCTCAGCCCTCTTCAAAACTTCTC3'	356 - 343	
IL-1β	Forward	5'TGTCACTCATTGTGGCTGTGGAGA3'	247 - 270	NM_031512
	Reverse	5'GGGCCAAGCCAAAGTCACAGATT3'	411 - 388	
TNF-α	Forward	5'TAGACTTGAAATGCTGGCTCCCT3'	244 - 270	NM_013752
	Reverse	5'TGGCAGTGACAGTGATGGTAGGTT3'	234 - 265	
Cox-2	Forward	5'GCATTCTTTGCCCAGCACTTCACT 3'	677 - 700	U03389
	Reverse	5'TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA3'	223 - 254	
ICAM1	Forward	5'TGCAGGTGAACTGCTCTTCTCTT3'	161 - 184	NM_012967
	Reverse	5'AGCTTCCAGTTGTGCCACTCGAT3'	263 - 240	
MCP1	Forward	5'TAGACTTGAAATGCTGGCTCCCT3'	176 - 189	NM_02371
	Reverse	5'TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA3'	121 - 134	
VCAM1	Forward	5'TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA3'	321 - 367	NM-02314
	Reverse	5'TCACCAAAGCCAGCACATAGGAGA3'	223 - 254	
18S	Forward	5'TCAACTTTTCGATGGTAGTCGCCGT3'	363 - 385	X01117
	Reverse	5'TCCTTGGATGTGGTAGCCGTTTCT3'	470 - 447	

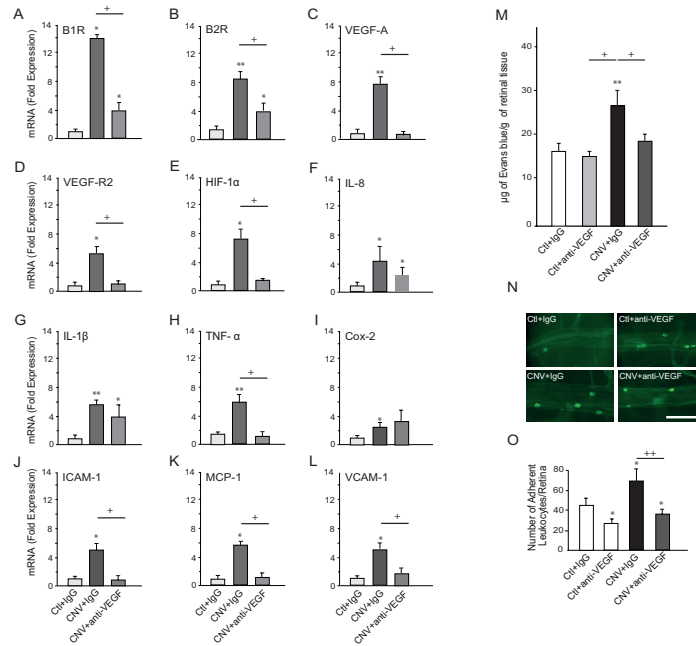
Table 2 Expression of inflammatory mediators in the CNV retina

	CNV + IgG	CNV +anti-VEGF		CNV + veh	CNV + R954	
B1R	13.9±0.2	3.8±0.8	F (2,06)=36.9; 0.001	7.2±0.2	2.1±0.4	F (2,12)=23.1; 0.001
B2R	8.3±0.2	3.9±0.3	F (2,03)=92.2; 0.002	4.5±0.1	2.7±0.3	F (2,15)=55.6; 0.001
VEGF-A	7.9±0.4	1.6±0.4	F (2,06)=39.7; 0.001	8.9±0.4	6.7±0.2	F (2,15)=67.0; 0.021
VEGF-R2	5.4±0.3	1.6±0.6	F (2,06)=151; 0.001	6.0±0.3	5.8±1.1	F (2,15)=03.91; 0.042
HIF-1α	7.8±1.1	1.8±0.8	F (2,12)=98.1; 0.001	8.6±0.9	6.7±0.1	F (2,15)=51.5; 0.032
IL-8	4.5±2.4	3.1±0.8	F (2,09)=5.7; 0.026	6.8±0.6	5.1±0.7	F (2,09)=16.5; 0.041
IL-1β	5.8±0.5	3.9±1.2	F (2,10)=07.2; 0.011	5.7±0.8	1.8±0.6	F (2,15)=16.23; 0.01
TNF-α	6.5±1.1	1.9±0.8	F (2,12)=31.8; 0.001	9.8±0.5	4.2±0.7	F (2,15)=11.4; 0.01
COX-2	3.2±0.4	3.8±2.4	F(2,08)=5.3; 0.036	6.4±0.4	3.9±0.6	F (2,11)=14.5; 0.001
ICAM-1	5.8±0.4	1.6±0.4	F (2,06)=215; 0.001	5.2±0.3	2.3±0.3	F (2,11)=37.3; 0.001
MCP-1	5.8±0.5	1.8±0.3	F (2,09)=28.6; 0.001	5.7±0.6	5.3±0.7	F (2,09)=14.6; 0.001
VCAM-1	5.5±0.9	1.8±0.8	F (2,06)=36.1; 0.001	5.1±0.5	3.8±1.8	F (2,11)=08.1; 0.007

Values are fold expression of mRNA ± s.e.m. in comparison to control (fold =

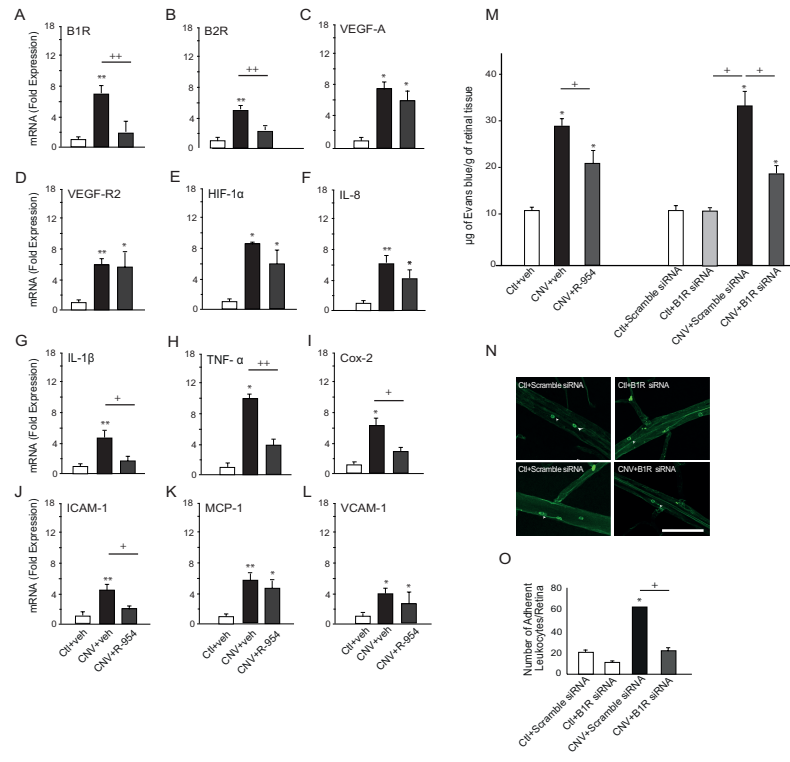
Figure Legends

Figure 1. Effect of anti-VEGF on the expression of retinal inflammatory mediators, retinal vascular permeability and retinal leukocyte adhesion



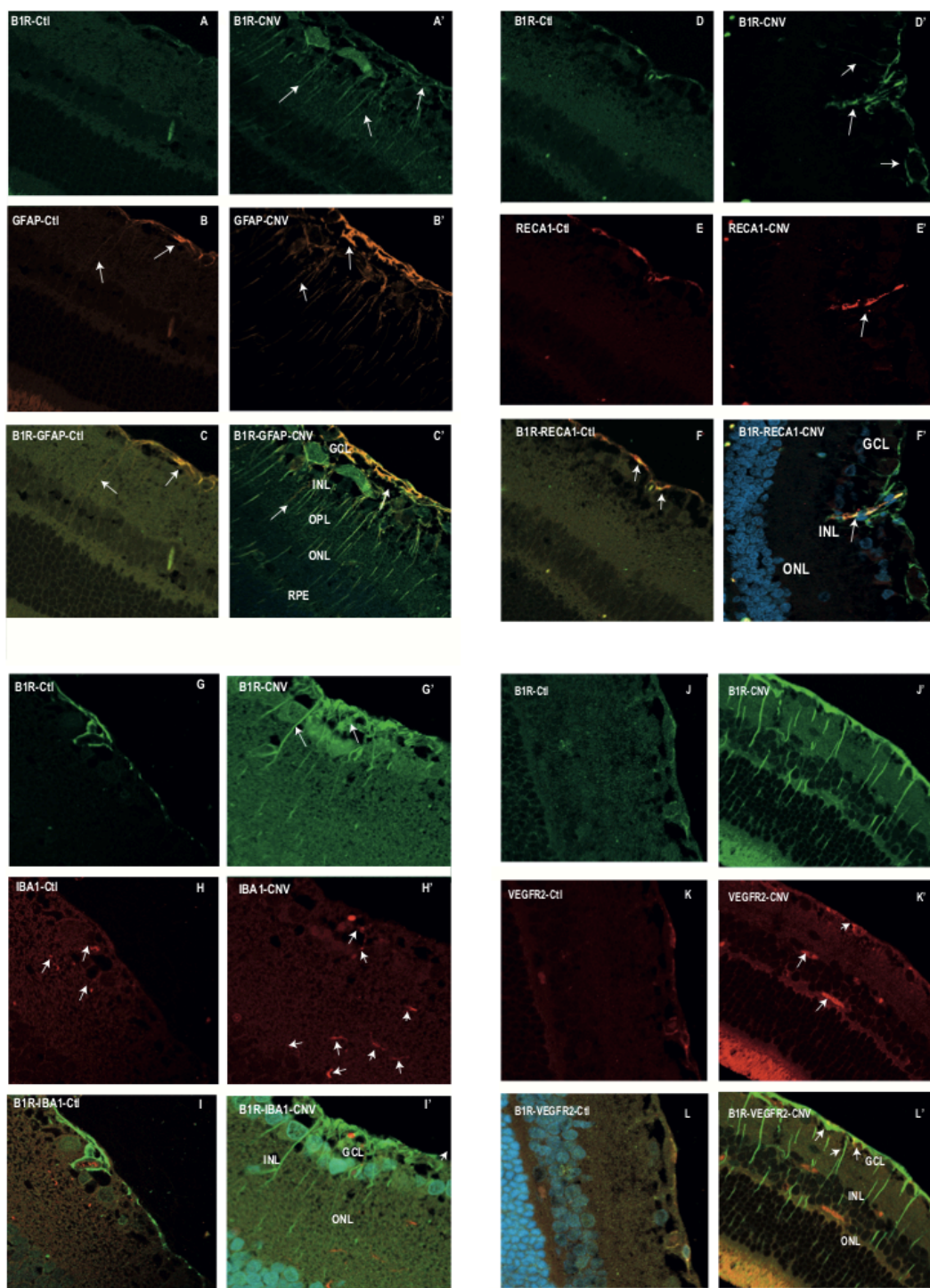
In the control and CNV retina treated with IgG or anti-VEGF are shown (A-L) mRNA levels of B1R, B2R, VEGF-A, VEGF-R2, HIF-1 α , IL-8, IL-1 β , TNF- α , COX-2, ICAM-1, MCP-1 and VCAM-1, (M) Evans blue dye extravasation, (N) Representative images of adherent leukocytes in retinal vessels Scale bar = 40x. (O) Number of adherent leukocytes. Data are means \pm s.e.m. of values obtained from 6 to 7 rats per group. Ctl, control without lesion; CNV, choroidal neovascularization; IgG, immunoglobulin; VEGF, vascular endothelial growth factor; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, statistically different from control+IgG. + $p \leq 0.05$, ++ $p \leq 0.01$, statistically different from CNV+ IgG.

Figure 2. Effect of R-954 or B1RsiRNA on the expression of retinal inflammatory mediators, retinal vascular permeability and retinal leukocyte adhesion



In the control and CNV retina treated with vehicle or R-954, scramble siRNA or B1R siRNA are shown (A-L) mRNA levels of B1R, B2R, VEGF-A, VEGF-R2, HIF-1 α , IL-8, IL-1 β , TNF- α , COX-2, ICAM-1, MCP-1 and VCAM-1, (M) Evans blue dye extravasation, (N) Representative images of adherent leukocytes in retinal vessels Scale bar = 40x. (O) Number of adherent leukocytes. Data are means \pm s.e.m. of values obtained from 6 to 7 rats per group. Ctl, control without lesion; CNV, choroidal neovascularization; veh, vehicle; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, statistically different from control+veh or control+scramble siRNA. + $p \leq 0.05$, ++ $p \leq 0.01$, statistically different from CNV+ veh or CNV+scramble siRNA.

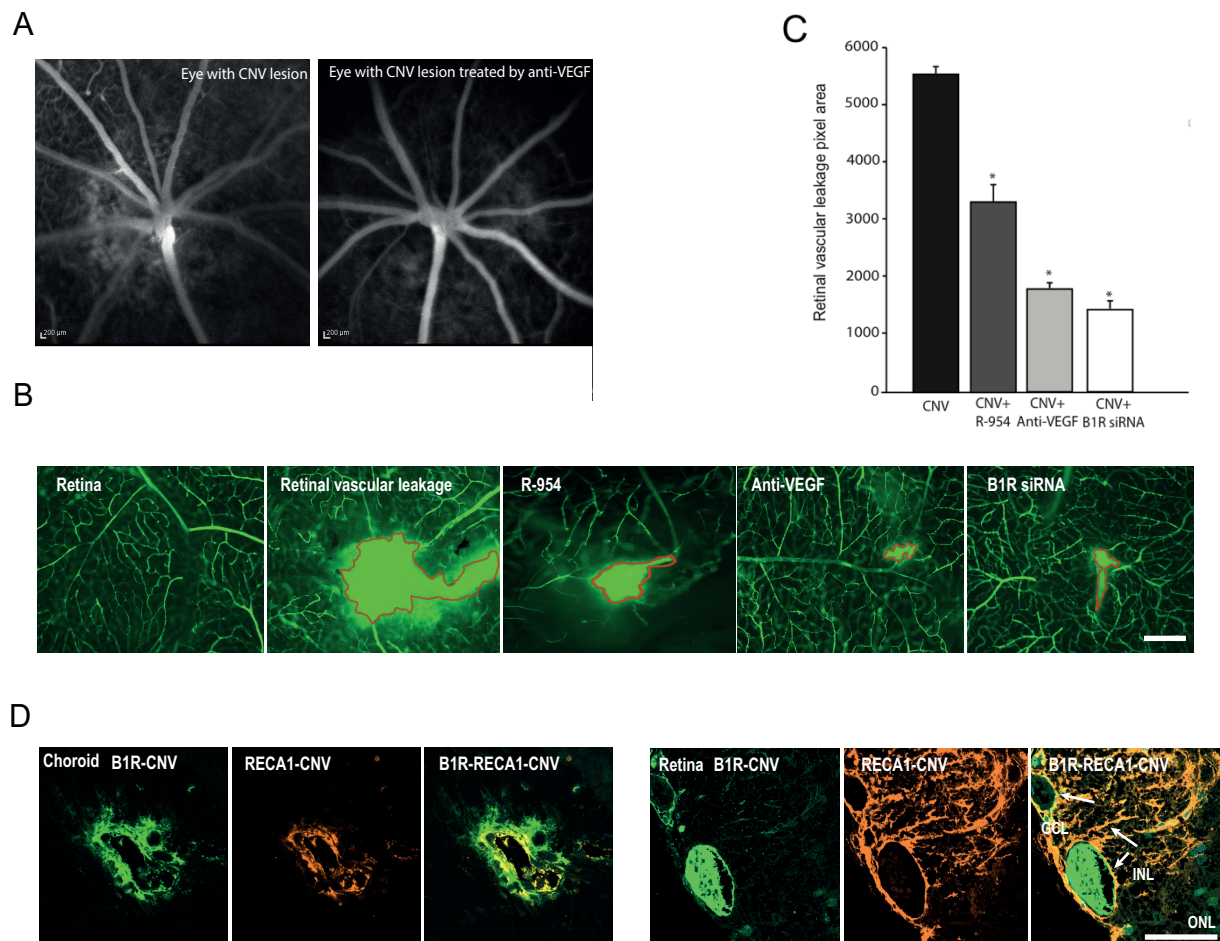
Figure 3. Micrographs of cellular distribution of B1R on glial and endothelial cells, microglia and VEGF-R2



Representative micrographs of immunolabeling for B1R (green) with GFAP, RECA1, IBA1, VEGF-R2 (red) in control (Ctl) and CNV retinas. Sections are counter-stained for DAPI

(blue) which labels cell nuclei. Note that B1R co-localized (yellow) with GFAP (panel C') and RECA-1 (panel F') in CNV retina and to some extent in control retina (C, F). Iba-1(+) cells were even sporadically distributed in the inner retina (Panel H', arrows). No visible co-localization was seen in most sections for B1R and Iba-1 in control (panel I) and CNV (Panel I') retinas. B1R and VEGF-R2 are co-expressed partially in GCL layer of control (Panel L) and CNV (Panel L') retinas. Data are from 16 retinal sections per rat x 4 rats. Scale bar: 75µm.

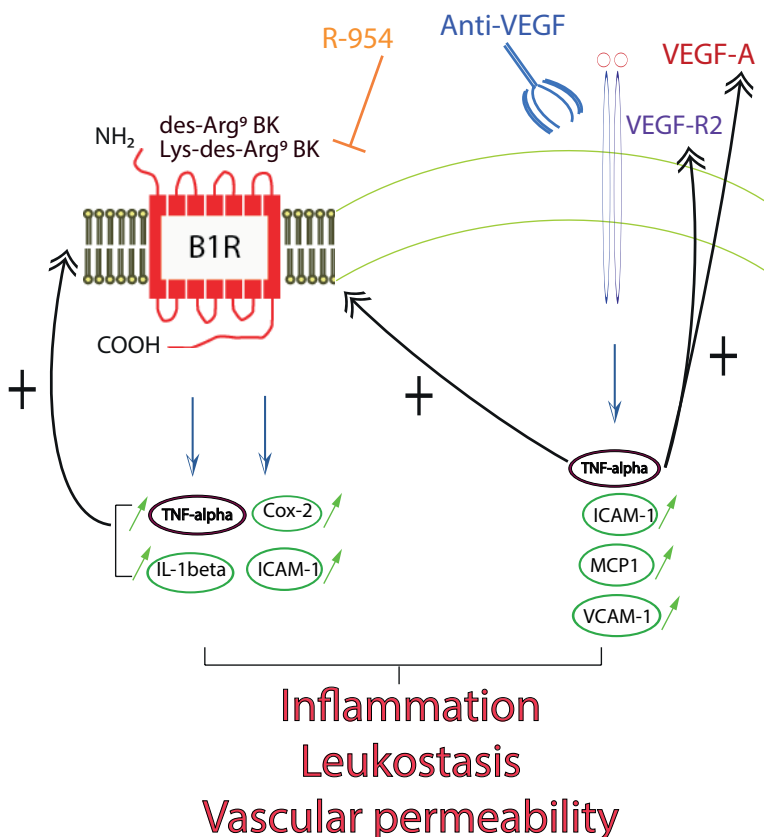
Figure 4. Effect of anti-VEGF, R-954 and B1R siRNA on the retinal vascular leakage



CNV is evidenced by visible hyperfluorescence in the late phase of rat eyes with occult CNV on fluorescein angiography (Panel A). Effect of ITV anti-VEGF or B1R siRNA and ocular administration of R-954 on retinal vascular leakage are shown in representative micrographs of

the FITC-dextran. The area of retinal lesions is identified by a red trace in flat-mounted control and CNV-retinas (Panel B). The retinal vascular leakage is quantified by the number of green pixels (Panel C). Data are representative of 5 laser spots for each group of 4 rats. *p ≤0.05 statistically different from CNV without treatment. Scale bar is 40x for A and 60x for B. Microphotographs of immunolocalization of B1R (Panel D, green) are shown on endothelial cells (Panel D, red) in choroid (left three panels) and retina (right three panels). Scale bar: 60x.

Figure 5. Possible interaction between kinin-B1R and VEGF signaling in retinal inflammation



The pro-inflammatory mediators (HIF-1 α , IL-1 β , MCP-1, TNF- α , ICAM-1, VCAM-1, COX-2) are affected differently by the B1R antagonist (R-954) and anti-VEGF treatment. These two main systems could favor pathological effects in a complementary but distinctive manner in the vascular and inflammatory processes. Anti-VEGF ITV injection and R-954 topical

application were both able to reduce TNF- α expression in CNV retina. B1R and VEGF may work in concert as a loop of auto-amplification mediated by TNF- α known to upregulate B1R and VEGF. In that scenario, the B1R is instrumental for the inflammatory effects of VEGF as anti-VEGF therapy prevents the upregulation of B1R. Conversely, the anti-B1R does not affect the expression of the VEGF system and may exert its effect independently of VEGF.

CHAPITRE 4

Troisième article

4 Article 3

Hachana S, Pouliot M, Couture R and Vaucher E (2018) Diabetes-induced inflammation and vascular alterations in Goto–Kakizaki rat retina (Article en préparation)

4.1 Problématique

Le rat Goto-Kakizaki (GK) est un modèle génétique de diabète de type 2. La rétinopathie diabétique est une complication fréquente du diabète. Dans la population mondiale, la prévalence du diabète de type 2 est plus importante que celle du diabète de type 1. Afin d'appuyer les résultats obtenus chez le rat STZ dans l'article 1, les altérations vasculaires rétiniennes ont été évaluées chez le rat GK. Très peu d'études se sont intéressées à étudier les premières phases de l'inflammation survenant au cours de la rétinopathie diabétique dans ce modèle animal. À notre connaissance, aucune étude n'a déterminé l'expression du RB1 dans la rétine du rat GK.

4.2 Hypothèse

Les rats diabétiques Goto-Kakizaki développent des altérations vasculaires de la rétine en réponse à l'hyperglycémie. Les changements pathologiques de la rétine chez le rat GK sont associés à une réactivité microgliale ainsi qu'à une augmentation de l'expression de certains médiateurs de l'inflammation, notamment le RB1 et le VEGF.

4.3 Objectifs

L'objectif principal de cette étude consiste à examiner la rétine et la choroïde de rats Goto-Kakizaki dans le but de détecter des altérations microvasculaires, des dépôts lipidiques ainsi que des dysfonctions endothéliales, de la microgliose et de l'astrogliose liés à la production de médiateurs inflammatoires tels que le RB1, le VEGF et la production des macrophages.

4.4 Contribution

SH a réalisé les expériences d'immunohistochimie, la quantification des résultats d'immunohistochimie et du marquage triglycérides et du collagène, interprété les résultats et a écrit la première version du manuscrit. MP a réalisé les marquages des triglycérides et du collagène. RC et EV ont aidé à l'interprétation des résultats et à l'écriture de la version finale du manuscrit.

Diabetes-induced inflammation and vascular alterations in Goto–Kakizaki rat retina

Soumaya Hachana^{1,2}, Mylène Pouliot^{1,2}, Réjean Couture² and Elvire Vaucher¹

¹ École d'optométrie and ² Département de pharmacologie et physiologie, Université de Montréal, Montréal, Qc, Canada H3C 3J7

Corresponding author :

Elvire Vaucher, PhD

Laboratoire de Neurobiologie de la Cognition Visuelle

École d'optométrie. Université de Montréal.

CP 6128, succ. Centre-ville. Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

Tel. : 514-343-7537

Email : elvire.vaucher@umontreal.ca

Abstract

PURPOSE: Diabetic retinopathy is characterized by multiple microcirculatory dysfunctions and angiogenesis resulting from oxidative stress and hyperglycemia. In this study, the retina and choroid of non-insulin-dependent diabetic Goto–Kakizaki (GK) rats were examined to detect microvascular alterations, collagen deposits and fibrosis as well as endothelial dysfunction, microgliosis and macrophage production. In addition, protein expression of B1R and VEGF was investigated in retinal vascular cells.

MATERIALS AND METHODS: 30-week old male GK rats and age-matched Wistar rats were used. The retinal vascular bed was examined using ADPase staining. The level of lipid accumulation was graded using triglycerides staining with Oil red O. Macrophages and retinal microglia activation were revealed by immunohistochemistry. The intensity of labeling for these mediators was quantified using standard image analysis software. In addition, retina tissue was also labeled with markers for fibronectin and collagen I and studied with confocal laser scanning microscopy.

RESULTS: Abundant lipid deposits were observed in the retina and choroid of GK rats. A greater tortuosity of the retinal microvessels, an index of endothelial dysfunction, was also observed. Immunohistochemistry and quantitative analysis of cross-sectional membranes showed significantly higher B1R, VEGF-A, Iba1 (microglia) and RECA1 (endothelium) labeling in diabetic retina. B1R immunolabeling was detected in the vascular layers of the GK retina. A strong staining of VEGF within different retinal cell processes was detected and pattern of GFAP staining suggests a strong reactivity of Müller cells. As well, microgliosis was apparent in GK retina. However, retinal vessels density was not affected in 30-GK rats compared to controls. GK retina showed more elements staining positive for fibronectin and collagen I.

CONCLUSIONS: These data suggest the alteration of the retinal vascular bed of GK rats at 30 Weeks. Lipid and collagen accumulation in the retina and choroid in addition to VEGF, B1R, microgliosis Müller cells reactivity may contribute to vascular alterations and inflammatory process in spontaneous type 2 diabetic retina.

Key words: glial cells, kinin B1 receptor, microgliosis, Müller cells, retinopathy, retinal inflammation, type 2 diabetes, VEGF

Introduction

In diabetes, the damage to retina results primarily from the alteration of the vascular system and reactivity of glial cells. The microangiopathy is characterized by the thickening of the basal lamina, the loss of pericytes surrounding capillaries which control their tone, tortuosities and microaneurysms (Arden and Sivaprasad. 2012). This slow and progressive processes result in endothelial dysfunction, leakage of blood-retinal barrier, local ischemia, retinal angiogenesis, the formation of fibrous tissue into the vitreous cavity and a consecutive loss of retinal function (Wilkinson-Berka. 2006). It has also been established that local retinal inflammation contributes to these pathogenic events evolving in vision loss in diabetes. One of the critical steps in the inflammatory response is the rapid recruitment and migration of immune and inflammatory cells. Macrophages play a crucial role in many diseases associated with chronic inflammation notably in diabetes (Schultze et al., 2015). The increased infiltration of macrophages during the development of type 2 diabetes suggests a link between inflammation and type2 diabetes processes (Bai et al., 2011).

Most studies have focused their attention on animal models of type 1 diabetes despite the higher prevalence of type 2 diabetes in the population. The Goto-Kakizaki (GK) rat is a genetic model of type 2 diabetes that develops glucose intolerance due to insulin resistance (Kimura et al., 1982). It was developed by repeated breeding of normal Wistar rats with glucose intolerance (Goto et al., 1975). GK rats represent a moderate diabetic condition without obesity. Impaired glucose tolerance occurs after two weeks and hyperglycemia occurs after around 4 weeks (Goto and Kakizaki. 1981; Portha et al., 1991). The GK rat thus represents an appropriate model to study inflammatory vascular dysfunction processes during diabetic retinopathy and allows prolonged monitoring of the disease. There are some studies about the reduced retinal blood flow and retinal inflammation in GK rats (Miyamoto et al., 1996; Omri et al., 2011; Ai-Latayfeh et al., 2012). Particularly, blood flow was obviously reduced at 1, 3 and 5 months in GK rats (Miyamoto et al., 1996). In addition, in GK rats, microglia/ macrophages were detected in the sub-retinal space at 5 months and this gliosis activation phenomenon became stronger in GK rat at 12 months (Gong et al., 2016). GK rat appears to be a suitable model for experimental studies

of DR (Carmo et al., 2000; Takeo-Goto et al., 2002; Fernandes et al., 2003; Matsubara et al., 2006; Li et al., 2010; Omri et al., 2011; Omri et al., 2013; Fan et al., 2014; Gong et al., 2016).

Thus, the present study was designed to observe retinal vascular changes and inflammation in GK rats at 30 weeks. Endothelial cells immunostaining and retinal vascular permeability were measured as an indication of the integrity of the endothelial function. This work evidenced morphological changes of the retinal vascular bed, lipid and collagen deposits in the retina and choroid as well as up regulation of VEGF, kinin B1R, microglia/macrophage migration and Müller cells activation.

Materials and Methods

Animal model

Male GK rats of 30- weeks old from Taconic (Hudson, NY, USA) were used for the study. Age-matched male Wistar rats were purchased from Charles River laboratories (St-Constant, QC, Canada) and housed two per cage in a room under standard condition of temperature (23°C) and lighting (12-hour light/dark cycle) with food and water provided *ad libitum*. The measurement of the retinal vascular permeability was performed in rats of 30 weeks and histological analyzes were performed in rats of 30 weeks.

Experimental protocols

Examination of the retinal vascular bed by histochemistry with ADPase

The retinal vascular bed was examined using ADPase staining (Penn et al., 1993). Rats were euthanized with pentobarbital and the eyes were removed and then immersed in paraformaldehyde 4% (PFA). Retinas were dissected out and stored for 12 h at 4°C in PFA 4%. The retinas were then rinsed three times in Tris-Malate buffer 50 mM (pH 7.2) and incubated in the ADPase solution (made of lead nitrate (3 mM) and magnesium chloride (6 mM) in buffer 0.2 M Tris-malate (pH 7.2)), which was filtered and heated at 37°C. Just before adding the retinas, 10 mg of ADP (adenosine 5'-diphosphate, grade VI crystalline di [monocyclohexylammonium] salt, Sigma Aldrich, Canada) was added to the incubation solution. Retinas

were incubated for 15 min with gentle agitation. They were rinsed three times in Tris-malate buffer and then immersed in a solution of ammonium sulfide for 1 min (1:10 dilution, Fisher Scientific, ON, Canada). Finally, the retinas were rinsed in Tris-malate buffer, flat mounted and fixed by medium (Vectashield; Vector Laboratories, California). Retinal vascular bed was examined for the presence of microaneurysms and tortuosity, and the density of the retinal blood vessels was measured with the use of the Scion Image software (NIH).

Triglycerides staining with Oil red O

Rats were anesthetized with pentobarbital and perfused with 2% PFA. The eyes were collected, the cornea and crystalline were discarded, and the remaining eyes were placed for 12 h in 30% sucrose, frozen in isopentane (-55 °C) and cut into sections of 20- μ m with a cryostat. The sections were briefly submerged in 60% isopropanol and placed in an Oil Red O solution 60% (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 10 min. The sections were immersed again in 60% isopropanol and then rinsed in distilled water and placed in a hematoxylin solution for 5 min to stain the nucleus cells.

Immunohistochemistry of VEGF, GFAP, kinin B1R, fibronectin, collagen I and microglia/macrophage activation

Under pentobarbital anesthesia, rats were perfused with (PFA 4 % and the eyes were dissected out, post-fixed in 4% PFA during 2 h and then frozen in isopentane (-55°C). Eyes were cut into 20-µm thick sections with a cryostat and placed onto glass slides. Sections were incubated overnight at room temperature (RT) with the blocking buffer containing one of the following antibodies: the mouse monoclonal anti-glial fibrillary acid protein (GFAP) (IF03L, Millipore Sigma) 1:500 to label astrocytes and Müller cells or chicken monoclonal anti-VEGF-R2 (GW21181, Sigma-Aldrich) 1:250. The slides were washed (PBS-T (0.25%)) and exposed to ABC solution (1%) (Vectastain, Vector Elite PK6100) for 1h at RT. After rinsing, the slides were revealed with diaminobenzidine (DAB/Vector SK4100 peroxydase substrate Kit) chromogen for up to 10 min. The sections were rinsed for 5 min with PBS to stop the reaction. The slides were rinsed and cleared with xylene, and then mounted using DPX mounting medium. For GFAP and VEGF immunostaining, Leica LCS Lite software was used to quantify the mean grey values in the retinal ganglion cell layer (GCL), the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer. (ONL). Data are expressed as the mean pixel energy ratio in the GCL, INL and ONL for each retinal image quantified in four rats

Sections were also incubated overnight at RT with the blocking buffer containing one of the following primary antibodies: polyclonal rabbit antiserum to rat B1R 1:150, mouse monoclonal anti-endothelial cells (RECA-1, ab 9774, ABCAM) 1:500, mouse polyclonal anti-ionized calcium binding adapter molecule (Iba-1, Wako, Richmond, VA, USA) 1:500 (2 µg/mL) to label microglia and mouse monoclonal CD11-b (GW21181, Sigma-Aldrich) 1:250 to label macrophages. In addition, anti-rat collagen type I Antibody Sigma Millipore (AB755P, Sigma Millipore) 1:150 and polyclonal anti-fibronectin rabbit antibody (MA5-11981, Thermo Fisher Scientific) were used to assess collagen deposits and fibrosis respectively. Afterwards, the slides were incubated for 2 h at RT with Alexa Fluor 488 donkey secondary anti-rabbit IgG (A21206, Invitrogen) to visualize B1R and collagen I, with Alexa Fluor 555 donkey secondary anti-mouse IgG (A31570, Invitrogen) to visualize endothelial cells, microglia, macrophages and fibronectin. The slides were finally washed and mounted using ProLong® Gold Antifade

Reagent (Invitrogen). Images were obtained with a confocal microscope Zeiss-LSM800 equipped with an argon laser.

Semi-quantitative immunofluorescence staining intensity (white vs. gray) was made on selected half surface areas of four retinal sections per rat from four controls and four GK rats. Background intensity (gray intensity) was subtracted from each individual value.

Collagen staining with Sirius Red

Sections were immersed in 0.1% solution of Picosirius for 1 h. The solution was prepared by dissolving Sirius red (Direct Red 80, Sigma Aldrich, Canada) in an aqueous picric acid solution (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). The sections were then rinsed with 1% acetic acid and dried in alcohol.

Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm s.e.m. and n is the number of animals used for each experiment. Statistical significance was determined with Student's t -test for unpaired samples between control and GK rats. Only probability values (p) less than 0.05 was considered to be statistically significant.

Results

As shown in Table 1, blood glucose levels were significantly increased, and body weights were significantly decreased in GK rats at 30 weeks compared to age-matched control Wistar rats.

Immunohistochemistry of Kinin B1 Receptor, microglia/macrophage migration and endothelial cells

The distribution of B1R in the GK retina and the intensity of staining (Figure 1) was located mainly in the retinal ganglion cell layer (GCL), which is consistent with earlier studies in STZ rat retina. In contrast to the low immunostaining for B1R in control retina.

Microglia immunodetection was revealed by Iba1 staining. In the retina of GK diabetic rats, microglia cells were mostly ramified with some hypertrophic cell bodies, and mainly distributed in the GCL. We can also find microglia in the inner nuclear layer (INL). In the control retina, microglia morphology was characterized by a small soma, and particularly distributed in the INL.

We identified CD11-positive cells with intact nuclei. The majority of macrophages were distributed in the GCL, INL and the ONL in the GK retina. Macrophages appear much more numerous in GK than in control retina.

Endothelial cells labelled with the antibody RECA-1 was pronounced particularly in the photoreceptors layer in GK retina (indicated by arrows). The RECA-1 labelling in the control retina was less abundant.

Immunohistochemistry of VEGF and GFAP

Upregulation of VEGF and glial reactivity (GFAP) was assessed by immunohistochemistry (Figure 2). The immunodetection quantification of VEGF was located mainly in retinal ganglion cell layer, the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer (ONL). Müller cells appeared to be activated in GK retina since numerous GFAP hypertrophied cytoplasmic extension were seen throughout the tissue. The GFAP labelling in the control retina was less intense and limited to low ramified glial extensions compared to the GK retina, which displayed highly ramified and hypertrophic glial extensions. Therefore, retina of GK rats exhibited higher staining of VEGF within different retinal cell process and stronger activity of Müller cells than control retina.

Examination of the fibrosis in the vessel wall

Fibrosis of the vessel wall in the retina was determined using immunostaining with fibronectin (Figure 3A), which showed a significant increase density of fibrosis accumulation in retinal vessels of 30-weeks GK compared to control rats (Figure 3B), particularly in ganglion cell layer, outer nuclear layer and retinal pigment epithelium cells, which could be associated with the thickening of the basal membrane of the vessel wall.

Lipids accumulation was determined also using triglycerides staining with Oil red O on cryostat eye transections. Staining of the retinal sections with Oil Red O revealed abundant lipid deposits between the retina and choroid of GK rats. No lipid staining was detected in the retina and choroid of control animals (Figure 3C).

Assessment of collagen accumulation

Analysis of collagen I in the retina and choroid was performed using immunofluorescence localization (Figure 4A). To support these results, we showed also a stronger staining intensity for GK compared to control retina in the ganglion cell and the photoreceptor layer. The density of labelled collagen was significantly increased in retina compared to the control (Figure 4B). A Collagen deposit was also detected through collagen staining with Sirius red (Figure 4C).

Retinal vascular bed

The retinal vascular bed was examined using ADPase staining on whole mounted retina to detect the presence of microaneurisms and tortuosities. Retinal vessels density was quantified using Scion Image software (Figure 5). Data showed that the density of the blood vessels in the retina was not significantly changed in 30-week-old GK rats compared with controls (% of vessels/surface area (mm²): 23.4±0.5 vs 22.2±0.5). However, retinal microvessels appeared more tortuous in GK rats.

Discussion

Our evaluation of the retinal vascular bed revealed collagen accumulation in blood vessels of GK rats, suggesting the presence of fibrosis and thickening of the basement membrane. In addition to vascular changes, we found VEGF and B1R upregulation, macrophage production and microgliosis reactivity that may contribute to inflammatory process in spontaneous type 2 diabetic retina. Although our results show vascular dysfunction in diabetic rats at 30 weeks, no change in retinal vascular permeability was observed compared to control rats.

These results are globally in agreement with previous studies reporting macular edema, subretinal accumulation of activated microglia/macrophages (Omri et al., 2011), microvascular

complications such as decreased retinal blood flow, microvascular occlusion, ischemia and inflammation in GK rats (Miyamoto et al., 1996; Kengkoom et al., 2013; Gong et al., 2016). Increased VEGF levels in the retina was also previewed in this model until 28 weeks of diabetes (Sone et al., 1997). However, vascular hyperpermeability and an increase in NO production was observed in the GK retina at 4 months (Miyamoto et al., 1996; Carmo et al., 2000).

Our data show microglia activation and an increase in the number of macrophages in the retina of the GK rat at 30 weeks. Our results are in agreement with another study showing sub-retinal accumulation of activated microglia / macrophages at 12 months in GK rat (Omri et al., 2012). Vascular alteration and inflammatory process are two events that occur in parallel during, with ocular inflammation affecting retinal vascularization resulting in capillary loss and development of progressive and irreversible ischemic hypoxia (Curtis et al., 2009). The increase in cytokines during DR promotes the activation of microglia, which is strongly implicated in neurotoxicity and tissue damage (Arroba et al., 2016). *In vitro* studies showed that microglia and macrophages can become both pro-inflammatory and can cause vascular rupture, glial dysfunction and neuronal death (Altmann et al., 2018). Furthermore, microglial reactivity seems to directly influence the expression of Müller cells, that increased the expression of GFAP (Altamann et al., 2018). Müller cells increased the inflammatory response across the retinal layers by chemotaxis (Wang et al., 2011). Chronic inflammation of Müller cells and local release of factors induce Müller cell gliosis and vascular leakage (Schubert, 1989). In agreement, our results show a strong reactivity of Müller cells as evidenced by the upregulation of GFAP in GK rats.

During the inflammatory process, astrocytes are also activated via the NF- κ B signaling pathway and strongly contribute to increase the expression of many inflammatory mediators such as the kinin B1R, a potent inflammatory mediator implicated in the pathogenesis of DR (Pouliot et al., 2012; Hachana et al., 2018). Increased expression of several pro-inflammatory cytokines have also been reported in retinas of diabetic patients and models of diabetes in rodents (Abu et Asrar et al., 1992; Yuuki et al., 2001; Patel et al., 2008; Hachana et al., 2018). Hence, our data show the distribution of kinin B1R in retinal glial and Müller cells in GK retina, compared to the weak expression of B1R in the retina of control rat. Other studies support the

detrimental role of kinin B1 receptors on glial cells in acute and advanced phases of DR (Wilkinson-berka et al., 2004; Hachana et al., 2018).

In our study, changes in the vascular bed of the retina were assessed in GK rats at the age of 30 weeks. The results obtained show an abnormal tortuosity of the vascular bed of the retina in the GK rat, thus suggesting vascular dysfunction caused by hyperglycemia that may affect the regulation of vascular tone, endothelium function and retinal perfusion. In diabetic patients, tortuosity of blood vessels of the retina is one of the first signs visible to the ophthalmic examination indicating the presence of retinopathy (Frank. 2004). This morphological alteration has previously been observed in the diabetes model induced by Streptozotocin where it was associated with a loss of pericytes and endothelial cells (Su et al., 2000). An increase in retinal blood vessels was reported at 6 and 7 months in GK rats (Gong et al., 2016), which was not seen in our GK rats of 30 weeks.

Our evaluation of retinal vascular bed revealed an accumulation of collagen in blood vessels of GK rats, suggesting the presence of fibrosis and thickening of the basement membrane (BM). These results are consistent with previous data obtained in different animal models showing that the thickening of the BM affects retinal function in diabetes (Hainsworth et al., 2002; Chronopoulos et al., 2011). BM thickening is significantly increased during diabetes mainly in the capillaries located near the arterial side of the retinal circulation (Stitt et al., 1994). Synthesis in excess of BM components is the major factor contributing to the thickening of the BM (Roy et al., 2010), which could be associated with inflammation and increased polyol pathway (Roy et al., 2010). The activation of multiple intracellular signaling cascades leads to the expression of BM component proteins such as collagen IV, laminin and fibronectin (Thoumine et al., 1995).

In addition to vascular changes, we found the presence of lipid deposits in GK rats between the retina and the choroid, which could suggest a dysfunction of the retinal pigment epithelium. Lipid deposits were related to decreased blood flow in GK rats and to the reduction of ganglion cells (Kengkoom et al., 2013).

VEGF plays also an important role in the development of DR since it is involved in neovascularization and increased vascular permeability. VEGF is mainly regulated by tissue hypoxia induced by obstruction of the vessels of the retina during early stages of the disease.

The expression of VEGF mRNA and hypoxic factor (HIF-1 α) was strongly increased in the rat retina of GK at 6 and 7 months (Gong et al., 2016). In our study, higher staining of VEGF was observed within different retinal cell processes accompanied by strong reactivity of Müller cells as shown by upregulation of GFAP in GK rats of 30 weeks. In GK rats, the ocular VEGF level remains overexpressed at 6 weeks (Sone et al., 1997).

Conclusion

The retinal vascular bed of GK rat shows several morphological and structural alterations. Tortuosity of blood vessels, an index of vascular dysfunction in response to hyperglycemia, is associated with thickening of the basement membrane of the capillaries and lipid deposits in the retina. However, these factors seem to have no influence on the integrity of the blood-retinal barrier, which is maintained at 30 weeks of diabetes. Increased immunostaining for VEGF, kinin B1R, Müller cells, macrophages and microglia cells are representative of retinal inflammation. Therefore, the GK appears a relevant pre-clinical animal model to study several features of diabetic retinopathy associated to type 2 diabetes.

Funding:

This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-125962) to EV and RC, and from the Antoine-Turmel Foundation, le Fond de recherche du Québec en santé (FRQS), Vision Health Research Network (AMD program) to EV, RC and MS. SH was recipient of a scholarship from the GRUM- Université de Montréal. OF was a recipient of a scholarship from the FROUM.

References

Ai-Latayfeh, M., Silva, P.S., Sun, J.K. and Aiello, L.P. Antian- giogenesis therapy for ischemic retinopathies. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2: a006411, 2012.

Albert-Weissenberger C, Stetter C, Meuth SG, Göbel K, Bader M, Sirén AL, Kleinschnitz C. 2012. Blocking of bradykinin receptor B1 protects from focal closed head injury in mice by reducing axonal damage and astroglia activation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2012 Sep;32(9):1747-56.

Arden GB, Sivaprasad S. The pathogenesis of early retinal changes of diabetic retinopathy. *Doc Ophthalmol.* 2012;124(1):15-26.

Arroba AI, Alcalde-Estevez E, García-Ramírez M, Cazzoni D, de la Villa P, Sánchez-Fernández EM, Mellet CO, García Fernández JM, Hernández C, Simó R, Valverde ÁM. Modulation of microglia polarization dynamics during diabetic retinopathy in db/db mice. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Sep; 1862(9):1663-74.

Altmann C, Schmidt MHH. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy: Inflammation, Microvasculature Defects and Neurodegeneration. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 1;19(1). pii: E110

Ben-Shmuel S, Danon A, Fleisher-Berkovich S. 2013. Bradykinin decreases nitric oxide release from microglia via inhibition of cyclic adenosine monophosphate signaling. *Peptides.* 2013 Feb;40:133-40.

Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, Lopes MC. Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability. *Nitric Oxide.* 2000;4: 590-6.

Chronopoulos A, Trudeau K, Roy S, Huang H, Viores SA, Roy S. High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.* 2011 Aug;36(8):747-53.

Curtis TM, Gardiner TA AND Stitt T. Microvascular lesions of diabetic retinopathy: clues towards understanding pathogenesis? *Eye* volume 23, pages 1496–1508 (2009)

Du Y, Sarthy VP, Kern TS (2004) Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: R735-741.

Fan Y, Liu K, Wang Q, Ruan Y, Ye W, Zhang Y. Exendin-4 alleviates retinal vascular leakage by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Exp Eye Res.* 2014;127:104-16.

Fernandes R, Suzuki K, Kumagai AK. 2003. Inner blood-retinal barrier GLUT1 in long-term diabetic rats: an immunogold electron microscopic study. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 Jul;44(7):3150-4.

Frank, R.N., 2004. Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.* 350, 48-58.

Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats. *Proc Jpn Acad.* 1975;51: 80-85.

Goto Y, Kakizaki M. The spontaneous-diabetes rat: A model of noninsulin dependent diabetes mellitus. *Proc Jpn Acad.* 1981;57: 381-384.

Gong CY, Lu B, Sheng YC, Yu ZY, Zhou JY, Ji LL. The Development of Diabetic Retinopathy in Goto-Kakizaki Rat and the Expression of Angiogenesis-Related Signals. *Chin J Physiol.* 2016 Apr 30;59(2):100-8.

Hachana S, Bhat M, Sénécal J, Huppé-Gourgues F, Couture R, Vaucher E. Expression, distribution and function of kinin B1 receptor in the rat diabetic retina. *Br J Pharmacol.* 2018 Mar;175(6):968-983.

Hainsworth DP, Katz ML, Sanders DA, Sanders DN, Wright EJ, Sturek M. Retinal capillary basement membrane thickening in a porcine model of diabetes mellitus. *Comp Med.* 2002 Dec;52(6):523-9.

Kengkoom K, Klinkhamhom A, Sirimontaporn A, Singha O, Ketjareon T, Panavechkijkul Y, Seriwatanachai Y, Ukong Y, Ampawong S. Effects on high cholesterol-fed to liver, retina, hippocampus, and Harderian gland in Goto-Kakizaki rat. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013; 6(4): 639–649.

Kimura K, Toyota T, Kakizaki M, Kudo M, et al. Impaired insulin secretion in the spontaneous diabetes rat. *Tohoku J Exp Med*. 1982;137: 453-459.

Klein R, Klein BE, Moss SE, Cruickshanks KJ. The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy: XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology*. 1989;105: 1801-1815.

Matsubara H, Kuze M, Sasoh M, Ma N, Furuta M, Uji Y. 2006. Time-dependent course of electroretinograms in the spontaneous diabetic Goto-Kakizaki rat. *Jpn J Ophthalmol*. 2006 May-Jun;50(3):211-6.

Miyamoto K, Ogura Y, Nishiwaki H, Matsuda N, et al. Evaluation of retinal microcirculatory alterations in the Goto- Kakizaki rat. A spontaneous model of non- insulin-dependent diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37: 898-905.

Newman E, Reichenbach A. The Muller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosc*. 1996;19: 307-312.

Omri S, Behar-Cohen F, de Kozak Y, Sennlaub F, Verissimo LM, Jonet L, Savoldelli M, Omri B, Crisanti P. Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: role of PKC ζ in the Goto Kakizaki rat model. *Am J Pathol*. 2011;179(2):942-53.

Omri S, Behar-Cohen F, Rothschild PR, Gélizé E, Jonet L, Jeanny JC, Omri B, Crisanti P. PKC ζ mediates breakdown of outer blood-retinal barriers in diabetic retinopathy. *PLoS One*. 2013;29;8(11):e81600.

Portha B, Serradas P, Bailbe D, Suzuki K, et al. Beta-cell insensitivity to glucose in the GK rat, a spontaneous nonobese model for type II diabetes. *Diabetes*. 1991;40: 486- 491.

Pouliot M, Talbot S, Sénécal J, Dotigny F, Vaucher E, Couture R. Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One*. 2012;7(3):e33864.

Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*. 2010;35: 1045-56.

Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol*, 2003.

Schubert HD. Cystoid macular edema: the apparent role of mechanical factors. *Prog Clin Biol Res*. 1989;312:277-91.

Schultze JL, Schmieder A, Goerdts S. Macrophage activation in human diseases. *Semin Immunol*. 2015 Aug;27(4):249-56.

Sone H, Kawakami Y, Okuda Y, Sekine Y, et al. Ocular vascular endothelial growth factor levels in diabetic rats are elevated before observable retinal proliferative changes. *Diabetologia*. 1997;40: 726-730.

Stitt AW, Anderson HR, Gardiner TA, Archer DB. Diabetic retinopathy: quantitative variation in capillary basement membrane thickening in arterial or venous environments. *Br J Ophthalmol* 1994; 78(2): 133–137.

Su EN, Alder VA, Yu DY, Yu PK, et al. Continued progression of retinopathy despite spontaneous recovery to normoglycemia in a long-term study of streptozotocin-induced diabetes in rats. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2000;238: 163-73.

Takeo-Goto S, Doi M, Ma N, Goto R, Semba R, Uji Y. 2002. Immunohistochemical localization of amino acids in the diabetic retina of Goto-Kakizaki rats. *Ophthalmic Res*;34(3):139-45.

Talbot S, Couture R. 2012. Emerging role of microglial kinin B1 receptor in diabetic pain neuropathy. *Exp Neurol*. 2012 Apr;234(2):373-81.

Thoumine O, Nerem RM, Girard PR. Changes in organization and composition of the extracellular matrix underlying cultured endothelial cells exposed to laminar steady shear stress. *Lab Invest* 1995; 73(4): 565–576.

Torika N, Filipovich-Rimon T, Asraf K, Roasso E, Danon A, Fleisher-Berkovich S. 2014. Differential regulation of astrocyte prostaglandin response by kinins: possible role for mitogen activated protein kinases. *Eur J Pharmacol*. 2014 Oct 15;741:323-9.

Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of beta-cells in obesity and in other causes of fatty acid spillover. *Diabetes*, 2001

Wang M, Ma W, Zhao L, Fariss RN, Wong WT. Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J Neuroinflammation*. 2011 Dec 7; 8():173.

Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Angiotensin and bradykinin: targets for the treatment of vascular and neuro-glial pathology in diabetic retinopathy. *Curr Pharm Des*. 2004;10(27):3313-30.

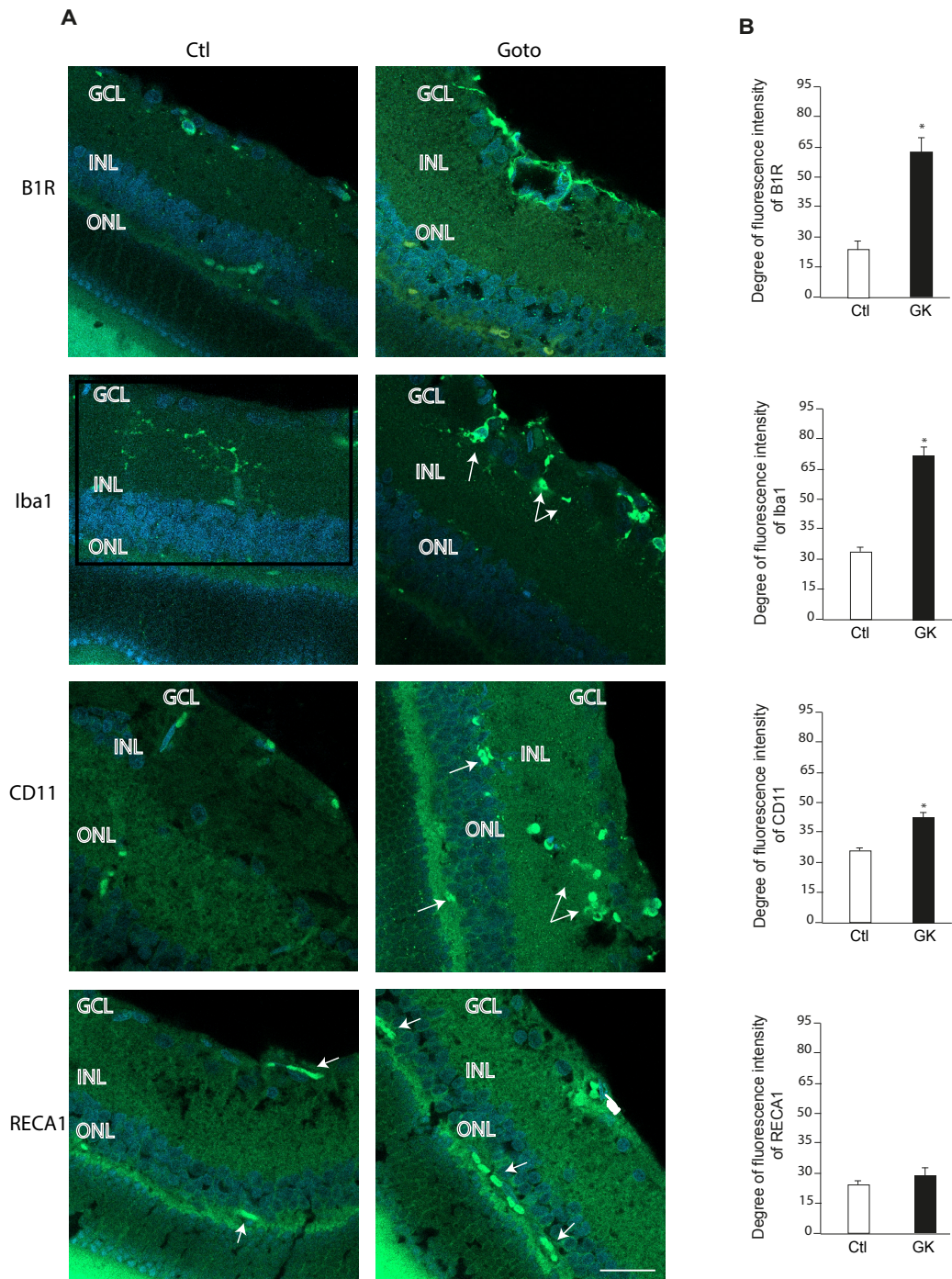
Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell*. 2006; 38: 752-765.

Table 1. Body weight and glycemia of GK rats

	Body Weight (g)	Glycemia (mmol/L)
30-week control, n=10	586 ± 14	4.9 ± 0.3
30-week GK, n=10	424 ± 8 *	16.4 ± 1.1 *

Values are mean ± s.e.m. of 6 to 10 rats per group. Statistical significance was determined with unpaired Student *t*-test. *P<0.05 significantly different from control rat.

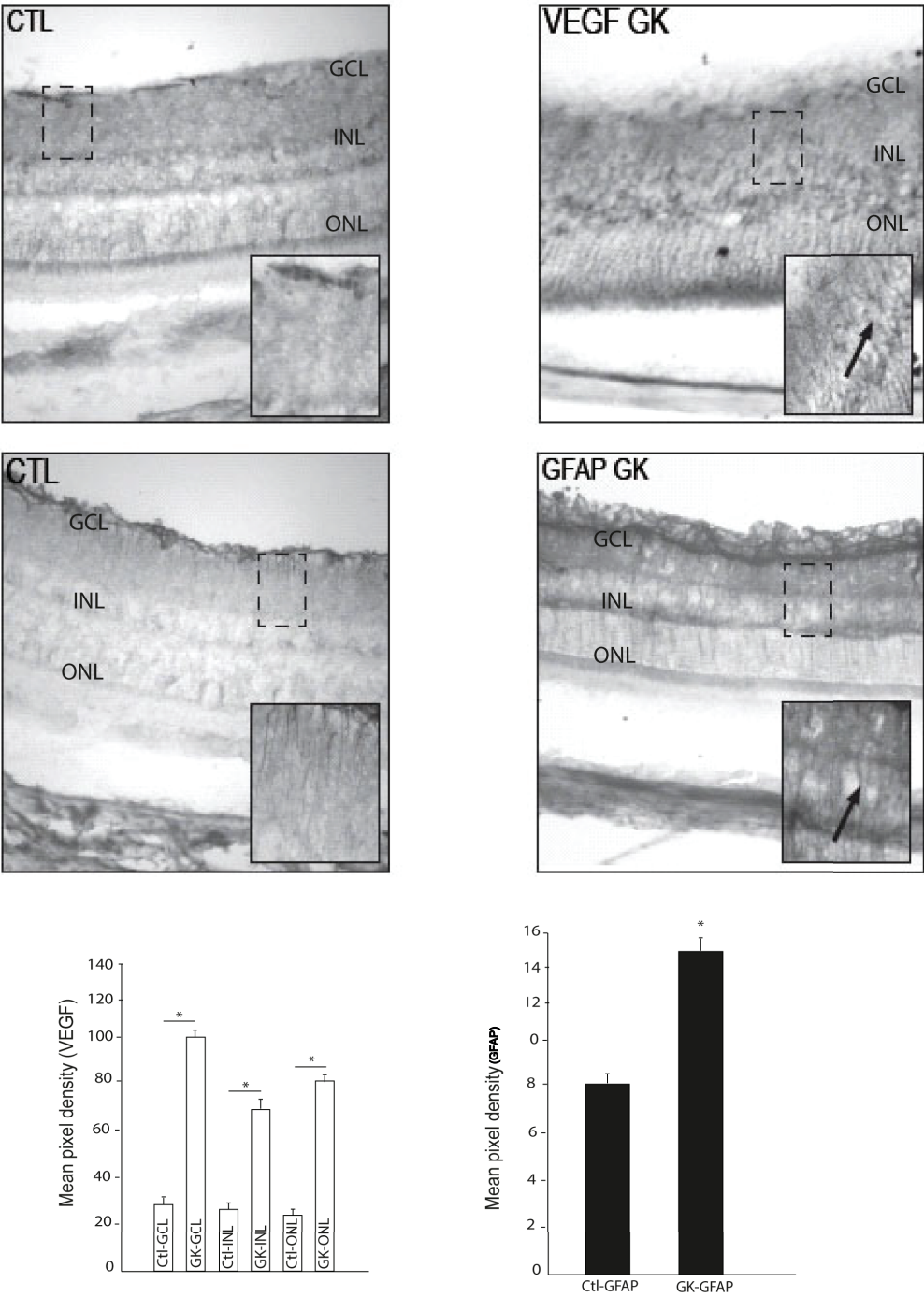
Figure 1. Kinin B1R, microglia, macrophage and endothelial cell immunostaining



Representative images of immunofluorescent detection of kinin B1R, microglia cells, macrophages and endothelial cells obtained from 4 rats in each group (Panel A). All immunofluorescence sections were

counter-stained for DAPI (blue). Immunofluorescent detection of B1R or Iba1 or CD11 or RECA-1 in GK and control retina (green). Iba1 and B1R showed higher staining in GCL in GK-retina but faint immunostaining in control retina. Abundant macrophages immunolabeling in GK retina in contrast to the low number detected in control retina. Note that RECA-1 marker, indicating expression of the endothelial cells in photoreceptor layer of GK rat. We also observed some blood vessels in control retina but less pronounced. Panel B shows semi-quantitative of B1R, Iba1, CD11 and REAC1 immunofluorescence intensity in control and GK cross-sectional retinal membranes. Data are representative of a minimum of four retina sections per rat from four controls and four GK rats. Data are mean \pm SEM of values obtained from 4 rats in each group. Statistical comparison with control (*) rats is indicated by *P<0.05. Bar scale: 40x.

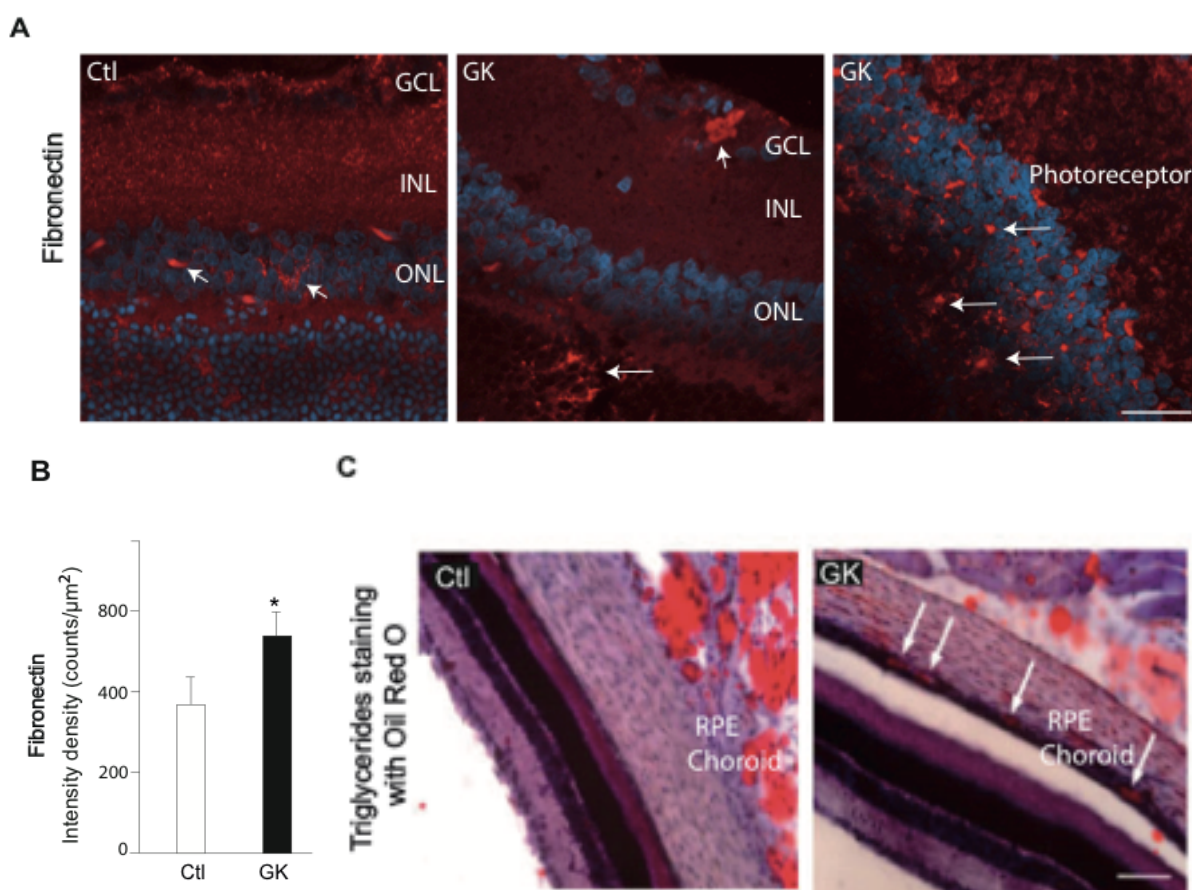
Figure 2. Upregulation of VEGF and glial reactivity (GFAP production)



Representative microphotographs of VEGF and GFAP immunostaining. Higher staining of VEGF within different retinal cell processes and strong reactivity of Müller cells as shown

by upregulation of GFAP in GK retina compared to control retina. Scale bar: 40x. Evaluation of mean pixel density of VEGF in the retinal ganglion cells layer (RGC), the inner nuclear layer (INL) and the outer nuclear layer (ONL). Evaluation of mean pixel density ratio GFAP in the RGC. Data are mean \pm SD of values obtained from 4 rats in each group. Statistical comparison with control (*) rats is indicated by * $P < 0.05$

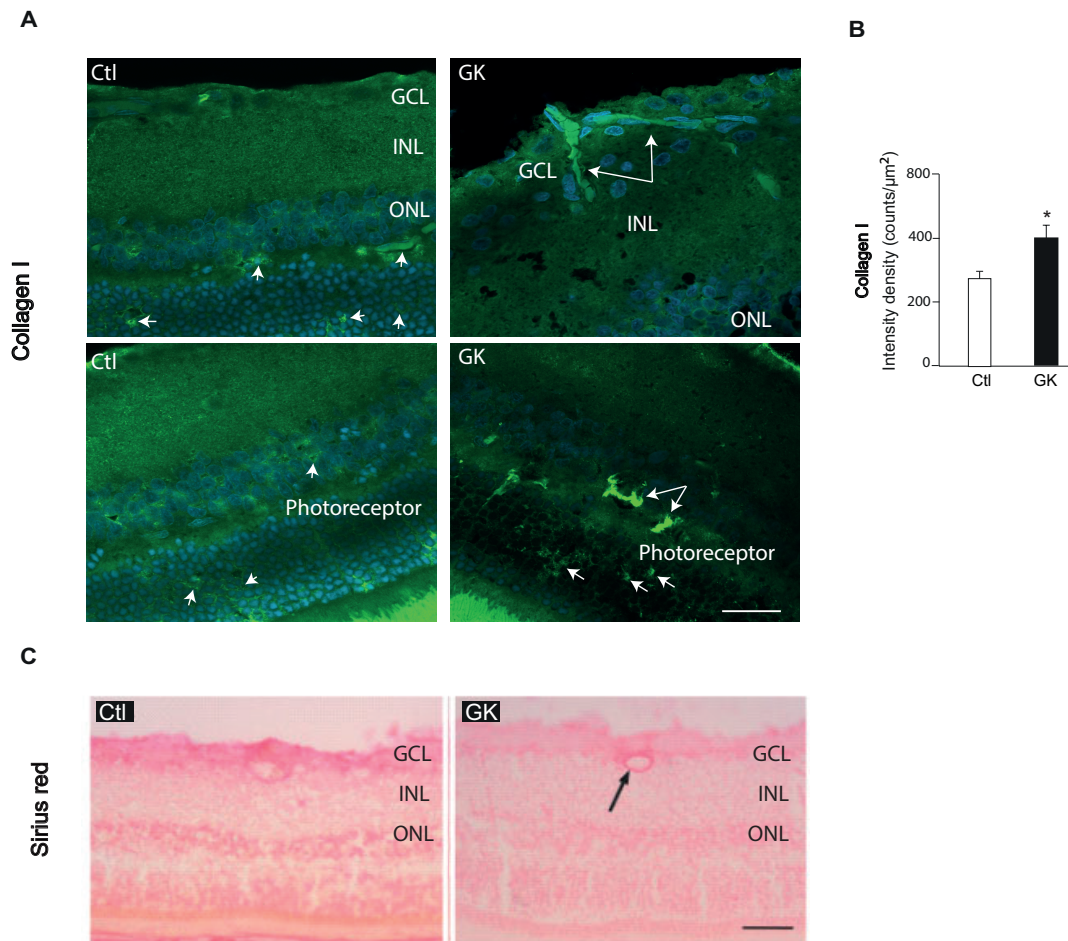
Figure 3. Fibronectin immunostaining



Confocal images show a fibronectin immunostaining selectively found in microvessels particularly in photoreceptor layer in control and GK (Panel A). In GK retina, vessels in the GCL were more intensely and uniformly stained. Quantification has also revealed a much higher intensity of density in GK retina compared to control (Panel B). Immunostaining was obtained

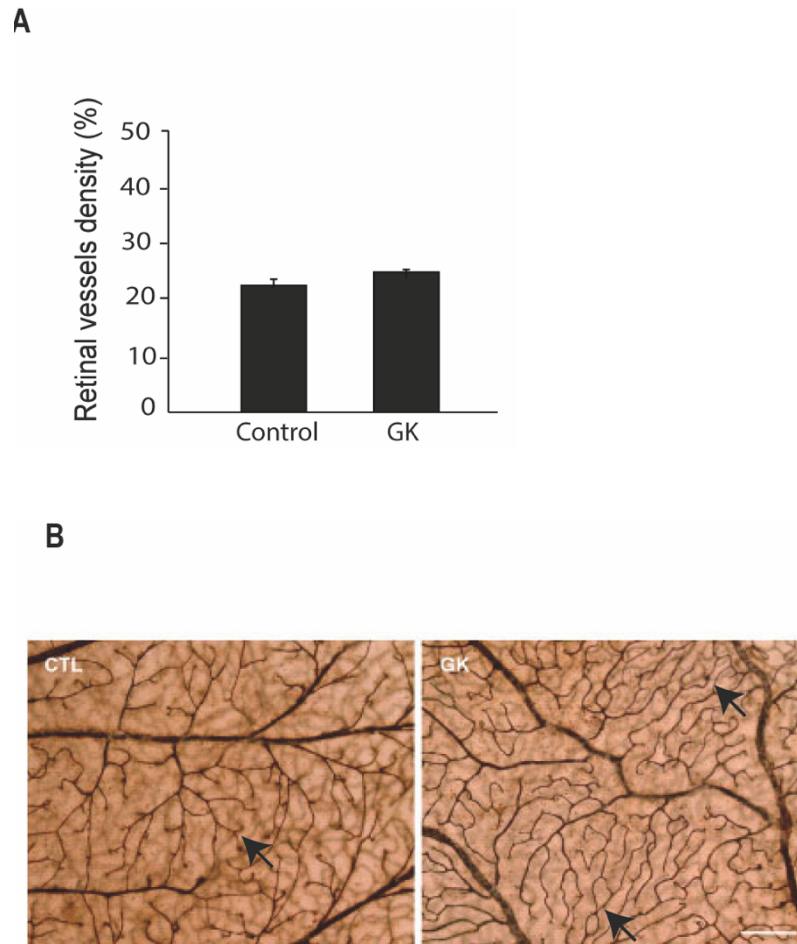
from 4 rats in each group. Nuclei are labeled with DAPI (blue). Bar scale: 60x. Representative picture of lipid deposit revealed by triglycerides staining with Oil Red O in the GK rat compared to control in the choroid (Panel C). The arrows indicate the presence of lipid deposits in GK rats. Scale bar: 40x.

Figure 4. Immunostaining with anti-collagen I



Both control and diabetic rat retina had a variable collagen I immunofluorescence (green). GK retina showed particularly strong collagen I immunofluorescence in GCL and photoreceptor layer (Panel A) Scale bar: 60x. Evaluation of the intensity of density pixel ratio showed an increase of collagen deposits in retina GK compared to control (Panel B). Representative picture of collagen staining with Sirius Red in the retina of GK rats indicated by an arrow (Panel C). Data are mean \pm SD of values obtained from 4 rats in each group. Statistical comparison with control (*) rats is indicated by * $P < 0.05$. Scale bar: 40.

Figure 5. Density analysis and morphological evaluation of retinal vascular bed in control rats and GK



The density of blood vessels was quantified in the retina of GK and control rats at 30 weeks (A). Data are mean \pm s.e.m. of values obtained from 6 to 10 rats in each group. Representative picture of retinal microvessels in GK rats (B). Scale bar = 100 μ m.

CHAPITRE 5

Discussion et perspectives

5 Faits saillants de la thèse

Le premier article a mis en évidence pour la première fois la localisation cellulaire du récepteur B1 des kinines au niveau des couches les plus vascularisées dans la rétine diabétique. Nous avons démontré que le RB1 est encore surexprimé à un stade avancé de la maladie (6 mois de diabète). L'article 2 fait partie des rares études ayant mis en évidence l'implication des récepteurs des kinines dans le processus inflammatoire de la DMLA néovasculaire. Nous avons montré que l'administration d'un antagoniste pharmacologique du RB1 ou sa suppression avec un siRNA réduit la taille d'une néovascularisation rétinienne. Dans l'article 3, les altérations morphologiques du lit vasculaire rétinien ainsi que l'accumulation de lipides dans la rétine ont été mises en évidence dans un modèle héréditaire de diabète de type 2, le rat Goto-Kakizaki (GK). Notre évaluation du lit vasculaire rétinien a également montré une accumulation de collagène dans les vaisseaux sanguins des rats GK, suggérant la présence de fibrose. L'étude immunohistochimique a révélé un fort marquage du RB1 des kinines, des cellules endothéliales, une infiltration des macrophages ainsi qu'une microgliose dans la rétine GK comparé à la rétine témoin.

5.1 Identification et localisation cellulaire des récepteurs des kinines

Les premières mesures d'expression du SKK ont été réalisées dans la glande surrénale humaine (Wang *et al.*, 1996). La présence des récepteurs B1 et B2 des kinines a été montrée sur le tissu synovial humain (Cassim *et al.*, 1997). Le RB1 a aussi été identifié sur les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires chez les patients présentant des plaques athérosclérotiques (Raidoo *et al.*, 1997). La localisation et l'expression des récepteurs B1 et B2 des kinines ont été étudiées dans des échantillons d'autopsie du cerveau humain (Mahabeer *et al.*, 2000) et sur des échantillons humains de tumeurs astrocytaires. En effet, le RB2 est situé plus près de la périphérie des cellules tumorales tandis que le RB1 est présent sur toute la cellule tumorale (Raidoo, 1999). Plus récemment, le rôle des kinines et de leurs récepteurs dans les tumeurs cérébrales malignes a été étudié. En effet, une analyse immunohistochimique d'échantillons de tumeurs provenant de patients présentant un diagnostic

de gliome a révélé une surexpression du RB1 chez les personnes atteintes de glioblastome (Nicoletti *et al.*, 2017).

Bien que largement controversées, les premières études d'immunolocalisation suggèrent une expression du RB1 dans les ganglions de la racine dorsale chez le rat témoin (Ma *et al.*, 2000). Le développement au sein de notre laboratoire d'un anticorps spécifique dirigé contre le RB1 a permis d'avancer sur les travaux d'immunolocalisation. Notre laboratoire a pu identifier la présence du RB1 sur les cellules gliales et sensorielles de la moelle épinière du rat STZ-diabétique contrairement à son absence chez le rat témoin (Talbot *et al.*, 2009) et a pu établir sa distribution cellulaire et ses altérations dans le pancréas, le cerveau et le système vasculaire dans ce modèle de diabète (Ongali *et al.*, 2004; Campos *et al.*, 2005; Tidjane *et al.*, 2016; Haddad et Couture, 2017). La surexpression du RB1 dans le cerveau de souris transgéniques surexprimant une forme mutée de la protéine précurseur amyloïde humaine (Souris APP) a été mise en évidence avec ce même anticorps (Lacoste *et al.*, 2013). Dans cette étude, le RB1 a été localisé sur l'astroglie des souris APP.

Toutes les composantes du SKK sont présentes dans l'œil et sont susceptibles de participer aux fonctions oculaires (Webb *et al.*, 2011). La kallibréine tissulaire est exprimée dans les cellules de la rétine, du muscle ciliaire et du trabéculum (Ma *et al.*, 1996; Webb *et al.*, 2011) ont montré pour la première fois que les récepteurs B1 et B2 sont exprimés à des niveaux élevés dans la rétine humaine, la choroïde et le corps ciliaire, et à des niveaux relativement faibles dans le nerf optique. Bien qu'il ait été démontré que le RB1 est présent dans la rétine, on ignorait sur quelle structure ou type cellulaire de la rétine est localisé ce récepteur. Pour répondre à cette question fondamentale, nous avons mis à profit notre anticorps spécifique dirigé contre le RB1. Aucune bande n'est détectée lorsque le tissu rétinien est exposé au sérum pré-immun du RB1. Dans l'article 1 nous avons davantage démontré la spécificité de cet anticorps avec un traitement intraoculaire d'un siRNA chez le rat STZ. Par immunohistochimie, nous avons donc montré que le RB1 est présent principalement au niveau de la rétine interne à deux semaines de diabète. La rétine interne est irriguée par trois couches de microvaisseaux : la couche superficielle, la couche intermédiaire et la couche profonde. La couche superficielle est située au niveau des cellules ganglionnaires, ces dernières ont le rôle de collecter les informations à partir de la rétine et de

les transférer au cerveau. La couche intermédiaire est située dans la couche plexiforme interne. Et la couche profonde est située dans la couche plexiforme externe (Pâques *et al.*, 2003). Ces résultats intéressants suggèrent que le RB1 est présent au niveau des couches les plus vascularisées de la rétine à deux semaines de diabète. Cela a été confirmé par la co-localisation du RB1 avec le marqueur des cellules endothéliales dans la rétine diabétique. Tel qu'attendu, le RB1 est faiblement exprimé dans la rétine témoin. Des études immunohistochimiques seraient nécessaires pour déterminer la plasticité de l'expression du RB1 dans d'autres cellules rétinienne (péricytes, photorécepteurs et neurones) qui peuvent affecter la vision dans le diabète.

5.2 Surexpression fonctionnelle du RB1 dans la rétine diabétique à différents stades

Notre laboratoire a rapporté une augmentation des niveaux d'ARNm pour le RB1 dans la rétine humaine diabétique (Bhat *et al.*, 2014) et la rétine du rat STZ-diabétique (Pouliot *et al.*, 2012). D'autres composantes du SKK incluant la KP, le FXII et le KHPM ont été étudiées dans le corps vitré et la rétine des personnes atteintes de rétinopathie diabétique (Phipps *et al.* 2008; Liu et Feener, 2013). Les premières études réalisées par notre équipe en autoradiographie quantitative ont montré que le RB1 est exprimé dans la rétine du rat STZ à partir du 4^e jour jusqu'à 21 jours après l'initiation du diabète (Abdouh *et al.*, 2003). Ce résultat a été confirmé par qRT-PCR et immunobuvardage de type Western (Pouliot *et al.*, 2011; Pouliot *et al.*, 2012). L'augmentation du RB1 (protéine) dans la rétine du rat est maintenue jusqu'à 6 semaines de diabète (Pouliot *et al.*, 2011). Fait intéressant, l'agoniste sélectif du RB1 (R-838) amplifie le niveau d'expression d'ARNm du RB1 à 2 et 6 semaines de diabète, suggérant que le RB1 est fonctionnel et peut répondre à son agoniste. Ce résultat est conforme avec l'auto-induction du RB1 par ses propres agonistes via la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α et IL-1 β (Schanstra *et al.*, 1998). Le RB1 peut augmenter le stress oxydatif et amplifier le processus inflammatoire grâce à un mécanisme de boucle de rétroaction positive (auto-induction) (Bhat *et al.*, 2014; Couture *et al.*, 2014). Par conséquent, B1R devrait amplifier et perpétuer le processus inflammatoire rétinien. Cette rétroaction positive peut être bloquée par l'antagoniste du RB1(R-954), ce qui explique ainsi la suppression de la régulation à la hausse de l'expression du RB1 par le traitement avec le R-954 dans la rétine du rat STZ.

Collectivement, ces données appuient–fortement un rôle pour le RB1 dans les événements inflammatoires de la rétinopathie diabétique.

5.3 Rôle du récepteur B1 dans l'inflammation microvasculaire

Les données de notre premier article montrent la localisation du RB1 sur les cellules gliales rétiniennes et les cellules de Müller en accord avec sa distribution sur les vaisseaux sanguins rétiniens. Le RB1 est présent sur les cellules endothéliales et les extrémités astrocytaires des vaisseaux sanguins rétiniens, soutenant ainsi son action dans la fonction endothéliale et la perméabilité vasculaire rétinienne. Le RB1 augmente la perméabilité vasculaire rétinienne possiblement en activant les cellules endothéliales, ce qui favorise l'extravasation. Ceci suggère un rôle stratégique pour le RB1 dans l'inflammation microvasculaire et la dysfonction endothéliale dans la rétine diabétique. La surexpression du RB1 sur les cellules endothéliales peut également expliquer l'altération du flux sanguin rétinien dans la phase aiguë du diabète (Pouliot *et al.*, 2011). Notre deuxième article met aussi en évidence le rôle du SKK dans l'inflammation rétinienne et l'altération vasculaire dans un modèle de CNV, impliquant les cellules gliales et les cellules endothéliales vasculaires par la surexpression du RB1. Le blocage du RB1 avec des injections intravitréennes de siRNA-RB1 ou avec une application topique d'antagoniste du RB1 (R-954) diminue l'hyperperméabilité vasculaire rétinienne et la leukostase dans la rétine STZ (article 1) et dans la rétine ayant subi une CNV (article 2). Ces deux paramètres sont fortement impliqués dans les altérations vasculaires de la rétine dans la rétinopathie diabétique et la DMLA. L'activation du RB1 entraîne également la production de médiateurs vasoactifs tel que le NO, ce dernier peut interagir avec l'anion superoxyde pour former le peroxynitrite (ONOO⁻). La formation de cette molécule toxique peut affecter la régulation du tonus vasculaire et causer ainsi une dysfonction endothéliale (Haddad et Couture, 2017). De plus, il est connu que la surexpression du RB1 dans les vaisseaux sanguins contribue à la diapédèse des leucocytes et à leur migration dans les tissus endommagés en réponse à l'attraction des cytokines (McLean *et al.*, 2000). Dans les conditions inflammatoires, l'infiltration leucocytaire est favorisée également par de nombreuses molécules pro-adhésives, ICAM-1, VCAM-1 et MCP-1. L'augmentation du nombre de leucocytes dans la rétine CNV s'accompagne d'une augmentation de l'expression de l'ARNm de MCP-1, ICAM-1

et VCAM-1. Nous avons montré que le traitement avec le R-954 réduit la surexpression de l'ICAM-1 dans la rétine CNV et diminue l'adhérence des leucocytes dans ce modèle animal. Toutefois, la surexpression de VCAM-1 et de MCP-1 n'est pas affectée par l'antagoniste du RB1. L'hypothèse ici est que l'adhésion des leucocytes fonctionne via la régulation du RB1 en libérant le TNF- α . Il est connu que le RB1 est induit par différentes cytokines pro-inflammatoires, principalement par TNF- α et l'expression de l'immunoglobuline ICAM-1 est régulée essentiellement par TNF- α .

Les caractéristiques pathologiques du dysfonctionnement de la BHR comprennent à la fois la perte de l'intégrité des jonctions serrées, la surexpression du VEGF, le stress oxydatif et les modifications inflammatoires (Zhang *et al.*, 2014). Une ouverture sélective de la barrière hémato-encéphalique a été observée chez le chat lors de la superfusion corticale ou de l'application intra-artérielle de BK. Cette fuite est relayée principalement par le RB2 situé au niveau de la membrane luminale des cellules endothéliales et elle est probablement une conséquence d'une ouverture des jonctions serrées (Wahl *et al.*, 1999). Il serait intéressant de vérifier si l'antagoniste du RB1 peut rétablir l'expression des molécules qui forment les jonctions cellulaires de la barrière hémato-rétinienne (Occludine et ZO-1) dans le modèle de CNV.

5.4 Le processus inflammatoire dans la DMLA néovasculaire

La forme néovasculaire de DMLA représente seulement 10% des cas de DMLA mais celle-ci est responsable de 90% des cas de pertes de vision sévère dans cette maladie (Shahar *et al.*, 2006). Cette néovascularisation envahissant l'espace sous rétinien est la conséquence d'une cascade de réponses inflammatoire et angiogénique (Dorrell *et al.*, 2007) dans laquelle de nombreuses cytokines et facteurs de croissance sont impliqués dont le VEGF-A (Luand et Adamis, 2006). Ce dernier joue un rôle central dans la prolifération cellulaire, la migration et la formation de néovaisseaux ce qui en fait une cible de choix dans le traitement des maladies angiogéniques oculaires. Depuis quelques années, le Bevacizumab et le Ranibizumab, qui ciblent toutes les isoformes du VEGF-A, sont utilisés couramment en injection intravitréenne pour traiter la néovascularisation choroidienne (CNV), notamment dans la DMLA néovasculaire (Mitchell, 2011). Dans notre projet DMLA, le rôle du RB1 et son interaction avec le VEGF ont

été déterminés en comparant l'impact d'un anticorps spécifique anti-VEGF avec celui d'un traitement sélectif par un antagoniste du RB1 (R-954) ou un siRNA RB1 sur ces caractéristiques pathologiques (Article 2). Nos résultats montrent que des cytokines pro-inflammatoires sont affectées différemment par l'antagoniste du R-954 et le traitement anti-VEGF. Ces résultats permettent de faire l'hypothèse que ces deux principaux systèmes, la signalisation du RB1 et du VEGF, pourraient favoriser les effets pathologiques de manière réciproque et concomitante mais indépendante dans les processus vasculaires et inflammatoires. Cela suggère peut-être que les processus vasculaires et inflammatoires initiaux doivent être initiés, au moins en partie, via la signalisation du VEGF. Les effets délétères du VEGF seraient tributaires de l'induction du RB1 qui amplifie l'inflammation par des boucles positives auto-régulatrices impliquant le TNF- α .

Pour évaluer plus en profondeur la composante inflammatoire de la CNV induite par laser, nous avons mesuré l'expression de l'ARNm du HIF-1 α , la surexpression de ce facteur hypoxique impliquée dans l'expression du VEGF dans la CNV, a été bloquée également par le traitement anti-VEGF. L'hypoxie n'est pas la seule composante responsable de l'angiogenèse pathologique. L'inflammation et la leucostase jouent aussi un rôle majeur dans la néovascularisation (Nakao *et al.*, 2005; Schmidand et Varner, 2010). La migration leucocytaire est un évènement primaire dans de nombreuses réponses inflammatoires et maladies chroniques. Les leucocytes entrant continuellement dans les tissus génèrent des dommages cellulaires dans les maladies à composante inflammatoire. De nombreuses études mettent en évidence le rôle délétère de l'infiltration leucocytaire dans la DMLA de type néovasculaire (Takeda *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2012). Il a été montré que le VEGF-A peut contribuer à l'infiltration leucocytaire et des macrophages via le récepteur VEGF-R1 *in vitro* (Sawano *et al.*, 2001). *In vivo*, l'angiogenèse, dépendante de la présence de VEGF-A, est aussi accompagnée par une infiltration leucocytaire (Nakao *et al.*, 2005). Comme on pouvait s'y attendre, nous avons observé que l'augmentation du nombre de leucocytes adhérents dans la rétine CNV s'accompagnait d'une augmentation des niveaux d'ARNm de MCP-1, ICAM-1 et VCAM-1. La présence de macrophages dans les membranes néovasculaires excisées de patients présentant une DMLA néovasculaire est clairement établie (Sheridan *et al.*, 2009). De nombreuses molécules contribuent à l'adhésion leucocytaire et à la diapédèse. ICAM-1, VCAM-1 et la E-selectine sont surexprimés par les cellules endothéliales en présence de VEGF (Kim *et al.*,

2001). La NO synthase endothéliale, activée par la présence de VEGF, induit la migration transendothéliale des polymorphonucléaires via PECAM-1 (Liu *et al.*, 2012). Un effet synergique a aussi été mis en évidence entre le VEGF et MCP-1 (Futagami *et al.*, 2008). L'expression de cette molécule chimiotactique pro-inflammatoire est augmentée dans les CNV induites par laser chez l'animal (Xie *et al.*, 2011) et chez les patients atteints de DMLA (Jonas *et al.*, 2010).

L'IL-1 β et le TNF- α sont deux cytokines pro-inflammatoires qui jouent un rôle dans l'angiogenèse (Lavalette *et al.*, 2011). Ces cytokines sont surexprimées dans des modèles murins de CNV induite par laser (Zou *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2012) et dans les membranes néovasculaires excisées de patients présentant une DMLA néovasculaire (Oh *et al.*, 1999). L'IL-8, produit par de nombreux types cellulaires, active et recrute les polymorphonucléaires dans l'inflammation aiguë et chronique. Sa présence dans l'humeur aqueuse a été corrélée avec le degré de sévérité de la CNV. Les cytokines IL-1 β , IL-1 α et TNF- α stimulent les cellules endothéliales et entraînent une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dont la E-selectine ou ICAM-1 à leur surface. Elles entraînent aussi la sécrétion de chimiokines tels que l'IL-8 (Frenetteand et Wagner, 1996; Luster, 1998). Elles contribuent donc activement au recrutement leucocytaire agissant à la fois durant l'étape d'adhésion et durant la diapédèse. Des études suggèrent que la COX-2 et les prostaglandines sont des mécanismes contribuant à la production de VEGF et aux maladies néovasculaires (Sennlaub *et al.*, 2003; Wilkinson-Berka *et al.*, 2003). Après une ischémie transitoire de la rétine chez le rat, on observe une surexpression de COX-2/prostaglandines et du VEGF dans la rétine (Ju *et al.*, 2003). L'inhibition pharmacologique de la COX-2 prévient la néovascularisation rétinienne (Barnett *et al.*, 2010) et l'infiltration leucocytaire normalement observée 24h post-hypoxie, suggérant à la fois un rôle pro-angiogénique et chimiotactique de cette dernière (Ju *et al.*, 2003).

5.5 Rôle du récepteur B1 dans une néovascularisation rétinienne

Notre étude montre clairement la surexpression du RB1 dans une CNV induite par laser et l'impact d'un inhibiteur (siRNA) et d'un antagoniste (R-954) du RB1 sur la réduction de la CNV. Le rôle du RB1 dans la néovascularisation a été très peu étudié. La première étude impliquant un rôle du SKK dans une néovascularisation a été publiée il y a déjà 25 ans (Hu et

Fan, 1993). Ces auteurs ont montré que la BK via le RB1 augmente l'angiogenèse dans un modèle d'implantation chez le rat. Une réduction de la néovascularisation a également été observée chez des souris knock-out pour le RB1 en utilisant un modèle d'ischémie d'un membre postérieur (Emanuelli *et al.*, 2002). Une étude de Nagai *et al.*, 2007, suggère fortement que le SKK est un régulateur positif de la CNV en mettant en évidence les effets additifs d'un antagoniste du RB2 et de l'inhibition de l'ACE sur la diminution de la CNV. Une étude réalisée avec des modèles de rongeurs génétiquement déficients montre que le RB1 induit l'expression du VEGF et du VEGF-R2 (Ikeda *et al.*, 2004), alors que le RB2 transactive le VEGF-R2 par phosphorylation de son domaine cytoplasmique (Thuringer *et al.*, 2002). D'autre part, il a été démontré que la synthèse de NO induite par le RB1 augmente l'expression du facteur de croissance des fibroblastes 2 (FGF2), qui est lui-même pro-angiogénique via son récepteur FGF-R1 (Parenti *et al.*, 2001). Toutes ces données suggèrent finalement que le SKK participe activement à la signalisation des différents médiateurs bien connus dans la prolifération et la migration endothéliale tel que le NO, le VEGF ou encore le FGF2 et stimule ainsi l'angiogenèse.

L'angiogenèse est un facteur pathogène majeur dans la DMLA, comme en témoigne l'efficacité clinique des anticorps anti-VEGF. Cette maladie de plus en plus importante peut être une cible pour les médicaments inhibant le SKK. En outre, la formation de nouveaux vaisseaux est considérée pathologique dans d'autres maladies communes telle que la polyarthrite rhumatoïde et les tumeurs cancéreuses, ce qui élargit encore l'applicabilité thérapeutique pour de tels médicaments.

5.6 Des mécanismes indépendants impliquant le RB1 et le système VEGF dans la pathogénèse de la RD et de la DMLA

L'injection intravitréenne de l'agoniste du RB1 (R-838) n'a pas permis d'induire la surexpression du VEGF et du VEGF-R2 chez le rat STZ à deux semaines de diabète, bien que le blocage du RB1 avec un inhibiteur (siRNA-RB1) ou un antagoniste (LF22-0542) a permis de diminuer le niveau d'expression d'ARNm du système VEGF dans la rétine diabétique (Pouliot *et al.*, 2012). Cette régulation à la baisse de l'expression du système VEGF par l'antagonisme du RB1 ou la délétion du gène RB1 pourrait possiblement découler de l'inhibition du processus inflammatoire et non d'une interaction directe VEGF-RB1.

L'absence d'effet du R-838 sur l'expression du VEGF-R2 est confirmée par l'absence de co-localisation des deux marqueurs sur les cellules rétinienne à l'exception des cellules endothéliales. Il est connu que le VEGF augmente l'extravasation de la kallibréine plasmatique dans la rétine, et que la kallibréine plasmatique est requise pour les effets complets du VEGF sur la perméabilité vasculaire rétinienne et l'épaississement de la membrane rétinienne chez les rongeurs (Clermont *et al.*, 2016). Inversement, la kallibréine tissulaire inhibe la signalisation du VEGF via le clivage de l'isoforme VEGF165, ce qui peut réduire la perméabilité vasculaire rétinienne (Nakamura *et al.*, 2011). Une étude récente a conclu que le SKK plasmatique est impliqué en tant que médiateur indépendant du VEGF dans l'œdème maculaire diabétique (Kita *et al.*, 2015). En effet, la surexpression du RB1 sur les cellules endothéliales de la rétine STZ peut témoigner d'un effet direct du RB1 sur la perméabilité des capillaires qui peut se produire indépendamment du VEGF. Ainsi, le mécanisme d'induction de la perméabilité vasculaire rétinienne par le SKK semble être indépendant de la cascade favorisée par le VEGF, ces deux systèmes semblent agir séparément mais de façon concomitante. Dans notre étude visant l'implication du RB1 dans le développement de la DMLA néovasculaire, nous avons montré que les marqueurs de cytokines pro-inflammatoires sont affectés différemment par l'antagoniste R-954 et la thérapie anti-VEGF. Le traitement topique avec R-954 a permis de réduire fortement l'expression des médiateurs inflammatoires (cytokines et COX-2), tandis que l'inhibition du VEGF a permis de réduire les molécules d'adhésion vasculaire (ICAM-1, VCAM-1, MCP-1). Ces résultats suggèrent que les voies des deux systèmes VEGF et RB1 sont complémentaires et additives dans le développement de la CNV. Par conséquent, le blocage du RB1 pourrait représenter une approche alternative ou complémentaire de la thérapie anti-VEGF pour soulager l'inflammation et les conséquences pathologiques de la CNV.

Afin de confirmer les résultats obtenus des traitements avec le R-954 et l'anti-VEGF sur l'ARNm des médiateurs de l'inflammation, il serait indispensable de vérifier aussi leurs effets sur l'expression protéique.

5.7 Avantage de l'utilisation de l'antagoniste du RB1, le R-954

Plusieurs composantes ont été ciblées afin de prévenir les complications rétinienne du diabète et de la DMLA.

Dans le cadre de ce projet, le RB1 est proposé comme cible thérapeutique pour le traitement non invasif de la rétinopathie diabétique car il s'exprime au tout début du diabète et pendant sa progression. Nos résultats ont démontré que l'administration du R-954 diminue plusieurs paramètres impliqués dans le processus inflammatoire durant la RD et la DMLA. On sait que l'activation du RB1 peut intervenir dans une boucle de rétroaction positive pour augmenter davantage le stress oxydatif via la voie NF- κ B, ce qui entraîne la régulation positive du RB1 (autoinduction de son propre récepteur) et la surexpression de molécules inflammatoires. Par conséquent, le RB1 amplifie et perpétue le processus inflammatoire rétinien. Cette rétroaction positive peut être bloquée par le R-954, ce qui explique ainsi la suppression de la régulation à la hausse de l'expression du RB1 par l'antagoniste du RB1 dans la rétine du rat STZ et CNV.

Cette étude prouve également que l'instillation de gouttes ophtalmiques d'un antagoniste peptidique soluble et métaboliquement stable du RB1(R-954) pendant une semaine peut représenter une nouvelle approche thérapeutique non invasive et efficace pour soulager l'inflammation vasculaire rétinienne induite pendant le diabète et la DMLA. D'autant plus que les traitements actuels (photocoagulation laser, vitrectomie) disponibles sur le marché ne traitent pas la cause et ne ciblent que les stades les plus avancés de la maladie, une fois que la rétine est fortement endommagée. De plus, il s'avère que les traitements ciblant le VEGF, couramment utilisés pour les patients atteints de PDR, ne sont pas efficaces chez tous les patients, ils sont coûteux et peuvent conduire à un risque accru d'infection rétinienne, de cataracte et de glaucome. L'inhibition oculaire du VEGF pourrait influencer la fonction rétinienne normale puisque ce facteur angiogénique est exprimé constitutivement dans les yeux normaux et contribue au maintien de l'intégrité vasculaire et joue un rôle neuroprotecteur (Zachary, 2001).

D'un point de vue clinique, le traitement topique du R-954 est non invasif et peut être auto-administré, représentant un avantage certain par rapport à la thérapie intravitréenne anti-VEGF qui doit être répétée à chaque mois. Parmi les autres avantages d'un traitement avec un antagoniste du RB1, notons la plus grande sécurité d'administration et la préservation des fonctions physiologiques car ce récepteur est induit uniquement en situation pathologique.

De plus, le R-954 est bien toléré, il présente des caractéristiques pharmacologiques / pharmacocinétiques précliniques favorables et des profils de sécurité encourageants, convenant aux premières études chez l'homme. D'autres antagonistes peptidiques du RB1 ont été décrits mais démontrent une stabilité incomplète (par exemple, R-715, B-9858 et B-9958). Tandis que le R-954 se présente comme l'antagoniste du RB1 de nature peptidique le plus puissant, biostable, sélectif et disponible actuellement. Des expériences réalisées au sein de notre laboratoire ont montré une surexpression marquée des niveaux d'ARNm du RB1 dans la rétine des donneurs diabétiques de type 1 et 2 et aucune valeur n'est détectable dans la rétine des donneurs témoins. Ceci fournit une preuve supplémentaire que le RB1 est présent dans les rétines humaines diabétiques de types 1 et 2 et que le ciblage de ce récepteur a une pertinence clinique.

Les travaux de cette thèse se sont concentrés principalement sur l'action d'antagoniste du RB1 mais d'autres stratégies pour inhiber l'action du RB2 ont été aussi proposées comme agents thérapeutiques. Des études cliniques ont confirmé l'innocuité et l'efficacité de l'antagoniste du RB2, l'icatibant, administré dans le traitement aigu des crises associées à l'angioedème héréditaire. Le RB2 pourrait avoir un rôle à jouer dans les composantes de l'inflammation rétinienne, toutefois il peut aussi interférer avec les conditions physiologiques de la rétine. Le RB2 est distribué de façon ubiquitaire et il est présent notamment sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les cellules épithéliales, certains neurones, les astrocytes et les polynucléaires neutrophiles contrairement au RB1 qui est complètement absent dans les tissus sains. Par conséquent, cet aspect doit être sérieusement pris en compte dans les essais cliniques à venir pour chaque environnement pathologique.

5.8 Les changements rétiniens chez le rat Goto-Kakizaki: corrélation avec la perméabilité de la barrière hémato-rétinienne

Pour étudier les altérations vasculaires rétiniennes dans un modèle de diabète de type 2, nous avons opté pour un modèle spontané de diabète sucré non insulino-dépendant sans obésité. D'une part, l'état diabétique est modéré et stable avec l'âge chez le rat GK. De plus, contrairement aux rats atteints de diabète d'origine pharmacologique, les rats GK ne présentent pas de cataracte pendant longtemps en raison de leur état diabétique modéré. Cette fonctionnalité

nous permet d'observer les modifications circulatoires de la rétine plus longtemps que d'habitude. Des études antérieures ont montré que les rats GK développent des anomalies circulatoires rétinienne modérées (Miyamoto *et al.*, 1996; Carmo *et al.*, 2000). La perméabilité de la BHR chez les rats GK a été évaluée pour la première fois par l'équipe de Carmo *et al.*, 2000. Ces derniers ont montré qu'il y a une augmentation significative des valeurs de perméabilité vasculaire rétinienne à 4 mois. Les rats GK de 4 mois développent des altérations de la microcirculation rétinienne caractérisées par une réduction du débit sanguin rétinien (Miyamoto *et al.*, 1996). Des études immunohistochimiques et d'immunobuvardage par Western blot ont révélé que la protéine iNOS est exprimée au niveau des couches nucléaires externe et interne dans des sections oculaires chez le rat GK (Carmo *et al.*, 2000). Or, il est connu que la surexpression de l'isoforme iNOS contribue à la dégradation de la BHR et, par conséquent, au développement de la rétinopathie diabétique (Carmo *et al.*, 1998; 1999). Un trafic cellulaire inflammatoire de microglies et de macrophages a été détecté entre la rétine et la choroïde chez le rat GK (Omri *et al.*, 2011). Une néovascularisation cérébrale augmentée a été reportée dans le modèle GK comprenant à la fois l'angiogenèse et l'artériogenèse (Li *et al.*, 2010). Une étude récente a révélé que l'angiogenèse rétinienne survient chez les rats GK à 6 et 7 mois, et que l'expression de certains facteurs liés à l'angiogenèse sont augmentés chez les rats GK pendant le développement de la rétinopathie diabétique (Gong *et al.*, 2016). L'expression du facteur inflammatoire ICAM-1 chez les rats GK est aussi augmentée (Fan *et al.*, 2014), ICAM-1 est connu par sa participation à l'adhésion des leucocytes au système vasculaire rétinien diabétique, un processus qui déclenche la décomposition de la BHR (Miyamoto *et al.*, 1999).

Le but de notre troisième article était d'examiner si les rats GK diabétiques développent des modifications rétinienne avec des caractéristiques similaires à celles observées chez les rats diabétiques STZ en ce qui concerne la perméabilité vasculaire, la densité et l'évaluation morphologique du lit vasculaire rétinien. Nos résultats n'ont montré aucun changement significatif dans la perméabilité vasculaire rétinienne à 30 semaines contrairement à notre étude avec des rats wistar rendus diabétiques avec la STZ (1^{er} Article). Cela peut être dû au fait que l'hyperglycémie est beaucoup plus basse chez les rats GK que chez les rats STZ (Adeghate *et al.*, 2010). L'hyperperméabilité vasculaire rétinienne semble donc transitoire chez le rat GK. L'administration intraveineuse du bleu d'Evans chez le rat GK a montré une augmentation de

la perméabilité vasculaire rétinienne à 16 semaines (Fan *et al.*, 2014). Les auteurs ont adopté une technique un peu différente de celle utilisée dans notre étude. Le volume d'administration du bleu Evans est d'une part plus élevée (100 mg versus 45 mg dans notre étude). De plus, un volume égal de sang a été prélevé à des intervalles de 15 min jusqu'à 2 h après l'injection pour obtenir une concentration plasmatique moyenne de bleu d'Evans dans le temps et qui a été prise en compte dans les calculs. Il est toutefois peu probable que ces différences mineures au niveau des méthodes de mesure puissent expliquer les divergences de résultats sur la perméabilité vasculaire.

5.9 Modifications structurelles de la rétine diabétique : Accumulation de lipides et de collagènes contribuant à la pathogenèse de la RD

Notre étude sur les altérations vasculaires chez le rat GK a montré une accumulation de collagène dans les vaisseaux sanguins des rats âgés de 30 semaines, suggérant un épaissement de la membrane basale et la présence de fibrose (Article 3). Ces résultats sont consistants avec d'autres études précédentes sur différents modèles (Roy *et al.*, 2010; Chronopoulos *et al.*, 2011; Greenwood *et al.*, 2011).

Les patients atteints de diabète de type 1 et de type 2 présentent une membrane basale vasculaire épaissie, caractéristique de la RD (Roy *et al.*, 2000). Dans le diabète, l'épaississement de la membrane basale vasculaire est une altération structurelle fondamentale des petits vaisseaux sanguins. Au cours des conditions hyperglycémiques, la synthèse de la fibronectine, du collagène de type IV et de la laminine augmente considérablement, contribuant ainsi à l'épaississement de la membrane basale. L'inflammation et l'augmentation de la voie Polyol sont également associées à l'épaississement de la membrane basale (Roy *et al.*, 2010). D'autres facteurs peuvent participer aussi à l'épaississement de la membrane basale tel que l'activité accrue des facteurs de croissance, l'activation de la protéine kinase C et l'accumulation des AGEs (Roy *et al.*, 2010). La fibrose rétinienne est étroitement associée au développement de la RDP et elle est caractérisée par la présence de vaisseaux sanguins nouvellement formés souvent accompagnés d'un tissu fibreux s'étendant le long de la surface interne de la rétine, traversant le nerf optique ou pénétrant dans la cavité vitréenne (Ryan *et al.*, 2004). Nos résultats d'immunomarquage ont révélé une forte immunodétection des cellules endothéliales, de la

microglie et une accumulation de macrophages dans la rétine GK à 30 semaines (Article 3). Fait important, les cellules vasculaires, les astrocytes et la réactivité microgliale, ainsi que les cellules de Müller, participent au processus fibrotique (Roy *et al.*, 2016). L'inflammation favorise également la cicatrisation fibrovasculaire en contribuant au processus d'angiogenèse.

En plus de ces altérations vasculaires, nous avons constaté la présence de dépôts lipidiques chez le rat GK localisés principalement entre la rétine et la choroïde (Article 3). Des taux élevés de lipides sont connus pour causer une dysfonction endothéliale, un facteur important dans la pathogenèse de la RD. Des niveaux élevés de cholestérol et de lipides sont des éléments fondamentaux du syndrome métabolique. Ils entraînent clairement un risque plus élevé de troubles de la vision dans la RD (Noda *et al.*, 2014). Il a également été signalé que la peroxydation des lipides dans la paroi vasculaire entraîne la production locale d'espèces réactives carbonylées qui interviennent dans le recrutement des macrophages ainsi que dans la modification chimique des protéines vasculaires affectant à la fois la structure et la fonction de la paroi vasculaire (Bayes *et al.*, 2000). Avec le vieillissement, il y a aussi accumulation frappante de lipides dans la membrane de Bruch située au même endroit où les dépôts de drusen se forment pendant la DMLA (Prakash *et al.*, 2017). Pour la première fois, nous avons montré une surexpression du RB1 essentiellement au niveau de la couche GCL dans la rétine du rat GK (Article 3) associée à une accumulation de lipides et de collagène pouvant affecter à la fois la structure et la fonction des vaisseaux sanguins, ce qui est considéré comme un facteur important dans la pathogenèse de la RD.

5.10 Avantages et limitations des modèles animaux utilisés

Il existe de nombreux modèles animaux de diabète de type 1 et de type 2. Chacun a ses mérites, mais aucun des modèles ne représente complètement la physiopathologie de la maladie. Dans cette thèse, deux modèles expérimentaux de diabète ont été utilisés :

5.10.1 Le modèle de diabète de type 1 induit par la STZ

Ce modèle a été utilisé dans le cadre du premier article et a été couramment utilisé pour étudier le rôle du RB1 dans les complications du diabète (Couture *et al.*, 2014). Ce modèle permet d'induire le diabète rapidement, dans les premiers jours après l'injection de la STZ. Toutefois,

la STZ est relativement instable et les solutions doivent être idéalement préparées immédiatement avant l'injection. Un des inconvénients avec le diabète induit chimiquement est que cette solution chimique peut s'avérer toxique sur d'autres organes du corps. Une modification des isozymes du cytochrome P450 a été signalée dans différents organes (le foie, les reins, les poumons, les intestins, les testicules et le cerveau) après administration de la STZ (Lee *et al.*, 2010). Ce modèle animal ne permet pas d'étudier l'évolution de la maladie dans le temps sans avoir recours à des injections d'insuline car les rats STZ ne peuvent pas être maintenus en vie au-delà de six semaines de diabète à cause de la perte de poids liée à l'hyperglycémie. Ainsi, ce modèle animal ne permet pas d'étudier les stades les plus avancés de la RD. Toutefois, il s'avère un excellent modèle pour visualiser les premières lésions qui surviennent dans la rétine (rétinopathie non proliférative) tel que l'épaississement de la membrane basale des capillaires et l'ouverture de la barrière hémato-rétinienne.

5.10.2 Le modèle de rats Goto-Kakizaki (GK)

Le rat GK est un modèle spontané de diabète non insulino-dépendant sans obésité qui a été utilisé dans le cadre de notre troisième article. Ces rats proviennent de rats wistar contrôles qui ont été sélectionnés par le biais d'exercices de consanguinité répétés en utilisant l'intolérance au glucose comme indice de sélection. A partir de 4 à 6 semaines, ces rats développent une hyperglycémie maintenue (Miyamoto *et al.*, 1996). Les rats GK ont été utilisés dans plusieurs études portant sur le dysfonctionnement des cellules bêta dans le diabète de type 2 (Portha *et al.*, 2009; Giroix *et al.*, 2011; Dolz *et al.*, 2011). Les rats GK présentent des caractéristiques plus ou moins communes à celles présentes chez les patients diabétiques humains. Le rat GK est un modèle intéressant pour étudier les altérations de la microcirculation rétinienne, y compris la suppression de la perfusion rétinienne, l'hyperperméabilité vasculaire ou encore l'augmentation de la production de NO dans la rétine. Cependant, la morphologie et le métabolisme des îlots semblent variables entre les différentes colonies de rats. En effet, dans certaines colonies, le volume et la densité des cellules bêta sont similaires à ceux des témoins. Alors que dans d'autres colonies, il existe une réduction de la masse des cellules bêta (Ostenson *et al.*, 2007).

5.10.3 Modèle de néovascularisation

Afin d'évaluer le rôle du RB1 dans une néovascularisation, nous avons utilisé le modèle de CNV induit par laser qui permet de détruire la membrane de Bruch, entraînant ainsi le développement de la CNV à partir de 10 jours. Lorsque cela se produit, des perforations se créent et se brisent dans la membrane de Bruch, avec une formation de bulle centrale visible avec ou sans hémorragie intra-rétinienne ou choroïdienne. Par la suite, les cellules endothéliales des choriocapillaires, les péricytes, les fibrocytes et les cellules inflammatoires sont introduits dans l'épithélium pigmentaire rétinien et / ou dans les espaces sous-rétiens. La combinaison de la croissance des cellules endothéliales et des péricytes entourés de la matrice extracellulaire par le VEGF et le PDGF semble essentielle à la formation des CNV (Greenberg *et al.*, 2008). Ce modèle est actuellement populaire et utilisé dans de nombreux laboratoires; l'avantage est qu'il est relativement simple à créer, peu coûteux, reproductible et efficace. Toutefois, le taux variable des CNV et les fuites transitoires de CNV sont des inconvénients majeurs dans ce modèle animal. Les inconvénients incluent aussi la nature artificielle du modèle, la petite taille de l'œil du rat / souris par rapport à l'œil humain et l'absence de macula chez les rats et les souris.

Récemment, Albert et ses collaborateurs ont décrit la formation de CNV dans un modèle de rat induit par la lumière cyclique (Albert *et al.*, 2010). Dans ce modèle, des rats albinos ont été exposés à 12 h de lumière cyclique à 3000 lux pendant 1, 3 et 6 mois. Les résultats ont montré une néovascularisation sous-EPR à 1 mois, une extension de la néovascularisation dans la rétine externe à 3 mois et de multiples zones de néovascularisation associées à des vaisseaux rétiens à 6 mois. La lumière cyclique a également provoqué d'autres atrophies rétiennes et des dépôts de type drusen. L'avantage de ce modèle comparé au modèle CNV est la possibilité d'étudier la progression biologique de la CNV dans un modèle animal non modifié génétiquement, sans laser ni perforation mécanique de la membrane de Bruch.

5.11 Perspectives de recherche

Dans le cadre de cette thèse, nous avons présenté un aperçu des principales caractéristiques inflammatoires et vasculaires associées à la rétinopathie diabétique. Nous avons discuté des approches thérapeutiques actuelles, en mettant l'accent sur le RB1 des kinines en tant que nouvelle cible thérapeutique prometteuse en raison de son lien avec les principales voies

inflammatoires. Ceci est proposé comme une intervention plus spécifique, non invasive et plus confortable qui prend en compte la biosynthèse des ligands du RB1 générés à partir des voies des kallikréines plasmatique et tissulaire. Il est important de remarquer qu'aucune fonction physiologique n'a été attribuée au RB1 alors que son apparition est généralement la signature d'une maladie. Nos données montrent que la distribution et la co-localisation du RB1 avec les cellules gliales et de Müller sont en corrélation évidente avec la présence et la distribution des vaisseaux sanguins de la rétine. D'autres recherches seront nécessaires pour déterminer la présence et la plasticité de l'expression du RB1 sur d'autres types de cellules rétiniennes (péricytes, photorécepteurs et neurones) pouvant affecter le diabète pendant la vision.

D'autre part, il est important de rappeler que le RB2 des kinines participe à la vasoprotection et la kallikréine plasmatique à la thrombogénèse et à la formation de kinines impliquées dans l'homéostasie vasculaire. Ebrahimian *et al.*, 2005, ont signalé un rôle pour le RB2 dans les réponses angiogéniques rétiniennes induites par l'ischémie. Par conséquent, le mécanisme d'action des kinines dans la formation de nouveaux vaisseaux semble inclure non seulement le RB1 mais aussi le RB2 sur les cellules endothéliales et autres types cellulaires. Il serait important de s'intéresser davantage à l'implication du RB2 dans l'inflammation rétinienne lors de la RD et la DMLA.

La prévalence du diabète de type 2 est beaucoup plus importante dans la population mondiale que celle du diabète de type 1. Il serait pertinent de continuer à explorer le mécanisme d'action des récepteurs B1 et B2 des kinines dans les altérations morphologiques des microvaisseaux rétiniens dans un modèle animal de diabète de type 2 tel que le rat Goto-Kakizaki, précédemment utilisé dans notre troisième article ou encore le modèle génétique de rat diabétique et obèse Zucker (EL Midaoui *et al.*, 2015).

Dans la rétinopathie diabétique, on assiste également à une perte précoce et sélective des péricytes. Ces cellules contractiles jouent un rôle important dans l'évolution de la maladie. Dans les capillaires rétiniens, les péricytes exercent une fonction similaire à celle des cellules musculaires lisses des gros vaisseaux régulant le tonus vasculaire et la pression de perfusion (Beltramo *et al.*, 2013). L'hyperglycémie et l'hypertension locale sont connues pour être une cause directe de l'apoptose et de la perte de ces péricytes. Il serait donc pertinent d'explorer la

contribution du SKK dans le mécanisme de migration des péricytes capillaires dû à une hyperglycémie et d'étudier leur rôle dans la régulation de la microcirculation rétinienne.

Notre projet sur la DMLA montre clairement la surexpression du RB1 dans une CNV induite par laser et l'impact des antagonistes du RB1 sur la réduction de la CNV. Les mécanismes moléculaires de la pathogenèse de la DMLA restent toutefois mal compris et, plus particulièrement, le mécanisme de la mort cellulaire de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dans la DMLA reste controversé. Il est à rappeler que cette maladie est caractérisée principalement par une accumulation de débris membranaires des deux côtés de la membrane basale de l'EPR. Ainsi, comprendre le mécanisme de la mort cellulaire dans l'EPR induite par le stress oxydatif, et vérifier l'implication du SKK dans ce mécanisme seraient aussi à considérer.

D'autre part, plusieurs faits expérimentaux suggèrent que le dysfonctionnement mitochondrial peut contribuer aussi à la progression de la DMLA. La microscopie de l'EPR humaine provenant de patients atteints de DMLA sèche montre des perturbations graves de la structure de la membrane interne et externe mitochondriale, de la taille des mitochondries et de l'organisation cellulaire mitochondriale (Brown *et al.*, 2018). Il serait pertinent pour la suite du projet DMLA de comprendre la biologie de la dynamique mitochondriale et la dérégulation de ce processus qui peut affecter profondément la viabilité des cellules ganglionnaires de la rétine et leur fonction dans cette maladie.

6 Conclusion

Nos projets de recherche basés sur trois modèles animaux ont confirmé le rôle clé du RB1 des kinines dans la physiopathologie de la rétinopathie diabétique et de la dégénérescence maculaire liée à l'âge, notamment dans l'inflammation et les altérations vasculaires et la néovascularisation rétinienne. Cette étude fournit pour la première fois la démonstration que l'application oculaire d'un antagoniste peptidique du RB1 est une approche efficace et non toxique pour inhiber la taille d'une néovascularisation rétinienne. Le blocage pharmacologique du RB1 a montré aussi des effets bénéfiques chez le rat diabétique. L'application oculaire topique de l'antagoniste du RB1 (R-954) apparaît donc comme une approche thérapeutique plus sûre pour le traitement de la RD et de la DMLA.

Nos données montrent définitivement que la voie du RB1 des kinines est indépendante du système VEGF, au moins en partie, ce qui éluciderait un nouveau mécanisme moléculaire et proposerait une nouvelle cible thérapeutique dans l'œdème maculaire. Toutefois, de nombreuses questions restent encore à être développées. Comment la stimulation des récepteurs des kinines participe-t-elle à la mort cellulaire dans les cellules endothéliales vasculaires de la rétine? Ou encore comment la cascade des kinines influence-t-elle les autres cellules rétiniennes? La recherche sur le SKK s'avère donc très prometteuse pour offrir de nouvelles thérapies pour les patients atteints de rétinopathie diabétique et de DMLA.

7 Bibliographie

- Abdouh M, Khanjari A, Abdelazziz N, Ongali B, Couture R, Hasséssian HM. (2003). Early upregulation of kinin B1 receptors in retinal microvessels of the streptozotocin-diabetic rat. *Br J Pharmacol*, 140(1):33-40.
- Abdouh M, Talbot S, Couture R, Hasséssian HM. (2008). Retinal plasma extravasation in streptozotocin-diabetic rats mediated by kinin B(1) and B(2) receptors. *Br J Pharmacol*, 154(1):136-43.
- Adeghate E, Fernandez-Cabezudo M, Hameed R, El-Hasasna H, El Wasila M, Abbas T, Al-Ramadi B. (2010). Orexin-1 receptor co-localizes with pancreatic hormones in islet cells and modulates the outcome of streptozotocin-induced diabetes mellitus. *PLoS One*, 5(1): e8587.
- Agardh CD, Agardh E, Zhang H, Ostenson CG. (1997). Altered endothelial/pericyte ratio in Goto-Kakizaki rat retina. *J Diabetes Complications*, 11(3):158-62
- Albert DM, Neekhara A, Wang S, Darjatmoko SR, Sorenson CM, Dubielzig RR, Sheibani N. (2010). Development of choroidal neovascularization in rats with advanced intense cyclic light-induced retinal degeneration. *Arch Ophthalmol*, 128(2):212-22.
- Ambati J, Fowler BJ. (2012). Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, 75(1):26-39.
- Amed, S., Dean, H. J., Panagiotopoulos, C., Sellers, E. A., Hadjiyannakis, S., Laubscher, T. A. Hamilton, J. K. (2010). Type 2 Diabetes, Medication-Induced Diabetes, and Monogenic Diabetes in Canadian Children: A prospective national surveillance study. *Diabetes Care*, 33(4), 786-791.
- Andreoli CM, Miller JW. (2007). Anti-vascular endothelial growth factor therapy for ocular neovascular disease. *Curr Opin Ophthalmol*, 18(6):502-8.

- Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. (2012). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 366: 1227-1239.
- Araújo RC, Kettritz R, Fichtner I, Paiva AC, Pesquero JB, Bader M. (2001). Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptor-deficient mice. *Biol Chem*, 382(1):91-5.
- Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA. (2010). Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468(7321):232-43.
- Audet R, Rioux F, Drapeau G, Marceau F. (1997). Cardiovascular effects of Sar-[D-Phe⁸] des-Arg⁹-bradykinin, a metabolically protected agonist of B1 receptor for kinins, in the anesthetized rabbit pretreated with a sublethal dose of bacterial lipopolysaccharide. *J Pharmacol Exp Ther*, 280: 6–15.
- Ayalasomayajula SP, Amrite AC, Kompella UB. (2004). Inhibition of cyclooxygenase-2, but not cyclooxygenase-1, reduces prostaglandin E₂ secretion from diabetic rat retinas. *Eur J Pharmacol*, 498(1-3):275-8.
- Bainbridge JW, Mistry A, De Alwis M, Paleolog E, Baker A, Thrasher AJ, Ali RR. (2002). Inhibition of retinal neovascularisation by gene transfer of soluble VEGF receptor sFlt-1. *Gene Ther*, 9(5):320-6.
- Barnett JM, McCollum GW, Penn JS. (2010). Role of cytosolic phospholipase A₂ in retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(2):1136-42.
- Baynes JW, Thorpe SR. (2010). Glycooxidation and lipoxidation in atherogenesis. *Free Radical Biol Med*, 28: 1708–16.
- Beavers CJ, Dunn SP, Macaulay TE. (2011). The role of angiotensin receptor blockers in patients with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *Ann Pharmacother*, 45(4):520-4.
- Beltramo E, Porta M. (2013). Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem*, 20(26):3218-25.

- Bezalel, S; Mahlab-Guri, K; Asher, I; Werner, B; Sthoeger, ZM. (2015). Angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced angioedema. *The American Journal of Medicine*, 128 (2): 120–5.
- Bhat M, Pouliot M, Couture R, Vaucher E. (2014). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy. *Prog Drug Res*, 69: 111-43.
- Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*, 44: 1-80.
- Bhoola K, Ramsaroop R, Plendl J, Cassim B, Dlamini Z, Naicker S. (2001). Kallikrein and kinin receptor expression in inflammation and cancer. *Biol Chem*, 382(1):77-89.
- Bhutto IA, Kim SY, McLeod DS, Merges C, Fukai N, Olsen BR, Luty GA. (2004). Localization of collagen XVIII and the endostatin portion of collagen XVIII in aged human control eyes and eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(5):1544-52.
- Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, Luty GA. (2006). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res*, 82(1):99-110.
- Bhutto I, Luty G. (2012). Understanding age-related macular degeneration (AMD): relationships between the photoreceptor/retinal pigment epithelium/Bruch's membrane/choriocapillaris complex. *Mol Aspects Med*, 33(4):295-317.
- Bhutto IA, McLeod DS, Jing T, Sunness JS, Seddon JM, Luty GA. (2016). Increased choroidal mast cells and their degranulation in age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 100(5):720-6.
- Bill A, Tornqvist P, Alm A. (1980). The permeability of the intraocular blood vessels. *Trans. Ophthalm. Soc*, 100:332–336.

- Bill A, Sperber G, Ujiie K. (1983). Physiology of the choroidal vascular bed. *Int Ophthalmol*, 6(2):101-7.
- Bird B, Stawicki SP. (2017). *Anatomy, Head, Face, Eye, Arteries*. StatPearls Publishing
- Björkqvist J, Jämsä A, Renné T. (2013). Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thromb Haemost*, 110(3):399-407.
- Böckmann S1, Paegelow I. (2000). Kinins and kinin receptors: importance for the activation of leukocytes. *J Leukoc Biol*, 68(5):587-92.
- Bringmann A, T Pannicke, Biedermann B, Francke M, Iandiev I, Grosche J, P Wiedemann, Albrecht J, Reichenbach A. (2009). Rôle des cellules gliales rétinienne dans l'absorption et le métabolisme de neurotransmetteurs. *Neurochem Int*, 54: 143-160.
- Bringmann A, Iandiev I, Pannicke T, Wurm A, Hollborn M, Wiedemann P, Osborne NN, Reichenbach A. (2009). Signalisation cellulaire et facteurs impliqués dans la gliose à cellules de Muller: effets neuroprotecteurs et nuisibles. *Prog Retin Eye Res*, 28: 423–451.
- Brovkovych V, Zhang Y, Brovkovych S, Minshall RD, Skidgel RA. (2011). A novel pathway for receptor-mediated post-translational activation of inducible nitric oxide synthase. *J Cell Mol Med*, 15(2):258-69.
- Brown EE, Lewin AS, Ash JD. (2018). Mitochondria: Potential Targets for Protection in Age-Related Macular Degeneration. *Adv Exp Med Biol*, 1074:11-17.
- Bucci M, Roviezzo F, Posadas I, Yu J, Parente L, Sessa WC, Ignarro LJ, Cirino G. (2005). Endothelial nitric oxide synthase activation is critical for vascular leakage during acute inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, 102(3):904-8.
- Bursell SE, Clermont AC, Kinsley BT, Simonson DC, Aiello LM, Wolpert HA. (1996). Retinal blood flow changes in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and no diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37(5):886-97.

- Campanholle G, Landgraf RG, Borducchi E, Semedo P, Wang PH, Amano MT, Russo M, Pacheco-Silva A, Jancar S, Camara NO. (2010). Bradykinin inducible receptor is essential to lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Eur J Pharmacol*, 634(1-3):132-7.
- Campochiaro PA. (2013). Ocular neovascularization. *J Mol Med*, 91(3):311-21.
- Campos MM, Calixto JB. (1995). Involvement of B1 and B2 receptors in bradykinin-induced rat paw oedema. *Br J Pharmacol*, 114(5):1005-13.
- Campos MM, Ongali B, De Souza Buck H, Schanstra JP, Girolami JP, Chabot JG, Couture R. (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.
- Carmo, A., Lopes, C., Santos, M., Proença, R., Cunha-Vaz, J. G., and Carvalho, A. P. (1998). Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen. Pharmacol*, 30(3):319-24.
- Carmo, A., Cunha-Vaz, J. G., Carvalho, A. P., and Lopes, M. C. (1999). L-arginine transport in retinas from streptozotocin diabetic rats: Correlation with the level of IL-1 and NO synthase activity. *Vis. Res*, 39(23): 3817–3823.
- Carmo A, Cunha-Vaz JG, Carvalho AP, Lopes MC. (2000). Nitric oxide synthase activity in retinas from non-insulin-dependent diabetic Goto-Kakizaki rats: correlation with blood-retinal barrier permeability. *Nitric Oxide*, 4(6):590-6.
- Carron JA, Hiscott P, Hagan S, Sheridan CM, Magee R, Gallagher JA. (2013). Cultured human retinal pigment epithelial cells differentially express thrombospondin-1, -2, -3, and -4. *Int J Biochem Cell Biol*, 32(11-12):1137-42.
- Cassim B, Naidoo S, Ramsaroop R, Bhoola KD. (1997). Immunolocalization of bradykinin receptors on human synovial tissue. *Immunopharmacology*, 36(2-3):121-5.

- Catanzaro O, Labal E, Andornino A, Capponi JA, Di Martino I, Sirois P. (2012). Blockade of early and late retinal biochemical alterations associated with diabetes development by the selective bradykinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides*, 34(2):349-52.
- Cauli B, Tong XK, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. (2004). Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci*, 24(41):8940-9.
- Ceravolo G, Fernandes F, Munhoz C, Fernandes D, Tostes R, Laurindo F, Scavone C, Fortes Z, Carvalho M. (2007). Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. *Hypertension*, 50(4):756–761
- Chappelov AV, Kaiser PK. (2008). Neovascular age-related macular degeneration: potential therapies. *Drugs*, 68(8):1029-36.
- Charignon D, Spath L, Martin L. (2012). Icatibant, the bradykinin B2 receptor antagonist with target to the interconnected kinin systems. *Expert Opin Pharmacother*, 13(15):2233-47.
- Cherepanoff S, McMenamin P, Gillies MC, Kettle E, Sarks SH. (2010). Bruch's membrane and choroidal macrophages in early and advanced age-related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 94(7):918-25.
- Chirco KR, Sohn EH, Stone EM, Tucker BA, Mullins RF. (2017). Structural and molecular changes in the aging choroid: implications for age-related macular degeneration. *Eye*, 31(1):10-25.
- Ciulla TA, Harris A, Kagemann L, Danis RP, Pratt LM, Chung HS, Weinberger D, Garzosi HJ. (2002). Choroidal perfusion perturbations in non-neovascular age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol*, 86:209–213.
- Clermont A, Bursell SE, Feener EP. (2006). Role of the angiotensin II type 1 receptor in the pathogenesis of diabetic retinopathy: effects of blood pressure control and beyond. *J Hypertens Suppl*, 24(1):S73-80.

- Clermont A, Chilcote TJ, Kita T, Liu J, Riva P, Sinha S, Feener EP. (2011). Plasma kallikrein mediates retinal vascular dysfunction and induces retinal thickening in diabetic rats. *Diabetes*, 60(5):1590-8.
- Clermont A, Murugesan N, Zhou Q, Kita T, Robson PA, Rushbrooke LJ, Evans DM, Aiello LP, Feener EP. (2016). Plasma Kallikrein Mediates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Retinal Dysfunction and Thickening. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 57(6):2390-9.
- Cloutier F, Couture R. (2000). Pharmacological characterization of the cardiovascular responses elicited by kinin B(1) and B(2) receptor agonists in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 130(2):375-85.
- Coorey NJ, Shen W, Chung SH, Zhu L, Gillies MC. (2012). The role of glia in retinal vascular disease. *Clin Exp Optom*, 95(3):266-81.
- Couture R, Harrisson M, Vianna RM, Cloutier F. (2001). Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, 429(1-3):161-76
- Couture R, Girolami JP. (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):467-85.
- Couture R, Blaes N, Girolami JP. (2014). Kinin receptors in vascular biology and pathology. *Curr Vasc Pharmacol*, 12(2):223-48.
- Chronopoulos A, Trudeau K, Roy S, Huang H, Viores SA, Roy S. (2011). High glucose-induced altered basement membrane composition and structure increases trans-endothelial permeability: implications for diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*, 36(8):747-53.
- Cunha-Vaz JG. (1978). Pathophysiology of diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*, 62(6):351-5.

- De Brito Garipey H, Talbot S, Senecal J, Couture R (2013). Brain kinin B1 receptor contributes to the onset of stereotypic nocifensive behavior in rat. *Behav Brain Res*, 241:17–26
- Decarie A, Adam A, Couture R. (1996). Effects of captopril and Icatibant on bradykinin (BK) and des [Arg9] BK in carrageenan-induced edema. *Peptides*, 17(6):1009-15.
- Del Maschio A, Zanetti A, Corada M, Rival Y, Ruco L, Lampugnani MG, Dejana E. (1996). Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *J Cell Biol*, 135(2):497-510.
- Dias JP, Talbot S, Sénécal J, Carayon P, Couture R. (2010). Kinin B1 receptor enhances the oxidative stress in a rat model of insulin resistance: outcome in hypertension, allodynia and metabolic complications. *PLoS One*, 5(9):e12622.
- Dolz M, Movassat J, Bailbe D, Le SH, Giroix MH, Fradet M et al. (2011). cAMP-secretion coupling is impaired in diabetic GK/Par rat beta-cells. A defect counteracted by GLP-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 301: E797–E806.
- Dorrell M, Uusitalo-Jarvinen H, Aguilar E, Friedlander M. (2007). Ocular neovascularization: basic mechanisms and therapeutic advances. *Surv Ophthalmol*, 52 Suppl 1:S3-19.
- Dray A. (1997). Kinins and their receptors in hyperalgesia. *Can J Physiol Pharmacol*, 75(6):704-12.
- Du Y, Sarthy VP, Kern TS. (2004). Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 287(4):R735-41.
- Dua, Harminder S.; Faraj, Lana A.; Said, Dalia G.; Gray, Trevor; Lowe, James (2013). Human Corneal Anatomy Redefined. *Ophthalmology*, 120 (9): 1778–85.
- Eastlake K, Banerjee PJ, Angbohang A, Charteris DG, Khaw PT, Limb GA. (2016). Müller glia as an important source of cytokines and inflammatory factors present in the gliotic retina during proliferative vitreoretinopathy. *Glia*, 64(4):495-506.

- Ebrahimian TG, Tamarat R, Clergue M, Duriez M, Levy BI, Silvestre JS. (2005). Dual effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on angiogenesis in type 1 diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(1):65-70.
- El Midaoui A, Haddad Y, Couture R. (2016). Beneficial effects of argan oil on blood pressure, insulin resistance, and oxidative stress in rat. *Nutrition*, 32(10):1132-7.
- Emanuelli C, Bonaria Salis M, Stacca T, Pintus G, Kirchmair R, Isner JM, Pinna A, Gaspa L, Regoli D, Cayla C, Pesquero JB, Bader M, Madeddu P. (2002). Targeting kinin B(1) receptor for therapeutic neovascularization. *Circulation*, 105(3):360-6.
- Erdös EG, Marcic BM. Kinins, receptors, kininases and inhibitors. (2001). Where did they lead us? *Biol Chem*, 382:43–7.
- Eric J, Bkaily G, Bkaily GB, Volkov L, Gabra BH, Sirois P. (2003). Des-Arg9-bradykinin increases intracellular Ca²⁺ in bronchoalveolar eosinophils from ovalbumin-sensitized and -challenged mice. *Eur J Pharmacol*, 475(1-3):129-37.
- Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, Harris NR. (2017). Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology*, 24(4):229-241.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. (1998). Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*, 111(13):1853-65.
- Fan Y, Liu K, Wang Q, Ruan Y, Ye W, Zhang Y. (2014). Exendin-4 alleviates retinal vascular leakage by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability in diabetic Goto-Kakizaki rats. *Exp Eye Res*, 127:104-16.
- Fein AM, Bernard GR, Criner GJ, et al. (1997). Treatment of severe systemic inflammatory response syndrome and sepsis with a novel bradykinin antagonist, deltibant (CP-0127). Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA*, 277:482-7

- Fernandes, A., Miller-Fleming, L., Pais, T.F. (2014). Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cell Mol Life Sci*, 71(20):3969-85.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 9(6):669-76.
- Ferrari R, Boersma E. (2013). The impact of ACE inhibition on all-cause and cardiovascular mortality in contemporary hypertension trials: a review. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 11(6):705-17.
- Ferreira AP, Rodrigues FS, Della-Pace ID, Mota BC, Oliveira SM, de Campos Velho Gewehr C, Bobinski F, de Oliveira CV, Brum JS, Oliveira MS, Furian AF, de Barros CS, dos Santos AR, Ferreira J, Figuera MR, Royes. (2014). LF.HOE-140, an antagonist of B2 receptor, protects against memory deficits and brain damage induced by moderate lateral fluid percussion injury in mice. *Psychopharmacology*, 231(9):1935-48.
- Fontaine O, Olivier S, Descovich D, Cordahi G, Vaucher E, Lesk MR. (2011). The effect of intravitreal injection of bevacizumab on retinal circulation in patients with neovascular macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(10):7400-5.
- Frank RN. (2004). Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 350(1):48-58.
- Frenette PS, Wagner DD. (1996). Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med*, 334(23):1526-9.
- Frey T, Antonetti DA. (2011). Alterations to the blood-retinal barrier in diabetes: cytokines and reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 15(5):1271-84.
- Fukuhara J, Noda K, Murata M, Namba S, Kinoshita S, Dong Z, Ando R, Lennikov A, Kanda A, Ishida S. (2013). Tissue kallikrein attenuates choroidal neovascularization via cleavage of vascular endothelial growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 54(1):274-9.
- Funatsu H, Noma H, Mimura T, Eguchi S, Hori S. (2009) Association of vitreous inflammatory factors with diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 116(1):73-9.

- Futagami S, Hiratsuka T, Shindo T, Hamamoto T, Tatsuguchi A, Nobue U, Shinji Y, Suzuki K, Kusunoki M, Tanaka S, Wada K, Miyake K, Gudis K, Tsukui T, Sakamoto C. (2008). COX-2 and CCR2 induced by CD40 ligand and MCP-1 are linked to VEGF production in endothelial cells. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 78(2):137-46.
- Gabra BH, Sirois P. (2002). Role of bradykinin B(1) receptors in diabetes-induced hyperalgesia in streptozotocin-treated mice. *Eur J Pharmacol*, 457(2-3):115-24.
- Gabra BH, Couture R, Sirois P. (2003). Functional duality of kinin receptors in pathophysiology. *Med Sci*, 19(11):1101-10.
- Gabra BH, Sirois P. (2003). Kinin B1 receptor antagonists inhibit diabetes-induced hyperalgesia in mice. *Neuropeptides*, 37(1):36-44.
- Gao G, Li Y, Zhang D, Gee S, Crosson C, Ma J. (2001). Unbalanced expression of VEGF and PEDF in ischemia-induced retinal neovascularization. *FEBS*, 489(2-3):270-6.
- Gao G, Shao C, Zhang SX, Dudley A, Fant J, Ma JX. (2003). Kallikrein-binding protein inhibits retinal neovascularization and decreases vascular leakage. *Diabetologia*, 46(5):689-98.
- Gao L, Pulido JS, Hatfield RM, Dundervill RF 3rd, McCannel CA, Shippy SA. (2007). Capillary electrophoretic assay for nitrate levels in the vitreous of proliferative diabetic retinopathy. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 847(2):300-4.
- Gardner David G, Shoback Dolores M. (2011). Greenspan's basic and clinical endocrinology (9th éd., vol1) Gastinger MJ, Singh RS, Barber AJ. (2006). Loss of cholinergic and dopaminergic amacrine cells in streptozotocin-diabetic rat and Ins2Akita-diabetic mouse retinas. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 47(7):3143-50.
- Giroix MH, Irminger JC, Lacraz G, Noll C, Calderari S, Ehses J et al. (2011). Hypercholesterolaemia, signs of islet microangiopathy and altered angiogenesis precede onset of type 2 diabetes in the Goto-Kakizaki (GK) rat. *Diabetologia*, 54: 2451–2462.

- Gobeil F Jr, Sirois P, Regoli D. (2014). Preclinical pharmacology, metabolic stability, pharmacokinetics and toxicology of the peptidic kinin B1 receptor antagonist R-954. *Peptides*, 52:82-9. doi: 10.1016/j.peptides.2013.12.009
- Gong CY, Lu B, Sheng YC, Yu ZY, Zhou JY, Ji LL. (2016). The Development of Diabetic Retinopathy in Goto-Kakizaki Rat and the Expression of Angiogenesis-Related Signals. *Chin J Physiol*, 59(2):100-8
- Gougat J, Ferrari B, Sarran L, Planchenault C, Poncelet M, Maruani J, Alonso R, Cudennec A, Croci T, Guagnini F, Urban-Szabo K, Martinolle JP, Soubrié P, Finance O, Le Fur G. (2004). SSR240612 [(2R)-2-(((3R)-3-(1,3-benzodioxol-5-yl)-3-(((6-methoxy-2-naphthyl)sulfonyl)amino]propanoyl)amino)-3-(4-[[2R,6S)-2,6-dimethylpiperidinyl]methyl]phenyl)-N-isopropyl-N-methylpropanamide hydrochloride], a new non peptide antagonist of the bradykinin B1 receptor: biochemical and pharmacological characterization. *J Pharmacol Exp Ther*, 309(2):661-9.
- Gouvernement du Canada (2015). *Diabète de type 2*. Repéré à <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies/diabete-type-2.html>
- Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, Scheppke L, Stockmann C, Johnson RS, Angle N, Cheresch DA. (2008). A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*, 456(7223):809-13.
- Greenwood MD, Ressler MJ, Audette JL, Laturus DI, Chhoun R, Teiken JM, Carlson EC. (2011). Significant retinal capillary basement membrane thickening in hyperglycemic and normoglycemic diabetic-prone (DP) BB Wistar rats. *Ultrastruct Pathol*, 35(2):97-105.
- Haasemann M, Cartaud J, Muller-Esterl W, Dunia I. (1998). Agonist-induced redistribution of bradykinin B2 receptor in caveolae. *J Cell Sci*, 111:917-928.
- Haddad Y, Couture R. (2017). Localization and Interaction between Kinin B1 Receptor and NADPH Oxidase in the Vascular System of Diabetic Rats. *Front Physiol*, 8:861.

- Haddad Y, Couture R. (2017). Kininase 1 As a Preclinical Therapeutic Target for Kinin B1 Receptor in Insulin Resistance. *Front Pharmacol*, 8:509.
- Hamann M, Rossi DJ, Marie H, Attwell D. (2002). Knocking out the glial glutamate transporter GLT-1 reduces glutamate uptake but does not affect hippocampal glutamate dynamics in early simulated ischaemia. *Eur J Neurosci*, 15(2):308-14.
- Hamilton B, Attwell, Hall CN (2010). Pericyte-mediated regulation of capillary diameter: a component of neurovascular coupling in health and disease. *Front Neuroenergetics*, 21(2): 10-3389.
- Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE. (2002). Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*, 109(8):1057-63.
- Harrison, Fauci Anthony S., Kasper Dennis L, Hauser Stephen L., Jamseson J. Larry, Loscalzo Joseph, Longo Dan L. (2006). *Principes de médecine interne* (16e éd., vol.2).
- Hartnett ME, Martiniuk D, Byfield G, Geisen P, Zeng G, Bautch VL. (2008). Neutralizing VEGF decreases tortuosity and alters endothelial cell division orientation in arterioles and veins in a rat model of ROP: relevance to plus disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49(7):3107–3114.
- Hartnett ME. (2013). *Pediatric Retina* (2^e éd., vol. 4). Philadelphia.
- Hayashi, Shuichiro; Osawa, Tokuji; Tohyama, Koujiro. (2002). Comparative observations on corneas, with special reference to bowman's layer and descemet's membrane in mammals and amphibians. *Journal of Morphology*, 254 (3): 247–58.
- Heckenlively JR, Hawes NL, Friedlander M, Nusinowitz S, Hurd R, Davisson M, Chang B. (2003). Mouse model of subretinal neovascularization with choroidal anastomosis. *Retina*, 23(4):518-22.
- Hejtmancik JF, Shiels A. (2015). Overview of the Lens. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 134:119-27.

- Herman IM, D'Amore PA. (1985). Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J Cell Biol*, 101(1):43-52
- Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO. (2014). Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res*, 42:44-84.
- Hong SH, Park HM, Ahn JY, Kim OJ, Hwang TS, Oh D, Kim NK. (2008). ACE I/D polymorphism in Korean patients with ischemic stroke and silent brain infarction. *Acta Neurol Scand*, 117(4):244-9.
- Hu DE, Fan TP. (1993). [Leu8] des-Arg9-bradykinin inhibits the angiogenic effect of bradykinin and interleukin-1 in rats. *Br J Pharmacol*, 109(1):14-7.
- Ibrahim AS, El-Remessy AB, Matragoon S, Zhang W, Patel Y, Khan S, Al-Gayyar MM, El-Shishtawy MM, Liou GI. (2011). Retinal microglial activation and inflammation induced by amadori-glycated albumin in a rat model of diabetes. *Diabetes*, 60(4):1122-33.
- Ikeda Y, Hayashi I, Kamoshita E, Yamazaki A, Endo H, Ishihara K, Yamashina S, Tsutsumi Y, Matsubara H, Majima M. (2004). Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res*, 64(15):5178-85.
- Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakano T, Miyazaki M, Kohno R, Nakagawa K, Ueno A, Sueishi K, Ishibashi T. (2006). The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and -D) expression in the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res*, 83(5):1031-40.
- Ismael MA, Talbot S, Carbonneau CL, Beauséjour CM, Couture R. (2008). Blockade of sensory abnormalities and kinin B(1) receptor expression by N-acetyl-L-cysteine and ramipril in a rat model of insulin resistance. *Eur J Pharmacol*, 589(1-3):66-72.
- Jha, M.K., Seo, M., Kim, J.H., Kim, B.G., Cho, J.Y., Suk, K. (2013). The secretome signature of reactive glial cells and its pathological implications. *Bio-phys*, 1834(11):2418-28.

- Jiang X, Yang L, Luo Y. (2015). Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr Eye Res*, 40(8):761-71.
- Jo DH, Cho CS, Kim JH, Jun HO, Kim JH. (2013). Animal models of diabetic retinopathy: doors to investigate pathogenesis and potential therapeutics. *J Biomed Sci BioMed Central*, 20(1):38.
- Jonas JB, Libondi T, Golubkina L, Spandau UH, Schlichtenbrede F, Rensch F. (2010). Combined intravitreal bevacizumab and triamcinolone in exudative age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*, 88(6):630-4.
- Jones A, Kumar S, Zhang N, Tong Z, Yang JH, Watt C, Anderson J, Amrita, Fillerup H, McCloskey M, Luo L, Yang Z, Ambati B, Marc R, Oka C, Zhang K, Fu Y. (2011). Increased expression of multifunctional serine protease, HTRA1, in retinal pigment epithelium induces polypoidal choroidal vasculopathy in mice. *Proc Natl Acad Sci*, 108(35):14578-83.
- Joussen AM, Joeres S. (2007). Benefits and limitations in vitreoretinal surgery for proliferative diabetic retinopathy and macular edema. *Dev Ophthalmol*, 39:69-87.
- Joussen AM, Doehmen S, Le ML, Koizumi K, Radetzky S, Krohne TU. (2009). TNF- α mediated apoptosis plays an important role in the development of early diabetic retinopathy and long- term histopathological alterations. *Mol Vis*, 15:1418-28.
- Ju WK, Kim KY, Neufeld AH. (2003). Increased activity of cyclooxygenase-2 signals early neurodegenerative events in the rat retina following transient ischemia. *Exp Eye Res*, 77(2):137-45.
- Kawarai M, Koss MC. (1998). Sympathetic vasoconstriction in the rat anterior choroid is mediated by α_1 - adrenoceptors. *Eur J Pharmacol*, 363:35–40.
- Kern TS, Engerman RL. (1994). Comparison of retinal lesions in alloxan- diabetic rats and galactose-fed rats. *Curr Eye Res*, 13(12):863–7.

- Kern TS, Engerman RL. (1995). Vascular lesions in diabetes are distributed non-uniformly within the retina. *Exp Eye Res*, 60:545–9.
- Kern TS, Engerman RL. (1996). A mouse model of diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol Am Med Assoc*, 114(8):986–90.
- Kern TS. (2007). Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*, 2007:95103. doi: 10.1155/2007/95103.
- Kiel JW, Shepherd AP. (1999). Autoregulation of choroidal blood flow in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 33(8):2399-410.
- Kim I, Moon SO, Park SK, Chae SW, Koh GY. (2001). Angiopoietin-1 reduces VEGF-stimulated leukocyte adhesion to endothelial cells by reducing ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expression. *Circ Res*, 89(6):477-9.
- Kim, J.H., Kim, J.H., Park, J.A., Lee, S.W., Kim, W.J., Yu, Y.S., Kim, K.W. (2006). Blood-neural barrier: intercellular communication at gliovascular interface. *J. Biochem. Mol. Biol*, 31;39(4):339-45.
- Kim JH, Kim JH, Yu YS, Min BH, Kim KW. (2010). Protective effect of clusterin on blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(3):1659-65.
- Kintsurashvili E, Duka I, Gavras I, Johns C, Farmakiotis D, Gavras H. (2001). Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 281(4):H1778–H1783
- Kita T, Clermont AC, Murugesan N, Zhou Q, Fujisawa K, Ishibashi T, Aiello LP, Feener EP. (2015). Plasma Kallikrein-Kinin System as a VEGF-Independent Mediator of Diabetic Macular Edema. *Diabetes*, 64(10):3588-99.

- Ko F, Vitale S, Chou CF, Cotch MF, Saaddine J, Friedman DS. (2012). Prevalence of non refractive visual impairment in US adults and associated risk factors, 1999-2002 and 2005-2008. *JAMA*, 308(22):2361-8.
- Kohner EM, Hamilton AM, Saunders SJ, Sutcliffe BA, Bulpitt CJ. (1975). The retinal blood flow in diabetes. *Diabetologia*, 11(1):27-33.
- Kowluru RA, Chan PS. (2007). Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*, 2007:43603.
- Kowluru RA, Kanwar M, Kennedy A. (2007). Metabolic memory phenomenon and accumulation of peroxynitrite in retinal capillaries. *Exp Diabetes Res*, 2007:21976.
- Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, Skidgel RA. (2010). Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*, 44(2):145-54.
- Kura Joanna, Newman Eric A and Chan-Ling Tailoi. (2012). Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina choroid in health disease. *Prog Retin Eye Res*, 31(5): 377–406.
- Lacoste B, Tong XK, Lahjouji K, Couture R, Hamel E. (2013). Cognitive and cerebrovascular improvements following kinin B1 receptor blockade in Alzheimer's disease mice. *J Neuroinflammation*, 10:57. doi: 10.1186/1742-2094-10-57.
- Lai AK, Lo AC. (2013). Animal models of diabetic retinopathy: summary and comparison. *J Diabetes Res*, 2013:106594. doi: 10.1155/2013/106594.
- Langmann T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol*, 81(6):1345-51.
- Lavalette S, Raoul W, Houssier M, Camelo S, Levy O, Calippe B, Jonet L, Behar-Cohen F, Chemtob S, Guillonnet X, Combadière C, Sennlaub F. (2011). Interleukin-1 β inhibition prevents choroidal neovascularization and does not exacerbate photoreceptor degeneration. *Am J Pathol*, 178(5):2416-23.

- Lawson SR, Gabra BH, Nantel F, Battistini B, Sirois P. (2005). Effects of a selective bradykinin B1 receptor antagonist on increased plasma extravasation in streptozotocin-induced diabetic rats: distinct vasculopathic profile of major key organs. *Eur J Pharmacol*, 514(1):69-78.
- Leahy JL. (2005). Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*, 36(3):197-209.
- Lee PY, Park SG, Kim EY, Lee MS, Chung SJ, Lee SC, Yu DY, Bae KH. (2010). Proteomic analysis of pancreata from mini-pigs treated with streptozotocin as a type I diabetes models. *J Microbiol Biotechnol*, 20(4):817-20.
- Leeb-Lundberg LM, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. (2005). International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev*, 57(1):27-77
- Levin Leonard, Nilsson Siv, Ver Hoeve James, Wu Samuel, Kaufman Paul, Alm Albert. (2011). Adler's physiology of the eye. (11 ed., vol.1). St-Louis, Missouri: Mosby, 876p.
- Li P, Kondo T, Numaguchi Y, Kobayashi K, Aoki M, Inoue N, Okumura K, Murohara T. (2008). Role of bradykinin, nitric oxide, and angiotensin II type 2 receptor in imidapril-induced angiogenesis. *Hypertension*, 51(2):252-8.
- Li W, Prakash R, Kelly-Cobbs AI, Ogbi S, Kozak A, El-Remessy AB, Schreihof DA, Fagan SC, Ergul A. (2010). Adaptive cerebral neovascularization in a model of type 2 diabetes: relevance to focal cerebral ischemia. *Diabetes*, 59(1):228-35.
- Linz W, Wiemer G, Gohlke P. (1995). Contribution of kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev*, 47:25–50.
- Liu G, Place AT, Chen Z, Brovkovich VM, Vogel SM, Muller WA, Skidgel RA, Malik AB, Minshall RD. (2012). ICAM-1-activated Src and eNOS signaling increase endothelial cell surface PECAM-1 adhesivity and neutrophil transmigration. *Blood*, 120(9):1942-52. doi: 10.1182/blood-2011-12-397430.

- Liu J. (1995). The Anatomy and Physiology of Direction-Selective Retinal Ganglion Cells. *The Anatomy and Physiology of Direction-Selective Retinal Ganglion Cells*.
- Liu J, Feener EP. (2013). Plasma kallikrein-kinin system and diabetic retinopathy. *Biol Chem*, 394(3):319-28. doi: 10.1515/hsz-2012-0316.
- Lorenzi M. (2007). The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes*, 61038. doi: 10.1155/2007/61038.
- Lu M, Adamis AP. (2006). Molecular biology of choroidal neovascularization. *Ophthalmol Clin North Am*, 19(3):323-34.
- Lungu C, Dias JP, França CE, Ongali B, Regoli D, Moldovan F, Couture R. (2007). Involvement of kinin B1 receptor and oxidative stress in sensory abnormalities and arterial hypertension in an experimental rat model of insulin resistance. *Neuropeptides*, 41(6):375-87.
- Luster AD. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med*, 338(7):436-45.
- Ma JX, Song Q, Hatcher HC, Crouch RK, Chao L, Chao J. (1996). Expression and cellular localization of the kallikrein-kinin system in human ocular tissues. *Exp Eye Res*, 63(1):19-26.
- Ma, W., Zhao, L., Fontainhas, A.M., Fariss, R.N., Wong, W.T. (2009). Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD. *PLoS One* 4, e7945.
- Maeda S, Matsui T, Ojima A, Takeuchi M, Yamagishi S. (2014). Sulforaphane inhibits advanced glycation end product-induced pericyte damage by reducing expression of receptor for advanced glycation end products. *Nutr Res*, 34(9):807-13.
- Mahabeer R, Naidoo S, Raidoo DM. (2000). Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis*, 15(4):325-35.

- Marceau F. (1995). Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*, 30(1):1-26.
- Marceau F, Sabourin T, Houle S, Fortin JP, Petitclerc E, Molinaro G, Adam A. (2002). Kinin receptors: functional aspects. *Int Immunopharmacol*, 2(13-14):1729-39.
- Marcic BM, Erdös EG. (2000). Protein kinase C and phosphatase inhibitors block the ability of ACE inhibitors to resensitize the receptor to bradykinin, without altering the primary effects of bradykinin. *J Pharmacol Exp Ther*, 294:605–12.
- Marcic B, Deddish PA, Skidgel RA, Erdos EG, Minshall RD, Tan F. (2000). Replacement of the transmembrane anchor in angiotensin I-converting enzyme (ACE) with a glycosylphosphatidylinositol tail affects activation of the B2 bradykinin receptor by ACE inhibitors. *J Biol Chem*, 275:16110 –16118.
- Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. (2004). Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 45(9):3330-6.
- Masland RH. (2001). The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*, 4(9):877-86.
- Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. (1996). B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*, 50(1):128-39.
- McLean PG, Ahluwalia A, Perretti M. (2000). Association between kinin B(1) receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. *J Exp Med*, 192(3):367-80.
- Midaoui AE, Talbot S, Lahjouji K, Dias JP, Fantus I, Couture R. (2015). Effects of Alpha-Lipoic Acid on Oxidative Stress and Kinin Receptor Expression in Obese Zucker Diabetic Fatty Rats. *J Diabetes Metab*, 6(6):1-7.
- Milo Ron, Phillips Rob. (2015). Cell Biology by the Numbers. 1st Edition, 358 P

- Minshall RD, Erdos EG, Vogel SM. (1997). Angiotensin I-converting enzyme inhibitors potentiate bradykinin's inotropic effects independently of blocking its inactivation. *Am J Cardiol*, 80:132A–136A.
- Mitchell P. (2011). A systematic review of the efficacy and safety outcomes of anti-VEGF agents used for treating neovascular age-related macular degeneration: comparison of ranibizumab and bevacizumab. *Curr Med Res Opin*, 27(7):1465-75. doi: 10.1185/03007995.2011.585394.
- Miyamoto K, Ogura Y, Nishiwaki H, Matsuda N, Honda Y, Kato S, Ishida H, Seino Y. (1996). Evaluation of retinal microcirculatory alterations in the Goto-Kakizaki rat. A spontaneous model of non-insulin-dependent diabetes. *Invest Ophthalmol Vi*, 37(5):898-905.
- Miyamoto K, Khosrof S, Bursell SE, Moromizato Y, Aiello LP, Ogura Y, Adamis AP. (2000). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Am J Pathol*, 156(5):1733-9.
- Mullins RF, Johnson MN, Faidley EA, Skeie JM, Huang J. (2011). Choriocapillaris vascular dropout related to density of drusen in human eyes with early age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 52(3):1606-12.
- Murakami T. (2015). Kallikrein-Kinin System: An Emerging Competitor or Collaborator for VEGF in Diabetic Macular Edema? *Diabetes*, 64(10):3350-2.
- Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Koto T, Satofuka S, Shinoda H, Noda K, Ozawa Y, Inoue M, Tsubota K, Ishida S. (2007). Suppression of choroidal neovascularization by inhibiting angiotensin-converting enzyme: minimal role of bradykinin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 48(5):2321-6.
- Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, Ueda S, Kimura YN, Hamano S, Sonoda KH, Saijo Y, Nukiwa T, Strieter RM, Ishibashi T, Kuwano M, Ono M. (2005). Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest*, 115(11):2979-91.

- Nakamura S, Morimoto N, Tsuruma K, Izuta H, Yasuda Y, Kato N, Ikeda T, Shimazawa M, Hara H. (2011). Tissue kallikrein inhibits retinal neovascularization via the cleavage of vascular endothelial growth factor-165. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 31(5):1041-8.
- Nelson CM, KM Ackerman, P O'Hayer, TJ Bailey, RA Gorsuch, DR Hyde. (2013). Le facteur alpha de nécrose tumorale est produit par la mort des neurones rétiniens et est nécessaire à la prolifération de la glie de Muller au cours de la régénération rétinienne du poisson zèbre. *J Neurosci*, 33: 6524-6539.
- Nentwich MM, Ulbig MW. (2015). Diabetic retinopathyocular complications of diabetes mellitus. *World J. Diabetes*, 6: 489-99
- Nickla Debora L and Wallman Josh. (2010). The multifunctional choroid. *Prog Retin Eye Res*, 29(2): 144-168.
- Nicoletti NF, Sénécal J, da Silva VD, Roxo MR, Ferreira NP, de Morais RLT, Pesquero JB, Campos MM, Couture R, Morrone FB. (2017). Primary Role for Kinin B1 and B2 Receptors in Glioma Proliferation. *Mol Neurobiol*, 54(10):7869-7882.
- Nieuwdorp M, van Haefen TW, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra JB, Vink H, Kastelein JJ, Stoes ES. (2006.) Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo. *Diabetes*, 55(2):480-6.
- Nilsson SF. (1996). Nitric oxide as a mediator of parasympathetic vasodilation in ocular and extraocular tissues in the rabbit. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 37:2110-2119.
- Noda K, Nakao S, Zandi S, Sun D, Hayes KC, Hafezi-Moghadam A. (2014). Retinopathy in a novel model of metabolic syndrome and type 2 diabetes: new insight on the inflammatory paradigm. *FASEB J*, 28(5):2038-46.
- Obrosova IG. (2005). Increased sorbitol pathway activity generates oxidative stress in tissue sites for diabetic complications. *Antioxid Redox Signal*, 7(11-12):1543-52.

- O'Day K. (1955). The value of the study of the comparative anatomy of the eye. *Trans Ophthalmol Soc Aust*, 15:144-6.
- Oh H, Takagi H, Takagi C, Suzuma K, Otani A, Ishida K, Matsumura M, Ogura Y, Honda Y. (1999). The potential angiogenic role of macrophages in the formation of choroidal neovascular membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 40(9):1891-8.
- Oku H, Kodama T, Sakagami K, Puro DG. (2001). Diabetes-induced disruption of gap junction pathways within the retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42(8):1915-20.
- Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngelis MM, Haider N. (2017). Animal Models of Diabetic Retinopathy. *Curr Diab Rep*, 17(10):93.
- Omri S, Behar-Cohen F, de Kozak Y, Sennlaub F, Verissimo LM, Jonet L, Savoldelli M, Omri B, Crisanti P. (2011). Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: role of PKC ζ in the Goto Kakizaki rat model. *Am J Pathol*, 179(2):942-53
- Ongali B, Campos MM, Petcu M, Rodi D, Cloutier F, Chabot JG, Thibault G, Couture R. (2004). Expression of kinin B1 receptors in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rat. *Neuroreport*, 15(16):2463-6.
- Orsenigo F, Giampietro C, Ferrari A, Corada M, Galaup A, Sigismund S, Ristagno G, Maddaluno L, Koh GY, Franco D, Kurtcuoglu V, Poulikakos D, Baluk P, McDonald D, Grazia Lampugnani M, Dejana E. (2013). Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nat Commun*, 3:1208.
- Ostenson CG, Efendic S. (2007). Islet gene expression and function in type 2 diabetes; studies in the Goto-Kakizaki rat and humans. *Diabetes Obes Metab*, 2:180-6
- Paques M, Tadayoni R, Sercombe R, Laurent P, Genevois O, Gaudric A, Vicaut E. (2003). Structural and hemodynamic analysis of the mouse retinal microcirculation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(11):4960-7.

- Parenti A, Morbidelli L, Ledda F, Granger HJ, Ziche M. (2001). The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J*, 15(8):1487-9.
- Parreiras-E-Silva LT, Reis RI, Santos GA, Pires-Oliveira M, Pesquero JB, Gomes MD, Godinho RO, Costa-Neto CM. (2014). The kinin B1 receptor regulates muscle-specific E3 ligases expression and is involved in skeletal muscle mass control. *Clin Sci*, 127(3):185-94.
- Parver LM, Auken C, Carpenter DO. (1983). Choroidal blood flow III. Reflexive control in human eyes. *Arch Ophthalmol*, 101:1604–1606.
- Parver LM. (1991). Temperature modulating action of choroidal blood flow. *Eye*, 5:181–185.
- Patel J, Iyer A, Brown L. (2009). Evaluation of the chronic complications of diabetes in a high fructose diet in rats. *Indian J Biochem Biophys*, 46(1):66-72.
- Paul Rordan-Eva, John, P. Whitcher, Seventeenth. (2008). Vaughan & Asbury's GENERAL OPHTHALMOLOGY, Edition Mc Graw Hill LANGE.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*, 565:30-8.
- Penfold PL, Liew SC, Madigan MC, Provis JM. (1997). Modulation of major histocompatibility complex class II expression in retinas with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 38(10):2125-33.
- Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*, 443(7112):700-4.
- Phipps JA, Feener EP. (2008). The kallikrein-kinin system in diabetic retinopathy: lessons for the kidney. *Kidney Int*, 73(10):1114-9.
- Phipps JA, Clermont AC, Sinha S, Chilcote TJ, Bursell SE, Feener EP. (2009). Plasma kallikrein mediates angiotensin II type 1 receptor-stimulated retinal vascular permeability. *Hypertension*, 53(2):175-81.

- Pietrovski EF, Paludo KS, Mendes DA, Guimarães Fde S, Veiga SS, Buchi Dde F, Fonseca RG, Zampronio AR, Bader M, Pesquero JB, Ferreira J, Otuki MF, Cabrini DA. (2011). B1 and B2 kinin receptor participation in hyper proliferative and inflammatory skin processes in mice. *J Dermatol Sci*, 64(1):23-30.
- Polska E, Simader C, Weigert G, Doelemeyer A, Kolodjaschna J, Scharmann O, Schmetterer L. (2007). Régulation du flux sanguin choroïdien lors de modifications combinées de la pression intra-oculaire et de la pression artérielle. *Ophthalmol Vis Sci*, 48: 3768 à 3774.
- Porreca F, Vanderah TW, Guo W, Barth M, Dodey P, Peyrou V, Luccarini JM, Junien JL, Pruneau D. (2006). Antinociceptive pharmacology of N-[[4-(4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl)phenyl]methyl]-2-[2-[[4-methoxy-2,6-dimethylphenyl)sulfonyl]methylamino]ethoxy]-N-methylacetamide, fumarate (LF22-0542), a novel nonpeptidic bradykinin B1 receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 318(1):195-205.
- Portha B, Lacraz G, Kergoat M, Homo-Delarche F, Giroix MH, Bailbe D et al. (2009). The GK rat beta-cell: a prototype for the diseased human beta-cell in type 2 diabetes? *Mol Cell Endocrinol*, 297: 73–85.
- Pouliot M, Héту S, Lahjouji K, Couture R, Vaucher E. (2011). Modulation of retinal blood flow by kinin B1 receptor in Streptozotocin-diabetic rats. *Exp Eye Res*, 92(6):482-9.
- Pouliot M, Talbot S, Sénécal J, Dotigny F, Vaucher E, Couture R. (2012). Ocular application of the kinin B1 receptor antagonist LF22-0542 inhibits retinal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-diabetic rats. *PLoS One*, 7(3):e33864.
- Prakash G, Agrawal R, Natung T. (2017). Role of Lipids in Retinal Vascular and Macular Disorders. *Indian J Clin Biochem*, 32(1):3-8.
- Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP. (2000). Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59(10):896-906.

- Pruneau D, Luccarini JM, Fouchet C, Defrêne E, Franck RM, Loillier B, Duclos H, Robert C, Cremers B, Bélichard P, Paquet JL. (1998). LF 16.0335, a novel potent and selective nonpeptide antagonist of the human bradykinin B2 receptor. *Br J Pharmacol*, 125(2):365-72
- Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Müller-Esterl W, Bhoola KD. (1997). Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology*, 36(2-3):153-60.
- Raidoo DM, Sawant S, Mahabeer R, Bhoola KD. (1999). Kinin receptors are expressed in human astrocytic tumour cells. *Immunopharmacology*, 43(2-3):255-63.
- Raymond P, Drapeau G, Raut R, Audet R, Marceau F, Ong H, Adam A. (1995). Quantification of des-Arg9-bradykinin using a chemiluminescence enzyme immunoassay: application to its kinetic profile during plasma activation. *J Immunol Method*, 180(2):247-57.
- Regoli D, Barabe J, Park WK. (1977). Receptors for bradykinin in rabbit aorta. *Can J Physiol Pharmacol*, 55:855-67
- Regoli D, Marceau F, Barabé J. (1978). De novo formation of vascular receptors for bradykinin. *Can J Physiol Pharmacol*, 5:674-7
- Regoli D, Barabé J. (1980). Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*, 32(1):1-46.
- Regoli D, Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S, Tousignant C, D'Orléans-Juste P, Devillier P. (1989). Basic pharmacology of kinins: pharmacologic receptors and other mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 247A:399-407.
- Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. (1998). Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol*, 348(1):1-10
- Regoli D, Gobeil F. (2017). Kallikrein-kinin system as the dominant mechanism to counteract hyperactive renin-angiotensin system. *Can J Physiol Pharmacol*, 95(10):1117-1124.

- Reichenbach A, Bringmann A. (2013). Nouvelles fonctions des cellules de Muller. *Glia*, 61: 651–678.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*, 20(12):570-7.
- Rob Phillips. (2015). *Cell Biology by the number*. (1^e éd., vol.2). New York.
- Robinson PR, Radeke MJ, Cote RH, Bownds MD. (1986). cGMP influences guanine nucleotide binding to frog photoreceptor G-protein. *J Biol Chem*, 261(1):313-8.
- Roy S, Sato T. (2000). Role of vascular basement membrane components in diabetic microangiopathy. *Drug News Perspect*, 13(2): p. 91–8.
- Roy S, Ha J, Trudeau K, Beglova E. (2010). Vascular basement membrane thickening in diabetic retinopathy. *Curr Eye Res*, 35(12):1045-56.
- Roy Sayon, Amin Shruti, and Roy Sumon. (2016). Retinal Fibrosis in Diabetic Retinopathy. *Exp Eye Res*, 142: 71–75.
- Ryan. SJ, Hinton. DR, Schachat. AP, Wilkinson. P. (2004). *Retina*. (6^e éd., vol.2). Mosby Inc; St. Louis, MO.
- Rübsam A, Parikh S, Fort PE. (2018). Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*, 22: 19(4).
- Rungger-Brandle, E., Messerli, J.M., Niemeyer, G., Eppenberger, H.M. (1993). Confocal microscopy and computer-assisted image reconstruction of astrocytes in the mammalian retina. *Eur. J. Neurosci*, 5, 1093e1106.
- Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM. (2000). Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 41(7):1971-80.
- Rusnak S, Vrzalova J, Sobotova M, Hecova L, Ricarova R, Topolcan O. (2015). The Measurement of Intraocular Biomarkers in Various Stages of Proliferative Diabetic

- Retinopathy Using Multiplex xMAP Technology. *J Ophthalmol*, 424783. doi: 10.1155/2015/424783.
- Sabatini RA, Guimarães PB, Fernandes L, Reis FC, Bersanetti PA, Mori MA, Navarro A, Hilzendege AM, Santos EL, Andrade MC, Chagas JR, Pesquero JL, Casarini DE, Bader M, Carmona AK, Pesquero JB. (2008). ACE activity is modulated by kinin B2 receptor. *Hypertension*, 51(3):689-95.
- Sakurai E, Anand A, Ambati BK, van Rooijen N, Ambati J. (2003). Macrophage depletion inhibits experimental choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 44(8):3578-85.
- Saltiel AR, Kahn CR. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(6865):799-806
- Sawano A, Iwai S, Sakurai Y, Ito M, Shitara K, Nakahata T, Shibuya M. (2001). Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans. *Blood*, 97(3):785-91.
- Schanstra JP, Bataillé E, Marin Castaño ME, Barascud Y, Hirtz C, Pesquero JB, Pecher C, Gauthier F, Girolami JP, Bascands JL. (1998). The B1-agonist [des-Arg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappaB and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J Clin Invest*, 101(10):2080-91.
- Schanstra JP, Marin-Castaño ME, Alric C, Pesquero JB, Claire M, Girolami JP, Bascands JL. (1999). Homologous and heterologous induction of the human bradykinin B1-receptor and B1-receptor localisation along the rat nephron. *Immunopharmacology*, 45(1-3):29-34.
- Schmaier AH, McCrae KR. (2007). The plasma kallikrein-kinin system: its evolution from contact activation. *J Thromb Haemost*, 5(12):2323-9.

- Schmid MC, Varner JA. (2010). Myeloid cells in the tumor microenvironment: modulation of tumor angiogenesis and tumor inflammation. *J Oncol*, 201026. doi: 10.1155/2010/201026.
- Sennlaub F, Valamanesh F, Vazquez-Tello A, El-Asrar AM, Checchin D, Brault S, Gobeil F, Beauchamp MH, Mwaikambo B, Courtois Y, Geboes K, Varma DR, Lachapelle P, Ong H, Behar-Cohen F, Chemtob S. (2003). Cyclooxygenase-2 in human and experimental ischemic proliferative retinopathy. *Circulation*, 108(2):198-204.
- Sharma JN, Narayanan P. (2014). The kallikrein-kinin pathways in hypertension and diabetes. *Prog Drug Res*, 69:15-36.
- Sheridan CM, Pate S, Hiscott P, Wong D, Pattwell DM, Kent D. (2009). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha in human choroidal neovascular membranes. *Arch Clin Exp Ophthalmol*, 247(10):1361-7.
- Shigematsu S, Ishida S, Gute DC, Korthuis RJ. (2002). Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283(6):H2676-86.
- Sigurdsson ST, Paulson OB, Høj Nielsen A, Strandgaard S. (2014). Bradykinin antagonist counteracts the acute effect of both angiotensin-converting enzyme inhibition and of angiotensin receptor blockade on the lower limit of autoregulation of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab*, 34(3):467-71.
- Simard B, Gabra BH, Sirois P. (2002). Inhibitory effect of a novel bradykinin B1 receptor antagonist, R-954, on enhanced vascular permeability in type 1 diabetic mice. *Can J Physiol Pharmacol*, 80(12):1203-7.
- Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M. (2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier-implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol*, 190724. doi: 10.1155/2010/190724.

- Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. (2014). Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*, 18(1):1-14.
- Shahar J, Avery RL, Heilweil G, Barak A, Zemel E, Lewis GP, Johnson PT, Fisher SK, Perlman I, Loewenstein A. (2006). Electrophysiologic and retinal penetration studies following intravitreal injection of bevacizumab (Avastin). *Retina*, 26(3):262-9.
- Shumway CL, Wade M. (2018). Anatomy, Head, Eye, Muscles, Medial Rectus. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
- Spraul CW, Lang GE, Grossniklaus HE, Lang GK. (1998). Choroidal blood flow in AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(11):2201-2.
- Srienc AI, Kurth-Nelson ZL, Newman EA. (2010). Imaging retinal blood flow with laser speckle flowmetry. *Front Neuroenergetics*, 2. pii: 128. doi: 10.3389/fnene.2010.00128.
- Steinberg SF. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*, 88(4):1341-78.
- Stern J, Temple S. 2015 Retinal pigment epithelial cell proliferation. *Exp Biol Med* 240(8):1079-86.
- Stewart JM, Gera L, Chan DC, Whalley ET, Hanson WL, Zuzack JS. (1997). Potent, long-acting, orally-active bradykinin antagonists for a wide range of applications. *Immunopharmacology*, 36(2-3):167-72.
- Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, Gardiner TA, Lyons TJ, Hammes HP, Simó R, Lois N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 51:156-86.
- Sun Y, Smith LEH. (2018). Retinal Vasculature in Development and Diseases. *Rev Vis Sci*, 4:101-122.
- Talbot S, Théberge-Turmel P, Liazoghli D, Sénécal J, Gaudreau P, Couture R. (2009). Cellular localization of kinin B1 receptor in the spinal cord of streptozotocin-diabetic rats with a

- fluorescent [Nalpha-Bodipy]-des-Arg9-bradykinin. *J Neuroinflammation*, 6:11. doi: 10.1186/1742-2094-6-11.
- Tang J, Mohr S, Du YD, Kern TS. (2003). Distribution non uniforme des lésions et des anomalies biochimiques dans la rétine des humains diabétiques. *Curr eye res*, 27: 7-13.
- Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. (2013). Pathophysiology of diabetic retinopathy. *Ophthalmol*, 343560. doi: 10.1155/2013/343560.
- Thuringer D, Maulon L, Frelin C. (2002). Rapid transactivation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR/Flk-1 by the bradykinin B2 receptor contributes to endothelial nitric-oxide synthase activation in cardiac capillary endothelial cells. *J Biol Chem*, 277(3):2028-32.
- Tidjane N, Gaboury L, Couture R. (2016). Cellular localisation of the kinin B1R in the pancreas of streptozotocin-treated rat and the anti-diabetic effect of the antagonist SSR240612. *Biol Chem*, 397(4):323-36. doi: 10.1515/hsz-2015-0230.
- Tong JP1, Yao YF. (2006). Contribution of VEGF and PEDF to choroidal angiogenesis: a need for balanced expressions. *Clin Biochem*, 39(3):267-76.
- Tschöpe C, Schultheiss HP, Walther T. (2002). Multiple interactions between the renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems: role of ACE inhibition and AT1 receptor blockade. *J Cardiovasc Pharmacol*, 39(4):478-87.
- Van Lookeren Campagne M, LeCouter J, Yaspan BL, Ye W. (2014). Mechanisms of age-related macular degeneration and therapeutic opportunities. *J Pathol*, 232(2):151-64.
- Van der Pol CB, Chakraborty S, Gao J, Nguyen T, Torres C, Glikstein R. (2014). Imaging anatomy and pathology of extraocular muscles in adults. *Can Assoc Radiol J*, 65(4):366-71.
- Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*, 51:1-40.

- Vempati P, Popel AS, Mac Gabhann F. (2014). Extracellular regulation of VEGF: isoforms, proteolysis, and vascular patterning. *Cytokine Growth Factor Rev*, 25(1):1-19.
- Vincent JA, Mohr S. (2007). Inhibition of caspase-1/interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia. *Diabetes*, 56(1):224-30.
- Wahl M, Görlach C, Hortobágyi T, Benyó Z. (1999). Effects of bradykinin in the cerebral circulation. *Acta Physiol Hung*, 86(2):155-60.
- Walshe TE, Dole VS, Maharaj AS, Patten IS, Wagner DD, D'Amore PA. (2009). Inhibition of VEGF or TGF- β signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(8):1185-92.
- Wan J, Goldman D. (2016). Régénération de la rétine chez le poisson zèbre. *Opin Genet Dev*, 40: 41-47.
- Wang GL, Semenza GL. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 270(3):1230-7.
- Wang DZ, Song Q, Chen LM, Chao L, Chao J. (1996). Expression and cellular localization of tissue kallikrein-kinin system in human adrenal gland. *Am J Physiol*, 271(3 Pt 2):F709-16.
- Wang Z, Yadav AS, Leskova W, Harris NR. (2010). Attenuation of streptozotocin-induced microvascular changes in the mouse retina with the endothelin receptor A antagonist atrasentan. *Exp Eye Res*, 91(5):670-5.
- Webb JG. (2011). The kallikrein/kinin system in ocular function. *J Ocul Pharmacol Ther*, 27(6):539-43.
- Weerasekera LY, Balmer LA, Ram R, Morahan G. (2015). Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 56(6):3721-30. doi: 10.1167/iovs.14-16289.

- Whalley ET, Figueroa CD, Gera L, Bhoola KD. (2012). Discovery and therapeutic potential of kinin receptor antagonists. *Expert Opin Drug Discov*, 7(12):1129-48.
- Wijesekara I, Kim SK. (2010). Angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitors from marine resources: prospects in the pharmaceutical industry. *Drugs*, 8(4):1080-93.
- Wilkinson-Berka JL. (2006). Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol*, 8(5-6):752-65.
- Willermain F, Libert S, Motulsky E, Salik D, Caspers L, Perret J, Delporte C. (2014). Origins and consequences of hyperosmolar stress in retinal pigmented epithelial cells. *Front Physiol*, 5:199.
- Williams B, Gallacher B, Patel H, Orme C. (1997). Glucose-induced protein kinase C activation regulates vascular permeability factor mRNA expression and peptide production by human vascular smooth muscle cells in vitro. *Diabetes*, 46(9):1497-503.
- Wirotko B, Wong TY, Simó R. (2008). Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. *Prog Retin Eye Res*, 27(6):608-21.
- Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J, et al. (1991). Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. *Br J Pharmacol*, 102(3):774-7.
- Xie P, Kamei M, Suzuki M, Matsumura N, Nishida K, Sakimoto S, Sakaguchi H, Nishida K. (2011). Suppression and regression of choroidal neovascularization in mice by a novel CCR2 antagonist, INCB3344. *PLoS One*, 6(12):e28933.
- World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. (2003). Report of a WHO Consultation. Geneva.
- Xu W, Grunwald JE, Metelitsina TI, DuPont JC, Ying GS, Martin ER, Dunaief JL, Brucker AJ. (2010). Association of risk factors for choroidal neo-vascularization in age-related

- macular degeneration with decreased foveolar choroidal circulation. *Am J Ophthalmol*, 150:40–47.
- Yi X, Ogata N, Komada M, Yamamoto C, Takahashi K, Omori K, Uyama M. (1997). Vascular endothelial growth factor expression in choroidal neovascularization in rats. *Arch Clin Exp Ophthalmol*, 235(5):313-9.
- Zachariah S et al. Community Eye Health. (2015). The Scottish Diabetic Retinopathy Screening programme. *Community Eye Health*, 28(92):s22-3.
- Zachary, I. (2001). Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280. C1375-1386.
- Zhang C, Wang H, Nie J, Wang F. (2014). Protective factors in diabetic retinopathy: focus on blood-retinal barrier. *Discov Med*, 18(98):105-12.
- Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, Kern TS, Ball S, Berkowitz BA. (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*, 50(9):1987-1996.
- Zou Y, Xu X, Chiou GC. (2006). Effect of interleukin-1 blockers, CK112, and CK116 on rat choroidal neovascularization in vivo and endothelial cell cultures in vitro. *J Ocul Pharmacol Ther*, 22(1):19-25.